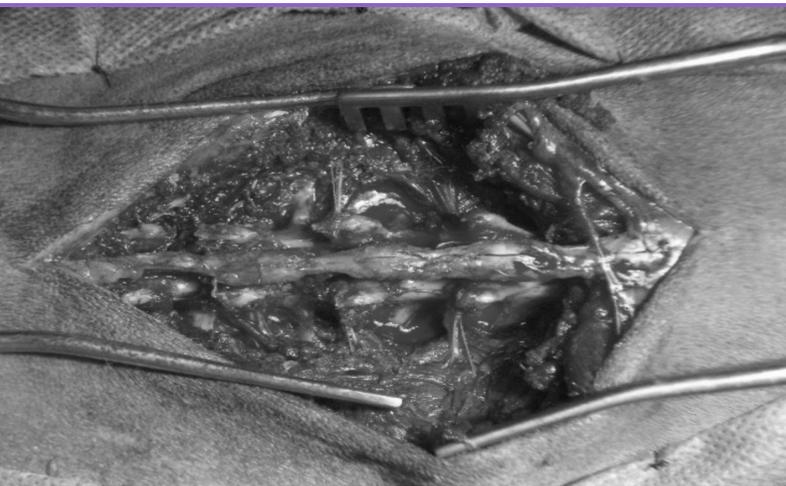


ANALECTA VETERINARIA



Publicación de la
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Volumen 35 nº 1 año 2015



Autoridades

Decano

Dr. Claudio Barbeito

Vicedecano

Dr. Miguel Petruccelli

Secretaria de Asuntos Académicos

Dra. Vanina Cambiaggi

Secretario de Posgrado

Dr. Luzbel de la Sota

Secretario de Ciencia y Técnica

Dr. Enrique Portiansky

Secretaria de Gestión de Calidad

Dra. Cecilia di Lorenzo

Secretaria de Extensión

Méd. Vet. Elena del Barrio

Secretaria de Asuntos Estudiantiles

Méd. Vet. Verano Gómez

Prosecretaría Relaciones Institucionales

Ms. Sci. Julio Copes

Coordinador Académico de Campos Experimentales

Méd. Vet. Hugo Marcantoni

ANALECTA VETERINARIA

Editor Responsable

Dr. Claudio Barbeito

Editor Asociado

Dr. Enrique Portiansky

Director

Dr. Nestor Stanchi

Coordinador Editorial

Dr. Julio Idiart

Secretaria de Redacción

Dra. Mónica Diessler

Clasificada nivel 1 (superior de excelencia) por
CAICYT-CONICET

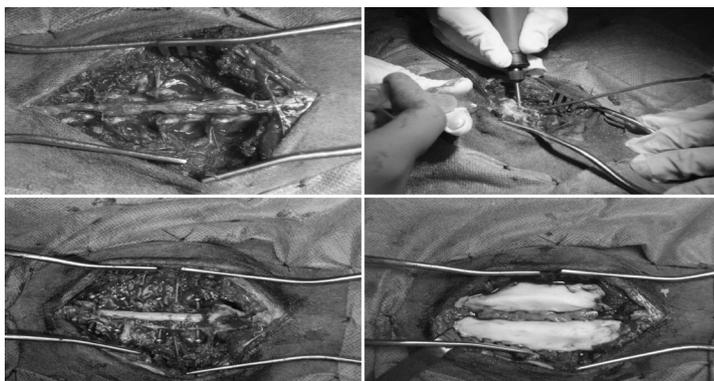


Foto de tapa: La figura muestra los pasos sucesivos para abordar la columna vertebral de un canino y remover un disco intervertebral extruido entre las vértebras T12 y L2. Delgado Stagnares JJ.

La revista ANALECTA VETERINARIA es una publicación semestral de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Está destinada a la difusión de trabajos científicos en el campo de las Ciencias Veterinarias, generados en esta Unidad Académica y en otras instituciones. Asimismo, refleja las actividades académicas de postgrado y de extensión que se desarrollan en esta Casa de Estudio.

The Journal ANALECTA VETERINARIA is a biannual publication of the College of Veterinary Sciences of the National University of La Plata, Argentina. It is dedicated to the diffusion of scientific reports in the field of the Veterinary Sciences, generated in this and in other institutions. Also, it reflect the academic activities of graduate school and of extension that they are developed in this College.

ANALECTA

Pronunciación: «a-n&l-'ek-t&

Etimología: Latin Moderno *analecta*, del Griego *analekta*, plural neutro de *analektos*, verbo de *analegein* recolectar, de *ana-* + *legein* reunir: selección miscelánea de pasajes escritos, cartas.

ISSN 0365514-8 Versión Impresa

ISSN 1514-2590 Versión Electrónica

<http://www.fcv.unlp.edu.ar/analecta/analecta.html>

ISSN 1666295-4 Versión CD-ROM

Registro Propiedad Intelectual 77383

Dirección postal: 60 y 118 (B1900AVW)

La Plata, Buenos Aires, ARGENTINA

Comité Editorial

Dra. María Barrandeguy
Instituto de Virología, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Castelar, Argentina

Dr. Carlos Campero
Ex Investigador del INTA-Balcarce, Académico Correspondiente, Argentina

Dr. Rodolfo Cantet
Mejoramiento Genético Animal, Departamento de Producción Animal, Universidad de Buenos Aires, Argentina

Dra. Cecilia Furnus
Instituto de Genética Veterinaria "Ing. Fernando N Dulout", Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina

Dr. Mauricio Giuliudori
Fisiología y Patología Médica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina

Dr. Carlos Lanusse
Fisiología y Farmacología Veterinaria, Depto. de Fisiopatología, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina

Dr. Antonio Javier Masot Gómez-Landero
Anatomía y Anatomía Patológica Comparada, Departamento de Medicina Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Extremadura, España

Dr. Martí Pumarola i Batle
Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Barcelona, España

Dr. Francisco Reynaldi
Micológia Médica e Industrial, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina

Revisor del idioma inglés

Dr. Pablo Martino
Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires

Evaluadores de trabajos de ANALECTA VETERINARIA

ANALECTA VETERINARIA convoca para la evaluación de sus artículos a reconocidos profesionales con amplia trayectoria en las diferentes disciplinas que contemplan las Ciencias Veterinarias.

Todos los trabajos publicados en ANALECTA VETERINARIA son sometidos a revisores externos.

El Editor se reserva el derecho de editar los artículos para clarificarlos y modificarles el formato para adecuarlos al estilo de ANALECTA VETERINARIA.

All articles published in ANALECTA VETERINARIA are submitted to external scientific reviewers.

The Editor reserves the right to edit articles for clarity and to modify the format to fit the publication style of ANALECTA VETERINARIA

Impreso en papel libre de ácido Printed in acid-free paper
Impreso en Argentina Printed in Argentina

Diseño
Nestor Oscar Stanchi



Citación de la versión electrónica: La citación de los artículos aparecidos en la versión electrónica de ANALECTA VETERINARIA (VE) debería seguirse según el siguiente ejemplo:

Costa E.F. y col. Alteraciones en la diferenciación y proliferación celular cutánea en bovinos, inducidas por Hipervitaminosis D de origen vegetal. *Analecta vet (VE)* 1998; 18,1/2: 7-13 (7 pantallas). Recuperable de www.fcv.unlp.edu.ar

ANALECTA VETERINARIA está indizada en el Índice Latinoamericano de Revistas Científicas LATINDEX (www.latindex.unam.mx), Ulrich's International Periodicals Directory (www.ulrichsweb.com) Zoological Records (www.biosis.org.uk/products_services/zrss.html) BIOSIS (<http://www.biosis.org>) Infocyt <http://www.redhucyt.oas.org/infocyt/> Directory of Open Access Journals <http://www.doaj.org/>

Las opiniones expresadas por los autores que contribuyen a esta revista no reflejan necesariamente las opiniones de este medio, ni de las entidades que la auspician o de las instituciones a que pertenecen los autores.

Queda prohibida la reproducción total o parcial por cualquier metodología del material impreso en esta revista sin el consentimiento expreso del Editor. Está autorizada la reproducción con fines académicos o docentes mencionando la fuente. El uso de nombres comerciales está destinado únicamente para la identificación y no implica el respaldo directo o indirecto de los Ministerios de la Nación Argentina ni de los países respectivos de donde provengan los trabajos. Tampoco se garantizan ni respaldan los productos promocionados en los avisos de publicidad.

Acceso Electrónico a ANALECTA VETERINARIA

Si tiene acceso a INTERNET, puede recuperar la revista electrónicamente y en forma gratuita accediendo a la página en la Web

www.fcv.unlp.edu.ar/analecta/analecta.html

Los números de la revista a partir del Volumen 18 están disponibles en formato de archivo: pdf (Portable Document File-Adobe Acrobat Reader®) y pueden imprimirse en cualquier impresora que permita diferenciar escala de grises o colores. Se recomienda que la misma posea un resolución mínima de 600 x 600 dpi.

Para más información sobre cómo recibir ANALECTA VETERINARIA electrónicamente, enviar un e-mail a la dirección: analecta@fcv.unlp.edu.ar

ANALECTA VETERINARIA Vol 35 n° 1, 2015

Artículos de Investigación/Research articles

Factores de virulencia de cepas de *Enterococcus* aisladas de aves silvestres y de corral en la Patagonia

Virulence Factors of Enterococcus Strains Isolated from Wild Birds and Poultry in Patagonia 5-12
Ledesma P, Parada RB, Vallejo M, Marguet ER

Evaluación de un producto bactericida aplicado por micronebulización

Evaluation of a Bactericidal Product Applied by Micronebulization 13-16
Linares LH, Guirin G, Stambullian J, Brusa V, de la Torre JH, Ortega EE, Copes J, Leotta GA

Congelación de semen porcino: resultados y avances en la técnica

Boar Semen Cryopreservation: Results and Advances in the Technique 17-25
Williams S, Fernández V, Gavazza M, Marmunti M, Zeinstege P, Prenna G

Revisiones/Reviews

Diagnóstico de leptospirosis mediante técnicas moleculares: ventajas y limitaciones en Medicina Veterinaria

Diagnosis of leptospirosis by molecular techniques: advantages and limitations in veterinary medicine 26-38
Martin PL, Arauz MS, Stanchi NO

Descripciones de casos

La tomografía axial computarizada como herramienta para el diagnóstico y la planificación quirúrgica de la compresión medular

Computed Tomography as a Tool for Diagnosis and Surgical Planning of Spinal Cord Compression 39-44
Delgado Stagnares JJ, Portiansky EL, Sánchez HL

Factores de virulencia de cepas de *Enterococcus* aisladas de aves silvestres y de corral en la Patagonia

Virulence Factors of *Enterococcus* Strains Isolated from Wild Birds and Poultry in Patagonia

Ledesma P¹, Parada RB², Vallejo M², Marguet ER^{2*}

¹Cátedra de Química Orgánica; ²Cátedra de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Naturales, Sede Trelew, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco (UNPSJB). Roca 115, (9100) Trelew, Argentina. *Autor correspondiente. Correo electrónico del autor: emarguet@yahoo.com.ar

Resumen: En este estudio se analizaron la frecuencia y la distribución de la resistencia a vancomicina y de factores de virulencia en cepas del género *Enterococcus* aisladas de muestras de materia fecal de aves silvestres y aves de corral. Un total de 128 aislamientos de enterococos fueron recuperados utilizando medios de cultivo selectivos a partir de 250 muestras de materia fecal. Dentro de las cepas que exhibieron al menos uno de los factores de virulencia estudiados, *Enterococcus faecalis* fue la especie más frecuentemente detectada (30 cepas), seguida por *E. faecium* (23 cepas), *E. durans/hirae* (3 cepas) y *E. avium* (1 cepa). Al evaluar la presencia de factores de virulencia se encontraron 16 cepas β -hemolíticas, mientras que 47 cepas exhibieron actividad gelatinasa. Mediante el uso de métodos estándares se detectaron 17 cepas resistentes a vancomicina. Sin embargo, la presencia de los genes *vanA*, *vanB* y *vanC* no pudo ser confirmada mediante técnicas de PCR. Estos datos sugieren que las aves silvestres, así como las aves de corral, tienen la posibilidad de dispersar en el ambiente cepas de *Enterococcus* que albergan factores de virulencia, con potencial de transferir estos factores tanto a otros animales como a seres humanos.

Palabras clave: resistencia a vancomicina, factores de virulencia, *Enterococcus*, aves silvestres, aves de corral.

Abstract: In this study, the frequency and distribution of vancomycin resistance and virulence factors in *Enterococcus* strains isolated from faecal samples of wild birds and poultry were analysed. A total of 128 enterococci isolates were recovered using selective culture media from 250 faecal samples. Within the strains that displayed at least one of the studied virulence factors, *Enterococcus faecalis* was the most prevalent detected species (30 isolates), followed by *E. faecium* (23 isolates), *E. durans/hirae* (3 isolates) and *E. avium* (1 isolate). Screening of virulence factors resulted in 16 β -hemolytic strains, while 47 strains exhibited gelatinase activity. Vancomycin resistance was detected in 17 strains using standard method for clinical samples. However, the presence of *vanA*, *vanB* and *vanC* genes could not be confirmed by PCR techniques. The data shown suggest that wild birds and poultry have the potential to disseminate in the environment *Enterococcus* strains that harbour virulent traits, which in turn might be transferred either to other animals or to humans.

Key words: vancomycin resistance, virulence factors, *Enterococcus*, wild birds, poultry.

Introducción

Los enterococos son microorganismos ubicuos y comprenden una parte de la microbiota intestinal normal de la mayoría de los mamíferos y aves.

Su presencia en alimentos puede resultar perjudicial debido a que son responsables del deterioro de carne, cerveza, jugo de frutas y derivados lácteos. Sin embargo, bajo condiciones controladas, como ocurre en los procesos de fermentación de alimentos, se los incluye con el propósito de mejorar la calidad de los productos. En los últimos años la producción de bacteriocinas ha sido investigada con profundidad en este género, lo que ha permitido seleccionar cepas para incluirlas como probióticos en alimentos y suplementos dietarios.

En contraste con estas características positivas, los enterococos son reconocidos como importantes patógenos nosocomiales y están dentro de los organismos más prevalentes en infecciones hospitalarias (European Centre for Disease Prevention and Control 2011; Fisher y Phillips 2009; Kayser 2003). En este sentido, de las 54 especies incluidas en el género *Enterococcus*, las infecciones en seres humanos se deben fundamentalmente a dos especies, *E. faecalis* y *E. faecium* (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, Sharifi *et al* 2012). Sin embargo, otras especies, incluyendo *E. hirae* y *E. durans* se han identificado ocasionalmente en los aislamientos de origen clínico (Fisher y Phillips 2009).

Además de su reconocida capacidad para adquirir resistencia a antibióticos, los enterococos desarrollan, gracias al intercambio de información genética a través de elementos genéticos móviles, características que aumentan su virulencia. Dentro de estas características podemos mencionar: la adherencia a tejidos del huésped, la invasión y formación de abscesos, la modulación de la respuesta inflamatoria, la secreción de productos tóxicos y la síntesis de enzimas hidrolíticas (Werner *et al* 2013).

No existe un único agente responsable de su virulencia como ocurre en otros microorganismos, sino que pueden ser varios los factores que juegan un papel en su patogénesis, siendo la mayoría de los descritos hasta ahora productos de secreción, como la citolisina y la gelatinasa, o factores de adhesión como la sustancia de agregación (*Agg*) y la proteína de superficie de los enterococos (*Esp*).

Debido a su alta tolerancia al calor y capacidad de supervivencia bajo condiciones ambientales adversas, se han aislado cepas de *Enterococcus* potencialmente patógenas de vegetación acuática y terrestre, aguas superficiales, efluentes cloacales, arenas y sedimentos costeros, suelos terrestres y materia fecal de mamíferos y aves (Byappanahalli *et*

al 2012). La resistencia a antimicrobianos en bacterias del ambiente es una preocupación en salud pública debido a la transferencia de organismos virulentos y genes de virulencia a los humanos a través de la cadena alimentaria.

La fauna silvestre, y en particular las aves, pueden considerarse importantes dispersores de microorganismos patógenos y sus determinantes genéticos, debido a su habilidad para trasladarse a grandes distancias. Esta característica y el frecuente contacto con los núcleos urbanos llevan a considerar a las poblaciones de aves como reservorios de *Enterococcus* patógenos, de potencial impacto sanitario tanto para animales como para seres humanos.

En nuestro país existen numerosos estudios orientados a la caracterización de *Enterococcus* de origen nosocomial y en menor medida relacionados con la presencia de este género en efluentes cloacales. No existen estudios epidemiológicos vinculados a la caracterización y evaluación de *Enterococcus* aislados de aves silvestres.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el potencial de las aves de la comarca Valle Inferior del Río Chubut (VIRCh) – Península Valdés como posible reservorio de cepas de *Enterococcus* portadoras de factores de virulencia.

Materiales y métodos

Área de muestreo

Se tomaron muestras en la región geográfica denominada Comarca VIRCh -Valdés - provincia del Chubut, desde marzo a noviembre de 2012. En la ciudad de Trelew se recolectaron muestras en el área recreativa Laguna Cacique Chiquichano, así como en áreas residenciales y rurales de la ciudad, y en tres establecimientos avícolas. En cuanto a las muestras recolectadas en la ciudad de Rawson, estas provinieron de la zona costera de la misma, denominada Playa Unión. Solamente 6 muestras provinieron del Área Natural Protegida Península de Valdés. Igual cantidad de muestras se recolectaron en el área rural de la ciudad de Gaiman (Tabla 1).

Toma de muestras

Las muestras consistieron en hisopados fecales de aves, tanto de corral como silvestres. Fueron conservadas en medio de transporte Stuart (Merck, Alemania) a 4 °C hasta el momento de su procesamiento.

Aislamiento de enterococos

Las muestras se sembraron en caldo púrpura de bromocresol-azida (Merck, Alemania). Luego de 24 h de incubación a 37 °C los cultivos se repicaron a agar

Tabla 1. Especies de aves, localidades y cantidad de muestras recolectadas y cepas aisladas.

| Nombre científico | Nombre vulgar | Cantidad de muestras recolectadas | Cantidad de cepas aisladas | Localidad |
|--------------------------------------|-------------------|-----------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|
| <i>Chloephaga picta</i> | Cauquén | 4 | 3 | Área rural (Trelew) |
| <i>Columba livia</i> | Paloma | 13 | 7 | Área residencial (Trelew) |
| <i>Columba livia</i> | Paloma doméstica | 22 | 16 | Laguna Caci que Chiquichano (Trelew) |
| <i>Gallus gallus</i> | Gallina | 10 | 1 | Establecimiento 1 (Trelew) |
| <i>Gallus gallus</i> | Gallina | 27 | 18 | Establecimiento 2 (Treorcky) |
| <i>Gallus gallus</i> | Gallina | 8 | 4 | Establecimiento 3 (Trelew) |
| <i>Mimus saturninus</i> | Calandria | 8 | 1 | Área rural (Trelew) |
| <i>Mimus saturninus</i> | Calandria | 20 | 13 | Playa Unión (Rawson) |
| <i>Anas versicolor</i> | Pato capuchino | 38 | 21 | Laguna Caci que Chiquichano (Trelew) |
| <i>Anas platyrhynchos domesticus</i> | Pato común | 6 | 2 | Área rural (Gaiman) |
| <i>Rhea pennata</i> | Choique | 6 | 2 | Península de Valdés |
| <i>Zenaida auriculata</i> | Torcaza común | 2 | 1 | Área rural (Trelew) |
| <i>Phalacrocorax atriceps</i> | Cormorán imperial | 5 | 2 | Isla Escondida |
| <i>Passer domesticus</i> | Gorrion | 27 | 14 | Playa Unión (Rawson) |
| <i>Turdus falcklandii</i> | Zorzal patagónico | 2 | 1 | Área rural (Trelew) |
| <i>Vanellus chilensis</i> | Tero | 6 | 4 | Área rural (Trelew) |
| <i>Vanellus chilensis</i> | Tero | 3 | 1 | Laguna Caci que Chiquichano (Trelew) |
| <i>Larus dominicanus</i> | Gaviota cocinera | 43 | 17 | Playa Unión (Rawson) |
| Total de muestras | | 250 | 128 | |

bilis esculina (Merck, Alemania), suplementado con ácido nalidixico (40 µg/ml) y nistatina (20 µg/ml). Todas las muestras se incubaron a 37 °C durante 24-48 h.

Identificación preliminar

Las colonias obtenidas en los aislamientos se seleccionaron en función de la coloración de Gram, la morfología celular, las pruebas de la catalasa y la oxidasa, el crecimiento a 45 °C, a pH 9,6, la hidrólisis de la esculina en presencia de sales biliares (40 %) y la actividad de pirrolidónil aminopeptidasa (PYR) y leucina-aminopeptidasa (LAP).

Las distintas especies del género *Enterococcus* se identificaron mediante la fermentación de azúcares según el esquema de Manero y Blanch (1999).

Actividad de la gelatinasa

Para la prueba de la gelatinasa se utilizó una prueba propuesta por Kanemitsu *et al* (2001). Para tal fin se suplementó el agar tripticasa soja (DIFCO, EE.UU.) con 0,8 % de gelatina. Las placas se incubaron durante 48 h a 37 °C y se revelaron con una solución de ácido tricloroacético al 20 %. Las zonas claras alrededor de las cepas se consideraron como positivas.

Actividad hemolítica

La producción de hemolisinas de las cepas

aisladas se evaluaron en agar cerebro-corazón (BHI) (Biokar, Francia) suplementado con sangre desfibrinada de conejo al 5 % luego de una incubación a 37 °C durante 48 h. Los resultados se interpretaron como positivos cuando se observó un halo de hemólisis completo alrededor de las colonias (β -hemólisis).

Selección de cepas potencialmente resistentes a vancomicina

Para la búsqueda de microorganismos con potencial resistencia se utilizó el agar tripticasa soja suplementado con vancomicina (6 µg/ml) según las recomendaciones de Domig *et al* (2003). Todas las cepas que exhibieron desarrollo durante este ensayo se enriquecieron en caldo BHI sin vancomicina y se repicaron a placas chromID VRE (Biomérieux, Francia).

En todas las cepas que exhibieron desarrollo durante este ensayo se determinó su concentración inhibitoria mínima para la vancomicina mediante el método de las diluciones seriadas, según las recomendaciones del *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, Wayne, EE.UU. (2007).

Purificación de ADN

Luego de una incubación a 37 °C durante 12 h en caldo de Man, Rogosa & Sharp (MRS) (Biokar, Francia), las cepas de enterococos se centrifugaron a 12.000 g durante 5 min y el ADN se extrajo utilizando

un equipo comercial de purificación Wizard Genomics, Promega (Madison, Wisconsin, EE.UU.).

Determinación de la presencia de los genes *vanA*, *vanB* y *vanC*

Los cebadores y protocolos utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de los genes *vanA* y *vanC-1* fueron los descritos por Kariyama *et al* (2000), mientras que en el caso de *vanB* se utilizó el cebador descrito por Elsayed *et al* (2001) (Tabla 2). La reacción se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler® (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). La electroforesis de los productos de la amplificación genética se realizó en gel de agarosa al 1,5 %, a 70 V durante 1 h en buffer TAE (Tris, ácido acético, EDTA, pH 8). Luego de finalizada la corrida, el gel se colocó durante 20 min en una solución de buffer TAE y bromuro de etidio de 0,5 µg/ml; posteriormente se lo visualizó con luz UV en un transiluminador, se fotografió y se archivó.

Resultados

Se procesaron 250 muestras de materia fecal proveniente de aves silvestres y de corral del VIRCH y de la zona costera de la Provincia del Chubut. Se aislaron un total de 128 cepas, de las cuales 57 exhibieron algunos de los factores de virulencia en estudio. La mayor prevalencia de los factores de virulencia estudiados corresponde a la actividad gelatinasa, detectada en 47 cepas (82 %), mientras que 16 (28 %) exhibieron actividad β-hemolítica.

Mediante la técnica de Domig *et al* (2003) se seleccionaron 17 cepas potencialmente resistentes a la vancomicina sin embargo, cuando se realizó la confirmación mediante la determinación de concentración inhibitoria mínima (CIM), 15 resultaron sensibles a la vancomicina (≤ 4 µg/ml) y sólo 2 presentaron una resistencia intermedia (8-16 µg/ml), de acuerdo con los parámetros establecidos por el *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, Wayne, EE.UU. (2007) (Tabla 3).

Tabla 2. Cebadores empleados para la reacción de PCR.

| Cebador | Tamaño del producto de amplificación (pb) | Secuencia | Referencia |
|---------|---|---|----------------------------|
| vanA | 1030 | CATGAATAGAATAAAAGTTGCAATA CCCCTTTAACGCTAATACGATCAA | Kariyama <i>et al</i> 2000 |
| vanB | 536 | AAGCTATGCAAGAAGCCATG CCGACAATCAAATCATCCTC | Elsayed <i>et al</i> 2001 |
| vanC1 | 822 | GGTATCAAGGAAACCTC CTTCGCCATCATAGCT | Kariyama <i>et al</i> 2000 |

Tabla 3. Concentración inhibitoria mínima para vancomicina.

| Nº de orden | Origen | Identificación | CIM (µg/ml) |
|-------------|-------------------|------------------------|-------------|
| 117 | Calandria | <i>E. faecalis</i> | 4 |
| 143 | Pato capuchino | <i>E. faecium</i> | 2 |
| 326 | Gallina | <i>E. durans/hirae</i> | 0,5 |
| 327 | Gallina | <i>E. faecium</i> | 1 |
| 328 | Gallina | <i>E. faecium</i> | 1 |
| 414 | Calandria | <i>E. faecalis</i> | 2 |
| 423 | Gaviota cocinera | <i>E. faecium</i> | 0,5 |
| 430 | Gaviota cocinera | <i>E. faecium</i> | 2 |
| 442 | Torcaza común | <i>E. faecium</i> | 1 |
| 443 | Cormorán imperial | <i>E. durans/hirae</i> | 2 |
| 445 | Tero | <i>E. faecalis</i> | 8 |
| 447 | Tero | <i>E. faecalis</i> | 8 |
| 448 | Tero | <i>E. faecalis</i> | 2 |
| 449 | Cormorán imperial | <i>E. faecium</i> | 1 |
| 490 | Gaviota cocinera | <i>E. faecium</i> | 1 |
| 598 | Paloma doméstica | <i>E. durans/hirae</i> | 1 |
| 608 | Pato capuchino | <i>E. faecium</i> | 2 |

Posteriormente, mediante las claves dicotómicas desarrolladas por Manero y Blanch (1999) se clasificaron 30 cepas como *E. faecalis*, 23 como *E. faecium* y 1 como *E. avium*, mientras que 3 cepas se asignaron al grupo *E. durans/hirae*.

No se detectó la presencia de los tres genes estudiados que codifican la resistencia a vancomicina en ninguno de los 17 aislamientos seleccionados previamente en las pruebas en placas de agar tripticasa soja suplementadas con vancomicina. Domig *et al* (2003), a través de una amplia revisión de métodos empleados en distintos trabajos para la detección de enterococos resistentes a la vancomicina en distintos ambientes, sugieren utilizar una concentración \geq a 6 $\mu\text{g/ml}$ de vancomicina. Sin embargo, esta concentración de antibiótico podría inhibir algunas cepas que expresan los genes *VanC* y *vanB*, cuyas concentraciones inhibitorias mínimas se encuentran por debajo del rango sugerido por Domig *et al* (2003). El mencionado trabajo no enfatiza la necesidad de utilizar un inóculo determinado de los microorganismos a estudiar, lo que podría conducir a la detección de falsas resistencias.

De las 57 cepas que exhibieron factores de virulencia sólo una exhibió los tres factores ensayados, mientras que 8 presentaban actividad gelatinasa y resistencia a vancomicina y 15 aislamientos exhibieron actividad gelatinasa y β -hemólisis (Tabla 4).

Discusión

Los 128 aislamientos de *Enterococcus* obtenidos a partir de 250 muestras de materia fecal ponen de manifiesto la alta frecuencia (51 %) con que se encuentra este género en muestras provenientes de aves, tanto de corral como silvestres.

Probablemente la temperatura corporal de las mismas (42 °C) actuaría como factor selectivo en favor de estos microorganismos, ya que pueden multiplicarse en forma efectiva en un rango de 10 a 45 °C. Muchas bacterias entéricas, en especial algunas especies de enterobacterias, se desarrollan en forma escasa o nula a la temperatura corporal normal de las aves. El amplio rango de temperaturas que permite la duplicación de los enterococos también facilita su persistencia en ambientes extraentéricos donde las

variaciones de temperatura, como en el caso del intestino de las aves, actúa como un factor de selección de la microbiota.

Entre los aislamientos que expresaron alguno de los factores de virulencia en estudio, *E. faecalis* (53 %) y *E. faecium* (40 %) fueron las especies predominantes. Esto coincide con estudios previos de otros autores en aislamientos recuperados a partir de muestras de materia fecal de animales silvestres (Foulquié Moreno *et al* 2006; Lanthier *et al* 2010; Oravcova *et al* 2013; Poeta *et al* 2005). Al igual que en nuestro trabajo, en estos estudios se encontró una baja prevalencia de otras especies de enterococos: es el caso de *E. durans/hirae* y *E. avium*.

El factor de virulencia de mayor prevalencia correspondió a la actividad gelatinasa (47/57), poniendo en evidencia que la presencia de la enzima, y en consecuencia la de los genes involucrados, es alta dentro del género *Enterococcus*, tal como se ha comunicado en trabajos previos (Marguet *et al* 2008; Waters *et al* 2003).

La gelatinasa (*gelE*) es una metaloendopeptidasa extracelular, capaz de degradar sustratos como la gelatina, fragmentos insolubles de colágeno, la cadena b de la insulina y otros péptidos bioactivos de los tejidos del hospedador, mejorando la migración y difusión de los enterococos por los tejidos dañados (Qin *et al* 2000). Además, también está implicada en la degradación de feromonas sexuales y de péptidos involucrados en la transferencia de plásmidos por conjugación entre diferentes cepas de enterococos (Qin *et al* 2000). Esta enzima contribuye a la patogénesis en diferentes modelos de infección en animales, entre los que se incluyen los de peritonitis en ratones y endoftalmítis en conejos (Mylonakis *et al* 2002; Semedo *et al* 2003). Sin embargo, de acuerdo a estudios previos, la presencia de los genes involucrados no implica la capacidad de expresión del correspondiente fenotipo, debido a diferentes niveles de regulación o por la inactivación del producto genético (Fisher y Phillips 2009).

En menor medida observamos aislamientos con actividad β -hemolítica (16/57). Al analizar la prevalencia encontrada incluyendo la totalidad de los aislamientos de enterococos, el 12 % encontrado

Tabla 4. Factores de virulencia presentes en cepas aisladas de aves.

| Especie | N° | RV* | β -hemólisis | gelatinasa | RV + H + G | H + G | RV + G | H + RV |
|------------------------|----|------|--------------------|------------|------------|-------|--------|--------|
| <i>E. faecalis</i> | 30 | 5/30 | 10/30 | 29/30 | 1/30 | 9/30 | 4/30 | 0/30 |
| <i>E. faecium</i> | 23 | 9/23 | 5/23 | 17/23 | 0/23 | 5/23 | 4/23 | 0/23 |
| <i>E. durans/hirae</i> | 3 | 3/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 |
| <i>E. avium</i> | 1 | 0/1 | 1/1 | 1/1 | 0/1 | 1/1 | 0/1 | 0/1 |

RV: resistencia a vancomicina; H: hemólisis; G: gelatinasa. *Resultados según la técnica de Domig *et al* (2003).

es similar a lo informado por otros autores (Eaton y Gasson 2001). La ausencia de actividad en las cepas restantes podría deberse a la ausencia o inactivación de algunos de los genes que conforman el operón *cyl* y se requieren para la expresión de la actividad β -hemolítica (Gilmore et al 1994).

El ensayo de expresión de hemolisinas, según la técnica descrita, permitió detectar actividad β -hemolítica en 10 cepas de *E. faecalis*, en 5 de *E. faecium* y sólo en una cepa de *E. avium*. Los resultados obtenidos coinciden con trabajos previos donde se informa sobre la prevalencia de las especies *E. faecalis* y *E. faecium* en la expresión de este factor de virulencia y en consecuencia vinculadas a infecciones enterocócicas (Eaton y Gasson 2001).

La citolisina o hemolisina b es una toxina extracelular, también reconocida como una bacteriocina (Kayser 2003), perteneciente a la clase I o lantibióticos (Kak y Chow 2012), siendo la única bacteriocina de este grupo capaz de lisar células eucarióticas. Esta toxina/bacteriocina presenta un interés especial porque su actividad incrementa la virulencia de los enterococos en diferentes modelos de infección (Gilmore et al 1994, Kak y Chow 2012).

Estudios recientes sobre la síntesis de la citolisina (*cyl*) han revelado que para su producción es necesaria la expresión de ocho genes situados en un único operón, que bien puede estar localizado en una isla de patogenicidad o en otros sitios del cromosoma bacteriano o de plásmidos regulados por feromonas y asociados a otros factores de virulencia como la *Agg* y la *Esp* (Kak y Chow 2012). En algunos casos puede detectarse la presencia de uno o más genes relacionados con el operón *cyl*, condición necesaria pero no suficiente para que se exprese la capacidad hemolítica de la enzima (Kak y Chow 2012). En consecuencia, la hemólisis en placa sigue siendo la "regla de oro" para evaluar la posible virulencia de cepas de *Enterococcus* (Eaton y Gasson 2001).

Las técnicas utilizadas para detectar resistencia a vancomicina son las de uso rutinario en microbiología clínica, complementada con el sistema chromID VRE agar, diseñado tanto para detectar cepas resistentes como para diferenciar entre *E. faecalis* y *E. faecium*, las 2 especies prevalentes dentro de las enfermedades humanas, sin embargo éstas no brindan resultados confiables al evaluar aislamientos de origen ambiental. Ambas técnicas en placa podrían emplearse como una primera aproximación al estudio de la resistencia a vancomicina. No obstante, sus resultados deberían confirmarse estableciendo la CIM de cada aislamiento y, posteriormente, revelando la presencia de los determinantes genéticos responsables de tal resistencia.

En este sentido los aislamientos seleccionados

con las técnicas previamente mencionadas exhibieron una resistencia intermedia al antibiótico con valores máximos de 8 $\mu\text{g/ml}$ para los aislamientos 445 y 447, ambos identificados como *E. faecalis*, mientras que las cepas 326 y 423 vieron inhibido su crecimiento a concentración $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$.

Al evaluar la presencia de los genes *vanA*, *vanB* y *vanC-1* en los 17 aislamientos resistentes a vancomicina seleccionados a partir de las técnicas en placa, no se detectaron productos de amplificación en ninguna de las cepas. Estos resultados sugerirían que la resistencia observada estaría codificada en el cromosoma bacteriano, por cuanto tanto el gen *vanA*, como el gen *vanB* residen en plásmidos, transferibles entre cepas de *Enterococcus* (Nilsson 2012; Werner et al 2013). En cuanto a la ausencia de *vanC-1*, si bien se ha descrito que es el genotipo presente en cepas de *Enterococcus* que exhiben una tolerancia a vancomicina de 2 a 32 $\mu\text{g/ml}$, la resistencia observada en las cepas 117, 445 y 447 podría deberse a un genotipo diferente a los estudiados. La aparición de nuevos genotipos asociados a la resistencia a vancomicina es un hallazgo habitual en los últimos años, corroborado por distintos autores. En este sentido deberían llevarse a cabo estudios posteriores para verificar o descartar esta hipótesis (Chadfield et al 2004; Werner et al 2013).

Las infecciones por enterococos, relativamente raras en aves de corral (Devriese et al 1990) y en otros pájaros como canarios y psitácidos (Silva et al 2012) son, por el contrario, frecuentes en ambientes nosocomiales, en cuyos aislamientos se observa una alta prevalencia de cepas con actividad gelatinasa y β -hemolítica, además de resistencia a antibióticos (Deshpande et al 2007). Los suelos agrícolas y costeros marinos y continentales, la vegetación terrestre y acuática, así como las aguas marinas y dulces suelen actuar como reservorio de enterococos potencialmente patogénicos, como consecuencia de la contaminación de estos habitats a partir de actividades humanas como la recreación acuática, la agricultura intensiva y las plantas de tratamiento de líquidos cloacales y de mataderos (Byappanahalli et al 2012).

No se ha demostrado con claridad el circuito que potencialmente transitarían las cepas virulentas entre seres humanos, medio ambiente y aves. Sin embargo, la hipótesis más aceptada es la que indica que las aves pueden estar expuestas a ambientes contaminados por actividades de origen antrópico o animal y, en consecuencia, los enterococos, gracias a su capacidad para adaptarse a condiciones adversas, podrían formar parte de la flora intestinal por tiempos prolongados o en forma permanente. En este sentido las aves silvestres en contacto con estos ambientes podrían representar un dispersor de microbiota con potencial patogénico (Silva et al 2012).

Referencias bibliográficas

- Byappanahalli MN, Nevers MB, Korajkic A, Staley ZR, Harwood VJ. Enterococci in the environment. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2012; 76(4):685-705.
- Chadfield MS, Christensen JP, Christensen H, Bisgaard M. Characterization of streptococci and enterococci associated with septicemia in broiler parents with a high prevalence of endocarditis. *Avian Pathol.* 2004; 33(6):610-617.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2011, Stockholm, SE.
- Elsayed S, Hamilton N, Boyd D, Mulvey M. Improved primer design for multiplex PCR analysis of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(6):2367-2368.
- Deshpande LM, Fritsche TR, Moet GJ, Biedenbach DJ, Jones RN. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe: a report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007; 58(2):163-170.
- Devriese LA, Ducatelle R, Uyttendaele E, Haesebrouck, F. *Enterococcus hirae* infection and focal necrosis of the brain of chicks. *Vet Rec.* 1991; 129(14):316-318.
- Domig KJ, Mayer HK, Kneifel W. Methods used for isolation, enumeration, characterization and identification of *Enterococcus* spp. 2. Pheno- and genotypic criteria. *Int J Food Microbiol.* 2003; 88(2-3):165-188.
- Eaton TJ, Gasson MJ. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67(4):1628-1635.
- Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology.* 2009; 155(6):1749-1757.
- Foulquié Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L. The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol.* 2006; 106(1):1-24.
- Gilmore MS, Segarra RA, Booth MC, Bogie CP, Hall LR, Clewell DB. Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J Bacteriol.* 1994; 176(23):7335-7344.
- Kak V, Chow JW. Acquired antibiotic resistances in enterococci. En: Gilmore MS, Clewell DB, Courvalin P, Dunny GM, Murray BE, Rice LB, 2002. *The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance.* Washington DC; ASM Press, pp. 355-372.
- Kanemitsu K, Nischino T, Kunishima H, Okamura N, Takemura H, Yamamoto H, Kaku M. Quantitative determination of gelatinase activity among enterococci. *J Microbiol Methods* 2001; 47(1):11-16.
- Kariyama R, Mitsuhata R, Chow JW, Clewell DB, Kumon H. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(8):3092-3095.
- Kayser FH. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *Int J Food Microbiol.* 2003; 88(2):255-262.
- Lanther M, Scott A, Lapen DR, Zhang Y, Topp E. Frequency of virulence genes and antibiotic resistances in *Enterococcus* spp. isolates from wastewater and feces of domesticated mammals and birds, and wildlife. *Can J Microbiol.* 2010; 56(9):715-729.
- List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN). Genus *Enterococcus*. Disponible en: www.bacterio.cict.fr/e/enterococcus.html. Acceso: 20 de febrero de 2015.
- Manero A, Blanch AR. Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65(10):4425-4430.
- Marguet ER, Vallejo M, Olivera NL. Factores de virulencia de cepas de *Enterococcus* aisladas de quesos ovinos. *Acta Bioquim Clín Latinoam.* 2008; 42(4):543-548.
- Mylonakis E, Engelbert M, Qin X, Sifri CD, Murray BE, Ausubel FM, Gilmore MS, Calderwood SB. The *Enterococcus faecalis* *fsrB* gene, a key component of the *fsr* quorum-sensing system, is associated with virulence in the rabbit endophthalmitis model. *Infect Immun.* 2002;70(8):4678-4681.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Approved standard M2-A7, 7th ed. NCCLS, Wayne, EEUU.
- Nilsson O. Vancomycin resistant enterococci in farm animals - occurrence and importance. *Infect Ecol Epidemiol.* 2012; 2:16959. DOI: 10.3402/iee.v2i0.16959
- Oravcova V, Zurek L, Townsend A, Clark AB, Ellis JC, Cizek A, Literak I. American crows as carriers of vancomycin-resistant enterococci with *vanA* gene. *Environ Microbiol.* 2014; 16(4):939-949.
- Poeta P, Costa D, Sáenz Y, Klibi N, Ruiz-Larrea F, Rodrigues J, Torres C. Characterization of antibiotic resistance genes and virulence factors in faecal enterococci of wild animals in Portugal. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2005; 52(9):396-402.
- Qin X, Singh KV, Weinstock GM, Murray BE. Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. *Infect Immun.* 2000; 68(5):2579-2586.
- Semedo T, Almeida Santos M, Martins P, Silva Lopes MF, Figueiredo Marques JJ, Tenreiro R, Barreto Crespo MT. Comparative study using type strains and clinical and food isolated to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyt* operon in enterococci. *J Clin Microbiol* 2003; 41(6):2569-76.
- Sharifi Y, Hasani A, Ghotaslou R, Varshochi M, Hasani A, Aghazadeh M, Milani M. Survey of virulence determinants among vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from clinical specimens of hospitalized patients of north west of Iran. *Open Microbiol J.* 2012; 6:34-39.
- Silva N, Igrejas G, Felgar A, Gonçalves A, Pacheco R, Poeta P. Molecular characterization of *vanA*-containing *Enterococcus* from migratory birds: song thrush (*Turdus philomelos*). *Braz J Microbiol.* 2012; 43(3):1026-1029.
- Waters CM, Antiporta MH, Murray BE, Dunny GM. Role of the *Enterococcus faecalis* GelE protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. *J Bacteriol.* 2003; 185(12):3613-3623.
- Werner G, Coque TM, Franz CMAP, Grohmann E, Hegstade K, Jenseng L, van Schaik W, Weaver K. Antibiotic resistant enterococci - Tales of a drug resistance gene trafficker. *Int J Med Microbiol.* 2013; 303(6-7):360-379.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado con fondos otorgados por la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco al proyecto "Evaluación de la seguridad alimentaria y sanitaria de *Enterococcus* ambientales" PI R/7 222/2013.

Conflictos de intereses

Todos los autores declaran que no existen conflictos de intereses, incluyendo las relaciones financieras, personales o de otro tipo con otras personas u organizaciones que pudieran influir de manera inapropiada en el trabajo.

Evaluación de un producto bactericida aplicado por micronebulización

Evaluation of a Bactericidal Product Applied by Micronebulization

Linares LH^{1*}, Guirin G², Stambullian J³, Brusa V¹, de la Torre JH¹, Ortega EE¹,
Copes J¹, Leotta GA^{1,4}

¹Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata; ²Universidad Nacional de Lanús; ³Centro Estudios Infectológicos "Dr. Stambouljian", División Alimentos; ⁴Instituto de Genética Veterinaria "Ing. Fernando Noel Dulout" (UNLP-CONICET La Plata), Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

*Autor correspondiente. Correo electrónico del autor: lucianolinares@hotmail.com

Resumen: La contaminación ambiental puede representar un problema para la salud pública. El objetivo de este trabajo fue evaluar el poder bactericida de un producto a base de peróxido de hidrógeno y sales de plata aplicado mediante micronebulización. El estudio fue realizado en ambientes con distinta frecuencia de procedimientos operativos estandarizados de sanitización: un aula universitaria y un quirófano. Previo a la aplicación del producto bactericida se colectaron muestras de superficies y aire para recuento de mesófilos. A los 12 min de aplicado el producto se tomaron muestras ambientales para determinar el efecto inmediato. El efecto residual se evaluó hasta 17 h posteriores a la aplicación. En el aula los mayores recuentos iniciales se observaron en la lámpara y pisos. Luego de aplicado el producto los mejores resultados se observaron en el aire mientras que en las superficies los resultados fueron variables. En el quirófano, el mayor desarrollo pretratamiento se detectó en aire y pisos. El efecto inmediato tuvo una eficacia absoluta en todas las muestras excepto en pisos, mientras que el efecto residual arrojó resultados negativos hasta 17 h posteriores. La alternativa evaluada fue eficaz y novedosa. Es interesante desarrollar estos sistemas como herramienta para mejorar la eficiencia del procedimiento operativo estandarizado de sanitización en ambientes controlados a nivel industrial.

Palabras clave: peróxido de hidrógeno, contaminación ambiental, acción bactericida.

Abstract: Environmental contamination may represent a public health problem. We evaluated the bactericide power of a product containing hydrogen peroxide and silver salts applied by micronebulization in rooms with different frequency of *sanitation standard operating procedures*: a university classroom and an operating room. Before applying the bactericidal product, surface and air samples were collected for mesophilic count. Environmental samples were collected after 12 min of product application to determine the immediate effect. The residual effect was evaluated up to 17 h after application. In the classroom, the highest initial counts were observed on a lamp and floor. After application of the product, the best results were observed in the air whereas results were variable on the surfaces sampled. In the operating room, pre-treatment counts were higher in the air and floors. The immediate effect was totally efficient in all samples excepting floors, whereas the residual effect showed negative results up to 17 h after application. The alternative tested was effective and novel; therefore, its development would improve the efficiency of *sanitation standard operating procedures* in industrially controlled environments.

Key words: hydrogen peroxide, environmental contamination, bactericide action.

Introducción

La contaminación ambiental con microorganismos potencialmente patógenos en superficies y aire de lugares de trabajo en hospitales, industria alimentaria y lugares públicos puede representar un problema para la salud pública (Herruzo *et al* 2014).

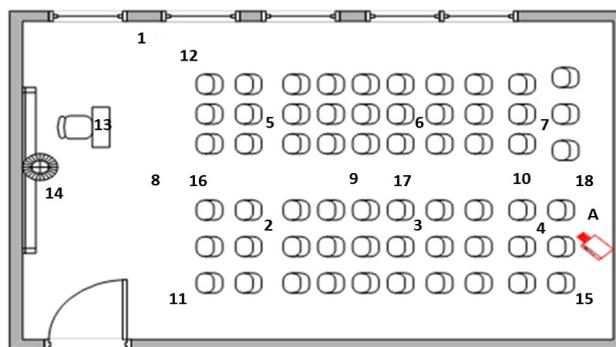
La limpieza tradicional con detergentes no siempre suele ser eficiente para eliminar estos microorganismos. Por este motivo, es de suma importancia contar con un sistema de desinfección que elimine eficazmente los microorganismos presentes en el aire y superficies ambientales, inclusive en sitios de difícil acceso (Carling *et al* 2010; Otter *et al* 2011). Uno de los productos mayormente utilizados es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Con la vaporización se consigue una reducción del número de microorganismos de entre 4 a 6 \log_{10} . Este proceso demora alrededor de 5 h y utiliza H_2O_2 al 30 %. La técnica de micronebulización utiliza una solución de H_2O_2 al 5 % y, según el área de trabajo, la desinfección total se consigue en 2 a 3 h (Herruzo *et al* 2014). Este método es de fácil uso y eficiente frente a esporas, micobacterias y otras bacterias (Bartels *et al* 2008; Fu *et al* 2012; Grare *et al* 2008). El objetivo del presente trabajo fue evaluar el poder bactericida de un producto a base de peróxido de hidrógeno y sales de plata aplicado por micronebulización en distintos ambientes.

Materiales y Métodos

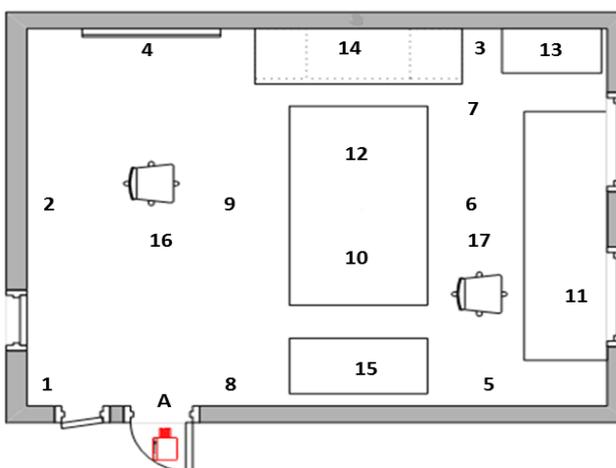
Se utilizó el sistema de micronebulización 99.99™ (La Fucina di Leonardo S.R.L., Bologna, Italia), mediante el cual se pulverizó una solución compuesta por H_2O_2 al 5 %, sales de plata (Ag^+) y agua bio-osmótica, permitiendo pulverizar hasta 1000 m^3 con una densidad de 7 ml/m^3 . Para poder alcanzar el efecto deseado es necesario que la solución bactericida esté en contacto con las superficies ambientales durante un tiempo mínimo de 12 min.

El trabajo fue realizado en dos ambientes con distinta frecuencia de procedimientos operativos estandarizados de saneamiento (POES): 1) un aula universitaria de 900 m^3 , con constante tránsito de personas. Durante la presente evaluación no se modificó el uso del aula; 2) un quirófano de pequeños animales de 180 m^3 . Este ambiente contaba con POES al comenzar y al finalizar la jornada, un primer paso de limpieza con detergente seguido de una etapa de desinfección con productos clorados. Durante la realización de la presente evaluación no se realizaron cirugías.

El equipo 99.99® se colocó en lugares estratégicos de cada uno de los ambientes para evaluar el alcance del producto (figuras 1 y 2). El proceso de desinfección tuvo una duración de 55 min en el aula y 20 min en el quirófano, aplicándose 800 ml de solución



Enviar texto de figura en word.



Enviar texto de figura en word.

bactericida en el primero y 600 ml en el segundo. La duración y el volumen de aplicación del producto fueron establecidos según las indicaciones del fabricante, las cuales dependen de las dimensiones del ambiente.

Se evaluó el efecto inmediato del producto sobre los microorganismos ambientales en el quirófano y en el aula. Se obtuvieron muestras en el momento previo a la aplicación del producto y 12 min posteriores. El efecto residual se evaluó en 4 zonas representativas de superficies, tomándose muestras en tiempos sucesivos hasta 17 h posteriores a la aplicación del producto, tanto en el quirófano como en el aula.

En el aula universitaria se colectaron muestras para recuento de mesófilos en la superficie de 15 sitios diferentes. Para la toma de muestras de aire se utilizó el equipo *Samp'l'air*® (AES CHEMUNEX, Princeton, Nueva Jersey, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. Se tomaron 3 muestras de aire con un flujo de muestreo de 100 l/min .

En el quirófano se colectaron muestras para recuento de mesófilos en la superficie de 15 sitios. La toma de muestras de aire fue realizada en 2 zonas representativas, de la misma forma que en el aula universitaria.

La toma de muestras para el recuento de mesófilos se realizó con placas RODAC (bioMérieux, Lion, Francia) con *Plate Count Agar* (PCA, Britania, Buenos Aires, Argentina) con inhibidor de desinfectantes, incubándose durante 24 h a 37 °C según Norma ISO 4833 (2013). Luego se procedió al recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).

Resultados

En el aula universitaria, el mayor recuento inicial se obtuvo a partir de muestras tomadas de la lámpara, las cuales dieron origen a numerosas colonias, seguidas por las muestras del piso que llegaron a 152 UFC. A partir de muestras de los pupitres se observaron conteos desde 17 UFC hasta 90 UFC mientras que las del escritorio originaron 52 UFC. Los recuentos más bajos se obtuvieron a partir de muestras del respaldo y de debajo de las sillas, con ausencia o <10 UFC.

Luego de aplicar el producto se observaron resultados variables. La carga de mesófilos se mantuvo igual en sitios con mayor recuento inicial, como en la lámpara (>300 UFC) y en el piso (208 UFC). En las muestras tomadas del resto de las superficies se observó una disminución de los recuentos. En las de los pupitres el recuento más elevado observado fue de 37 UFC, a partir de las del escritorio se contaron <10 UFC y en las sillas se mantuvieron los bajos conteos observados inicialmente (<10 UFC).

El estudio del efecto residual demostró que los pupitres y el pizarrón mantuvieron el descenso observado a los 12 min, con 11 UFC y ausencia, respectivamente. En el piso no se observó disminución del número ya que a las 17 h se contaron 128 UFC.

En las muestras de aire se observaron inicialmente conteos de 12 a 17 UFC, disminuyendo su cantidad de 0 y <10 UFC a los 12 minutos de aplicar el producto.

En el quirófano, los recuentos en superficies con carga bacteriana elevada antes de la aplicación del producto se observaron a partir de pisos (74 UFC) y de mesadas (28 UFC). En el equipo, el aire acondicionado y la lámpara se obtuvieron muestras que arrojaron recuentos de 20, 16 y <10 UFC, respectivamente. En las paredes y la camilla no se observó crecimiento bacteriano.

A los 12 min de la aplicación de la solución, sólo se observó crecimiento en las muestras del piso (entre <10 UFC y 11 UFC), demostrando una eliminación total de las bacterias en el resto de las superficies.

El efecto residual de la acción bactericida alcanzó las 17 h, siendo en este tiempo todas las muestras negativas.

El efecto bactericida en el aire fue absoluto, ya

que no se observó crecimiento de bacterias luego de la aplicación del producto.

Discusión y Conclusiones

La aplicación de soluciones bactericidas por micronebulización, luego de un correcto procedimiento de limpieza, es una alternativa a la desinfección tradicional para reducir la carga de bacterias en lugares públicos y en ambientes controlados. Sin embargo, es necesario establecer la frecuencia de aplicación ideal y la dosificación de la solución bactericida de acuerdo con las características físicas del ambiente a sanitizar.

En el aula, la acción bactericida evaluada fue afectada por las características edilicias del ambiente (dimensiones), la ausencia de aplicación de un POES y el constante tránsito de personas. Es interesante considerar la implementación de un POES en espacios públicos que justifique el uso de las nuevas alternativas de desinfección como herramienta para controlar el ambiente.

A diferencia del aula, en ambientes reducidos, controlados y que aplican POES rutinariamente, como es el caso del quirófano, la solución bactericida fue efectiva en el aire y en todas las superficies ambientales. Se logró reducir la carga de mesófilos a más de 6 m de distancia, resultados que concuerdan con estudios previos (Boyce 2007; Otter *et al* 2006; Shapey *et al* 2008).

Si bien los productos clorados son utilizados con frecuencia y son recomendados para la desinfección de ambientes hospitalarios (Dubberke *et al* 2008; Vonberg *et al* 2008), pueden presentar ciertos inconvenientes como la utilización manual del producto, el tiempo dedicado al proceso, la corrosión de materiales y la producción de vapores tóxicos, etc. La combinación de H₂O₂ y sales de plata produce un potente efecto oxidante en los microorganismos ya que bloquea su sistema respiratorio enzimático y actúa sobre el ADN y la pared bacteriana (Silver 2003). Se demostró que la aplicación de esta solución tiene varias ventajas con respecto a los productos clorados, entre ellas poseer baja toxicidad, ser de fácil uso y no causar efectos corrosivos (Eckstein *et al* 2007).

En este trabajo fue posible demostrar que en un ambiente controlado como un quirófano es posible lograr un efecto inmediato y residual capaz de eliminar/atenuar las bacterias presentes. En este ambiente el efecto residual perduró hasta las 17 h de aplicado el producto. Sin embargo, es necesario realizar evaluaciones del sistema de micronebulización en ambientes contaminados experimentalmente con microorganismos implicados en casos clínicos de infecciones nosocomiales (Herruzo *et al* 2014) e inclusive validarlo con mayor cantidad de estudios.

El método de desinfección con H₂O₂ y sales de plata aplicadas por micronebulización es una alternativa eficaz y novedosa, aunque no se encuentra disponible en el mercado nacional. Sería interesante desarrollar este tipo de sistemas destinándolos a mejorar la eficiencia de los POES en ambientes controlados, tales como quirófanos, salas de envasado de productos farmacológicos, salas de elaboración de biológicos y empresas elaboradoras de alimentos de Argentina.

Referencias Bibliograficas

Bartels MD, Kristoffersen K, Slotsbjerg T, Rohde SM, Lundgren B, Westh H. Environmental methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) disinfection using dry-mist-generated hydrogen peroxide. *J Hosp Infect* 2008; 70:35-41.

Boyce JM. Environmental contamination makes an important contribution to hospital infection. *J Hosp Infect* 2007; 65(2):50-4.

Carling PC, Parry MF, Bruno-Murtha LA, Dick B. Improving environmental hygiene in 27 intensive care units to decrease multidrug-resistant bacterial transmission. *Crit Care Med* 2010; 38:1054-9.

Dubberke E, Gerding DN, Classen D, et al. Strategies to prevent *Clostridium difficile* infection in acute care hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008; 29 (1):S81-S92.

Eckstein BC, Adams DA, Eckstein EC, et al. Reduction of *Clostridium difficile* and vancomycin-resistant *Enterococcus* contamination of environmental surfaces after an intervention to improve cleaning methods. *BMC Infect Dis* 2007; 7:61.

Fu TY, Gent P, Kumar V. Efficacy, efficiency and safety aspect of hydrogen peroxide vapour and aerosolized hydrogen peroxide room disinfection systems. *J Hosp Infect* 2012; 80:199-205.

Grare M, Dailloux M, Simon L, Dimajo P, Laurain C. Efficacy of dry mist hydrogen peroxide (DMHP) against *Mycobacterium tuberculosis* and use of DMHP for routine decontamination of biosafety level 3 laboratories. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2955-8.

Herruzo R, Vizcaíno MJ, Herruzo I. Quantifying Glosair™ efficacy for surface disinfection of American Type Culture Collection strains and microorganisms recently isolated from intensive care unit patients. *J Hosp Infect* 2014; 87:175-8.

International Standardization Organization. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganism – Part 1: colony count at 30 degrees C by the pour plate technique. ISO 4833-1:2013.

Otter A, Yezli S, French GL. The role played by contaminated surfaces in the transmission of nosocomial pathogens. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2011; 32:687-99.

Otter JA, French GL, Adams NM, Watling D, Parks MJ. Hydrogen peroxide vapour decontamination in an overcrowded tertiary care referral centre: some practical answers. *J Hosp Infect* 2006; 62:384-5.

Shapey S, Machin K, Levi K, Boswell TC. Activity of a dry mist hydrogen peroxide system against environmental *Clostridium difficile* contamination in elderly care wards. *J Hosp Infect* 2008; 70:136-41.

Silver S. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol Rev* 2003; 27:341-53.

Vonberg RP, Kuijper EJ, Wilcox MH, et al. Infection control measures to limit the spread of *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:2-20.

Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración del Dr. Filomena y de la empresa Ecopharma S.A. por proveer el sistema de desinfección 99,99® y el equipo de micronebulización.

Conflictos de intereses

Todos los autores declaran que no existen conflictos de intereses, incluyendo las relaciones financieras, personales o de otro tipo con otras personas u organizaciones que pudieran influir de manera inapropiada en el trabajo.

Congelación de semen porcino: resultados y avances en la técnica

Boar Semen Cryopreservation: Results and Advances in the Technique

Williams S^{*1}, Fernández V¹, Gavazza M², Marmunti M², Zeinsteger P², Prenna G³

¹Laboratorio de Reproducción Animal, Departamento de Clínicas. ²Cátedra de Zootecnia especial I, Departamento de Producción Animal. ³Cátedra de Bioquímica, Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. ⁴Bioter, SA.

*Autor correspondiente. Correo electrónico del autor: swilliams@fcv.unlp.edu.ar

Resumen: El proceso de congelación de espermatozoides porcinos produce alteraciones de la integridad de sus membranas, que pueden variar según el perfil de ácidos grasos o la composición de los medios utilizados. El objetivo de este estudio fue determinar las posibles variaciones individuales en la calidad seminal durante el proceso de congelación de semen porcino y sus respuestas ante modificaciones del medio, como el uso de diferentes gradientes del crioprotector o la inclusión de un antioxidante *in vitro*. Al analizar el efecto del tratamiento (temperatura según etapa del proceso), se observaron descensos de la calidad seminal muy marcados en la mayoría de los parámetros (motilidad, porcentaje de espermatozoides vivos y de acrosomas normales, $P < 0,001$), a excepción de las anomalías espermáticas. Las variaciones individuales tendieron a asociarse con diferencias en la motilidad, si bien no fueron de significación estadística ($P < 0,2$). Los mejores valores de calidad seminal se obtuvieron con el uso de hasta un 4 % de glicerol y de 0,5 % de dodecil sulfato de sodio. El agregado de un antioxidante natural a base de licopeno *in vitro* a muestras obtenidas durante la criopreservación ejerció un efecto protector, ya que los principales ácidos grasos insaturados no fueron afectados por el proceso de lipoperoxidación.

Palabras clave: semen porcino, congelación, calidad seminal, crioprotectores, antioxidante

Abstract: The freezing process of boar semen produces changes in the integrity of the membranes, which may vary according to the profile of fatty acids to medium composition. The objective of this study was to determine possible individual variations in the seminal quality during the freezing process in boar semen and the responses to changes in the environment, such as the use of different gradients of the cryoprotectant or *in vitro* inclusion of antioxidants. When the effect of the treatment (temperature according to the freezing steps) was analysed, it was observed a marked decline in seminal quality for most parameters (motility, percentage of live spermatozoa and with normal acrosomes, $P < 0.001$). Individual variations showed a trend towards an effect on motility, even though it was not significant ($P < 0.2$). The best values of seminal quality were obtained with the use of 4 % of glycerol and 0.5 % of sodium dodecyl sulphate. The addition of a natural antioxidant based on lycopene *in vitro* in samples obtained during cryopreservation conferred a protective effect because major unsaturated fatty acids were not affected by the process of peroxidation.

Key words: boar semen, freezing, semen quality, cryoprotectants, antioxidant

Introducción

La congelación de espermatozoides se inicia de forma experimental con perspectiva de utilizarla en inseminación artificial (IA) en el año 1949.

En la década del setenta se lograron inseminaciones exitosas en cerdas con semen congelado (Graham *et al* 1971, Pursel y Johnson 1971, Crabo y Einarsson 1971) y, posteriormente, se publicaron dos métodos de congelación que han sido la base de los utilizados hasta el día de hoy: en Estados Unidos, Pursel y Johnson (1976) congelaron semen en píldoras y, en Alemania, Westendorf *et al* (1975) congelaron semen en pajuelas de 5 ml. Ambos métodos utilizan diluyentes que están basados en la utilización de yema de huevo y glicerol como agentes crioprotectores, una concentración elevada de azúcares y la adición de un agente detergente.

En los últimos tiempos, los estudios se han centrado en los tipos de envases para semen congelado (Eriksson y Rodríguez-Martínez 2000, Eriksson *et al* 2002), en las alteraciones que produce la congelación en la célula espermática y, especialmente, en la desestabilización que se produce en el sistema antioxidante del espermatozoide durante dicho proceso.

La mayoría de las dosis inseminantes utilizadas en la especie porcina están constituidas por semen conservado a 15-18 °C, lo que representa el 85 % del total de inseminaciones realizadas en el mundo (Johnson *et al* 2000). El uso de semen congelado se encuentra limitado a programas de selección, transporte de dosis a largas distancias, conservación de poblaciones de interés por su escasa cantidad y pruebas que realizan los grupos de investigación, debido principalmente a que los resultados de fertilidad y prolificidad están en un 10-20 % y 1-2 lechones, respectivamente, por debajo de los obtenidos con semen refrigerado, a pesar de la elevada cantidad de espermatozoides por dosis, siendo la tasa media de partos del 70 %, aproximadamente.

La actual tendencia en la inseminación artificial con semen congelado porcino es reducir la cantidad de espermatozoides por inseminación y, en esta línea, se están desarrollando nuevas técnicas para la aplicación del semen cerca del lugar de fecundación. Con el uso del método de inseminación intrauterina profunda, algunos de estos inconvenientes han logrado superarse (Martínez *et al* 2001, Martínez *et al* 2002, Vázquez *et al* 2008).

El espermatozoide del porcino es muy sensible al choque térmico por frío, que produce una alteración de la funcionalidad de la membrana espermática comprometiendo la viabilidad celular. En numerosos estudios se han descrito grandes diferencias en la capacidad de congelación que presentan los eyaculados de distintos machos, las que afectan tanto la viabilidad de

los espermatozoides tras la descongelación como la fertilidad *in vivo*.

La reducida fertilidad y prolificidad tras la IA con semen congelado se debe a los cambios estructurales y funcionales que sufren los espermatozoides durante el proceso de criopreservación, la disminución de la funcionalidad que dichos espermatozoides tienen en el tracto genital de las cerdas, las peculiares características anatómicas del aparato genital de la hembra y la mala calidad de los embriones producidos que condicionan su posterior viabilidad.

Las membranas de los espermatozoides son ricas en ácidos grasos poliinsaturados y son sensibles al daño oxidativo mediado por el proceso de peroxidación lipídica (PL) (Sheweita *et al.*, 2005); ésta es causa potencial de infertilidad en machos de numerosas especies. El semen del verraco es susceptible al daño peroxidativo inducido por el proceso de criopreservación (Hernández *et al* 2007b) debido a la alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados presentes en sus membranas (Cerolini *et al* 2000). El grado en que los espermatozoides pierden movilidad *in vitro* se correlacionan con la tasa de PL que sufren. Los antioxidantes son sustancias que, cuando se encuentran presentes en bajas concentraciones respecto a los sustratos oxidables, retrasan o anulan la oxidación de dicho sustrato (Faudale *et al.*, 2008). Existen evidencias de que los carotenoides podrían actuar como antioxidantes, como el licopeno, que se halla casi exclusivamente en el tomate (*Lycopersicon esculentum*) y sus productos.

El objetivo de este estudio fue determinar posibles variaciones individuales en la calidad seminal frente a modificaciones del medio, como el uso de diferentes gradientes del crioprotector o la adición *in vitro* del antioxidante vegetal obtenido del tomate, durante el proceso de congelación de semen porcino.

Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron eyaculados obtenidos de cerdos provenientes de distintas granjas comerciales o de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP). Todos los animales se encontraban alojados en sistemas confinados y recibían un alimento balanceado de formulación comercial, en algunos casos especial para verracos. Las muestras enviadas desde las granjas fueron recibidas refrigeradas a 15 °C al día siguiente de la extracción. En el caso de los padrillos de la Facultad, la congelación se realizó en el mismo día de la extracción.

Protocolo de congelación

Se utilizó la técnica de Westendorf (Westendorf *et al*, 1975) con modificaciones. Los medios utiliza-

dos para el enfriamiento a 5 °C fueron los medios comerciales Boarciphos A y B® (IMV-technologies) modificados de la siguiente manera: medio A + 20 % de yema de huevo y medio B, utilizado previamente al envasado y la congelación, con la adición de 20 % de yema de huevo y crioprotector.

Evaluación de la calidad seminal inicial

La motilidad individual y el vigor se evaluaron mediante la observación de una gota de la muestra (colocada entre porta y cubreobjetos) con aumentos de 100X y 400X del microscopio óptico.

Los resultados de motilidad se expresaron como porcentaje de espermatozoides móviles (0-100 %) y el vigor en una escala de 0-5.

La viabilidad se determinó por tinción vital con eosina-nigrosina, a partir de un extendido de una mezcla homogénea de semen y colorante, y se observó en un microscopio óptico a 1000X, contabilizando un mínimo de 100 células espermáticas.

Para el estudio de la integridad de la membrana acrosomal se hicieron lecturas a partir de extendidos de semen fijados en alcohol y teñidos con una solución de *Pisum sativum agglutinin* (PSA) al 5 % en PBS. Se observaron en microscopio de fluorescencia, se contabilizaron como mínimo 100 células y se calculó el porcentaje de espermatozoides con acrosomas normales.

Las variaciones en la calidad seminal se estudiaron en las siguientes etapas: 1) a 15 °C, 2) a 15 °C + A, luego de la centrifugación y previo al enfriamiento, una vez diluido en medio comercial A, 3) 5 °C + A, una vez finalizado el enfriamiento; 4) 5 °C + A + B, luego de la dilución con medio comercial B, previo a la colocación en pajuelas y congelación y 5) en la descongelación. En cada etapa se analizó: motilidad, vigor, porcentaje de espermatozoides vivos e integridad de la membrana acrosomal.

Protocolo de descongelación

Las pajuelas se mantuvieron congeladas durante un mes, como mínimo. Se descongelaron sumergiéndolas en baño térmico a 37 °C durante 1 minuto y se realizó inmediatamente la dilución en un medio comercial de descongelación a 37 °C, procediéndose a su evaluación.

Evaluación de la calidad del semen porcino durante el proceso de congelación

1. Efecto de la variabilidad individual

Se utilizaron eyaculados de seis (6) padrillos de más de un año, de línea terminal, provenientes de un

establecimiento comercial. En el momento del arribo de las dosis se comprobaron los parámetros mínimos de calidad seminal: motilidad (> 70 %) y presencia de anomalías espermáticas (< 20 %) y, una vez contrastadas las dosis, se inició el proceso de criopreservación. Las variaciones en la calidad seminal se estudiaron en las distintas etapas del proceso.

Los resultados fueron analizados mediante análisis de varianza (procedimiento MIXED de SAS®, 2004). Los datos obtenidos se utilizaron para confeccionar curvas y demostrar las variaciones de la calidad de semen durante el proceso de la criopreservación.

2. Efecto del uso de crioprotectores y del dodecil sulfato de sodio (SDS)

Para analizar el impacto en la calidad espermática durante el proceso de congelación-descongelación utilizando distintas concentraciones de glicerol y de dodecil sulfato de sodio (SDS, por su nombre en inglés), se utilizaron eyaculados provenientes de un verraco adulto, alojado en la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP), con el fin de evitar variaciones individuales durante el proceso de congelación. El semen se obtuvo por extracción manual y, una vez en el laboratorio, se comprobaron los parámetros mínimos de calidad seminal.

Un total de 7 eyaculados fueron congelados. Luego del enfriamiento a 5 °C, cada eyaculado fue dividido en 4 alícuotas (I a IV), las que fueron diluidas en medios con diferente concentración de glicerol y de SDS: (I) 4% de glicerol y 1% de SDS; (II) 4% de glicerol y 0,5 % de SDS; (III) 2% de glicerol y 1% de SDS y (IV) 2% de glicerol y 0,5% de SDS. Durante el proceso de congelación, se tomaron muestras para contrastar la calidad seminal. Se calcularon los índices de congelabilidad (coeficiente entre el valor de la muestra descongelada/valor en cada paso del proceso, para cada uno de los parámetros). El estudio comparativo entre los medios I, II, III y IV se realizó mediante análisis de varianza (procedimiento CAT-MOD de SAS®, 2002).

3. Efecto antioxidante *in vitro* de *Lycopersicon esculentum* en ensayos con semen porcino

Se estudió el efecto del agregado *in vitro* de un antioxidante natural al medio, como es el uso del licopeno, extraído del tomate. Se trabajó con muestras de semen porcino durante el proceso de criopreservación en 4 circunstancias: 1) a 15 °C, 2) 15 °C + medio A (previamente al enfriamiento), 3) a 5 °C + medio A y 4) a 5 °C + medio A + medio B. Los espermatozoides se obtuvieron por el método descrito por Dandekar *et al* (2002). Se determinaron proteínas por el método

de Lowry *et al* (1951). Los lípidos fueron extraídos por el método de Folch *et al* (1957). Los ácidos grasos fueron transmetilados con F₃B (trifluoruro de boro) a 60 °C durante 3 horas. Los ésteres metílicos de ácidos grasos se analizaron mediante cromatografía gaseosa. El antioxidante utilizado se obtuvo de manera sencilla y abundante a partir del tomate, utilizando solventes como hexano y etanol. Se inició la peroxidación lipídica no enzimática mediante adición de ascorbato-Fe⁺⁺ (con una concentración final de 0,4 mM) (Wright *et al*, 1979). Se prepararon 3 grupos de muestras: 1) control: sin ascorbato, 1 mg de proteína; 2) sin antioxidante: 1 mg de proteína + ascorbato; 3) con antioxidante: 1 mg de proteína + ascorbato + 500 µg del antioxidante. La emisión lumínica se cuantificó en un contador de centelleo líquido, determinándose las cuentas por minuto (cpm) cada 10 minutos durante 120 minutos.

Para la obtención del extracto de tomate se cortaron frutos frescos en cubos de aproximadamente 1 g, los que luego fueron desecados en estufa a 40 °C hasta obtener peso constante. De esta manera el efecto del calor sobre los carotenoides es mínimo. Posteriormente se procesaron en molinillo hasta obtener un polvo fino, el que se reservó en recipientes de vidrio color caramelo al abrigo de la luz. Diez gramos de polvo de tomate se colocaron en recipiente de vidrio con 100 ml de butanol para la extracción de la fracción de carotenoides (EFSA, 2008) durante 60 min con agitación magnética y el extracto total se concentró con rotaevaporador a 40 °C hasta sequedad. Posteriormente el residuo se resuspendió con etanol, quedando la concentración final de extracto total en 123 mg en 10 ml del alcohol. Para corroborar la presencia de los carotenoides (representados prin-

cialmente por el licopeno) una alícuota del extracto fue sometido al reactivo de Shinoda, utilizado para la detección de flavonoides (Shinoda, 1928), dando resultado positivo.

Resultados

1. Efecto de la variabilidad individual

Los valores promedio de los parámetros analizados se presentan en la Tabla 1.

Al analizar el efecto del tratamiento (temperatura según etapa), se observaron descensos de la calidad seminal muy marcados para la mayoría de los parámetros, a excepción de las anomalías espermáticas. Estas variaciones mostraron diferencias estadísticamente significativas (P<0,001) para los valores correspondientes a motilidad, porcentaje de espermatozoides vivos y de acrosomas normales.

Las posibles variaciones individuales tendieron a mostrar un efecto sobre la motilidad, aunque sin diferencias significativas (P<0,2).

Cuando se analizó el efecto individual según las distintas temperaturas del tratamiento de congelación, se encontró que para la variable motilidad esta diferencia fue estadísticamente significativa (P<0,001), lo que explica los bajos valores promedio para motilidad, debidos al efecto individual (Figuras 1, 2 y 3).

2. Efecto del uso de crioprotectores y del dodecil sulfato de sodio (SDS)

Los parámetros de calidad seminal se mantuvieron hasta los 5 °C, los valores promedio de motilidad y vigor fueron de 73,57 % y 3,07, respectivamente,

Tabla 1. Valores promedio de parámetros de calidad seminal, según temperaturas durante el proceso de congelación.

| Variable | Temperaturas durante el proceso de congelación | | | | Descongelado |
|----------------|--|----------------------|---------------------|---------------------|--------------|
| | 15 °C | 15 °C+A ¹ | 5 °C+A ¹ | 5 °C+B ² | |
| Motilidad (%) | 66,6±3,0a | 68,2±2,1a | 66,6±1,9a | 65,5±2,3a | 22,6±4,0b |
| Vitalidad (%) | 86,7±1,1a | 86,6±1,1a | 86,5±1,2a | 88,6±1,0a | 34,9±3,6b |
| Morfología (%) | 12,7±2,5 | 11,2±2,3 | 12,3±2,9 | 12,4±2,5 | 14,5±2,6 |
| Acrosomía (%) | 85,5±2,4a | 84,4±2,6a | 83,6±1,9a | 77,0±3,4a | 35,8±3,0b |

En la misma fila, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas P<0,001).

1: medio comercial para el enfriamiento, más el agregado de yema de huevo.

2: medio comercial para la congelación, más el agregado de yema de huevo y de glicerol.

Tabla 2. Promedio de porcentaje de motilidad, vitalidad y de acrosomas normales luego del enfriamiento (5 °C) diluido en los medios I, II, III y IV.

| Medios | Motilidad | Vitalidad | Acrosomía |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| I | 71,00 | 60,75 | 80,67 |
| II | 69,17 | 86,20 | 83,50 |
| III | 66,67 | 77,67 | 77,00 |
| IV | 71,00 | 87,20 | 76,50 |

Tabla 3. Promedio de porcentaje de motilidad, vitalidad y de acrosomas normales luego de la descongelación para los medios I, II, III y IV.

| Medios | Motilidad | Vitalidad | Acrosomía |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| I | 31,25 | 40,25 | 35,67 |
| II | 36,00 | 39,80 | 55,6 |
| III | 10,00 | 33,50 | 10,00 |
| IV | 45,00 | 40,67 | 44,00 |

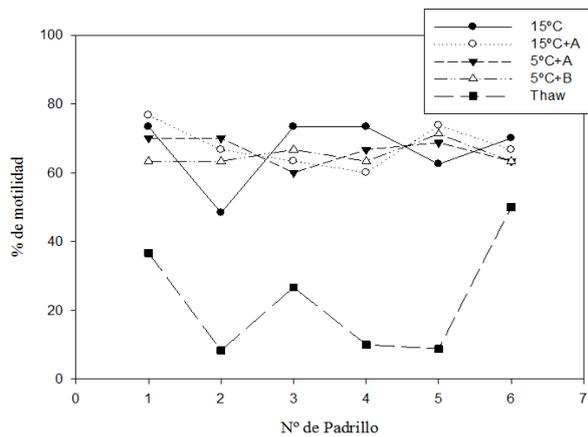


Figura 1. Motilidad según las etapas del proceso de congelación para los diferentes padrillos.

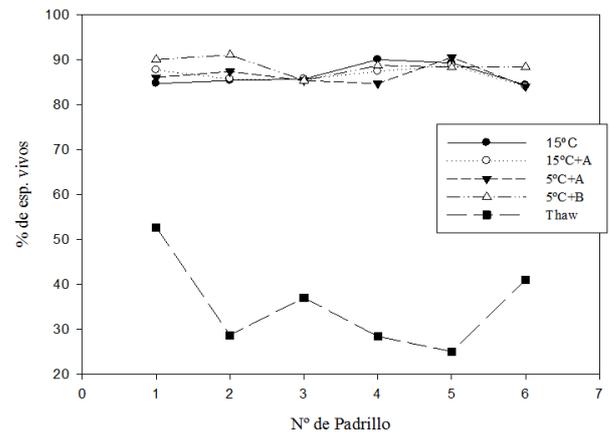


Figura 2. Vitalidad según las etapas del proceso de congelación para los diferentes padrillos.

la vitalidad fue de 82 % y la integridad acrosomal de 86,75 %.

En las Tablas 2 y 3 pueden observarse los valores promedio hallados luego de la dilución a 5 °C con los medios I, II, III y IV y de la descongelación. Observamos que la motilidad a 5 °C fue superior en el caso de los diluyentes I y IV en un 2,58 % y 6,1 % con respecto al medio II y III, respectivamente. A la descongelación estos parámetros fueron superiores en los medios IV y II en un 30,55 % y 13,19 % respecto al I. El vigor mostró similares variaciones. La vitalidad a 5 °C fue superior en el medio IV en un 1,14 % con respecto al II y a la descongelación I y IV obtuvieron similares resultados, superiores al II en un 2,13 %. La integridad acrosomal a 5°C fue mayor en el medio II en un 3,39 % respecto al medio I y a la descongelación se mantuvo superior la del medio II en un 20,86 % con respecto al IV.

Cuando se compararon los índices de congelabilidad de los 4 medios, se hallaron valores estadís-

ticamente significativos para el parámetro motilidad entre los medios III y IV ($P < 0,05$). Si bien los valores de acrosomas normales fueron similares, no se halló diferencia significativa, tal vez por haberse procesado menos muestras.

3. Efecto antioxidante *in vitro* de *Lycopersicum esculentum* en ensayos con semen porcino

Las muestras de semen porcino en las diferentes etapas del proceso de criopreservación fueron sensibles al proceso de lipoperoxidación. Los valores de quimioluminiscencia de las muestras peroxidadas sin antioxidante fueron aproximadamente 3 veces más elevados con respecto a las muestras control (Figura 4).

Comparando los valores de la emisión lumínica de las muestras con ascorbato- Fe^{++} , se observó que en presencia del antioxidante los valores fueron más bajos. Durante el proceso de PL, se observó que el

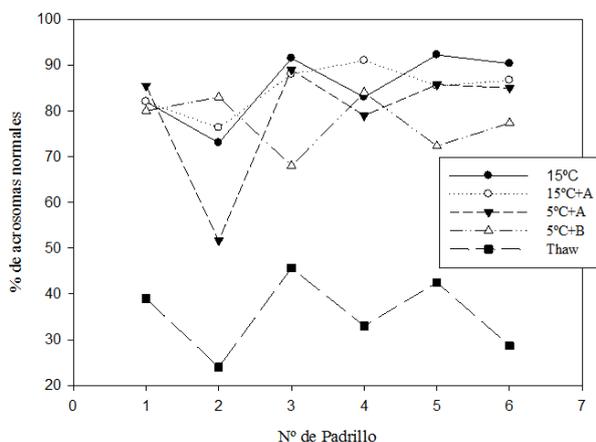


Figura 3. Acrosomas normales (%) según las etapas del proceso de congelación para los diferentes padrillos.

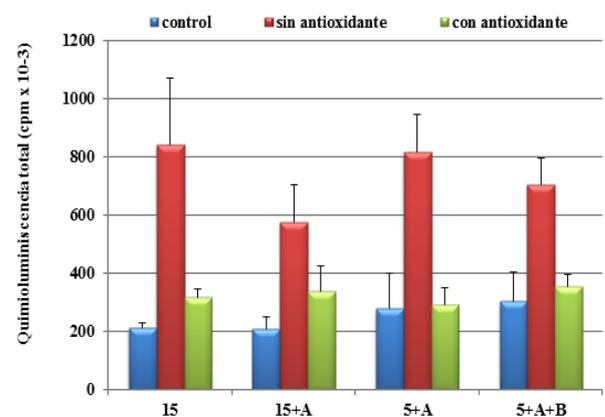


Figura 4. Valores de quimioluminiscencia de muestras peroxidadas con y sin antioxidante.

porcentaje de ácidos grasos insaturados de las muestras tratadas con ascorbato (31,3 %) disminuyó significativamente con respecto a los controles (53,73 %). El porcentaje de ácidos grasos insaturados de las muestras con el antioxidante fue de aproximadamente 62,03 %, siendo este valor similar al de las muestras controles (Figura 5).

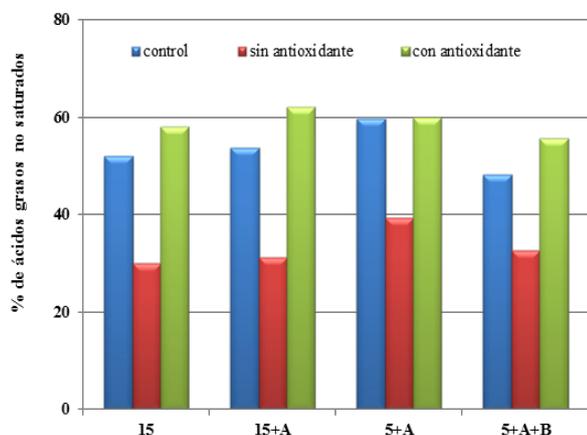


Figura 5. Porcentaje de ácidos grasos no saturados en muestras control, sin antioxidante y con antioxidante.

Discusión y conclusiones

Las diferencias en la composición química de la membrana espermática podrían explicar las variaciones individuales con respecto al congelado-descongelado y la pérdida de enzimas responsables de la metabolización de las especies reactivas del oxígeno (ROS, por su nombre en inglés) que produce la disminución de los compuestos antioxidantes en el medio extracelular tras la dilución y/o centrifugación previa a la congelación. En la especie porcina, las membranas poseen más moléculas de colesterol y una proporción de ácidos grasos saturados/insaturados diferente con respecto a otras especies, lo que predispone a mayores daños, por la alteración tanto química que producen los radicales libres, como física al bajar la temperatura, ya que la membrana se vuelve muy rígida y es más frágil.

Existen modificaciones del medio interno: alteraciones en el balance iónico de sodio, zinc y calcio, que se acumulan en el espacio intracelular, y de potasio y magnesio, que salen masivamente de la célula. Esto se debe a que las proteínas de la membrana que funcionan como bomba de iones disminuyen su actividad con el descenso de temperatura. Por otro lado, hay un efecto sobre el núcleo, debido a la supercondensación de la cromatina nuclear con incremento en la fragmentación del ADN del núcleo de los espermatozoides tras el proceso de congelación-descongelación.

Echegaray (2001) afirma que para congelar semen de verraco es absolutamente necesario realizar una selección previa de los animales que se van a utilizar: 1. Selección de los verracos por buena calidad seminal (motilidad superior al 80 %, vigor mayor a 4, y 80 % de acrosomas normales), 2. Selección de verracos por buena congelabilidad, considerándose, como un mínimo exigible, un 35 % de motilidad individual en las dosis descongeladas.

La membrana del espermatozoide se diferencia en regiones y muestra compartimientos diferentes, dependiendo de las regiones estructurales. El acrosoma (especialmente el segmento ecuatorial), el segmento posterior acrosómico, la pieza intermedia y la cola, con sus segmentos principal y final, son todos estructural y funcionalmente cruciales para la función espermática. Los protocolos de congelación/descongelación causan pérdidas de permeabilidad selectiva y de la integridad de estos compartimientos, sobre todo durante la descongelación (Medrano *et al.*, 2002a). La formación inadecuada de hielo y el subsiguiente estrés osmótico inducido durante la congelación y descongelación son los dos factores principales responsables de las alteraciones durante el proceso (Watson, 2000) y alteran las funciones del espermatozoide debido a modificaciones en los constituyentes de la membrana, particularmente los lípidos y las proteínas. Estos fenómenos podrían estar asociados con cambios proapoptóticos en espermatozoides causados por los ROS producidos bajo condiciones de estrés.

En este contexto, Waterhouse *et al* (2006) demostraron una relación entre los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en la membrana plasmática de los espermatozoides descongelados y diferencias individuales entre verracos en la crio-sensibilidad a la congelación. Estas diferencias entre verracos pueden relacionarse con las variaciones en la composición del espermatozoide.

Como en el caso de otros mamíferos (Holt *et al.* 2005, Loomis y Graham, 2008), la variabilidad entre individuos está demostrada también en el cerdo (Thurston *et al.*, 2001, Medrano *et al.* 2002b, Saravia *et al.*, 2005, Roca *et al.*, 2006b). Las diferencias entre verracos son el principal factor que explica la variación individual en la supervivencia de espermatozoides luego de la congelación/descongelación (Roca *et al.*, 2006a). Sin embargo, considerando que los eyaculados de determinados padrillos presentan la misma respuesta reproductiva con un mismo protocolo de congelación, se podría hacer un agrupamiento de los verracos como “buenos”, “moderados” o “pobres” congeladores, basado en la calidad del espermatozoide a la descongelación. Entre 20 y 33 % de los padrillos de centros de inseminación se consideran como “pobres” congeladores, probablemente con una

tendencia genética (Thurston *et al.*, 2002, Roca *et al.*, 2006a, 2006b, Hernández *et al.*, 2007a).

Con el objetivo de minimizar los efectos negativos de la variabilidad entre verracos en la calidad del esperma posterior a la descongelación, la industria biotecnológica de la reproducción debe primero enfrentar la identificación potencialmente de “buenos” o “pobres” congeladores. Además, deberían adoptarse medidas para la mejora de la supervivencia de eyaculados obtenidos y clasificados como “pobres” congeladores. La posibilidad de congelar esos eyaculados sigue siendo importante en el contexto del recurso de bancos genéticos y el intercambio internacional de material genético (Holt *et al.*, 2005). Tal acción podría emprenderse individualizando el protocolo de congelación/descongelación. Un ejemplo es la confección de protocolos individuales de congelación-descongelación, un concepto sugerido por Watson (1995) y recientemente aplicado por Hernández *et al.* (2007b) utilizando un llamado test de identificación de eyaculados de acuerdo a su capacidad de congelabilidad (SFT, del inglés *Split Freezability Test*). Se encontró una interacción significativa entre los protocolos de congelación/descongelación y los eyaculados, con la influencia de la tasa de concentración de glicerol y la tasa de calentamiento en la descongelación. Este procedimiento permitió reducir el porcentaje de “pobres” congeladores de 26,4 a 7,5 %. Recientemente se ha presentado una alternativa consistente en la congelación de los primeros 10 ml de la fracción rica de cada eyaculado (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2008; Saravia *et al.*, 2009a; b).

En presencia de un agente crioprotector apropiado, aunque se produzcan alteraciones, muchas células sobreviven el proceso. El glicerol es el crioprotector más comúnmente utilizado, en concentraciones de entre 2 y 4 % para semen porcino, aunque debido a que puede llegar a tener efectos tóxicos se han utilizado sustancias alternativas como las amidas DMA (dimetilacetamida) y el DMSO (dimetilsulfóxido). Debido a su menor peso molecular y mayor solubilidad en agua, las amidas disminuyen la formación intracelular de cristales de hielo y provocan una mínima toxicidad y un menor daño osmótico. Sin embargo, con su uso, la motilidad y la integridad de membrana fueron menores que cuando se criopreservó con glicerol al 3 % (Suhee *et al.*, 2011).

En nuestro trabajo, comparando los distintos valores de calidad con los medios con glicerol al 4 % (I y II), se obtuvieron valores aceptables en todos los parámetros estudiados. Estos resultados son similares a los obtenidos por Corcuera *et al.* (2007), quienes compararon distintas concentraciones de glicerol en el medio de congelación. Con respecto a la concentración de SDS, los mejores resultados se obtuvieron con

la menor concentración, resultando la mejor combinación la de 4 % de glicerol y 0,5 % de SDS, coincidente con la utilizada por Córdoba-Izquierdo *et al.* (2005).

Ekwall (2009), utilizando un microscopio electrónico de crio-exploración (Cryo-SEM), observó que se forma una solución viscosa dentro y fuera del espermatozoide, conformando una matriz vítrea relativamente estable, que se mantiene cuando los espermatozoides se almacenan a -196 °C. La mayoría de las células se dañan durante la descongelación y exhibe membranas y axonemas alterados por el desequilibrio osmótico que ha sido creado durante la congelación (Morris 2006; Morris *et al.*, 2007).

El estrés oxidativo durante los procesos de congelación-descongelación, debido a la excesiva generación de ROS o a deficiencias en el sistema de defensa antioxidante, puede inducir graves modificaciones a biomoléculas como proteínas, lípidos y ADN mitocondrial (ADNmt), así como al ADN nuclear (ADNn), que podrían llevar a alterar sus propiedades y, eventualmente, a la muerte celular (Aitken y Baker, 2004). Los cambios proapoptóticos en espermatozoides crio-preservados se caracterizan por mayor concentración de Ca⁺⁺, alteración en el potencial de membrana mitocondrial, reducción de los niveles de ATP y la cesión de factores proapoptóticos del citoplasma (Martin *et al.*, 2004; 2005; Peña *et al.*, 2009).

Los antioxidantes previenen la lipoperoxidación utilizando diferentes mecanismos. Por lo tanto, se ha probado el agregado de varios antioxidantes a diferentes fracciones del eyaculado del verraco para mejorar la supervivencia posterior a la descongelación (Peña *et al.*, 2003, Gadea *et al.*, 2005), incluyendo butilato de hidroxitolueno (BHT, Roca *et al.*, 2004), catalasa, superóxido dismutasa (SOD, Roca *et al.*, 2005), glutatión reductasa (GSH, Woelders *et al.*, 1996) y α -tocoferol (Breininger *et al.*, 2005). Este último reduce el daño oxidativo de las membranas del espermatozoide inducido por la congelación, la fosforilación de la proteína tirosina y los eventos semejantes a la capacitación espermática (Satorre *et al.*, 2007).

El semen porcino posee altos niveles de ácidos grasos no saturados. Estos ácidos grasos expuestos a un sistema *in vitro*, en presencia de ascorbato, fueron vulnerables a la peroxidación lipídica. El licopeno es un antioxidante natural que posee una elevada capacidad *in vitro* para ligarse al oxígeno singulete. Nuestros resultados indican que la lipoperoxidación podría ser uno de los mecanismos bioquímicos responsables de los cambios fisiológicos durante la criopreservación y que el licopeno ejerce un efecto protector, ya que los principales ácidos grasos insaturados no fueron afectados por el proceso de lipoperoxidación. Ensayos futuros nos permitirán confirmar esta presunción.

Se concluye que, para la preservación de semen porcino mediante la congelación, se requiere identificar verracos “buenos” congeladores, así como optimizar el proceso de congelación según las características individuales, con el propósito de disminuir los mecanismos bioquímicos responsables de los cambios fisiológicos que sufre el espermatozoide, con adecuadas concentraciones del crioprotector y el empleo de sustancias antioxidantes de efecto protector a la lipoperoxidación.

Referencias Bibliográficas

Aitken RI, Baker MA. Oxidative stress and male reproductive biology. *Reprod Fertil Dev.* 2004; 16:581-8.

Breining E, Beorlegui NB, O'Flaherty CM, Beconi MT. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology.* 2005; 63:2126-35.

Cerolini S, Maldjian A, Surai P, Noble R. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Anim Reprod Sci.* 2000; 58:99-111.

Corcuera BD, Marigorta A, Sagües F, Saíz-Cidoncha JF, Pérez Gutiérrez JF. Effect of lactose and glycerol on the motility, normal apical ridge, chromatin condensation and chromatin stability of frozen boar spermatozoa. *Theriogenology.* 2007; 67: 1150-7.

Córdoba-Izquierdo A, Oliva JH, Lleó B, García Artiga C, Corcuera BD, Pérez Gutiérrez JF. Effect of different temperatures on the viability, *in vitro* fertilizing capacity and chromatin condensation of frozen boar semen packaged in 5 ml straws. *Anim Reprod Sci.* 2005; 92:145-54.

Crabo BG, Einarsson S. Fertility of deep frozen boar spermatozoa. *Acta Vet Scand Suppl.* 1971; 12:125-27.

Dandekar SP, Nadkarni GD, Kulkarni VS, Puneekar S. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in male infertility. *J Postgrad Med.* 2002, 48:186-9.

Echegaray A. ¿Para cuándo el semen porcino congelado? *Venezuela Porcina.* 2001; 17(48):3-5.

EFSA (European Food Safety Authority). Use of lycopene as a food colour. *The EFSA Journal.* 2008; 674:1-66.

Ekwall H. Cryo-scanning electron microscopy discloses differences in dehydration of frozen boar semen stored in large containers. *Reprod Domest Anim.* 2009; 44:62-68.

Eriksson BM, Petterson H, Rodríguez-Martínez H. Field fertility with exported boar semen frozen in the new flatpack container. *Theriogenology.* 2002; 58(6):1065-79.

Eriksson BM, Rodríguez Martínez H. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in Flatpacks and Maxi-straws. *Anim Reprod Sci.* 2000; 63(3-4):205-20.

Faudale M, Viladomat F, Bastida J, Poli F, Codina C. Antioxidant activity and phenolic composition of wild, edible, and medicinal fennel from different Mediterranean countries. *J Agric Food Chem.* 2008; 26(6):1912-20.

Folch J, Less M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem.* 1957; 226:497-509.

Gadea J, García-Vázquez F, Matas C, Gardon IC, Canovas S, Gumbao D. Cooling and freezing of boar spermatozoa: Supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function. *J Androl.* 2005; 26:396-404.

Graham EF, Rajamannan AHJ, Schmehl MKL, Maki-Laurila M, Bowe RE. Preliminary report on procedure and rationale for freezing boar semen. Reprint for *AI Digest.* 1971; 19:12-4.

Hernández M, Roca J, Calvete JJ, Sanz L, Muiño-Blanco T, Cebrian-Pérez JA. Cryosurvival and *in vitro* fertilizing capacity post thaw is improved when boar spermatozoa are frozen in the presence of seminal plasma from good freezer boars. *J Androl.* 2007a; 26:689-97.

Hernández M, Vázquez JM, Martínez EA, Roca J. Oxidative stress during the cryopreservation of boar spermatozoa. *Reprod Fertil Dev.* 2007b; 19:177.

Holt WV, Medrano A, Thurston I, Watson PF. The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from cryomicroscope. *Theriogenology.* 2005; 63:370-82.

Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC. Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci.* 2000; 62:143-72.

Loomis PR, Graham JK. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Anim Reprod Sci.* 2008; 105119-105128.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193:265-75.

Martin G, Sabido, O, Durand P, Levy R. Cryopreservation induces an apoptosis like mechanism in bull sperm. *Biol Reprod.* 2004; 71:2B-37.

Martin G, Sabido, O, Durand P, Levy R. Phosphatidylserine externalization in human sperm induced by calcium ionophore A23187: relationship with apoptosis, membrane scrambling and the acrosome reaction. *Hum Reprod.* 2005; 20:3459-88.

Martínez EA, Vázquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA, Parrilla I, Vázquez JL, Day BN. Minimum number of spermatozoa required for normal fertility after deep intrauterine insemination in non-sedated sows. *Reproduction.* 2002; 123:163-70.

Martínez, EA, Vázquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA, Parrilla I, Vázquez JL, Day BN. Successful non-surgical deep intrauterine insemination with small number of spermatozoa in sows. *Reproduction.* 2001; 122:289-96.

Medrano A, Anderson J, Millar JO, Holt WV, Watson PF. A custom-built controlled-rate freezer for small sample cryopreservation studies. *CryoLetters,* 2002a, 23397-404.

Medrano A, Watson PF, Holt WV. Importance of cooling rate and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Reproduction.* 2002b; 123:315-22.

Morris GJ, Faszer K, Green JE, Draper O, Grout BW, Fonseca F. Rapidly cooled horse spermatozoa: loss of viability is due to osmotic imbalance during thawing, not intracellular ice formation. *Theriogenology.* 2007; 68:804-12.

Morris GJ. Rapidly cooled human sperm: no evidence of intracellular ice formation. *Hum Reprod.* 2006, 21:2075-83.

Peña FJ, Iohannisson A, Wallgren M, Rodríguez Martínez

- H. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Anim Reprod Sci.* 2003; 78:85-98.
- Peña FJ, Rodríguez-Martínez H, Tapia JA, Ortega Ferrusola C, Gonzales Fernández L, Macías García B. Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: A review. *Reprod Domest Anim.* 2009; 44:345-9.
- Polge C, Salamon S, Wilmut I. Fertilizing capacity of frozen semen following surgical insemination. *Vet Rec.* 1970; 87:424-8.
- Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and desiccation at low temperatures. *Nature.* 1949; 164:666.
- Pursel VG, Johnson LA. Frozen boar spermatozoa: methods of thawing pellets. *J Anim Sci.* 1976; 42:927-31.
- Pursel VG, Johnson LA. Procedure for the preservation of boar spermatozoa by freezing. *US Dept Agri ARS.* 1971; 44:227.
- Roca J, Gil MA, Hernández M, Parrilla I, Vázquez JM, Martínez EA. Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *J Androl* 2004, 25: 389-96.
- Roca J, Hernández M, Carvajal G, Vázquez JM, Martínez EA. Factors influencing boar sperm cryosurvival. *J Anim Sci,* 2006a, 84 2692-99.
- Roca J, Rodríguez MJ, Gil MA, Carvajal G, García EM, Cuello C, Vázquez JM, Martínez EA. Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase or catalase or both. *J Androl.* 2005; 26:15-24.
- Roca J, Rodríguez-Martínez H, Vázquez JM, Bolarin A, Hernández M, Saravia F, Wallgren M, Martínez EA. Strategies to improve the fertility of frozen thawed boar semen for artificial insemination. En: Ashworth CJ and Kraeling RR (Eds), 2006b. *Control of Pig Reproduction VII.* Nottingham: Nottingham University Press, pp. 261-275.
- Rodríguez-Martínez H, Saravia F, Wallgren M, Roca I, Peña FI. Influence of seminal plasma on the kinematics of boar spermatozoa during freezing. *Theriogenology.* 2008; 70:1242-50.
- Saravia F, Wallgren M, Johannisson A, Calvete JJ, Sanz L, Peña FI, Roca J, Rodríguez-Martínez H. Exposure to the seminal plasma of different portions of the boar ejaculate modulates the survival of spermatozoa cryopreserved in MiniFlatPacks. *Theriogenology.* 2009b; 71:662-75.
- Saravia F, Wallgren M, Nagy S, Johannisson A, Rodríguez Martínez H. Deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine insemination: effects on sperm viability. *Theriogenology.* 2005; 63:1320-33.
- Saravia F, Wallgren M, Rodríguez-Martínez H. Freezing of boar semen can be simplified by handling a specific portion of the ejaculate with a shorter procedure and MiniFlatPack packaging. *Anim Reprod Sci.* 2009a; 117(3-4):279-87.
- Satorre MM, Breininger E, Beconi MT, Beorlegui NB. α -Tocopherol modifies tyrosine phosphorylation and capacitation-like state of cryopreserved porcine sperm. *Theriogenology.* 2007; 68:958-65.
- Sheweita SA, Tilmisany AM, Al-Sawaf H. 2005. Mechanism of male infertility: role of antioxidants. *Curr Drug Metab.* 2005; 6:495-501.
- Shinoda J. A new biologically active flavone glycoside from the roots of *Cassia fistula* Linn. *J Pharm Soc Jpn.* 1928; 48:214-20.
- Suhee Kim, Young-Jun Lee, Dong-Beom Ji, Yong-Jun Kim. Evaluation of different cryoprotectants (CPAs) in boar semen cryopreservation. *J Vet Med Sci.* 2011; 73 (7):961-3.
- Thurston LM, Siggins K, Mileham AJ, Watson PF; Holt WV. Identification of amplified restriction fragment length polymorphism makers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. *Biol Reprod.* 2002; 66: 545-54.
- Thurston LM, Watson PF, Mileham AJ, Holt WV. Morphological distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *J Androl.* 2001; 22: 382-94.
- Vázquez JM, Roca J, Gil MA, Cuello C, Parrilla I, Vázquez JL, Martínez EA. New developments in low-dose insemination technology. *Theriogenology.* 2008; 70(8): 1216-24.
- Waterhouse KE, Hofmo PO, Tverdal A, Miller Jr RR. Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar semen. *Reproduction.* 2006; 131:887-94.
- Watson P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci.* 2000; 60-61:481-92.
- Westendorf P, Ritcher L, Tren H. Zur tiefgefrierung von ebesperma: labor und besamungsergebnissmint dem Hülsemberger pailleten verfarren. *Dtsch Tierärztl Wschr.* 1975; 82:261-7.
- Woelders H, Matthijs A, Den Beston M. Boar variation in "freezability" of the semen. *Reprod Domest Anim.* 1996; 31:153-9.
- Wright JR, Rumbaugh RC, Colby HD, Miles PR. The relationship between chemiluminescence and lipid peroxidation in rat hepatic microsomes. *Arch Biochem Biophys.* 1979; 192:344-51.

Conflictos de intereses

Todos los autores declaran que no existen conflictos de intereses, incluyendo las relaciones financieras, personales o de otro tipo con otras personas u organizaciones que pudieran influir de manera inapropiada en el trabajo.

Diagnóstico de leptospirosis mediante técnicas moleculares: ventajas y limitaciones en Medicina Veterinaria

Diagnosis of leptospirosis by molecular techniques: advantages and limitations in veterinary medicine

Martin PL^{1*}, Arauz MS¹, Stanchi NO^{1,2}

¹Laboratorio de leptospirosis. Hospital escuela. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata ²Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Católica de Cuyo
*Autor correspondiente. Correo electrónico del autor: mpaulalorena@gmail.com

Resumen: La leptospirosis constituye una zoonosis emergente de distribución mundial causada por espiroquetas patógenas del género *Leptospira*. La enfermedad reviste gran importancia tanto a nivel económico como en la salud pública. El diagnóstico de la leptospirosis es complejo y generalmente se realiza por métodos bacteriológicos y serológicos. En las últimas décadas la aplicación de técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha permitido el diagnóstico de muchas enfermedades de etiología microbiana, incluida la leptospirosis. El objetivo de este trabajo fue realizar una revisión de los protocolos de PCR publicados en medicina veterinaria para resaltar las ventajas y desventajas de esta técnica aplicada al diagnóstico clínico y a estudios epidemiológicos. Aunque, la aplicación de técnica de PCR demostró ser un complemento útil de los métodos de referencia, son necesarios estudios adicionales en relación a la utilización de la misma para el diagnóstico de la enfermedad en animales. Concluimos que al interpretar los resultados obtenidos con la técnica de PCR se debe considerar: incluir un control interno de amplificación en cada protocolo y optar por técnicas de PCR anidada o en tiempo real debido a su mayor sensibilidad y especificidad.

Palabras clave: PCR, *Leptospira*, diagnóstico veterinario

Abstract: Leptospirosis is an emerging worldwide zoonosis caused by pathogenic spirochaetes of the genus *Leptospira*. The disease is of great importance both economically and for the public health. The diagnosis of leptospirosis is complex and usually done by bacteriological and serological methods. In recent decades, the application of molecular techniques such as Polymerase Chain Reaction (PCR) has achieved the diagnosis of many diseases of microbial etiology, including leptospirosis. The aim of this study was to review PCR protocols published in veterinary medicine to highlight the advantages and disadvantages of this applied technique to clinical diagnosis and epidemiological studies. Although the application of PCR proved to be a useful complement to the referenced methods, additional studies are needed regarding the use of it for the diagnosis of disease in animals. We conclude that the interpretation of the results obtained with the PCR technique must include an internal amplification control for each protocol and must choose nested PCR techniques or real time, due to its higher sensitivity and specificity.

Key Words: PCR, *Leptospira*, veterinary diagnostic

Introducción

La leptospirosis constituye una zoonosis de distribución mundial causada por espiroquetas patógenas del género *Leptospira*. Actualmente es considerada una enfermedad infecciosa emergente debido a los brotes epidémicos que ocasiona, en su mayoría asociados a desastres naturales tales como inundaciones (Alemayehu 2012; Cruz *et al* 2009; Levett 2001). La principal fuente de infección la constituyen los animales domésticos y silvestres, quienes actúan como reservorios debido a que mantienen a la *Leptospira* spp. principalmente en riñón, contaminando por intermedio de la orina el medio ambiente (Bengis *et al* 2004).

En animales de producción, las pérdidas económicas que ocasiona están vinculadas a alteraciones reproductivas, muertes perinatales y disminución de la producción láctea (Draghi *et al* 2010; Gyles 2008). En el ser humano, la leptospirosis produce desde una enfermedad leve hasta cuadros que comprometen la vida como la neumonía hemorrágica o la forma icterohemorrágica conocida como enfermedad de Weil (Helmerhorst *et al* 2012; Krishnappa *et al* 2012; Li Cavoli *et al* 2012; Seijo *et al* 2002).

A pesar de su relevancia en la salud humana y en la economía del país, la leptospirosis se encuentra entre las enfermedades zoonóticas subdiagnosticadas. Las explicaciones a este hecho se basan posiblemente en su forma de presentación clínica y la metodología disponible para el diagnóstico. En cuanto a su presentación clínica, la enfermedad tanto en humanos como en animales tiene un amplio rango de signos clínicos sin embargo, ninguno es patognomónico siendo confundidos con los de otras enfermedades infecciosas. Acrecentando aún más la complejidad, la existencia de una forma subclínica de la enfermedad en muchas especies de animales, los convierte en eliminadores de *Leptospira* spp. favoreciendo su diseminación al medio ambiente (Adler *and de la Pena Moctezuma* 2010). Por otro lado en el diagnóstico, los métodos estándares son laboriosos y requieren personal bien entrenado, por lo que se realiza sólo en laboratorios especializados. El test de microaglutinación (MAT) considerado la técnica *gold standard* tanto en humanos como en animales constituye un método altamente específico sin embargo, presenta importantes limitaciones principalmente en la fase aguda de la enfermedad dada la ausencia de anticuerpos detectables en suero. Asimismo, la interpretación de los resultados requiere de muestras pareadas con un intervalo de 15 a 21 días para observar seroconversión (suero agudo y convaleciente) y así obtener un resultado confirmatorio (Barthi *et al* 2003; WHO 2003). El diagnóstico mediante el aislamiento del microorganismo no resulta útil desde el punto de vista clínico debido a que requiere varias semanas

para su confirmación y es frecuente la contaminación con otros microorganismos (Levett 2001).

En las últimas décadas la aplicación de técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha permitido mejorar el diagnóstico de leptospirosis. Hasta la fecha se han publicados numerosos protocolos de PCR punto final y en tiempo real para detección y/o cuantificación de *Leptospira* spp. en diversas muestras tanto clínicas como ambientales (Agampodi *et al* 2012; Aghaiypour *and Safavieh* 2007; de Abreu Fonseca *et al* 2006; Natarajaseenivasan *et al* 2012; Vein *et al* 2012; Yasouri *and Ghane* 2014). Sin embargo, pocos han sido sometidos a un riguroso protocolo de validación para su aplicación confiable en el diagnóstico de leptospirosis humana (Brown *et al* 1995; Gravekamp *et al* 1993; Merien *et al* 1992) siendo aún más escasos los protocolos validados para veterinaria.

El objetivo de este trabajo fue realizar una revisión de los diferentes protocolos de la técnica de PCR publicados en medicina veterinaria, con el fin de conocer su utilidad y las principales limitaciones de esta técnica aplicada al diagnóstico clínico y a estudios epidemiológicos.

Generalidades de la técnica de PCR:

La reacción en cadena de la polimerasa constituye una reacción enzimática que permite obtener un gran número de copias de una secuencia determinada a partir de un segmento específico de ADN. Todas las variaciones de la técnica (punto final y en tiempo real) comparten el mismo fundamento, sin embargo la principal diferencia se basa en el tiempo o fase en la cual se recolectan los datos. Así, en la PCR punto final la detección de los fragmentos amplificados se lleva a cabo por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio al final del proceso de amplificación (Wilson 2005). Mientras que, en la PCR en tiempo real los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en la fase exponencial, la lectura en este caso es realizada mediante la utilización de agentes intercalantes o sondas marcadas con fluoróforos. Esto permite medir la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, debido a que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado (Gibson 2006).

La técnica de PCR se caracteriza por ser un método de diagnóstico altamente sensible y específico. En los protocolos de PCR punto final, la sensibilidad se halla entre valores de 100 a 1.000 copias del genoma del microorganismo en estudio; mientras que la especificidad analítica alcanza valores aceptables dependiendo del diseño de los cebadores entre otros

factores. Tanto la sensibilidad como la especificidad pueden mejorarse mediante la aplicación de lo que se conoce como PCR anidada o nested-PCR, así como mediante la comprobación de los productos amplificados por hibridación con sondas marcadas. Sin embargo, esto conlleva tiempo adicional e inconvenientes de contaminación con falsos positivos. Por ese motivo no se aplica rutinariamente en los laboratorios de diagnóstico. En los ensayos de PCR anidada se utilizan dos ciclos de amplificación con cuatro cebadores, denominados cebadores externos e internos. Esto permite por un lado, aumentar la sensibilidad a 10 copias de genoma del microorganismo en estudio y por otro, incrementar la especificidad debido a que cuatro oligonucleótidos deben unirse específicamente a las secuencias seleccionadas para producir una reacción positiva (OIE 2008). Por su parte, en la PCR en tiempo real la sensibilidad es igual o superior a la de una PCR anidada, pero con un riesgo de contaminación menor debido a que la fluorescencia es medida a través del recipiente de reacción, de forma que no es necesario el manejo posterior de los productos amplificados (Kubista *et al* 2006).

Dos aspectos importantes a tener en cuenta en la utilización de las variantes de la técnica de PCR constituyen los controles utilizados y el proceso de validación seguido. Toda técnica de PCR debe incluir un control de sistema, es decir la mezcla de reacción de PCR sin ADN del microorganismo en estudio y uno o más controles externos positivos y negativos. Estos últimos son segmentos de ADN conocidos, que se analizan en tubos independientes del ADN problema. Además, la utilización cada vez más frecuente de un control interno de amplificación incluido en cada uno de los tubos de PCR con el ADN problema permite identificar resultados falsos negativos causados por inhibidores de la PCR o errores en el proceso de extracción. Por lo tanto, si una muestra diera negativa al gen buscado pero existiera amplificación del control interno se puede concluir que el *target* buscado está ausente o por debajo del límite de detección de la técnica (Hoorfar *et al* 2004).

Con referencia al proceso de validación existen numerosos protocolos a seguir, pero es importante remarcar algunos conceptos o definiciones que usualmente se utilizan de manera incorrecta. La sensibilidad analítica se refiere al número de copias mínimo en una muestra que puede ser adecuadamente medido con un ensayo; mientras que la sensibilidad clínica es el porcentaje de individuos con un desorden dado a quienes el ensayo identifica como positivos para esa condición. El límite de detección (LOD) es la concentración que puede ser detectada con certeza en un procedimiento analítico dado (95 % de probabilidad). La especificidad analítica se refiere a la detección de la

secuencia específica que se desea analizar; mientras que la especificidad diagnóstica es el porcentaje de individuos sin una condición dada a quienes el ensayo identifica como negativos para esa condición (Bustin *et al* 2009).

Principales diferencias en las técnicas moleculares para la detección de *Leptospira* spp.

Hasta la fecha varios protocolos de PCR punto final y en tiempo real han sido publicados para el diagnóstico de leptospirosis en las distintas especies animales. Las diferencias entre ellos radican fundamentalmente en los cebadores y muestras clínicas utilizadas como también, en los resultados de sensibilidad y especificidad obtenidos.

Cebadores

Con respecto a los cebadores, Van Eys *et al* (1989) utilizaron secuencias desarrolladas a partir de librerías genómicas para detectar específicamente *Leptospira* spp. pertenecientes al serovar Hardjo-Bovis en muestras de orina de bovinos, mientras que otros autores utilizaron elementos repetitivos presentes en el genoma de *Leptospira* spp. serovar Hardjo-Bovis con el fin de aumentar la sensibilidad de la técnica (Woodward and Sullivan 1991). Por otra parte, Zuerner *et al* (1995) desarrollaron un método basado en la técnica de PCR con cebadores diseñados a partir de secuencias de inserción (IS 1533) presentes en el genoma de *Leptospira interrogans sensu lato*, que permite la identificación de serovares mediante el análisis directo de la orina de los animales infectados.

Asimismo, los cebadores han sido desarrollados a partir de genes definidos. En este contexto, hay ensayos basados en la detección de secuencias específicas de genes tales como *rrs* que codifica para la subunidad ribosomal 16S (Doosti *et al* 2012; Merien *et al* 1992; Rodriguez *et al* 2001), *rrl* codifica para la subunidad ribosomal 23S (Woo *et al* 1997; Rodriguez *et al* 2001) *gyrB*, gen que codifica la subunidad B de la enzima ADN girasa (Slack *et al* 2006), y *secY* codificante para una proteína translocasa (Ahmed *et al* 2009; Victoria *et al* 2008). Además existen ensayos basados en la detección de genes presentes sólo en especies patógenas del Género *Leptospira* (OIE 2014), por ejemplo *lipL21* (Cheemaa *et al* 2007), *lipL32* (Azizi *et al* 2012; Bomfim *et al* 2008; Garcia Monte *et al* 2012; Levett *et al* 2005), *lipL41* (Balassiano *et al* 2012), *ligA* y *ligB* (Palaniappan *et al* 2005; Xu *et al* 2014)

A partir del gen *rrs* se han desarrollado cebadores que detectan todas las especies del género *Leptospira* (patógenas, intermedias y no patógenas).

Tabla 1. Cebadores, muestra, sensibilidad, especificidad y técnicas de PCR utilizadas para el diagnóstico de la leptospirosis por diferentes autores.

| Cebadores utilizados | Tipo de muestra | Sensibilidad | Especificidad | Técnica de PCR | Referencia |
|---|--|---|---|------------------------------------|--|
| Secuencia del clon pLBec23s derivado de una librería genómica de <i>L. interrogans</i> serovar Hardjo, tipo Hardjo-Bovis, cepa HB013. | Orina de bovinos | 10-20 <i>Leptospira</i> por reacción. Muestras de orina y medio añadidas. | No observó amplificación con otros serogrupos, bacterias (n=10) ni ADN de eucariotas | Punto final | Van Eys <i>et al</i> 1989 |
| Elemento repetitivo del genoma de <i>L. interrogans</i> serovar Hardjo tipo Hardjo-Bovis | Cepas puras | Sin datos | 30 aislamientos de Hardjo-Bovis fueron positivos. 12 aislamientos de Hardjoprajitno y Saxkoebing fueron negativos | Punto final | Woodward and Sullivan 1991 |
| Secuencia de Inserción 1533 | Orina de bovinos | Sin datos | Sin datos | Punto final | Zuerner <i>et al</i> 1995 |
| Gen rrs de la subunidad ribosomal 16S | Cultivo, LCR, orina y sangre con agregado de cepas puras. Orina de ratones infectados experimentalmente. Orina, LCR y sangre de humanos | Límite más bajo de detección fue 1 pg de ADN. Sensibilidad analítica 10 ² microorganismos. | 20 serotipos de <i>Leptospira</i> fueron positivos. Otras bacterias fueron negativas (n=13) | Punto final | Merien <i>et al</i> 1992 |
| Gen rrl, rrs y hap1 | Orina de bovinos | 100 % S. clínica comparada con el cultivo | 99 % E. clínica comparada con el cultivo | Punto final | Rodríguez <i>et al</i> 2001 (según León <i>et al</i> 2006) |
| Gen rrs de la subunidad ribosomal 16 S | Muestras de sangre de camélidos. | Sin datos | Sin datos | Punto final | Doosti <i>et al</i> 2012 |
| Gen rrs de la subunidad ribosomal 16 S | Cepas puras. Muestras de sangre y orina de humanos | S. analítica: dos células en suero y 10 células en orina. | E. analítica: Resultado positivo con 29 cepas de <i>Leptospira</i> y negativo con 22 de otros organismos | Tiempo real con sonda TaqMan | Smythe <i>et al</i> 2002 |
| Gen gyrB codificante de la subunidad B de la enzima ADN girasa | Suero y sangre con EDTA de pacientes humanos | S. analítica 10 copias del genoma por reacción. S clínica 96,4 % | E. clínica 99,5 % | Tiempo real con sonda TaqMan | Slack <i>et al</i> 2006 |
| Gen secY | Cepas puras, suero, sangre con anticoagulante y tejidos de pacientes humanos. | S. analítica: 1-1,5 copias de genoma una copia por reacción para cultivos. De 10-50 copias para muestras de sangre, suero y tejido renal. | E. analítica: todas las especies patógenas del género dieron un resultado positivo. No observaron reacción cruzada con especies saprófitas ni con otros géneros bacterianos | Tiempo real con química SYBR green | Ahmed <i>et al</i> 2009 |
| Gen lipL32 | Cepas puras. Sangre y orina de pacientes humanos. | S. analítica 3 copias en sangre 10 en orina | Sin datos | Tiempo real con SYBR green | Levett <i>et al</i> 2005 |

L. Martín y col.

| | | | | | |
|---|---|---|---|--|-------------------------------|
| Gen lipL32 | Cepas puras. Sangre con anticoagulante, suero, plasma y orina de pacientes humanos. | S. analítica: 1×10^1 <i>Leptospira</i> spp/ml de sangre; 1×10^3 <i>Leptospira</i> spp /ml de suero; 1×10^2 <i>Leptospira</i> spp /ml | E. analítica 100 % | Tiempo real con sonda TaqMan | Stoddard <i>et al.</i> 2009 |
| Gen ligA ligB | | S. analítica 6 <i>Leptospira</i> spp/ml con PCR punto final y 10 genomas / reacción con PCR tiempo real | E. analítica se observó amplificación con todos los serovares de <i>Leptospira</i> spp. No se observó amplificación con serovares de especies no patógenas ni con otros géneros | Punto final y tiempo real con sonda TaqMan | Palaniappan <i>et al</i> 2005 |
| Gen lig | Sangre y orina de caninos | 20 copias del gen <i>lig</i> / ml sangre y 10 copias/ 3-4 ml de orina | 100 % | Tiempo real con sondas FRET | Xu <i>et al</i> (2014) |
| G1-G2 (Secuencia del plásmido recombinante pLIPs60) B64I- B64II (Secuencia del plásmido recombinante pBIM64) | Cepas puras, muestras de suero humano | 1-10 <i>Leptospira</i> spp/ml de suero con agregado artificial de <i>Leptospira</i> . La PCR (50 %) más sensible que el cultivo (35 %). | Utilizando ambos cebadores amplificaron todas las especies patógenas. | Punto final | Gravekamp <i>et al</i> 1994 |

Ref. S. sensibilidad E. Especificidad.

La principal ventaja de su utilización es la mayor sensibilidad analítica debido a que presenta doble número de copias en el cromosoma de las especies de *Leptospira* (Nascimento *et al* 2004). Además puede facilitar la identificación de especies y/o cepas no descritas previamente y aquellas en las que todavía no se ha podido demostrar su condición de patógenas como el caso de las especies intermedias (Thaipadunpanit *et al* 2011; Zakeri *et al* 2010). Sin embargo, una importante limitación de este *target* es que al ser un gen conservado en el reino Bacteria puede amplificar segmentos de ADN de microorganismos no relacionados con *Leptospira* spp. disminuyendo de esta manera la especificidad analítica de la técnica (Villumsen *et al* 2012).

Otros autores como Smythe *et al* (2002) y Fearnley *et al* (2008), utilizaron cebadores dirigidos a una región conservada de la secuencia del gen *rrs* (16S ARNr) de especies patógenas de *Leptospira* spp. lo que permitió discriminar entre especies patógenas y saprófitas.

Por su parte, la utilización de cebadores dirigidos a genes presentes sólo en especies patógenas, proporciona un diagnóstico altamente específico debido a que al ser regiones conservadas entre las especies patógenas del género *Leptospira* no presentan el inconveniente de amplificar secuencias semejantes en otros microorganismos. La principal limitación del uso de estos *targets* recae en que no detectan especies intermedias tales como *L. wolffii*, *L.*

licerasiae, *L. inadai*, *L. fainei* y *L. broomii* de las cuales aún no se conoce su rol en la enfermedad humana o animal (Balamurugan *et al* 2013; Levett *et al* 2006;). Entre los genes más utilizados para el diseño de los cebadores se encuentran determinadas secuencias de genes que codifican para proteínas tales como: *lipL32* que codifica para una lipoproteína de membrana externa (Haake *et al* 2000); *ligA-ligB* que codifican para proteínas implicadas en la virulencia de cepas patógenas (Choy *et al* 2007; Palaniappan *et al* 2002) y *flaB* codificante para una proteína flagelar (Kawabata *et al* 2001; Michinos *et al* 1991; Picardeu *et al* 2001).

De la misma forma, existen ensayos específicos de especies patógenas que utilizan dos pares de cebadores (G1/G2 y B64-I/B64-II) abarcando todas las especies clasificadas dentro de esta categoría validados para medicina humana y posteriormente aplicados al diagnóstico veterinario (Cai *et al* 2002; Gravekamp *et al* 1993; Jafari *et al* 2011; Meira *et al* 2011; Talpada *et al* 2003; Rodriguez *et al* 2014).

Muestras clínicas

Para la detección de *Leptospira* spp. en animales generalmente se utilizan muestras de sangre con anticoagulante, plasma, suero, orina, semen, humor acuoso, productos del aborto y órganos tales como riñón e hígado (Faber *et al* 2000; Fearnley *et al* 2008; Van Eys *et al* 1989). La elección de una de ellas dependerá de la especie animal, del objetivo del estudio (diagnóstico precoz o búsqueda de especies

portadoras) y del momento de la toma de muestra (leptospiemia vs leptospiuria) (OIE 2008).

A fin de comparar la eficacia de cada una de ellas en la detección de *Leptospira* spp. por PCR, se han realizado estudios que evalúan el efecto de la matriz sobre la eficiencia de la PCR y el límite de detección. Para ello, utilizan muestras provenientes de individuos sanos a las que experimentalmente se les adiciona un número determinado de *Leptospira* spp. por mililitro. En veterinaria hay escasos datos publicados por lo que se mencionarán los ensayos más relevantes en medicina humana a fin de tomar como referencia los resultados para la detección de *Leptospira* spp. en las especies animales.

La sangre con anticoagulante, el suero y el plasma constituyen las muestras de elección en la primera fase de la enfermedad cuando la *Leptospira* spp. presenta alta concentración en sangre. En el caso de la sangre con anticoagulante la presencia de inhibidores puede afectar la eficiencia de la técnica de PCR (Wilson 1997). Sin embargo, este hecho es fácilmente eludido con los nuevos métodos de extracción y purificación basados en columnas de sílice (QIAGEN, Australia; Roche Applied Science) que permiten obtener cantidades de ADN de excelente calidad.

En un estudio realizado por Levett *et al* (2005) se demostró que el ADN de *Leptospira* spp. pudo ser detectado en muestras de sangre con EDTA o citrato como anticoagulante hasta 5 días después de la contaminación artificial, con una sensibilidad analítica de 3 equivalentes genomas por reacción; mientras que la utilización de heparina de litio o sodio como anticoagulante resultó inhibitoria. En forma similar, Stoddard *et al* (2009) utilizando sangre con anticoagulante EDTA obtuvo una sensibilidad de 10 *Leptospira* spp /ml.

Cuando la PCR se realizó a partir de muestras de suero reveló resultados de eficiencia discrepantes. Para algunos autores (Bouhry *et al* 2011, Stoddard *et al* 2009) mostró ser menos eficiente con valores de sensibilidad analítica de 1×10^3 *Leptospira* spp. /ml; mientras que para otros (Gonzales *et al* 2013) tuvo una sensibilidad de 10^2 bacterias/ml, similar al valor hallado con muestras extraídas con anticoagulante EDTA. Cabe destacar, que en el caso de la publicación de Stoddard *et al* (2009) la contaminación artificial se realizó antes que la sangre coagulara y por lo tanto las bacterias pudieron haber quedado retenidas en el coágulo, razón por la cual obtuvieron una menor sensibilidad. En otros trabajos realizados para el diagnóstico de leptospirosis humana a partir de muestras de suero mediante una técnica de PCR anidada con límites de detección de 1 a 2 pg hasta 10 fg de ADN, los autores pudieron detectar una bacteria por reacción (Blanco and Romero 2014; Djaid *et al* 2009).

Las muestras de orina en caninos y humanos cuyo pH normalmente es ácido representan un desafío para la detección molecular de *Leptospira* spp. Luchessi *et al* (2004) utilizando una técnica de PCR punto final obtuvieron resultados negativos al exponer muestras a orina ácida durante 90 minutos y conservadas a -20 °C sin tratamiento antes de su procesamiento. Los autores describieron una serie de recomendaciones como neutralizar la orina, concentrar las *Leptospira* spp. por centrifugación, lavado del *pellet*, etc. a fin de evitar la degradación del ADN luego del congelado. Por su parte, Levett *et al* (2005) pudieron detectar ADN de *Leptospira* spp. luego de mantener la muestra de orina hasta 16 días a temperatura ambiente en recipientes protectores de ADN/ARN (Sierra Diagnostics®). En cuanto a la sensibilidad analítica hallada con técnicas de PCR convencional existen valores de 1×10^4 *Leptospira* spp. /ml de orina; mientras que con la utilización de técnicas de PCR en tiempo real la sensibilidad aumenta a 1×10^2 *Leptospira* spp. /ml (Lucchesi *et al* 2004; Stoddard *et al* 2009).

Las muestras obtenidas *post mórtem* y procesadas para estudios histopatológicos constituyen un material imprescindible en aquellos pacientes que fallecen antes de la confirmación del diagnóstico o en la realización de estudios epidemiológicos retrospectivos. En este contexto cabe destacar el trabajo publicado por Noda *et al* (2014) en humanos, en este estudio diseñaron y validaron una técnica de PCR punto final con cebadores dirigidos al gen *lipL32* a partir de órganos embebidos en parafina. Además incorporaron un control interno de amplificación y confirmaron mediante secuenciación los resultados positivos.

Sensibilidad y especificidad diagnóstica

Finalmente, al evaluar la utilidad de la técnica de PCR frente a las técnicas tradicionales de diagnóstico como serología o cultivo bacteriológico los resultados de sensibilidad y especificidad diagnóstica son ambiguos. Merien *et al* (2005) demostraron la utilidad de una técnica de PCR en tiempo real y una PCR anidada con la detección de *Leptospira* spp. en suero de 9 pacientes humanos de un total de 51 personas incluidas en el estudio que posteriormente mostraron seroconversión en el segundo muestreo mediante la técnica de MAT. Asimismo, en este estudio se observaron 16 muestras positivas por la técnica de PCR pero desafortunadamente no se pudo obtener una segunda muestra de suero para demostrar seroconversión.

Cuando la técnica de PCR fue comparada con el cultivo como técnica de referencia Boonsilp *et al* (2011) demostraron que sólo el 9 % de un total de 418 pacientes humanos fueron positivos por el cultivo,

mientras que el 19 % fueron negativos para el cultivo pero positivos con la técnica de PCR.

En caninos, Harkin *et al* (2003a) evaluaron una técnica de PCR punto final dirigida al gen que codifica para la subunidad ribosomal 23S a partir de muestras de orina para el diagnóstico de leptospirosis. El 6 % de 132 animales resultaron positivos con los criterios de diagnóstico establecidos (seroconversión en muestras pareadas) y fueron también positivos por PCR, obteniendo de esta manera valores de sensibilidad y especificidad de 100 % y 88,3 % respectivamente. Asimismo, un canino resultó positivo con la técnica de PCR antes de mostrar seroconversión.

Al evaluar la utilidad de la PCR en la detección de caninos portadores y excretores de *Leptospira* spp. en orina, nuevamente Harkin *et al* (2003b) compararon la técnica de PCR contra el cultivo bacteriológico y test serológico. En su estudio el 8,2 % de 500 animales fueron positivos mediante la técnica de PCR y de estos el 1,8 % mostró serología positiva con títulos de anticuerpos en el Test de MAT iguales o mayores a 1:100.

Contrariamente a los hallazgos mencionados, en un estudio realizado por Fraune *et al* (2013) con muestras de orina de caninos la técnica de PCR no logró detectar ningún caso positivo a pesar de haber logrado la confirmación serológica de la enfermedad.

Diferentes protocolos utilizados en PCR punto final en animales

Entre los protocolos que utilizan regiones del gen *rrs* para la detección molecular de *Leptospira* spp. publicados hasta la fecha, el trabajo realizado por Merien *et al* (1992) en medicina humana ha sido el más evaluado para el diagnóstico en varias especies de animales con diferentes muestras clínicas. Así, en bovinos Richtzenhain *et al* (2002) realizaron una PCR punto final múltiple para la detección de *Brucella* y *Leptospira* a partir de fetos abortados. Con respecto a *Leptospira* spp, los autores obtuvieron resultados positivos con la técnica de PCR en tres muestras que dieron negativas por aislamiento. Posteriormente Magajevsky *et al* (2005) aplicaron la técnica de PCR con el mismo protocolo de Merien, en muestras de orina y semen de toros utilizando aislamiento, inoculación en animales de experimentación y serología como método de confirmación. En su estudio, todas las muestras de semen fueron negativas mediante la técnica de PCR y sólo una muestra de orina fue positiva por PCR y por cultivo. Por su parte, en caprinos y ovinos, Lilenbaum *et al* (2008) evaluaron la utilidad de la técnica de PCR para la detección de *Leptospira* spp. en semen y fluido vaginal proveniente de animales serorreactivos con títulos mayores a 400 mediante el Test de Microaglutinación. En su estudio pudieron

demostrar la presencia de ADN de *Leptospira* spp. en 6 muestras de semen y 7 de fluido vaginal en las cuales en el cultivo había sido negativo, demostrando una mayor sensibilidad de la técnica de PCR. En primates no humanos Scarcelli *et al* (2003) utilizaron la técnica de PCR para el diagnóstico en un mono capuchino (*Cebus apella*) muerto con características compatibles con leptospirosis en el examen *post mortem* (ictericia, riñones hemorrágicos y friables) comparándola con el aislamiento y la inoculación en animales de experimentación. En su estudio, tanto el cultivo como la inoculación experimental dieron resultados negativos y el único método de confirmación fue el resultado positivo de la técnica de PCR. Por su parte, en porcinos Soto *et al* (2006) evaluaron la técnica de PCR a partir de muestras de cerdas inoculadas experimentalmente (orina, riñón e hígado) y lechones nacidos de las madres infectadas (riñón, hígado, corazón, bazo, pulmón y contenido gástrico). Con respecto a las cerdas (n=6), todas mostraron anticuerpos luego de la infección, pero el cultivo y la PCR de orina dieron negativos; solo una muestra de riñón e hígado dio resultado positivo por PCR. Mientras que en los lechones (n=12) 10 mostraron resultados positivos por PCR en al menos una muestra.

En bovinos Bomfin *et al* (2008) utilizaron una técnica de PCR anidada para detectar *Leptospira* spp. en orina de animales con sospecha de la enfermedad. De un total de 30 muestras de orina analizadas, 10 resultaron positivas mediante el cultivo y la técnica de PCR anidada; mientras que 16 de las 20 muestras restantes fueron positivas sólo por la técnica de PCR. Posteriormente, Azizi *et al* (2012) evaluaron la correlación entre lesiones macroscópicas en riñones de animales de matadero con diagnóstico presuntivo de leptospirosis mediante la técnica de PCR utilizando los cebadores dirigidos al gen *lipL32* descritos por Tansuphasi *et al* (2006). En su estudio, los autores pudieron detectar ADN de *Leptospira* spp. en 19 de 24 riñones con lesiones macroscópicas conocidas como manchas blancas compatibles con leptospirosis, conjuntamente con diagnóstico histopatológico de nefritis intersticial. Cabe destacar que si bien tanto las lesiones macroscópicas como microscópicas halladas son frecuentes en animales con leptospirosis, no son patognomónicas de dicha enfermedad debido a que pueden presentarse en enfermedades como colibacilosis septicémica, salmonelosis, brucelosis o fiebre catarral maligna (Barker 1993; Maxie 1993; McGavin and Zachary 2007).

Utilizando también cebadores dirigidos al gen *lipL32*, Garcia Monte *et al* (2012) desarrollaron un método de PCR y separación inmunomagnética con anticuerpos monoclonales a fin de aumentar la sensibilidad y especificidad de la técnica, para el diag-

nóstico de leptospirosis en caninos. Cabe destacar de su estudio la incorporación de un Control Interno de Amplificación a fin de identificar resultados falsos negativos.

En equinos, Pinna *et al* (2011) demostraron la utilidad de la técnica de PCR con el protocolo descrito por Stoddard *et al* (2009) para el diagnóstico de leptospirosis en hembras con signología de aborto, donde el cultivo fue en todos los casos negativos. Asimismo, utilizando los cebadores descritos por Stoddard *et al* (2009), Hamond *et al* (2013) demostraron la presencia de ADN de *Leptospira* spp. en muestras de semen y orina de equinos serológicamente reactivos pero sin signología de la enfermedad; cabe destacar de su estudio, que también incorporó un Control Interno de Amplificación en su protocolo.

Diferentes protocolos utilizados en PCR en tiempo real en animales

En los últimos años, el protocolo de Merien *et al* (1992) fue evaluado mediante una técnica de PCR en tiempo real utilizando química SYBR Green. En el campo de investigación, Lourdault *et al* (2009) evaluaron la carga bacteriana en sangre y órganos (riñón, hígado, bazo, etc.) empleando un modelo de infección en cobayos. Mientras que, Fornazari *et al* (2012) compararon una PCR punto final, con una PCR cuantitativa en tiempo real, cultivo bacteriológico y la técnica de Warthin Starry para el diagnóstico de *Leptospira* spp en muestras de sangre y órganos (riñón e hígado) de ovinos y caprinos serológicamente reactivos; demostrando que la PCR cuantitativa en tiempo real fue el método más sensible para el diagnóstico.

Los cebadores dirigidos al gen *lipL* 32 fueron evaluados por diferentes autores en la especie canina, bovina y equina. En caninos, Rojas *et al* (2010) estudiaron muestras de orina remitidas para análisis completo demostrando un 6,8 - 11,1 % de positividad y un promedio de equivalentes genomas (número de copias) eliminados por orina de $6,2-2,3 \times 10^4$ por ml. En el campo de la investigación la aplicación de técnicas de PCR cuantitativas resultan útiles para evaluar la interacción de *Leptospira* spp. con el hospedador. Así Chagas Junior *et al* (2012) utilizaron el protocolo publicado por Rojas *et al* (2010) para detectar y cuantificar *Leptospira* spp. en riñón de ratas y hámsteres infectados experimentalmente en comparación con un método de impronta inmunofluorescente y aislamiento; demostrando la utilidad de la qPCR para determinar el número de *Leptospira* spp. por gramo de tejido.

En el año 2014 nuestro grupo de investigación ha trabajado en la estandarización de una técnica de PCR en tiempo real con cebadores dirigidos a un fragmento del gen *lipL*32 que incluye un control interno

no competitivo para la detección de *Leptospira* spp. en muestras de suero y orina de caninos. En los resultados preliminares hemos obtenido una sensibilidad 1×10^2 y 1×10^0 *Leptospira*/ ml respectivamente (datos del trabajo de Tesis no publicados).

Otros de los genes utilizados como *targets* para la detección de *Leptospira* spp. mediante PCR como *secY* también fueron ensayados. Ahmed *et al* (2012), evaluaron una PCR en tiempo real con química SYBR Green previamente validada en humanos (Ahmed *et al* 2009) para el seguimiento de una infección experimental utilizando el aislamiento como método de referencia. En su estudio pudieron demostrar la utilidad de la PCR para el diagnóstico temprano de la enfermedad en caninos con una sensibilidad y especificidad de la PCR de 88,9 % y 89,3 % respectivamente.

Finalmente, han sido utilizadas secuencias de los genes *ligA/B* para la detección de *Leptospira* spp. en muestras clínicas y en la discriminación de especies dentro del género. Palaniappan *et al* (2005) desarrollaron una PCR en tiempo real utilizando cebadores dirigidos a secuencias de los genes *lig*. En su estudio, evaluaron la eficacia de la técnica en comparación con el cultivo para la detección de *Leptospira* spp. en hámsteres inoculados artificialmente con la cepa *Leptospira interrogans* serovar Pomona. Los autores demostraron que fue 100 % específica para la detección de cepas patógenas con un rango de detección de 10^1 a 10^7 de ADN cromosómico de *Leptospira* spp.

Recientemente, han sido publicados nuevos protocolos de PCR en tiempo real para su aplicación en veterinaria. Xu *et al* (2014) desarrollaron una técnica de PCR en tiempo real utilizando cebadores dirigidos a los genes *lig* para el diagnóstico de leptospirosis en caninos. A diferencia de los ensayos en tiempo real descritos, los autores utilizaron un sistema de detección de fluorescencia basado en sondas FRET. El mismo se caracteriza por utilizar dos sondas que al unirse a secuencias adyacentes del ADN diana emiten la fluorescencia que es detectada por el equipo. En su estudio demostraron que la técnica de PCR dirigida a los genes *lig* fue 100 veces más sensible que el ensayo ampliamente aceptado *lipL*32 SYBR y 10 veces más sensible que el ensayo 16S rRNA TaqMan descritos por Levett *et al* (2005) y Smythe *et al* (2002) respectivamente.

Ferreira *et al* (2014) utilizaron una estrategia de PCR en dos etapas. En primer lugar, evaluaron muestras de tejidos animales mediante la utilización de una PCR múltiple dirigida a los genes *lip*32 y adicionando como control interno de amplificación el gen que codifica para la proteína beta-actina. Posteriormente, a partir de las muestras que dieron positivas realizaron la técnica de PCR en tiempo real y secuenciación me-

diante una combinación cebadores y sondas dirigidos a secuencias de genes *secY* y *ompL1* con el fin de identificar las 4 especies más comunes en veterinaria *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. kirschneri* y *L. noguchii*.

Discusión y conclusiones

Tradicionalmente el diagnóstico de leptospirosis en animales se ha realizado mediante métodos serológicos o microbiológicos. El test serológico de microaglutinación confirma la enfermedad, sin embargo, como se mencionó anteriormente, requiere muestras del período agudo y convaleciente para una correcta interpretación de los resultados. En aquellos animales que padecieron la enfermedad y en aquellas especies que actúan como reservorios la prueba de MAT puede no contribuir al diagnóstico debido al bajo nivel de anticuerpos que se presenta en estos casos. Por su parte, el diagnóstico mediante el cultivo microbiológico requiere de muestras adecuadamente extraídas, acondicionadas y transportadas hasta el laboratorio como también, de un período de incubación prolongado. Por lo tanto, el cultivo no representa un método apto para el diagnóstico precoz de la enfermedad (Gravekamp *et al* 1994; Rahelinirina *et al* 2010).

Es así como la técnica de PCR realizada a partir de muestras de sangre con anticoagulante, plasma o suero representa una ventaja cuando se necesita un diagnóstico temprano de leptospirosis humana (Merien *et al* 2005; Boonslip *et al* 2011). Sin embargo, en veterinaria y en particular en pequeños animales, usualmente los datos sobre la evolución de la enfermedad son desconocidos o ambiguos por lo tanto es recomendable analizar muestras de sangre en conjunto con orina a fin de aumentar la probabilidad de un resultado positivo. Ahmed *et al* (2012), demostraron como disminuye la sensibilidad de la técnica de PCR a partir de sangre entera a medida que progresa la enfermedad debido al descenso del número de *Leptospira* spp. en el torrente sanguíneo. En lo que respecta al diagnóstico de leptospirosis en animales de producción se debe considerar la obtención de muestras de órganos obtenidas durante la necropsia o posterior a un aborto con el propósito de aumentar las probabilidades de un resultado positivo.

Cuando el objetivo se basa en el diagnóstico de animales portadores la técnica de PCR demostró ser superior frente a los métodos tradicionales (Harkin *et al* 2003; Lilenbaum *et al* 2009). No obstante, una importante limitación en estos casos reside en la imposibilidad de varios protocolos de PCR en diferenciar serovares de *Leptospira*. Sin embargo, la utilización de otros cebadores permite la identificación de especies o cepas si los productos de PCR son secuenciados

(OIE 2014). Asimismo, la técnica de PCR identifica la presencia de ADN de *Leptospira* lo que no resulta necesariamente que se encuentren presentes microorganismos viables y transmisibles. Además si se tiene en cuenta que la eliminación de *Leptospira* spp. por orina en estos animales es intermitente, un resultado negativo mediante la técnica de PCR a pesar de su mayor sensibilidad tampoco descartaría el diagnóstico.

Concerniente a los estudios epidemiológicos la aplicación de la técnica de PCR ha permitido la detección de *Leptospira* spp en animales silvestres que actúan como reservorios (Cox *et al* 2005; Doosti *et al* 2012; Koizumi *et al* 2008; Koizumi *et al* 2009 a); Koizumi *et al* 2009 b); Paixão Mdos *et al* 2014; Wu *et al* 2014). Nuevamente una desventaja en estos casos es la falta de identificación de las especies involucradas, lo cual resulta imprescindible para el estudio de las cepas circulantes y su asociación con determinados hospedadores en una región dada. Otra limitación importante en estos casos reside en los procesos de autólisis y descomposición que pudieran sufrir las muestras utilizadas. Shearer *et al* (2014) demostraron resultados discordantes entre una técnica de PCR en tiempo real y la inmunohistoquímica para la detección de leptospirosis en animales silvestres. Cabe destacar de su estudio que la mayor parte de las muestras positivas por inmunohistoquímica fueron negativas por PCR. Esto según el autor, Shearer *et al* (2014) puede deberse a la autólisis de la muestra o los ciclos de congelado-descongelado de las mismas durante el procesamiento lo cual pudo haber impactado negativamente en la detección del ADN de *Leptospira* spp. Otra posibilidad, es la variación genética de las cepas de campo que pudieron haber reducido la eficiencia en la detección mediante el protocolo utilizado.

Al interpretar los resultados obtenidos con la técnica de PCR en cualquier contexto que se utilice se deben considerar ciertos factores. Por un lado, cuando los resultados con la técnica de PCR fueran positivos pero negativos con otros métodos de referencia como la serología o el aislamiento, se deberá determinar si dicha positividad es debida a una mayor sensibilidad de la técnica de PCR o corresponde a falsos positivos (Lilenbaum *et al* 2008; Richtzenhain *et al* 2002; Rojas *et al* 2010). Estos últimos podrían surgir por contaminación con ADN amplificado anteriormente o por amplificación de secuencias semejantes en otros microorganismos (Ahmed *et al* 2012; Villumnsen *et al* 2012). Mientras que, ante resultados negativos es importante considerar la conservación inadecuada de las muestras, desde la obtención hasta su procesamiento, los métodos de extracción inapropiados o la presencia de inhibidores de la PCR en las muestras extraídas. Por ello se recomienda incluir un control interno de amplificación en cada protocolo además de

los controles de rutina. Asimismo, es importante recordar que *Leptospira* spp. generalmente se encuentran en bajo número y son sensibles a la mayoría de los antimicrobianos (OIE 2008). Por lo tanto, las muestras deben ser extraídas antes de iniciado el tratamiento y se debe determinar con anterioridad la sensibilidad y especificidad analítica del ensayo a ser aplicado.

Finalmente, ante la elección de un protocolo de PCR determinado es recomendable optar por técnicas de PCR anidada o en tiempo real debido a su mayor sensibilidad y especificidad (Bomfim *et al* 2007; Fornazari *et al* 2012). En relación a los cebadores, una alternativa adecuada sería la elección de dos *targets* diferentes. Por un lado, se podría optar por genes que presenten más de una copia en el genoma como el gen *lig* o el *rrs* con el fin de aumentar la sensibilidad de la técnica; mientras que la utilización en forma conjunta de genes presentes sólo en las especies patógenas incrementará la especificidad de la misma (Bourhy *et al* 2011).

En conclusión, aunque la aplicación de técnica de PCR demostró ser un complemento útil de los métodos de referencia, son necesarios estudios adicionales en relación a la utilización de la misma para el diagnóstico de la enfermedad en animales.

Referencias Bibliográficas

- Adler B, de la Pena Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol.* 2010; 27; 140 (3-4): 287-96.
- Agampodi SB, Matthias MA, Moreno AC and Vinetz JM. Utility of Quantitative Polymerase Chain Reaction in Leptospirosis Diagnosis: Association of Level of Leptospiremia and Clinical Manifestations in Sri Lanka. *Clin Infect Dis.* 2012; 54 (9): 1249-55.
- Aghaiypour K, Safavieh S. Molecular detection of pathogenic *Leptospira* in Iran. *Arch of Razi Institute.* 2007; 62 (4): 191-7.
- Ahmed A, Engelberts MF, Boer KR, Ahmed N, Hartskeerl RA. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic leptospira species in clinical materials. *PLoS One.* 2009; 18; 4 (9): e7093.
- Ahmed A, Grobusch MP, Klatser PR, Hartskeerl RA. Molecular approaches in the detection and characterization of *Leptospira*. *J Bacteriol Parasitol.* 2012; 3:133.
- Ahmed A, Klaasen H, van der Veen M, van der Linden H, Goris M, Hartskeerl RA. Evaluation of Real-Time PCR and Culturing for the Detection of Leptospire in Canine Samples. *Advances in Microbiology.* 2012; 2: 162-70.
- Alemay A. Review on Emerging and Re-Emerging Bacterial Zoonotic Diseases. *American-Eurasian Journal of Scientific Research.* 2012; 7 (4): 176-86.
- Azizi S, Tajbakhsh E, Hajimirzaei MR, Gholami Varnamkhasht M, Sadeghian H, Oryan A. Evaluation of "white-spotted kidneys" associated with leptospirosis by polymerase chain reaction based LipL32 gene in slaughtered cows. *J S Afr Vet Assoc.* 2012 Nov 5; 83(1): 69.
- Balamurugan V1, Gangadhar NL, Mohandoss N, Thirumalesh SR, Dhar M, Shome R, Krishnamoorthy P, Prabhudas K, Rahman H. Characterization of *Leptospira* isolates from animals and humans: phylogenetic analysis identifies the prevalence of intermediate species in India. *Springerplus.* 2013; 30 (2):362.
- Balassiano IT, Vital-Brazil JM, Pereira MM. Leptospirosis diagnosis by immunocapture polymerase chain reaction: a new tool for early diagnosis and epidemiologic surveillance. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012; 74(1):11-5.
- Barker IK, Van Dreumel, A.A. Palmer, N. The alimentary system. In K.F. 1993 *Pathology of domestic animals.* 4th edn. Academic Press, San Diego. pp. 1-318.
- Bengis RG, Leighton FA, Fischer JR, Artois M, Mörner T, Tate CM. The role of wildlife in emerging and re-emerging zoonoses. *Rev Sci Tech.* 2004; 23 (2):497-511.
- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis.* 2003; 3 (12):757-71.
- Blanco RM, Romero EC. Evaluation of nested polymerase chain reaction for the early detection of *Leptospira* spp. DNA in serum samples from patients with leptospirosis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014; 78(4):343-6.
- Bomfim MR, Barbosa-Stancioli EF, Koury MC. Detection of pathogenic leptospire in urine from naturally infected cattle by nested PCR. *Vet J.* 2008; 178(2):251-6.
- Boonsilp S, Thaipadungpanit J, Amornchai P, Wuthiekanun V, hierakul W, Limmathurotsakul D, Day NP, Peacock SJ. Molecular detection and speciation of pathogenic *Leptospira* spp. in blood from patients with culture-negative leptospirosis. *BMC Infect Dis.* 2011; 13; 11:338.
- Bourhy P, Bremont S, Zinini F, Giry C, Picardeau M. Comparison of real-time PCR assays for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in blood and identification of variations in target sequences. *J Clin Microbiol.* 2011; 49(6):2154-60.
- Brown PD, Gravekamp C, Carrington DG, van de Kemp H, Hartskeerl RA, Edwards CN, Everard CO, Terpstra WJ, Levett PN. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *J Med Microbiol.* 1995; 43 (2): 110-4.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley G, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem.* 2009; 55(4):611-22.
- Cai HY, Hornby G, Key DW, Osuch MR, Maxie MG. Preliminary Study on Differentiation of *Leptospira* Grippotyphosa and *Leptospira* Sejroe from Other Common Pathogenic Leptospiral Serovars in Canine Urine by Polymerase Chain Reaction Assay. *J Vet Diagn Invest.* 2002; 14 (2):164-8.
- Chagas-Junior AD, da Silva CL, Soares LM, Santos CS, Silva CD, Athanzio DA, dos Reis MG, McBride FW, McBride AJ. Detection and Quantification of *Leptospira interrogans* in Hamster and Rat Kidney Samples: Immunofluorescent Imprints versus Real-time PCR. *PLoS One.* 2012; 7(2):e32712.
- Cheemaa PS, Srivastava SK, Amutha R, Singh S, Singh H, Sandey M. Detection of pathogenic leptospire in animals by PCR based on lipL21 and lipL32 genes. *Indian J Exp Biol.* 2007;45(6):568-73.

- Choy HA, Kelley MM, Chen TL, Møller AK, Matsunaga J, Haake DA. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. *Infect Immun*. 2007; 75(5):2441-50.
- Cox TE, Smythe LD, Leung LK. Flying foxes as carriers of pathogenic *Leptospira* species. *J Wildl Dis*. 2005; 41(4): 753-7.
- Cruz LS, Vargas R, Lopes AA. Leptospirosis: a worldwide resurgent zoonosis and important cause of acute renal failure and death in developing nations. *Ethn Dis*. 2009; 19 (1 Suppl 1): S1-37-41.
- de Abreu Fonseca C, Teixeira de Freitas VL, Caló Romero E, Spinosa C, Arroyo Sanches MC, da Silva MV, Shikanai-Yasuda MA. Polymerase chain reaction in comparison with serological tests for early diagnosis of human leptospirosis. *Trop Med Int Health*. 2006; 11(11): 1699-707.
- Djadid ND, Ganji ZF, Gouya MM, Rezvani M, Zakeri S. A simple and rapid nested polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism technique for differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Leptospira* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009; 63(3): 251-6.
- Doosti A., Ahmadi R., Arshi A. PCR Detection of leptospirosis in Iranian Camels. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 2012; 15(3): 178-83.
- Draghi MG, Brihuega B, Benítez D, Sala JM, Biotti GM, Pe-reyra M, Homse A, Guariniello L. Brote de leptospirosis en terneros en recría en la provincia de Corrientes, Argentina. *Rev Argentina Microbiol*. 2011; 43: 42-4.
- Faber NA, Crawford M, LeFebvre RB, Buyukmihci NC, Madigan JE, Willits NH. Detection of *Leptospira* spp. in the aqueous humor of horses with naturally acquired recurrent uveitis. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(7):2731-3.
- Fearnley C, Wakeley PR, Gallego-Beltran J, Dalley C, Williamson S, Gaudie C, Woodward MJ. The development of a real-time PCR to detect pathogenic *Leptospira* species in kidney tissue. *Res Vet Sci*. 2008; 85(1):8-16.
- Ferreira AS, Costa P, Rocha T, Amaro A, Vieira ML, Ahmed A, Thompson G, Hartskeerl RA, Inácio J. Direct detection and differentiation of pathogenic *Leptospira* species using a multi-gene targeted real time PCR approach. *PLoS One*. 2014 Nov 14; 9(11):e112312.
- Fornazari F, da Silva RC, Richini-Pereira VB, Beserra HE, Luvizotto MC, Langoni H. Comparison of conventional PCR, quantitative PCR, bacteriological culture and the Warthin Starry technique to detect *Leptospira* spp. in kidney and liver samples from naturally infected sheep from Brazil. *J Microbiol Methods*. 2012; 90(3):321-6.
- Fraune CK, Schweighauser A, Francey T. Evaluation of the diagnostic value of serologic microagglutination testing and a polymerase chain reaction assay for diagnosis of acute leptospirosis in dogs in a referral center. *J Am Vet Med Assoc*. 2013; 5; 242(10):1373-80.
- Gibson NJ. The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. *Clin Chim Acta*. 2006; 363 (1-2): 32-47.
- González S, Geymonat JP, Hernández E, Marqués JM, Schelotto F, Varela G. Usefulness of real-time PCR assay targeting lipL32 gene for diagnosis of human leptospirosis in Uruguay. *J Infect Dev Ctries*. 2013; 15; 7(12):941-5.
- Gravekamp C, Van de Kemp H, Franzen M, Carrington D, Schoone GJ, Van Eys GJ, Everard CO, Hartskeerl RA, Terpstra WJ. Detection of seven species of pathogenic *Leptospira* by PCR using two sets of primers. *J Gen Microbiol*. 1993; 139 (8): 1691-700.
- Gyles CL, Prescott JF, Songer G, Thoen CO, 2010. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. 4th Edition Wiley-Blackwell. ISBN: 978-0-8138-1237-3.
- Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, Matsunaga J, Levett PN, Bolin CA. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun*. 2000; 68(4):2276-85.
- Hamond C Martins G Medeiros MA Lilienbaum W. Presence of Leptospiral DNA in Semen Suggests Venereal Transmission in Horses *J Equi Vet Sc*. 2013; 33 1157-1159.
- Harkin KR a, Roshto YM, Sullivan JT. Clinical application of a polymerase chain reaction assay for diagnosis of leptospirosis in dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 2003; 1; 222(9):1224-9.
- Harkin KR b, Roshto YM, Sullivan JT, Purvis TJ, Chengappa MM. Comparison of polymerase chain reaction assay, bacteriologic culture, and serologic testing in assessment of prevalence of urinary shedding of leptospires in dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 2003; 1; 222(9): 1230-3.
- Helmerhorst HJF, van Tol EN, Tuinman PR, de Vries PJ, Hartskeerl RA, Grobusch MP, Hovius JW. Severe pulmonary manifestation of leptospirosis. *Neth J Med*. 2012 70 (5): 215-21.
- Hernández-Rodríguez P, Díaz CA, Dalmau EA, Quintero GM. A comparison between polymerase chain reaction (PCR) and traditional techniques for the diagnosis of leptospirosis in bovines. *J Microbiol Methods*. 2011; 84(1): 1-7.
- Hoorfar J, Malorny B, Abdulmawjood A, Cook N, Wagner M, Fach P. Practical Considerations in Design of Internal Amplification Controls for Diagnostic PCR Assays. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(5):1863-8.
- Jafari D, Shahbazkia HR., Ronagh N. Evaluation of pathogenic serovars of *Leptospira interrogans* in dairy cattle herds of Shahrekord by PCR. *Iran J Microbiol*. 2011; 3(3):135-9.
- Kawabata H, Dancel LA, Villanueva SY, Yanagihara Y, Koizumi N, Watanabe H. flaB-polymerase chain reaction (flaB-PCR) and its restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis are an efficient tool for detection and identification of *Leptospira* spp. *Microbiol Immunol*. 2001; 45(6):491-6.
- Koizumi N, Muto M, Yamamoto S, Baba Y, Kudo M, Tamae Y, Shimomura K, Takatori I, Iwakiri A, Ishikawa K, Soma H, Watanabe H. Investigation of reservoir animals of *Leptospira* in the northern part of Miyazaki Prefecture. *Jpn J Infect Dis*. 2008; 61(6):465-8.
- Koizumi N, Muto M, Yamada A, Watanabe H. Prevalence of *Leptospira* spp. in the kidneys of wild boars and deer in Japan. *J Vet Med Sci*. 2009; 71(6):797-9. A)
- Koizumi N, Uchida M, Makino T, Taguri T, Kuroki T, Muto M, Kato Y, Watanabe H. Isolation and characterization of *Leptospira* spp. from raccoons in Japan. *J Vet Med Sci*. 2009; 71(4):425-9. B)
- Krishnappa J, Susheela B, Beena PM, Dhananjaya CD. Leptospirosis A Case Report of a Patient with Unusual Pul-

- monary Involment. J Clin Biomed Sci 2012 ; 2 (1).
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. Mol Aspects Med. 2006; 27 (2-3): 95-125.
- Levett P. Leptospirosis. Clin. Microbiol. Rev. 2001; 14(2): 296-326.
- Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Steigerwalt AG. *Leptospira broomii* sp. nov., isolated from humans with leptospirosis. Int J Syst Evol Microbiol. 2006; 56(Pt 3):671-3.
- Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, Mayer LW. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. J Med Microbiol. 2005; 54(Pt 1):45-9.
- Li Cavoli G, Tortorici C, Bono L, Ferrantelli A, Giammarresi C, Rotolo U. Acute renal failure in Weil's disease. Dial Traspl. 2013; 34(1):33-5.
- Lilenbaum W, Varges R, Brandão FZ, Cortez A, de Souza SO, Brandão PE, Richtzenhain LJ, Vasconcellos SA. Detection of *Leptospira* spp. in semen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction. Theriogenology. 2008 15; 69(7):837-42.
- Lilenbaum W, Varges R, Ristow P, Cortez A, Souza SO, Richtzenhain LJ, Vasconcellos SA. Identification of *Leptospira* spp. carriers among seroreactive goats and sheep by polymerase chain reaction. Res Vet Sci. 2009; 87(1):16-9.
- Lourdault K, Florence Aviat and Mathieu Picaudeau. Use of quantitative real-time PCR for studying the dissemination of *Leptospira interrogans* in the guinea pig infection model of leptospirosis. J Med Microbiol. 2009; 58(Pt 5):648-55.
- Luchesi PM, Arroyo GH, Etcheverría AI, Parma AE, Seijo AC. Recommendations for the detection of *Leptospira* in urine by PCR. Rev Soc Bras Med Trop. 2004 ; 37(2):131-4.
- Magajevski FS, Silva Girio RJ, Mathias LA, Myashiro S, Élide Genovez M, Scarcelli EP. Detection of *Leptospira* spp. in the semen and urine of bulls serologically reactive to *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. Brazilian Journal of Microbiology. 2005; 36:43-47.
- Maxie MG. The urinary system, in K.F. 1993 Jubb, P.C.N. Kennedy & N. Palmer, (eds.) Pathology of domestic animals. 4th edn. Academic Press, San Diego. pp. 447–538.
- McGavin MD, Zachary JF. Pathologic basis of veterinary disease. 2007. 4th edn. Mosby-Elsevier, St Louis.
- Meira CD, Wenceslau AA, Santos Carvalho F, Xavier Correa JM, Rêgo Albuquerque G. Detecção molecular de leptospira em amostras de urina de cães infectados naturalmente. Veterinária e Zootecnia 2011; 18(2): 249-254.
- Merien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Girons Saint I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. J Clin Microbiol. 1992; 30 (9): 2219-24.
- Merien F, Portnoi D, Bourhy P, Charavay F, Berlioz-Arthaud A, Baranton G. A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. FEMS Microbiol Lett. 2005 1; 249(1):139-47.
- Michinos M, Rood JI, Faine S, Adler B. Molecular analysis of a *Leptospira borgpetersenii* gene encoding an endoflagellar subunit protein. J Gen Microbiol. 1991; 137(7):1529-36.
- Monte LG, Jorge S, Luiz JP, Sinnott F, Seixas KS, Aleixo JA, Samartino LE, Conceição FR, Hartleben CP. Diagnosis of canine leptospirosis using an immunomagnetic separation-PCR method. Braz J Microbiol. 2012 Apr; 43(2):602-5.
- Nascimento AL, Verjovski-Almeida S, Van Sluys MA, Monteiro-Vitorello CB, Camargo LE, Digiampietri LA, Harstkeerl RA, Ho PL, Marques MV, Oliveira MC, Setubal JC, Haake DA, Martins EA. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. Braz J Med Biol Res. 2004; 37(4):459-77.
- Natarajaseenivasan K, Raja V, Narayanan R. Rapid diagnosis of leptospirosis in patients with different clinical manifestations by 16S rRNA gene based nested PCR. Saudi J Biol Sci. 2012; 19 (2):151-5.
- Noda AA, Rodríguez I, Rodríguez Y, Govín A, Fernández C, Obregón AM. High sensitive PCR method for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in paraffin-embedded tissues. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2014; 56(5):411-5.
- OIE 2008. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Chapter 2.1.9), World Organization for Animal Health. ISBN 978-92-9044-718-4.
- OIE 2014. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Chapter 2.1.9), World Organization for Animal Health. <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-terrestre/acceso-en-linea/> consultado 23/3/15.
- Paixão Mdos S, Alves-Martin M, Tenório Mda S, Starke-Buzetti WA, Alves ML, da Silva DT, Ferreira AG, Floró e Silva M, Sousa LO, Lucheis SB. Serology, isolation, and molecular detection of *Leptospira* spp. from the tissues and blood of rats captured in a wild animal preservation centre in Brazil. Prev. Vet. Med. 2014. 1;115 (1-2): 69-73.
- Palaniappan RU, Chang YF, Jusuf SS, Artiushin S, Timoney JF, McDonough SP, Barr SC, Divers TJ, Simpson KW, McDonough PL, Mohammed HO. Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. Infect Immun. 2002; 70(11):5924-30.
- Palaniappan RU1, Chang YF, Chang CF, Pan MJ, Yang CW, Harpending P, McDonough SP, Dubovi E, Divers T, Qu J, Roe B. Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. Mol Cell Probes. 2005 Apr; 19(2):111-7.
- Picaudeau M, Brenot A, Saint Girons I. First evidence for gene replacement in *Leptospira* spp. Inactivation of *L. biflexa* flaB results in non-motile mutants deficient in endoflagella. Mol Microbiol. 2001; 40(1):189-99.
- Pinna AE, Martins G, Hamond C, Lilenbaum W, Medeiros MA. Molecular diagnostics of leptospirosis in horses is becoming increasingly important. Vet Microbiol. 2011 Dec 15;153(3-4):413.
- Rahelinirina S, Leon A, Harstkeerl RA, Sertour N, Ahmed A, Raharimanana C, Ferquel E, Garnier M, Chartier L, Duplantier J, Rahalison L, Cornet M. First isolation and direct evidence for the existence of large small-mammal reservoirs of *Leptospira* sp. in Madagascar. PLoS One. 2010 Nov 24;5 (11):e14111.
- Richtzenhain LJ, Cortez A, Heinemann MB, Martins Soares R, Miyoshi Sakamoto S, Vasconcellos SA, Morais Higaa ZM, Scarcelli E, Genovez ME. A multiplex PCR for the detection of *Brucella* spp. and *Leptospira* spp. DNA from aborted bovine fetuses. Vet Microbiol. 2002; 20; 87(2):139-47.
- Rodriguez J, Blais MC, Lapointe C, Arsenault J, Carioto L, Harel J. Serologic and Urinary PCR Survey of Leptospirosis in Healthy Cats and in Cats with Kidney Disease. J Vet Intern

Med. 2014; 28(2):284-93.

Rojas P, Monahan AM, Schuller S, Miller IS, Markey BK, Nally JE. Detection and quantification of leptospires in urine of dogs: a maintenance host for the zoonotic disease leptospirosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010 Oct; 29(10):1305-9.

Scarcelli E, Piatti RM, Luzes Fedullo JD, Simon F, Vasconcellos Cardoso M, Castro V, Miyashiro S, Genovez ME. *Leptospira* spp detection by polymerase chain reaction (PCR) in clinical samples of captive black-capped capuchin monkey (*Cebus apella*) Braz J Microbiol. 2003; 34:143-146 ISSN 1517-8382 143.

Seijo A, Coto H, San Juan J, Videla J, Deodato B, Cernigoi B, Garcia Messina O, Colliá O, Bassadoni D, Schtirbu R, Olenchuk A, De Mazzonelli GD, Parma A. Distres Respiratorio debido a Hemorragia Pulmonar por Leptospirosis. *Medicina (Bs As)* 2002; 62 (2): 135-40.

Shearer KE, Harte MJ, Ojkic D, DeLay J, Campbell D. Detection of *Leptospira* spp. in wildlife reservoir hosts in Ontario through comparison of immunohistochemical and polymerase chain reaction genotyping methods. *Can Vet J*. 2014; 55(3):240-8.

Slack A, Symonds ML, Dohnt MF, Smythe LD. Identification of pathogenic *Leptospira* species by conventional or real-time PCR and sequencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene. *BMC Microbiol*. 2006; 27; 6:95.

Smythe LD, Smith IL, Smith GA, Dohnt MF, Symonds ML, Barnett LJ, McKay DB. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. *BMC Infect Dis*. 2002; 8 (2):13.

Soto FRM, De Azevedo SS, De Moraes ZM, Pinheiro SR, DeLbem ACB, Moreno AM, Paixão R, Vuaden ER, Vasconcellos SA. Detection of *Leptospires* in clinically healthy piglets born from sows experimentally infected with *Leptospira interrogans* serovar Canicola. *Braz J of Microbiol*. 2006; 37:582-6.

Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, McCaustland K, Hoffmaster AR. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009; 64(3):247-55.

Talpada MD1, Garvey N, Sprowls R, Eugster AK, Vinetz JM. Prevalence of leptospiral infection in Texas cattle: implications for transmission to humans. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2003; 3(3):141-7.

Tansuphasiri U, Chanthadee R, Phulsuksombati D, Sangjun N. Development of a duplex-polymerase chain reaction for rapid detection of pathogenic *Leptospira*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2006; 37(2):297-308.

Thaipadungpanit J, Chierakul W, Wuthiekanun V, Limmathurotsakul D, Amornchai P, et al. Diagnostic accuracy of real-time PCR assays targeting 16S rRNA and lipL32 genes for human leptospirosis in Thailand: a case-control study. *PLoS One*. 2011; 24; 6(1):e16236.

Van Eys GJJM, Gravekamp C, Gerritsen MJ, Quint W, Cornelissen MTE, Ter Schegget J, Terpstra WJ. Detection of *Leptospires* in Urine by Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol*. 1989; 27 (10): 2258-62.

Vein J, Perrin A, Berny PJ, Benoit E, Leblond A, Kodjo A. Adaptation of a real-time PCR method for the detection and quantification of pathogenic leptospires in environmental water. *Can J Microbiol*. 2012; 58 (7): 828-35.

Victoria B, Ahmed A, Zuerner RL, Ahmed N, Bulach DM, Quinteiro J, Hartskeerl RA. Conservation of the S10-spc-alpha locus within otherwise highly plastic genomes provides phylogenetic insight into the genus *Leptospira*. *PLoS One*. 2008; 16; 3(7):e2752.

Villumsen S, Pedersen R, Binderup Borre M, Ahrens P, Skov Jensen J, Krogfelt KA. Novel TaqMan® PCR for detection of *Leptospira* species in urine and blood: Pit-falls of in silico validation. *J Microbiol Methods*. 2012; 91(1):184-90.

WHO, ILS (2003) Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. Malta: World Health Organization. ISBN 9241545895.

Wilson IG. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. *Appl Environ Microbiol*. 1997; 63(10):3741-51.

Wilson K, Walker J. 2005. Principles and techniques of biochemistry and molecular biology. 6th. Ed. Cambridge University Press. New York. U.S.A.

Woo TH, Smythe LD, Symonds ML, Norris MA, Dohnt MF, Patel BK. Rapid distinction between *Leptospira interrogans* and *Leptospira biflexa* by PCR amplification of 23S ribosomal DNA. *FEMS Microbiol Lett*. 1997; 1;150(1):9-18.

Woodward MJ, Sullivan GJ. Nucleotide sequence of a repetitive element isolated from *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis. *J Gen Microbiol*. 1991; 137 (5):1101-9.

Wu Q1, Prager KC, Goldstein T, Alt DP, Galloway RL, Zuerner RL, Lloyd-Smith JO, Schwacke L. Development of a real-time PCR for the detection of pathogenic *Leptospira* spp. in California sea lions. *Dis Aquat Organ*. 2014 Aug 11;110(3):165-72.

Xu C, Loftis A, Ahluwalia SK, Gao D, Verma A, Wang C, Kaltenboeck B. Diagnosis of Canine Leptospirosis by a Highly Sensitive FRET-PCR Targeting the lig Genes. *PLoS One*. 2014 Feb 24; 9(2):e89507.

Yasouri SR, Ghane M. A comparison between culture and PCR technique order to isolate and identify *Leptospira* spp. from environmental samples in the northern part of Iran. *European J Experimental Biology*. 2014; 4 (3):606-611.

Zakeri S, Khorami N, Ganji ZF, Sepahian N, Malmasi AA, Gouya MM, Djadid ND. *Leptospira wolffii*, a potential new pathogenic *Leptospira* species detected in human, sheep and dog. *Infect Genet Evol*. 2010; 10 (2):273-7.

Conflictos de intereses

Todos los autores declaran que no existen conflictos de intereses, incluyendo las relaciones financieras, personales o de otro tipo con otras personas u organizaciones que pudieran influir de manera inapropiada en el trabajo.

La tomografía axial computarizada como herramienta para el diagnóstico y la planificación quirúrgica de la compresión medular

Computed Tomography as a Tool for Diagnosis and Surgical Planning of Spinal Cord Compression

Delgado Stagnares JJ¹, Portiansky EL², Sánchez HL^{1*}

¹Instituto de Anatomía. ²Laboratorio de Análisis de Imágenes. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. Buenos Aires. Argentina.

*Autor correspondiente. Correo electrónico del autor: lilianasanchez@fcv.unlp.edu.ar

Resumen: La hernia discal es la causa más frecuente de lesión de la médula espinal en caninos. El 85 % de los casos se produce en la región toracolumbar. El Dachshund es una de las razas más susceptibles, debido a factores hereditarios. Desde el punto de vista anatómico, la lesión se localiza, principalmente, entre los espacios intervertebrales T11-T12 hasta L1-L2 y se asocia con la degeneración del núcleo pulposo del disco intervertebral, lo cual produce una extrusión o una protrusión. Las alteraciones neurológicas más frecuentes, como consecuencia de la compresión medular, se engloban dentro del síndrome de la neurona motora superior (SNMS). Se describe el caso de una hembra canina Dachshund de 5 años de edad, entera, con cifosis, dolor en la región toracolumbar y paraparesia, con una evolución de 15 días. Para corroborar el diagnóstico neurológico se utilizó la tomografía axial computarizada (TAC). Las imágenes obtenidas permitieron determinar el alcance y el carácter de las lesiones, consistentes en alteraciones en la apariencia del núcleo pulposo y una compresión medular significativa. La cirugía descompresiva fue el método propuesto para aliviar el déficit neurológico. Durante la cirugía, las imágenes obtenidas mediante la TAC fueron utilizadas para determinar la cantidad de vértebras a ser incluidas en la laminectomía con el fin de facilitar la extracción del material extruido y para ubicar, con mayor precisión, los reparos anatómicos. Durante el control posoperatorio realizado a los 30 días, la paciente mostró una recuperación incipiente de la función motora y coordinación de los movimientos voluntarios. Se concluye que ni la pérdida de la función motora, ni la severidad de los signos clínicos permitieron predecir el resultado del caso e indicar la reversibilidad de las lesiones. El uso de la TAC fue una herramienta de relevancia para el diagnóstico y la resolución del caso.

Palabras claves: región toracolumbar, cirugía, compresión medular, canino

Abstract: The herniated disc is the most common cause of spinal injury in dogs. In 85 % of cases it occurs at the thoracolumbar region. The Dachshund is one of the most susceptible breeds, due to inheritance. Anatomically, lesions are located mainly between the intervertebral spaces of T11-T12 to L1-L2. It is associated with a degeneration of the nucleus pulposus of the intervertebral disc, thus producing an extrusion or a protrusion. As a result of spinal cord compression the most frequent neurological disorders are included within the upper motor neuron syndrome (UMNS). A case of a 5 years old Dachshund female dog with kyphosis, thoracolumbar pain and a 15 days evolution paraparesis is described. To corroborate the diagnosis computerized axial tomography (CAT) was used. Images obtained assisted in defining the extent and nature of injuries, consisting of alterations in the appearance of the nucleus pulposus and a significant spinal cord compression. A decompressive surgery was proposed as a method to alleviate the neurological deficit. During surgery, images obtained by CAT were used to determine the number of vertebrae to be included in the laminectomy to facilitate removal of the extruded material and to more precisely locate the anatomic landmarks. Thirty days after surgery, the patient showed an incipient recovery of motor function and coordination of voluntary movements. It is concluded that neither loss of motor function nor severity of clinical signs allowed predicting the outcome of the case and the reversibility of the lesions. The use of CAT was an important tool for the diagnosis and resolution of the case.

Key words: thoracolumbar region, surgery, spinal cord compression, canine

Introducción

La columna vertebral del canino presenta dos tipos de articulaciones: las formadas entre los arcos vertebrales, clasificadas como de tipo sinovial y aquellas formadas por la unión de los extremos de los cuerpos vertebrales, que se clasifican como de tipo cartilaginosa, donde el medio de unión está constituido por un disco fibrocartilaginoso (Budras et al., 2007). Estos discos son más anchos en las regiones cervical y lumbar y más estrechos en la región torácica. El ligamento longitudinal dorsal recorre el piso del canal vertebral formando coberturas en forma de abanico sobre cada disco. La función de soporte del disco y su capacidad para tolerar las presiones depende de la constitución e integridad de sus componentes: el núcleo pulposo y el anillo fibroso.

La hernia discal es una enfermedad en la que parte del núcleo pulposo del disco intervertebral se desplaza presionando la médula espinal y genera lesiones neurológicas. Esta afección se observa con mayor frecuencia (85 %) en la región toracolumbar de los pequeños animales. En la región cervical estaría presente entre el 9 % y el 15 % de los casos y sólo hasta un 6 % se produciría a nivel lumbosacro (Griffin et al., 2009).

La hernia discal se presenta principalmente en caninos de entre los tres y seis años de edad (Lappalainen et al., 2001, Levine JM et al., 2006). El Dachshund es una de las razas más susceptibles debido a factores hereditarios, con una incidencia de hasta el 72 %. La lesión se localiza con mayor frecuencia entre los espacios intervertebrales T11-T12 hasta L1-L2. Normalmente se asocia con la degeneración del núcleo pulposo del disco intervertebral, pudiendo dar origen a una extrusión o una protrusión. Las alteraciones neurológicas más comunes son el dolor, la paraparesia ambulatoria o no ambulatoria en grados variables (Laitinen y Puerto, 2005) y la pérdida del control de esfínteres, signos que forman parte del síndrome de la neurona motora superior (SNMS).

Los impulsos eléctricos correspondientes a la sensibilidad al dolor profundo (nocicepción) son conducidos por fibras no mielinizadas de las vías espino-talámico y espinoreticular de la sustancia blanca del funículo lateral y ventral de la médula espinal. Estas fibras son relativamente resistentes a la compresión y su lesión indica un daño severo de la médula espinal y un déficit neurológico grave (Toombs y Waters, 2003).

Los signos clínicos del SNMS dependen de la localización anatómica de la lesión, la duración de la compresión y la fuerza compresora en el momento de la extrusión o protrusión discal (Griffin et al., 2009).

El objetivo del presente trabajo fue demostrar la importancia de la utilización de la tomografía axial

computarizada (TAC), como método de diagnóstico por imágenes para la resolución quirúrgica de las hernias discales en el canino. El uso de esta herramienta permitió percibir la magnitud real de las lesiones de la columna y médula espinal de nuestra paciente, ya que brindó imágenes en tiempo real, las que permitieron diseñar las estrategias quirúrgicas a utilizar.

Presentación del caso

Se presentó a consulta una hembra canina Dachshund, entera, de 5 años de edad y 8,5 Kg de peso, derivada de una Clínica Veterinaria de Trenque Lauquen, Argentina. Al examen físico, presentaba ligera cifosis y dolor toracolumbar, con paraparesia, principalmente del miembro pelviano derecho. La evolución del cuadro clínico era de 15 días. Al examen neurológico, el animal manifestaba signos correspondientes al SNMS, con hiperreflexia, hipertonicidad muscular, paresia espástica, déficit propioceptivo, pérdida de control de esfínteres, vejiga espástica (con micción intermitente) y sensibilidad profunda (nociceptiva) conservada.

Tomografía axial computarizada (TAC)

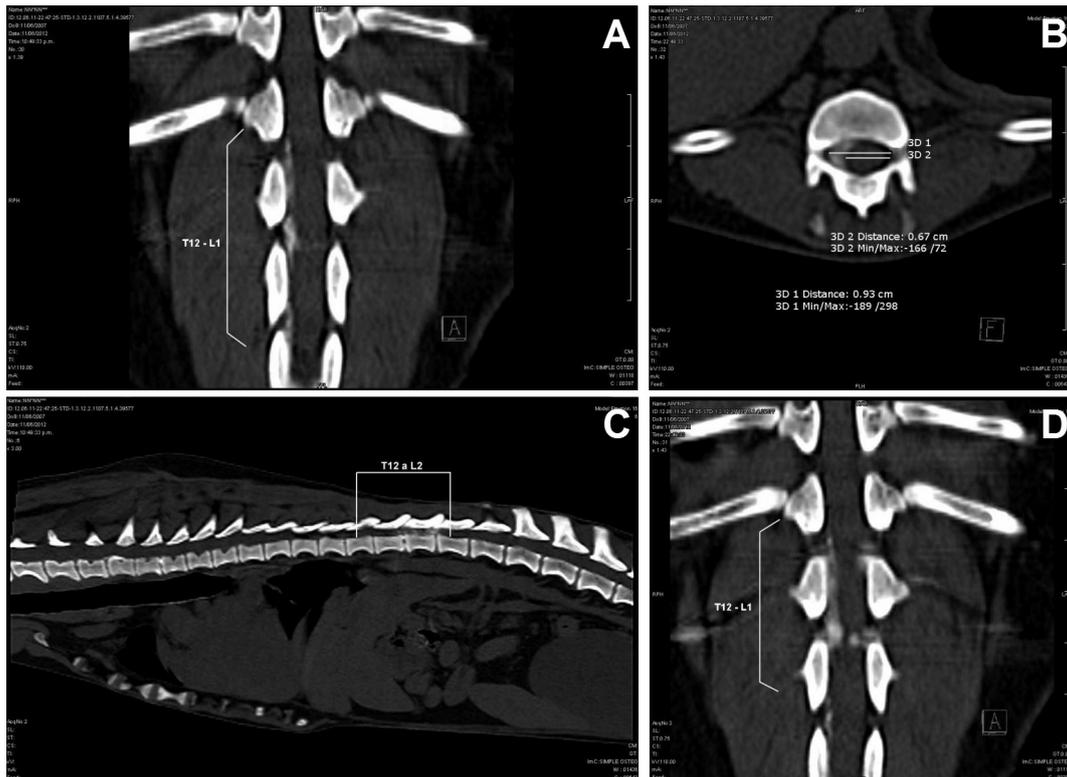
Este estudio complementario fue practicado bajo anestesia general. Las imágenes obtenidas fueron analizadas mediante el programa informático SIENET Sky – VA50B (SIEMENS). En los cortes coronales se observó material discal extruido y desplazado, extendiéndose longitudinalmente desde la vértebra T12 hasta la L2 (Fig. 1A). En los cortes transversales se observaba una estenosis del canal vertebral con material extruido que reducía el espacio epidural (Fig. 1B). En los cortes medianos la compresión medular aparecía concentrada en el segmento T12 (Fig. 1C). El material discal extruido se ubicaba en lateral derecho de la médula espinal, extendiéndose desde la vértebra T12 hasta la L1. La mayor compresión medular se presentaba entre los segmentos vertebrales T13 y L1 (Fig. 1D).

Este estudio permitió determinar con precisión el alcance y el carácter de las lesiones que mostraban alteraciones en la apariencia del núcleo pulposo, con extrusión del anillo fibroso y el núcleo pulposo hacia el canal vertebral, comprimiendo la médula espinal en grado 1 (Laitinen y Puerto, 2005).

Cirugía descompresiva

Se preparó al paciente para la cirugía en el quirófano y se lo posicionó en decúbito ventral. El abordaje de la columna vertebral se realizó por vía dorsal. Para ello, se incidió la piel sobre las apófisis espinosas desde la vértebra T8 hasta la L4. Posteriormente, se

Figura 1. Diagnóstico de la extrusión del disco intervertebral por medio de la TAC.



A: Sección coronal (vista dorsal). Se observa la extrusión del disco intervertebral desde T12 hasta L2. B: Sección transversal. El material extruido reduce el espacio epidural, provocando una estenosis del canal vertebral. C: Sección mediana que muestra la compresión de la médula espinal y el material extruido. D: Sección coronal (vista dorsal). Se observa el desplazamiento del material extruido hacia el lateral derecho de la médula espinal, entre las vértebras T12 y L1.

continuó con la incisión de la fascia toracolumbar, a ambos lados de las apófisis espinosas. A continuación, se desinsertaron los músculos epiaxiales mediante la ayuda de un elevador de periostio, los que se reflejaron hacia ventrolateral de las apófisis transversas lumbares y de las dos últimas costillas (Fig. 2A). Se removieron las apófisis espinosas de las dos últimas vértebras torácicas y de las dos primeras lumbares mediante una gubia. Los restos óseos se conservaron en solución fisiológica estéril hasta su posterior utilización como injerto en la artrodesis.

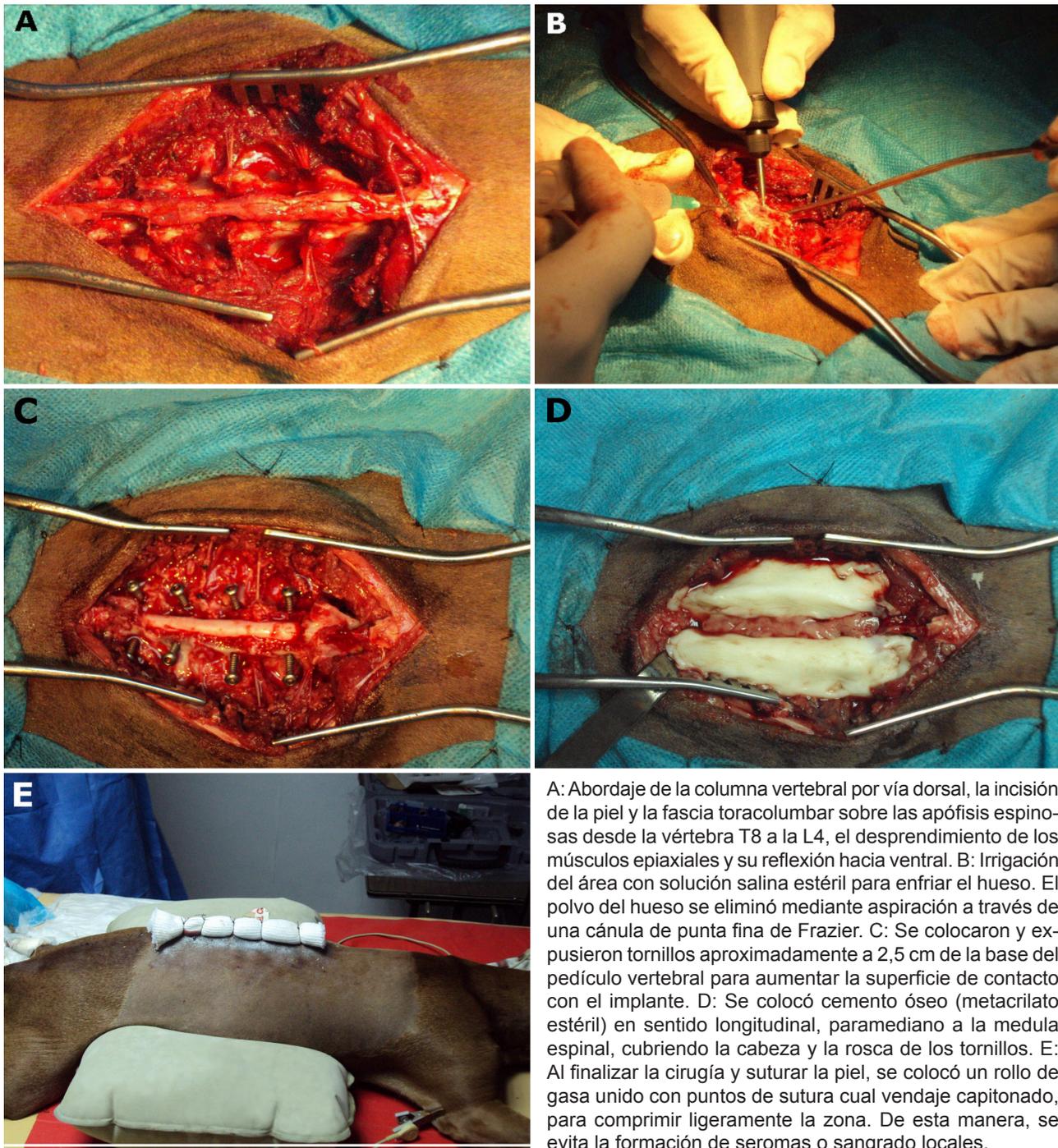
La descompresión de la médula espinal y la remoción del material extruido se realizó mediante laminectomía dorsal (Kirpensteijn y ter Haar, 2013). Para ello, se utilizó una fresa de 3 mm, con la que se eliminó la capa externa del hueso compacto y la capa media de hueso esponjoso. De manera simultánea, y para enfriar el hueso, se realizó la irrigación con solución fisiológica (solución salina estéril). El polvo óseo fue removido mediante aspiración con una cánula de punta fina de Frazier (Fig. 2B).

La capa interna de las láminas y pedículos vertebrales se retiró mediante gubia Kerrison de 1 mm, en combinación con una gubia recta doble articulada.

Esto permitió la remoción del material discal extruido y la descompresión medular.

Una vez removido el material extruido, se colocaron los tornillos transpediculares sobre la columna toracolumbar (Fig. 2C). Como guía de referencia, se utilizaron los cortes transversales de la TAC. Mediante el programa SIENET Sky se calculó el ángulo de convergencia apropiado para cada segmento vertebral y la longitud necesaria de cada tornillo. Los ángulos obtenidos fueron: T12 = 39°, T13 = 36°, L1 = 41° y L2 = 37°. Los tornillos se dejaron expuestos aproximadamente 2,5 cm desde la base del pedículo vertebral, para aumentar la superficie de contacto entre el implante metálico y el cemento óseo (Fig. 2D). A continuación, se recubrió la porción dorsal de la médula espinal con tejido adiposo obtenido del plano subcutáneo. Asimismo, se removió el periostio de los restos óseos obtenidos de las apófisis espinosas, los que luego fueron seccionados en trozos pequeños. Los mismos fueron posteriormente colocados alrededor de las apófisis articulares y a los lados de los pedículos vertebrales, para favorecer la artrodesis entre los segmentos vertebrales. Luego, se colocó el cemento óseo (metacrilato estéril - Subiton®, Argentina) en sentido longitudinal

Figura 2. Cirugía descompresiva.



A: Abordaje de la columna vertebral por vía dorsal, la incisión de la piel y la fascia toracolumbar sobre las apófisis espinosas desde la vértebra T8 a la L4, el desprendimiento de los músculos epiaxiales y su reflexión hacia ventral. B: Irrigación del área con solución salina estéril para enfriar el hueso. El polvo del hueso se eliminó mediante aspiración a través de una cánula de punta fina de Frazier. C: Se colocaron y expusieron tornillos aproximadamente a 2,5 cm de la base del pedículo vertebral para aumentar la superficie de contacto con el implante. D: Se colocó cemento óseo (metacrilato estéril) en sentido longitudinal, paramediano a la medula espinal, cubriendo la cabeza y la rosca de los tornillos. E: Al finalizar la cirugía y suturar la piel, se colocó un rollo de gasa unido con puntos de sutura cual vendaje capitonado, para comprimir ligeramente la zona. De esta manera, se evita la formación de seromas o sangrado locales.

paramediano, incluyendo la cabeza y la rosca de los tornillos. Aproximadamente 10 min después, se irrigó la zona con solución fisiológica para evitar la disipación del calor de la reacción exérgica del cemento óseo hacia la médula espinal.

Para suturar la fascia toracolumbar y cerrar el resto de los planos anatómicos, se recortaron los sectores desvitalizados de los músculos epiaxiales. Después de suturar la piel, se colocó un rollo de gasa

unido con puntos de sutura sobre la herida para ejercer una compresión ligera y evitar la acumulación de exudados o de hemorragias locales (Fig. 2E).

La paciente permaneció internada durante 48 horas, período en el cual se le administraron antibióticos y corticoesteroides por vía endovenosa. Fue externada al segundo día y se le sugirió al propietario hacer rehabilitación posoperatoria del animal, consistente en fisioterapia, electroestimulación y masaje muscular.

Examen neurológico postquirúrgico

La evolución postquirúrgica de la paciente fue seguida durante tres años. En el examen neurológico realizado a los 7 días de la cirugía descompresiva la paciente mostraba una evolución favorable a la cirugía, sin embargo, se mantenía la paraparesia de grado 1 y un déficit propioceptivo en miembros pelvianos (Fig. complementaria 1). A los 30 días de la cirugía, la paciente mostró recuperación de la propiocepción. Esto representa la primera señal indicativa de la recuperación de la función motora en caninos con lesiones de la médula espinal (Olby, 2003) (Fig. complementaria 2). A los 3 meses, se observó coordinación de los movimientos voluntarios, pero cierta debilidad muscular en los miembros pelvianos debido a la atrofia muscular (Fig. complementaria 3). Para ayudar a la recuperación de la actividad neuromuscular, se sugirió al propietario la aplicación de ejercicios terapéuticos asistidos con arnés o cincha. A los 3 años, el comportamiento del animal podría considerarse normal, a pesar de la utilización de un carrito ortopédico, ya que recuperó por completo la masa muscular de los miembros pelvianos, los que utiliza para su desplazamiento, controla esfínteres y mueve la cola (Fig. complementaria 4).

Diagnóstico diferencial

En el diagnóstico diferencial se consideró al meningioma espinal, ya que el mismo puede aparecer en el canal vertebral, como una masa solitaria, unilateral, fusiforme, de color blanco bien definido a la TAC, que ocupa varios segmentos vertebrales (Ferreira y Correia, 2002). El examen histopatológico confirmó que el material recuperado era parte del disco intervertebral y del núcleo pulposo, con evidencias de degeneración.

Discusión y conclusiones

Las imágenes de la TAC permitieron determinar los reparos anatómicos exactos para cada vértebra y establecer un abordaje quirúrgico, teniendo en cuenta la biomecánica de la región para recuperar la estabilidad de la columna vertebral. La representación tridimensional del cuerpo animal ayudó a la interpretación de las lesiones anatómicas y a la planificación del tratamiento quirúrgico (Dennis, 2000; Seo *et al.*, 2014). Algunos estudios han demostrado que el material mineralizado dentro del canal espinal puede ser observado claramente usando la TAC, sin la necesidad de introducir un medio de contraste. Esto se debe a que la extrusión del disco se produce, con frecuencia, después de la mineralización del núcleo pulposo, principalmente en razas condrodistróficas (Widmer y Thrall, 2002; Brawner y Hathcock, 2003). Una de las ventajas del uso de la TAC en caninos con signología espinal es que evita la inyección de un medio de

contraste en el espacio subaracnoideo, disminuyendo así el riesgo de sufrir una mayor compresión medular (Olby, 2000). Asimismo, con la TAC se puede reconstruir la zona explorada de manera tridimensional, lo que brinda un beneficio a la planificación quirúrgica (Griffin *et al.*, 2009). Sin embargo, si bien la TAC resulta una herramienta valiosa para el diagnóstico, no debe reemplazar al examen físico-neurológico básico. A partir de éste, surgirá la conveniencia de utilizar este método auxiliar de diagnóstico que sin dudas brinda abundancia de detalles.

La TAC en sus distintas formas y la resonancia magnética nuclear (RMN) son dos métodos complementarios que aportan datos de relevante valor en el estudio de alteraciones anatómicas. La Neurología y la Cirugía se han nutrido de estos métodos para lograr diagnósticos más precisos y procedimientos quirúrgicos más exitosos (Goldman, 2007; Hoeffner *et al.*, 2012).

La RMN permite el reconocimiento temprano y la clasificación de la degeneración discal. Las imágenes obtenidas brindan una alta proporción de la relación señal/ruido, lo que la hace apropiada para la observación de los detalles anatómicos (Griffin *et al.*, 2009). Si bien la TAC muestra imágenes más heterogéneas del material extruido, dependiendo de su evolución (las imágenes se homogenizan con el tiempo), es muy útil para la demostración de los cambios morfológicos macroscópicos del disco afectado y la detección de lesiones calcificadas. Otra ventaja de la TAC reside en ser menos sensible al movimiento de los pacientes (Sopena y Martí-Bonmatí, 2009). Al igual que la RMN proporciona imágenes en tiempo real y permite su almacenamiento y transferencia, por lo cual es una buena herramienta para guiar procedimientos quirúrgicos (Griffin *et al.*, 2009).

En los casos de hernia discal estaría indicada la aplicación de una hemilaminectomía sobre la vértebra adyacente al disco afectado, ya que tiene ciertos beneficios sobre la laminectomía dorsal: el material extruido podría ser más accesible para su remoción y el proceso de cicatrización sería más probable que en la laminectomía (Griffin *et al.*, 2009). Sin embargo, en la paciente tratada fue necesario aplicar la laminectomía dorsal de cuatro arcos vertebrales debido a que la evolución de la lesión había generado una fragmentación del disco, el que se expandió hacia ambos lados del canal vertebral y hacia craneal y caudal del sitio original.

Algunos autores argumentan que la duración de los signos clínicos en caninos paraparéticos influye directamente en el tiempo de recuperación posoperatoria, especialmente en aquellos animales que presentan signos durante más de 6 días (Ferreira y Correia, 2002). Sin embargo, otros estudios informan

que esta correlación no se puede establecer (Kazakos *et al.*, 2005). En nuestro caso, la paciente presentaba paraparesia 15 días previos al tratamiento quirúrgico. Por lo tanto, se puede concluir que ni la pérdida de la función motora, ni la severidad de los signos clínicos son elementos objetivos para formular un pronóstico. La TAC es una herramienta relevante que permitió precisar el alcance y la severidad de las lesiones, tanto en el diagnóstico como en la planificación de la cirugía descompresiva.

Las aplicaciones de la TAC en medicina veterinaria están avanzando constantemente en el mundo. Sin embargo, la relativa falta de disponibilidad de equipos de exploración, junto con el gasto que implica su instalación, muchas veces limitan su uso en los pacientes.

Referencias Bibliográficas

- Brawner WR, Hathcock JT. Cap. 76. Neuroradiology. En: Slatter D, 2003; Textbook of Small Animal Surgery. EEUU; Saunders, pp. 459-60.
- Budras, KD, McCarthy, PH, Fricke, W, Richter, R. Cap 1 Surface of the Body and Axial Skeleton. En: Budras KD, 2007. Anatomy of the Dog: An Illustrated text. 5th edition., Hannover, Germany, Schlutersche GmbH & Co, pp. 2-10.
- Dennis R. Exploración por TAC y RM en Veterinaria. 2000. XVII Congreso Anual AMVAC. [citado el 1/02/2015] Disponible en: http://www.advanceveterinary.com/Amvac00_02/2000/tacyrnm01.pdf.
- Ferreira AJ, Correia JH, Jaggy A. Thoracolumbar disc disease in 71 paraplegic dogs: influence of rate of onset and duration of clinical signs on treatment results. J. Small Anim Pract. 2002; 43:158-63.
- Griffin JF, Levine J, Kerwin S. Canine thoracolumbar intervertebral disc disease: pathophysiology, neurologic examination, and emergency medical therapy. Compend Contin Educ Vet. 2009; 31(3):E2.
- Goldman LW. Principles of CT and CT technology. J Nuc Med Technol 2007; 115-28.
- Hoeffner EG, Mukherji SK, Srinivasan A, Quint DJ. Neuro-radiology Back to the Future: Spine Imaging. AJNR Am J Neuroradiol. 2012; 33(6):999-1006.
- Kazakos G, Polizopoulou ZS, Patsikas MN, Tsimopoulos G, Roubies N, Dessiris A. Duration and severity of clinical signs as prognostic indicators in 30 dogs with thoracolumbar disc disease after surgical decompression. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. 2005; 52(3):147-52.
- Kirpensteijn J, ter Haar G, 2013. Reconstructive techniques of the neck and trunk. En: Kirpensteijn J. Reconstructive Surgery and Wound Management of the Dog and Cat. Cap 7. London, UK; Manson Publishing, pp. 153-82.
- Lappalainen A, Norrgård M, Alm K, Snellman M, Laitinen O. Calcification of the Intervertebral Discs and Curvature of the Radius and Ulna: A Radiographic Survey of Finnish Miniature Dachshunds. Acta Vet Scand. 2001; 42:229-36.
- Laitinen OM, Puerto DA. Surgical decompression in dogs with thoracolumbar intervertebral disc disease and loss of deep pain perception: A retrospective study of 46 cases. Acta Vet Scand. 2005; 46(1-2):79-85.
- Levine JM, Levine GJ, Kerwin SC, Hettlich BF, Fosgate GT. Association between various physical factors and acute thoracolumbar intervertebral disk extrusion or protrusion in Dachshunds. J Amer Vet Med Assoc. 2006; 229:370-5.
- Olby N, Levine J, Harris T, Munana K, Skeen T, Sharp N. Long-term functional outcome of dogs with severe injuries of the thoracolumbar spinal cord: 87 cases (1996-2001). J Amer Vet Med Assoc. 2003; 222:762-9.
- Olby NJ, Muñana KR, Sharp NJ, Thrall DE. The computed tomographic appearance of acute thoracolumbar intervertebral disc herniations in dogs. Vet Radiol Ultrasound. 2000; 41(5):396-402.
- Seo E, Choi J, Choi M, Yoon J. Computed tomographic evaluation of cervical vertebral canal and spinal cord morphometry in normal dogs. J Vet Sci. 2014; 15(2):187-93.
- Sopena R, Martí-Bonmatí L. Técnicas de imagen multimodalidad. Todo Hospital. 2009; 255:190-6.
- Toombs JP, Waters DJ. Intervertebral disc disease. En: Slatter D, 2003. Textbook of Small Animal Surgery. Philadelphia; Elsevier Science, pp. 1193-209.
- Widmer, WR; Thrall, D.E. Canine and feline intervertebral disc disease, myelography, and spinal cord disease. En: Thrall DE, 2002. Textbook of Veterinary Diagnostic Radiology, 4th ed. Philadelphia; Saunders, pp. 110-26.
- Zimmerman, KL, Bender, HS, Boon, D, Prater, MR, Thorn, CE, Prater, D, Robertson, JL, Saunders, JK, Sponenberg, DP, Inzana, KD, Lanz, OI, Wright, E. A comparison of the cytologic and histologic features of meningiomas in four dogs. Vet Clin Pathol. 2000; 29:29-34.

Conflictos de intereses:

Todos los autores declaran que no existen conflictos de intereses, incluyendo relaciones financieras, personales o de otro tipo con otras personas u organizaciones que pudieran influir de manera inapropiada en el trabajo.

Figuras complementarias

Figura 1. El video muestra la evolución favorable de la paciente a los 7 días posteriores a la cirugía. Se perciben, no obstante, paraparesia y un déficit propioceptivo en miembros pelvianos. <http://www.fcv.unlp.edu.ar/analecta/videos/2015/266.1>

Figura 2. A los 30 días, la paciente mostraba recuperación de la propiocepción y comienzo de la recuperación de la función motora. <http://www.fcv.unlp.edu.ar/analecta/videos/2015/266.2>

Figura 3. A los tres meses, la paciente mostró coordinación de los movimientos voluntarios con espasticidad de los miembros. <http://www.fcv.unlp.edu.ar/analecta/videos/2015/266.3>

Figura 4. Video mostrando la evolución de la paciente a los 3 años. Se observa recuperación de la masa muscular de los miembros pelvianos, su apoyo, con la ayuda de un carrito ortopédico y control de la micción. <http://www.fcv.unlp.edu.ar/analecta/videos/2015/266.4>

INSTRUCCIONES A LOS AUTORES

Política editorial y generalidades

Las opiniones expresadas por los autores que contribuyen con *Analecta Veterinaria* no reflejan, necesariamente, las opiniones de este medio ni de las entidades que lo auspician ni de nuestra institución. Asimismo, *Analecta Veterinaria* agradece el auspicio de las distintas empresas que la respaldan, pero deja establecido que dichas empresas no participan de las decisiones editoriales y su apoyo no genera obligaciones comerciales.

Analecta Veterinaria autoriza la reproducción de sus artículos con fines académicos, con la única condición de la mención de la fuente cuando corresponda. El uso de nombres comerciales destinados a la identificación de productos en el contexto de los artículos presentados no implica respaldo directo o indirecto ni promoción de dichos productos por parte de la revista. Los editores de *Analecta Veterinaria* tienen en consideración el tratamiento ético de los animales de experimentación y se reservan el derecho de no publicar trabajos que no cumplan esta premisa. Los autores deberán poder certificar la aprobación de su proyecto de investigación por parte del comité de ética de su unidad académica, o consignar según qué normas nacionales o internacionales realizaron sus trabajos. Todos los autores ceden a *Analecta Veterinaria* los derechos de autor, se hacen responsables de los datos y el contenido, dejan constancia de que han participado activamente en el proceso de la investigación y/o la confección del trabajo, declaran eventuales conflictos de intereses, mencionan los soportes financieros y explicitan la aprobación por los comités institucionales y autoridades regulatorias que correspondan a cada caso. No se asume responsabilidad editorial por la exactitud de las referencias. Es responsabilidad exclusiva de los autores asegurarse el permiso para citar datos no publicados. Eventualmente, los editores podrán requerir a los autores información probatoria. Idiomas. *Analecta Veterinaria* acepta artículos en español o en inglés para su publicación. Los resúmenes de los artículos se publicarán en español y en inglés. Originalidad. La información contenida en el trabajo no deberá ser enviada a más de una revista o medio de comunicación al mismo tiempo y debe ser original. El envío de un artículo publicado en otro sitio por otro autor (plagio) o por el mismo autor (publicación duplicada) se considera falta ética grave que invalida su publicación en *Analecta Veterinaria*.

Tipos de trabajo para publicación. Se aceptan: artículos de investigación, comunicaciones cortas, descripciones de casos, informes técnicos y revisiones bibliográficas (ver definiciones y características de cada tipo de trabajo). Los editores decidirán la prioridad de publicación de los trabajos. Otro tipo de contenidos, como por ejemplo resúmenes de comunicaciones en reuniones científicas, serán editados como parte de un suplemento. Los organizadores de las mencionadas reuniones deberán adecuar los resúmenes a las instrucciones que se encuentran en el punto 1.3.

Analecta Veterinaria adhiere a lo propuesto por el consenso de Vancouver del International Committee of Medical Journal Editors con respecto a asuntos de índole general como, por ejemplo, la definición de la autoría, las responsabilidades de los editores y las causas que obran

como posibles conflictos de intereses. En relación con otros aspectos, como el formato y el estilo de preparación del original, incluyendo las referencias bibliográficas, *Analecta Veterinaria* establece un conjunto de normas que se detallan en el apartado Instrucciones para la preparación del trabajo para publicación. Todas las dudas que se susciten podrán ser consultadas por correo electrónico a:

analecta@fvc.unlp.edu.ar

Instrucciones para la preparación del trabajo

Definición. El original para publicación comprende un documento principal y otros archivos.

1- Documento principal: se trata de un archivo que contiene la página de presentación, las secciones del trabajo (que varían según su tipo), los agradecimientos, la declaración de conflicto de intereses, las referencias bibliográficas y las leyendas para las figuras. Este documento podrá tener algunos de los siguientes formatos: doc, docx o rtf.

2- Otros archivos: tablas, figuras, material complementario.

Características generales

Los artículos escritos en inglés deberán seguir la gramática propia del inglés británico. Se aceptan otras variantes del idioma inglés, siempre que se respeten de manera uniforme en todo el trabajo. Las unidades de medida se expresarán según el Sistema Internacional de Medidas (documento disponible para su descarga en la página web de la facultad: <http://www.fvc.unlp.edu.ar/analecta>). Las abreviaturas deberán ser aclaradas la primera vez que el término se mencione, pero no será necesaria su utilización si el término se menciona menos de cinco veces. Si el trabajo requiere el uso de numerosas abreviaturas (más de diez) deberá generarse una lista que se incluirá luego de los resúmenes. Ciertas siglas o acrónimos y abreviaturas (ATP, DNA, ELISA, OMS, PBS, Dr., N°, entre otras) no requieren aclaración.

Para la denominación de enzimas, bacterias, virus, así como los términos anatómicos, se seguirán las recomendaciones de las nóminas y consensos vigentes para la especialidad correspondiente. Los productos comerciales deberán ser identificados mediante el símbolo de marca registrada consignando, además, los nombres genéricos de los componentes principales. Si la mención se efectúa en el apartado Materiales y Métodos deberán consignarse, además, el nombre y la dirección del fabricante (ciudad, país). Los nombres científicos de categoría genérica o inferior se escribirán en cursivas.

1- Documento principal

1.1. Formato general del documento (común a todo tipo de trabajos)

El documento se configurará en papel A4, con márgenes de 3 cm como mínimo por lado y 1,5 de interlineado. El texto deberá alinearse en los márgenes izquierdo y derecho (texto justificado). Se utilizará el tipo de fuente Arial de 12 puntos. Las páginas deberán estar numeradas, utilizando números arábigos en su ángulo inferior derecho.

Asimismo, las líneas deberán estar numeradas a lo largo de todo el documento de manera consecutiva, comen-

zando en la primera página o página de presentación. El uso de guiones automáticos de separación de palabras en sílabas estará permitido exclusivamente para los resúmenes de congresos.

1.2. Otras características comunes a todo tipo de trabajos

1.2.1. Primera página o página de presentación: contendrá el título del trabajo en dos idiomas, los autores y sus respectivas filiación/lugar de trabajo, la dirección electrónica de todos los autores, los datos completos del autor de contacto y el título abreviado. De ser necesario, la página de presentación podrá sobrepasar una página de extensión.

1.2.2. Páginas segunda y tercera: contendrán los resúmenes y las palabras clave.

1.2.3. Páginas sucesivas: contendrán el texto (organizado en secciones), los agradecimientos, la declaración de conflictos de intereses, las referencias bibliográficas y las leyendas para las figuras.

1.2.1 Primera página: página de presentación

-Título del trabajo. Se escribirá con la inicial en mayúscula (tipo oración) y en negrita, centrado, con fuente Arial y tamaño de fuente 14. Será conciso pero suficientemente informativo. No contendrá abreviaturas. Se dejará un espacio de interlineado y luego se consignará el título en inglés (o en español, si el artículo estuviera escrito en inglés), con las mismas características tipográficas.

-Nombres de los autores. Se dejará un espacio después del título en el segundo idioma. Se escribirá primero el apellido y luego las iniciales de los nombres. Se continuará listando el resto de los autores, separándolos entre sí por comas. Se colocarán números con formato de superíndice para indicar, más adelante, la filiación institucional.

-Filiación institucional/Lugar de trabajo. Se consignará a renglón seguido de los apellidos de autores. En primer término, se deberá indicar la unidad de investigación (Cátedra, grupo de trabajo, Laboratorio, Instituto). Luego, la Facultad u otra institución de la que depende y la Universidad u organismo superior. En caso de tratarse de un profesional de actividad en el ámbito privado se consignará "Profesional independiente".

El autor de contacto será identificado con un asterisco.

-Título abreviado. Se escribirá en el mismo idioma que el trabajo, luego de la filiación institucional, dejando un espacio. Consistirá en un título corto, de 45 caracteres o menos, incluyendo espacios.

-Datos personales.

Por debajo del título abreviado, se consignarán todos los datos correspondientes al autor de contacto: nombre completo, dirección postal laboral y electrónica y teléfono. Sólo la dirección de correo electrónico será visible a los lectores en la versión publicada.

Las direcciones de correo electrónico del resto de los autores deberán ser incluidas, aunque estas no serán publicadas en el artículo.

Ejemplo de primera página

Título completo en idioma del trabajo

Título en segundo idioma (inglés/español)

Autor AA¹, Autor BB^{1,2}, Autor CC³, Autor DD⁴*

1. Cátedra, Departamento, Facultad, Universidad; 2. Laboratorio, CONICET/CIC; 3. Profesional independiente; 4. Laboratorio, INTA. *Correo de contacto: dd@mail.com

Título abreviado

Datos del autor de contacto (*)

Nombre completo

Dirección postal laboral

Dirección electrónica laboral

Teléfono

Correo electrónico de los autores

Autor AA: aa@mail.com

Autor BB: bb@mail.com

Autor CC: cc@mail.com

1.2.2. Páginas segunda y tercera

La segunda página contendrá el resumen del trabajo en el idioma en que fue redactado, bajo el subtítulo de RESUMEN y, por debajo, dejando un espacio, se deberán incluir las palabras clave en el mismo idioma, bajo el subtítulo PALABRAS CLAVE. En la siguiente página (tercera), se redactará el resumen en el segundo idioma (en inglés se titulará como ABSTRACT). Dejado un espacio, se consignarán las palabras clave con el subtítulo

KEY WORDS

-Características de los resúmenes. En ellos deben constar los objetivos y principales resultados, desarrollados en 250 palabras o menos. Se sugiere evitar acrónimos, siglas y abreviaturas. No estarán divididos en secciones ni contendrán referencias.

-Palabras clave. Son palabras o expresiones adicionales que facilitan la recuperación del documento. Para una mayor utilidad en la búsqueda dentro de los sistemas de indización, se sugiere la utilización de términos no incluidos ni en el título ni en el resumen. Se permiten hasta cinco por idioma.

1.2.3. Páginas sucesivas

a- Texto. Organizado en secciones. Estas estarán encabezadas por subtítulos en mayúsculas, sin punto final. El texto contendrá las entradas para todas las tablas, figuras, referencias bibliográficas y material complementario. A continuación del texto se listarán las referencias bibliográficas.

b- Referencias bibliográficas

Cantidad. Se establece un máximo de treinta referencias para los artículos de investigación y quince para las comunicaciones cortas, descripciones de casos e informes técnicos. Para las revisiones bibliográficas se establece un mínimo de cuarenta referencias.

Formato de las citas en el texto. Se consignará, entre paréntesis y en color de fuente azul, el apellido del primer autor (seguido de la expresión et al si se trata de más de dos autores) y el año de publicación. Si el artículo tiene sólo dos autores, se consignarán ambos, separados por la letra y. Si la construcción así lo requiere podrá colocarse la cita a mitad de la oración.

... puede persistir el infiltrado de linfocitos (Deeg et al 2002).

El autor también podría haber elegido decir: "Según Deeg et al (2002), puede persistir el infiltrado de linfocitos.

Si la misma afirmación se sustenta en más de una cita bibliográfica, estas deberán estar separadas por medio de un punto y coma. La incorporación de las citas entre paréntesis será alfabética. Si se incluyeran dos o más referencias del mismo primer autor, las fechas de publicación deberán estar separadas por comas, en orden cronológico ascendente.

... en las células apoptóticas se produce la externalización de la fosfatidilserina de la

membrana (Fadok et al 1992; Savill 1993,1997; Willie 1997).

Si se incluyeran dos o más referencias del mismo primer autor y del mismo año, se

identificarán con letras:

... inducido por las células macrofágicas (Jones et al 2009a, 2009b)

Formato de las citas en la lista de referencias (al final del texto).

El orden será alfabético.

Artículos en publicaciones periódicas. Se citará la nómina completa de autores y sus iniciales. Luego del punto seguido, se introducirá el título del trabajo con mayúsculas y minúsculas (tipo oración), sin comillas ni negritas. A continuación, el título abreviado de la revista según consta en el servicio PubMed. Luego, el año, volumen, número y páginas, en ese orden, sin espacios luego de los signos de puntuación, según el formato que se muestra a continuación:

Deeg CA, Ehrenhofer M, Thurau SR, Reese S, Wildner G, Kaspers B. Immunopathology of recurrent uveitis in spontaneously diseased horses. *Exp Eye Res.* 2002;75(2):127-33.

Si se trata de una publicación anticipada disponible en línea, deberá consignarse (corresponde a las publicaciones que figuran como Epub ahead of print).

Libros. Se citará el o los autores, el año de publicación, el título y la edición (si no es la primera). Luego, la ciudad de la publicación y el nombre de la editorial, separados por punto y coma.

Gilbert SF, 2006. *Biología del desarrollo*. 7° Ed. reimp. Buenos Aires; Médica Panamericana.

Capítulos de libros. La cita constará de: autor/es del capítulo, título del capítulo. En: autor del libro, año de publicación. Luego el título del libro, la edición (si no es la primera).

Ciudad de publicación: nombre de editorial, páginas inicial y final del capítulo.

García V, Ochoa L, Quiroga MF y Pasquinelli V. Aspectos celulares y moleculares de la respuesta inmune frente a las micobacterias. En: Rabinovich GA, 2004.

Inmunopatología molecular: nuevas fronteras de la medicina. Un nexo entre la investigación biomédica y la práctica clínica. Buenos Aires; Médica Panamericana, pp. 217-27.

Libros electrónicos de acceso libre en internet. Autor, año de publicación. Título [libro electrónico/e-book]. Lugar de publicación (si se conoce): editor. Disponible en: (URL) [fecha de acceso].

En caso de dudas acerca de cómo citar otro tipo de material (estándares internacionales, leyes, publicaciones parciales en e-books de Congresos, patentes, informes de organizaciones) comunicarse con la revista.

c- Agradecimientos

Los autores pueden agradecer a individuos que han realizado aportes significativos diferentes a los de los coautores. En este apartado deberá consignarse, además, la fuente de financiamiento del trabajo.

d- Declaración de conflictos de intereses

Bajo el subtítulo CONFLICTOS DE INTERESES se

consignarán las relaciones financieras o personales con organizaciones o personas que pueden influenciar o sesgar los resultados del trabajo, o declararán que no existen conflictos de intereses.

Ejemplo:

Todos los autores declaran que no existen conflictos de intereses, incluyendo las relaciones financieras, personales o de otro tipo con otras personas u organizaciones que pudieran influir de manera inapropiada en el trabajo.

1.2.4. Formando parte del documento principal, pero en hoja aparte (página siguiente a los puntos c y d) se consignarán las leyendas para las figuras. Las tablas se enviarán en hoja aparte en un archivo con el título y las referencias correspondientes, que deberán seguir los mismos criterios tipográficos.

1.3 Tipos de trabajos

-Artículos de investigación: son informes completos de investigaciones originales o de meta-análisis. Constan de las siguientes secciones: Introducción, Materiales y Métodos,

Resultados y Discusión y Conclusiones.

-Comunicaciones cortas: se trata de informes originales que se caracterizan por ser acotados en extensión o envergadura, o que en razón de su novedad requieren comunicación inmediata como anticipo de otra más exhaustiva. Constan de las mismas secciones que los artículos de investigación. No podrán tener más de 4 páginas de texto ni más de 3 figuras.

-Revisiones bibliográficas: son revisiones narrativas dirigidas a la actualización de un tema relevante y que incluyen la discusión crítica del estado del conocimiento. Constan de:

Introducción, Subtítulos (los que resulten apropiados al tema en cuestión) y Discusión y Conclusiones.

-Descripción de casos: se trata de casos con aspectos inusuales que provean información significativa y original. Este concepto incluye la presentación o progreso poco habitual de una enfermedad, efectos colaterales o adversos no informados durante tratamientos o planes de vacunación, entre otros. Constan de Introducción, Presentación del Caso (con los subtítulos que requiera el tipo de caso) y Discusión y Conclusiones. Deberá incluir hallazgos relevantes, tanto positivos como negativos, que surjan de los exámenes realizados, la interpretación de los resultados y su discusión con referencias a los artículos citados.

-Informes técnicos: descripción y análisis de técnicas novedosas en los ámbitos de la investigación, el diagnóstico o el tratamiento quirúrgico. Constan de Introducción, Descripción Metodológica y Discusión y Conclusiones. En este y otros tipos de trabajo que así lo requieran, la descripción metodológica puede enriquecerse mediante videos de alta calidad.

Formato de resúmenes de presentaciones en reuniones científicas. Instrucciones para sus organizadores.

La presentación deberá realizarse en hoja A4, con un ancho de 8 cm, sin recuadrar, con tipografía Arial 9 pt e interlineado sencillo. La redacción deberá ordenarse como se describe a continuación.

Primer renglón: Título del trabajo, proyecto, beca o tesis, en negrita, sin abreviaturas, en tipografía mayúscula/minúscula.

Segundo renglón: Apellido completo e iniciales de los autores en tipografía mayúscula/minúscula.

Tercer renglón: Lugar de trabajo de los autores.

Cuarto renglón: en blanco.

Del quinto renglón en adelante se escribirá el texto. No deberá superar las 250 palabras y se organizará en Introducción, Objetivo/s, Metodología, Resultados y Conclusiones, aunque los títulos de estas secciones no deben aparecer. Para aquellos autores que presentan su plan de trabajo, deberá reemplazarse la sección de Resultados y Conclusiones por la de Resultados Esperados. Los resúmenes no pueden incluir gráficos ni imágenes, pero puede contener valores numéricos de los resultados encontrados. Se debe minimizar el uso de abreviaturas; en caso de ser utilizadas, deberán aclararse la primera vez que se citen y estar de acuerdo con el sistema internacional de unidades (SI).

2. Otros archivos

Figuras. Se consideran figuras que ilustran el trabajo tanto a las fotografías como a los dibujos lineales y esquemas. Deberán ser numeradas correlativamente con números arábigos y citadas en el texto en el orden que corresponda. En caso de tratarse de fotografías, estas no podrán incluir rostros de personas que no sean autores, o animales con marcas específicas que permitan reconocerlos, excepto que se posea consentimiento por escrito de los propietarios involucrados. Es responsabilidad de los autores obtener permiso de los poseedores de la propiedad intelectual para reproducir figuras o tablas que han sido publicadas en otro sitio. Las ilustraciones deben tener un contraste adecuado. Deberán ser enviadas en formato TIFF. Las figuras escaneadas deberán tener una resolución de 300 dpi (para imágenes fotográficas macro o microscópicas) o de 600 a 1200 dpi (para dibujos lineales). El tamaño de letras y números incluidos en las figuras deberá ser el adecuado para que conserve la legibilidad, aún luego de la reducción de tamaño. Las leyendas para las figuras deberán constituir una descripción precisa del contenido de las figuras y mencionar las técnicas cuyos resultados allí se muestran.

Tablas. Las tablas se diseñarán usando la función correspondiente del procesador de texto o de las planillas de cálculo. Deben ser de estructura sencilla, sin sombreados y sin divisiones entre las filas o las columnas.

Material complementario

Podrán remitirse otro tipo de archivos, como videos o hipervínculos, cuya pertinencia y calidad será evaluada por el Comité Editorial. Este material no será considerado si no se envía según el formato que aquí se detalla: peso máximo de 20 MB cada uno, formato reproducible mediante herramientas y programas gratuitos (PDF, SWF, MP4, MOV, XLS, XLSX). Los datos del material complementario (nombre del archivo, formato y extensión, título de los datos presentados y descripción de los datos) constarán en el apartado

LEYENDAS PARA LAS FIGURAS

Envío del original, proceso de revisión y comunicación con los autores.

Se encuentra disponible para su descarga una lista de comprobación que podrá ser utilizada por los autores para revisar algunas cuestiones formales del trabajo antes de su envío.

El autor de contacto debe remitir el trabajo con el conocimiento de que todos los autores han leído y aprobado el trabajo y están de acuerdo con el envío a *Analecta Veterinaria* y es responsable por esa situación. La remisión del

trabajo, así como toda la comunicación subsecuente entre editores y autores, se realizará por correo electrónico. Es un requisito que las direcciones activas de correo electrónico de todos los autores figuren en la página de presentación, así como la dirección completa del autor de contacto formal (quien remite el trabajo).

El envío se realizará al Sr Director de *Analecta Veterinaria* a la siguiente dirección de correo:

analecta@fcv.unlp.edu.ar

En el cuerpo del mensaje se solicita consignar: título del trabajo, autores y direcciones de correo electrónico de todos los autores. En ese mensaje es bienvenida la inclusión de nombres de evaluadores potenciales, que en ningún caso podrán haber sido coautores de ningún autor, al menos en los últimos cinco años, ni miembros actuales de la misma institución que ellos. Estos datos son recibidos en calidad de sugerencia y no generan ningún compromiso para el comité editorial. Si el envío consiste en numerosos archivos (tres o más) se enviarán comprimidos con la extensión .rar. Todos los autores recibirán un mensaje de confirmación de la recepción correcta de todos los archivos.

Revisión. El comité editorial evaluará primero la pertinencia de la recepción del trabajo, según se adecue o no a las áreas del conocimiento que alcanza la revista. En caso de corresponder, el comité verificará que se cumplan las siguientes premisas: calidad de contenido para ser remitida a los miembros del comité científico, corrección gramatical del idioma del trabajo y adecuación a las normas editoriales. Los originales que no cumplan con las normas editoriales serán devueltos a los autores para ser reordenados de acuerdo con ellas.

Todos los artículos serán sometidos a una revisión anónima por pares: tanto los nombres de los autores como de los revisores se conservan en el anonimato. El comité editorial seleccionará para esa función a, por lo menos, dos evaluadores con conocimiento de la especialidad e informará a los autores acerca de los resultados de la evaluación y los pasos a seguir en consecuencia. Los autores deberán responder los comentarios y sugerencias de los revisores punto por punto, en un documento aparte, titulado: "Respuestas al Editor".

Los trabajos que sean reenviados más de una vez, o después de los cuatro meses de la decisión inicial, serán considerados como un nuevo envío.

La obra de los autores se pondrá a disposición del público para que haga de ella un uso justo y respetuoso de los derechos de autor, cumpliendo las condiciones de la licencia de uso Creative Commons CC BY-NC-ND. Este tipo de licencia permite a otros descargar la obra y compartirla siempre y cuando se de crédito a los autores, pero no permite cambiarlas de forma alguna ni usarlas comercialmente.

Correo postal:

Sr. Director

Revista ANALECTA VETERINARIA

CC 296 (B1900AVW) La Plata,

ARGENTINA

