

VETERINARIA



Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay

Año LXXII Vol. 48 N° 185 Enero - Marzo de 2012

Cerro Largo 1895 - Montevideo - Uruguay - Tel-Fax (598) 2408 6174 - 2409 9458 - E-mail: smvu@smvu.com.uy

Página Web: www.smvu.com.uy

Contenido

Sección Científica

Parvovirus Canina: situación actual y protección de las vacunas contra las nuevas variantes virales circulantes en la región

Canine Parvovirus: current status and protection of vaccines against new viral variants circulating in the region

Puentes Palombo, R. 5

Análisis del descenso de anticuerpos en el periparto y su impacto en el diagnóstico serológico de la Leucosis Enzoótica Bovina

Antibody decrease during the peripartum period: its impact on Enzootic Bovine Leukosis diagnosis

Rama, G.; Pritsch, O.; Adrien, M.L.; Moratorio, G.; Meikle, A. 11

Sección Técnica

Resistencia antimicrobiana: ¿Quo Vadis?

Antimicrobial resistance: ¿Quo Vadis?

Errecalde, J. 19

Publicación trimestral (versión electrónica – página web de la SMVU).

El volumen completo (números 185-188) será impreso a fin de año y será distribuido a los socios de la SMVU.

Los contenidos y opiniones incluidos en los artículos son responsabilidad exclusiva de los autores.

Se autoriza la reproducción parcial o total de lo editado mencionando la fuente.

Por convenio de la SMVU y Facultad de Veterinaria (16-12-1988), el Dpto. de Documentación y Biblioteca de la Facultad de Veterinaria, se realiza el canje internacional por otras publicaciones científicas.



SOCIEDAD DE MEDICINA VETERINARIA DEL URUGUAY

(Creada el 10 de mayo de 1907)

Correo electrónico: revistavet@yahoo.com - Web: www.smvu.com.uy
ISSN 0376 - 4362 - Indizada en: Vet-CD/BEASTCD, Latindex

REDACTOR RESPONSABLE: Dr. Carlos Morón

SECCIÓN CIENTÍFICA:

Editor Jefe: Dr. Daniel Cavestany (PhD), Facultad de Veterinaria (UdelaR)

Consejo Editorial (en formación):

Dra. Cecilia Cajarville (PhD), Facultad de Veterinaria (UdelaR)
Ing. Agr. Pablo Chilibroste (PhD), Facultad de Agronomía (UdelaR)
Dr. Guillermo Couto (MV, dipl. ACVIM), Ohio State University, EE.UU.
Dr. Luzbel de la Sota (PhD), Facultad de Veterinaria, Universidad de La Plata, Argentina
Dr. Andrés Gil (PhD), Facultad de Veterinaria (UdelaR)
Dr. Roberto Kremer (MSc), Facultad de Veterinaria (UdelaR)
Dr. Carlos Larsson (PhD), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, USP, Brasil
Dra. Jacqueline Maisonnave (PhD), Facultad de Veterinaria (UdelaR)
Dra. Ana Meikle (PhD), Facultad de Veterinaria (UdelaR)
Dr. José Luis Repetto (PhD), Facultad de Veterinaria (UdelaR)
Dr. Franklin Riet (PhD), CSTR, UFCG, Patos PB, Brasil
Dr. Rodolfo Rivero (MSc), DILAVE «Miguel C. Rubino», MGAP, Uruguay
Dr. Heriberto Rodríguez-Martínez (PhD), CBR, Linköping University, Suecia
Dr. Jorge Tórtora, FES Cuautitlán UNAM, México
Ing. Agr. Jorge Urioste (PhD), Facultad de Agronomía (UdelaR)
Dra. Carolina Viñoles (PhD), INIA, Uruguay
Dr. Pablo Zunino (PhD) IIBCE, Uruguay

Secretario: Dr. Rodrigo Puentes (MSc), Facultad de Veterinaria (UdelaR)

SECCIÓN TÉCNICA:

Editora: Dra. María A. Solari, DILAVE «Miguel C. Rubino» - MGAP

Consejo Editorial «Profesor Walter García Vidal»:

Dr. Luis Barros (PhD), Facultad de Veterinaria (UdelaR)
Dr. Uruguaysito Benavides, Facultad de Veterinaria (UdelaR)
Dr. Jorge Carluccio, Facultad de Veterinaria (UdelaR)
Dr. Ulises Cuore, DILAVE «Miguel C. Rubino» - MGAP
Dra. Valeria Gayo (MSc), DILAVE «Miguel C. Rubino» - MGAP
Dr. Bernardo Otero, Ejercicio Liberal

Asesora Bibliotecológica: Elba Domínguez, Universidad de la República





Canine Parvovirus: Current Status and Protection of Vaccines Against New Viral Variants Circulating in the Region

Puentes Palombo, R.¹

RESUMEN

Parvovirus canino (CPV) tipo 2 es uno de los principales agentes causantes de diarreas en cachorros en varias partes del mundo. En los últimos años ha habido un interés trascendente por esta enfermedad debido a que luego del descubrimiento de la misma, a fines de la década del 70, se han encontrado nuevas variantes del virus (CPV-2a, CPV-2b, CPV-2c). En Uruguay esta enfermedad es una de las principales virosis en cachorros y las principales variantes circulantes son los genotipos CPV-2a y CPV-2c. Se ha observado que los síntomas clínicos producidos por la infección con las nuevas variantes virales son levemente diferentes a los producidos por el genotipo original (CPV-2). La forma de controlar CPV es a través de la vacunación de los animales susceptibles. Actualmente, la protección que confieren las vacunas comerciales contra las nuevas variantes es discutida. Algunos autores afirman que las vacunas con CPV-2 protegen eficazmente la enfermedad producida por las nuevas variantes. Sin embargo, otros trabajos demuestran lo contrario. El objetivo de esta revisión es recopilar la bibliografía actual existente de modo de facilitar la interpretación de la situación de la Parvovirus canina en el Uruguay y la región.

Palabras clave: Parvovirus canino, CPV-2c, diagnóstico, Uruguay

SUMMARY

Canine Parvovirus (CPV) type 2 is one of the main causative agents of diarrhea in puppies in different parts of the world. In recent years there has been an important concern about this disease because after its discovery, in the late 70's, new virus variants (CPV-2a, CPV-2b, and CPV-2c) have been found. This disease is associated with a major viral pathogen in puppies; in Uruguay the main circulating variants are CPV-2a and CPV-2c. It has been observed that the clinical symptoms produced by infection with the new viral variants are slightly different from those produced by the original (CPV-2). The way to control CPV is through vaccination of susceptible animals. Currently, the ability of new vaccines to confer protection against new variants is discussed. Some authors assert that the CPV-2 vaccines effectively protect against the disease caused by new variants. Nevertheless, other studies demonstrate the contrary. The goal of this review is to gather existing current literature, in order to facilitate interpretation of the situation of canine parvovirus in Uruguay and the region.

Key words: canine parvovirus, CPV-2c, diagnosis, Uruguay.

EVOLUCIÓN VIRAL

Parvovirus canino (CPV) es un pequeño virus (26 nm de diámetro), desnudo, con una simple hebra de ADN de aproximadamente 5200 nucleótidos que está envuelta por una cápside icosaédrica conformada por dos proteínas, VP1 y VP2 (Strassheim y col., 1994). CPV emergió en el año 1978 y fue denominado CPV-2 para distinguirlo del Virus Diminuto Canino (MVC o CPV-1), responsable de muertes neonatales en cachorros (Carmichael, 1994). El origen de CPV-2 es todavía incierto, aunque la hipótesis es que derivó del virus de la Panleucopenia felina (FPV) o de los FPV-like provenientes de carnívoros salvajes (Fig. 1). CPV-2 pertenece a la familia *Parvoviridae*, la misma que se encuentra el FPV (Truyen, 1999). CPV-2 ha sufrido una rápida evolución a lo largo del tiempo y en pocos años han aparecido nuevas variantes virales, denominadas CPV-2a y CPV-2b. Estos nuevos virus han reemplazando completamente al original tipo 2 (CPV-2) a tal punto que no se detecta más este genotipo en la población canina, mientras que CPV-2a y

CPV-2b están distribuido por todo el mundo (Hoelzer y Parrish, 2010). Más recientemente, en la década del 2000, una nueva variante antigénica emergió en Europa denominándose CPV-2c (Buonavoglia y col., 2001). Este nuevo mutante tiene una sustitución aminoacídica, Asp-426'!Glu, que ocurre en un residuo de la proteína de la cápside viral (VP2), considerada muy importante del punto de vista antigénico. Esta variante (CPV-2/Glu426), primeramente observada en Italia, actualmente ha sido detectada en muchos países en el mundo (Hoelzer y Parrish, 2010). Estas nuevas variantes difieren del CPV-2 original en al menos cinco o seis aminoácidos en la proteína VP2 de la cápside viral. Estas mutaciones afectan residuos importantes de esta proteína incluyendo regiones altamente antigénicas (Martella y col., 2006). Por otro lado, las diferencias antigénicas observadas entre las variantes (CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c) son la consecuencia del cambio en solo un aminoácido (Asn en 2a, Asp en 2b y Glu en 2c) también en el residuo 426 de la VP2.

¹Área Inmunología, Departamento de Ciencias Microbiológicas, Facultad de Veterinaria, UdelaR, Uruguay. Lasplacas 1550, Montevideo CP 11600, Uruguay, Tel: 598-2-6281303, Fax: 598-2-6280130. Correo electrónico: rpuentes@adinet.com.uy

Recibido: 12/7/11 Aprobado: 30/1/12

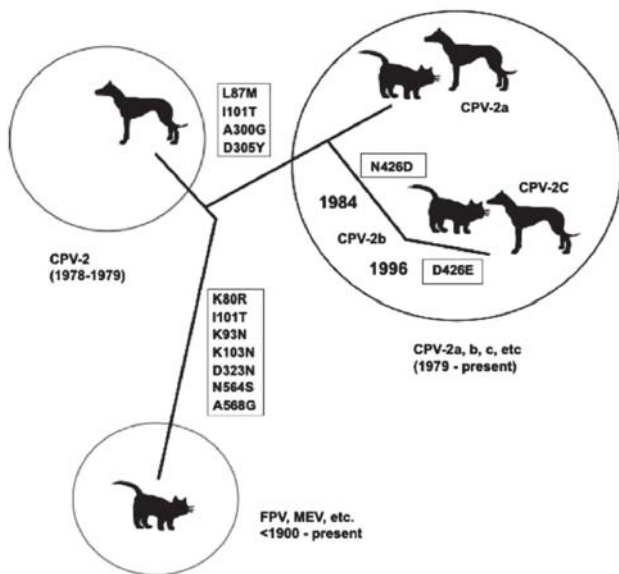


Figura 1. Evolución de Parvovirus canino (CPV). Relación genética, rangos de hospederos y año de aparición del virus de la Panleucopenia Felina (FPV), CPV y parvovirus relacionados. El virus original causante de la Parvovirus canina (CPV-2) se extinguió, y fue reemplazado por las nuevas variantes CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c. Extraído de Hoelzer y Parrish (2010).

VARIANTES CIRCULANTES DE CPV-2 EN EL URUGUAY LA REGIÓN

En cuanto a la distribución de las nuevas variantes a nivel mundial, CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c circulan con diferentes frecuencias en los países de acuerdo a la región geográfica analizada. En Uruguay la enfermedad está presente desde hace varias décadas. El diagnóstico está basado principalmente en la anamnesis y los síntomas clínicos. En un trabajo realizado con 30 muestras provenientes de distintos departamentos (Montevideo, Canelones, San José y Lavalleja) la principal variante viral detectada fue CPV-2c (Pérez y col., 2007). Por otro lado también se han realizado aislamientos y caracterización de CPV-2c en cultivos celulares a partir de animales enfermos (Puentes y col., 2011; Blanc y col., 2011). Recientemente Pérez y col (2011) encontraron una mayor proporción de CPV-2a en muestras provenientes de casos clínicos ocurridos en caninos en el año 2010. Por lo tanto hasta el momento las dos variantes que han sido detectadas con mayor frecuencia en casos clínicos en el Uruguay son CPV-2a y CPV-2c. En referencia a algunos países de la región, en Argentina Calderón y col (2011) encontraron la variante CPV-2c en mayor proporción de muestras positivas analizadas provenientes de distintas partes de ese país. Al analizar la secuencia completa de la VP2 de distintos aislamientos se pudo observar que, a nivel nucleotídico, muestras Argentinas de CPV-2c tienen un 99,3% a 99,9% de identidad con relación a cepas internacionales de CPV-2c, mientras que la identidad a

nivel de aminoácidos es de 99,7% a 100% (Calderón y col., 2012). Esto demuestra que existe un bajo grado de variabilidad en las secuencias analizadas de muestras provenientes de Argentina en relación a cepas internacionales. Sin embargo, los mismos autores encontraron sustituciones a nivel de aminoácidos relevantes en algunas muestras localizadas en regiones expuestas de la VP2 que pueden ser importantes. Por su parte en Brasil, se han detectado las variantes CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c en diferentes proporciones en casos clínicos de las ciudades de Rio de Janeiro y Porto Alegre en los últimos años (Streck y col., 2009, Castro y col., 2011).

PATOGENICIDAD Y CUADRO CLÍNICO ASOCIADO A LAS NUEVAS VARIANTES DE CPV-2

Varios trabajos han descrito los hallazgos clínicos y hematológicos en perros infectados naturalmente (Hirasawa y col., 1987) o experimentalmente (Macartney y col., 1984) con la cepa original CPV-2. Sin embargo son escasas y algo contradictorias las investigaciones que comparan la patogenicidad de las nuevas variantes virales en relación a CPV-2. CPV infecta los perros a través de la ruta oronasal y alcanza la mucosa intestinal luego de una diseminación inicial por tejidos linfoides. La viremia puede ser intensa y persistir por varias semanas, mismo que el virus haya desaparecido del contenido intestinal (Decaro y col., 2007). Los síntomas clásicos producidos por esta enfermedad mas allá de la variante viral presente, están relacionados en mayor o menor medida a cuadros de anorexia, letargia, vómitos y diarreas mucoides a hemorrágicas (Moon y col., 2008). Si comparamos la enfermedad producida por las nuevas variantes en relación al genotipo original, se ha visto que los genotipos CPV-2a y CPV-2b comúnmente causan una enfermedad más severa que CPV-2 (Decaro y col., 2005a). Se ha demostrado además que estas nuevas variantes, son eliminadas en mayor cantidad en materia fecal que el genotipo original (CPV-2) (Carmichael, 1994). Por otro lado, en relación a las diferencias en cuanto a la patogenicidad entre las nuevas variantes, mediante la técnica de *Real Time* PCR, se ha investigado la distribución de ADN viral en diferentes tejidos en perros infectados naturalmente con CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c. En todos los tejidos analizados², se pudo detectar el genoma viral de los tres genotipos, demostrándose una amplia distribución del virus en el organismo y con un comportamiento similar entre las variantes estudiadas. La mayor carga viral fue detectada en tejidos linfoides con máxima cantidad en tonsilas de perros infectados con CPV-2c y en bazo de perros infectados con CPV-2b. Alta cantidad de virus también fue detectado en médula ósea en perros infectados con CPV-2a. Por otro lado, en la vejiga fue donde se encontró la menor cantidad de ADN viral y, sorpresivamente, los autores encontraron ADN viral en tejido nervioso (cerebro, cerebelo y bulbo cerebral). Finalmente, en la materia fecal el número de copias de ADN fue menor que en los órganos internos (Decaro y col., 2007). Este trabajo si bien fue realizado con pocos animales, no encontraron diferencias importantes entre la infección con CPV-2a, 2b o 2c. En contrapartida, en perros infectados experimentalmente, Moon y col. (2008) sí encontraron que

²Se analizaron los siguientes tejidos: Cerebro, cerebelo, bulbo cerebral, tonsilas, nódulos retrofaringeos, timo, pulmón, miocardio, médula ósea, hígado, bazo, vejiga, nódulos mesentéricos, jejunio, colon, recto, materia fecal.

la variante CPV-2a es más patogénica que CPV-2b. En este sentido, también se ha visto que la variante CPV-2c produce síntomas algo diferentes de las causadas por las variantes CPV-2a/2b (por ejemplo diarrea mucoide en lugar de hemorrágica) (Decaro y col., 2005a). En lo que respecta a la patogenicidad de las nuevas variantes en infecciones de células *in vitro*, Puentes y col. (2011) encontraron que la variante CPV-2c produjo menos efecto citopático (CPE) en cultivos celulares de la línea CRFK que en cultivos primarios obtenidos a partir de corazón fetal canino (FCH). La cepa CPV-2 de referencia no mostró diferencias en cuando al CPE producido entre estos dos cultivos celulares. Todos estos trabajos, si bien representan información relevante para la comprensión de la patogenicidad de las nuevas variantes virales de CPV en perros, tienen la limitante del escaso número de animales estudiados y de que algunos de ellos han sido evaluados en infecciones experimentales o *in vitro*. Por lo tanto, aun no son suficientes las investigaciones existentes, para comprender con exactitud la patogenicidad de las nuevas variantes virales de Parvovirus canino, comparando con el genotipo original de la enfermedad (CPV-2). Sin embargo, parece ser que del punto de vista clínico actualmente existe una mayor patogenicidad y severidad de la enfermedad en los animales diagnosticados por veterinarios. Si bien esta apreciación clínica es importante no se tiene información suficiente sobre los posibles cuadros clínicos leves producidos por CPV-2c que no lleguen al consultorio y se recuperan sin atención veterinaria. Finalmente, existe una percepción clínica que solo los cachorros son susceptibles a la infección inducida por CPV-2. En este sentido, se han descrito brotes de esta enfermedad asociado a enteritis y mortalidad en perros adultos, pero la incidencia probablemente sea muy baja (Decaro y col., 2008).

ESTRATEGIAS ACTUALMENTE UTILIZADAS PARA EL DIAGNÓSTICO VIRAL

Si bien la anamnesis y los síntomas clínicos son fundamentales para realizar el diagnóstico, existen distintos patógenos que pueden causar cuadros similares en perros. Por lo tanto es conveniente la realización del diagnóstico definitivo utilizando una técnica de laboratorio. Varios métodos han sido desarrollados para el diagnóstico de CPV-2: aislamiento viral, Hemoaglutinación, SAT (*Slide agglutination test*), ELISA, SNAP (test comercial basado en el método del ELISA) e Inmunocromatografía, son métodos muy utilizados para el diagnóstico a partir de materia fecal de animales enfermos (Desario y col., 2005; Marulappa y Kapil, 2009; Schmitz y col., 2009; Puentes y col., 2010, 2011). Sin embargo, la sensibilidad de algunas de estas técnicas es relativamente baja (Esfandiari y Klingeborn, 2000; Desario y col., 2005; Schmitz y col., 2009). Schmitz y col. (2009), demostraron que los tests rápidos para el diagnóstico en material fecal (ej. SNAP test), tienen una alta especificidad pero pobre sensibilidad, al comparar con técnicas más sensibles. Actualmente otros métodos basados en la detección de ADN viral pueden ser utilizados para el diagnóstico virológico. Se ha demostrado que la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR), la *Real Time PCR* y la MGB (*Minor groove binder*), tienen alta sensibilidad para la detección de CPV-2 (Decaro y col., 2005b, 2005c). Con la *Real Time PCR* y la MGB, es posible además cuantificar el ADN viral presente en la material fecal

de perros infectados y es una técnica con alta especificidad, realizándose en un tiempo menor que la PCR convencional con gel de agarosa (Decaro y col., 2005b, 2005c). En un estudio realizado, de un total de 89 muestras analizadas de perros con diarrea, se encontró que la *Real Time PCR* fue capaz de diagnosticar el mayor número de animales positivos a CPV-2 (n=73), seguidas por PCR (n=68), aislamiento viral (n=54), Hemaglutinación (n=50) e inmunocromatografía (n=41) (Desario y col., 2005). Si bien estos resultados demuestran que la *Real Time PCR* es actualmente el mejor método para diagnosticar CPV-2, no es una técnica realizable a nivel de clínicas veterinarias, lo que dificulta su utilización de rutina por veterinarios. Actualmente una de las técnicas más utilizada para el diagnóstico rápido a nivel de clínicas veterinarias es la Inmunocromatografía. Es un método simple que puede ser realizado por veterinarios y por los propios dueños de las mascotas para confirmar la sospecha clínica de la enfermedad (Esfandiari y Klingeborn, 2000). Sin embargo se sabe que en estados tardíos de la infección los altos niveles de anticuerpos en el lumen intestinal pueden secuestrar la mayoría de los viriones, por lo que los test que se basan en la unión antígeno-anticuerpo (ej. Inmunocromatografía, hemoaglutinación y ELISA) pueden dar resultados falsos negativos (Desario y col., 2005). En este sentido, Puentes y col. (2010), encontraron baja concordancia en un estudio realizado donde se comparó el diagnóstico clínico realizado por veterinarios con el diagnóstico por las técnicas de Inmunocromatografía y Hemoaglutinación. Estos hallazgos advierten sobre las posibles diferencias que se pueden encontrar entre la clínica y estas técnicas actualmente disponibles, debiéndose ser cauteloso en la interpretación de resultados obtenidos para esta enfermedad.

RESPUESTA INMUNE PROTECTORA Y STATUS INMUNITARIO DE LA POBLACIÓN CANINA EN EL URUGUAY

La respuesta inmune protectora contra Parvovirus es predominantemente humoral, siendo los anticuerpos capaces de neutralizar la mayoría de las partículas virales. La importancia de los anticuerpos en la protección contra la infección ha sido demostrada por la efectividad de la inmunidad materna mediada por anticuerpos que confiere eficientemente protección contra Parvovirus en las primeras semanas de crecimiento del cachorro. Por lo que la enfermedad ocurre predominantemente en animales jóvenes luego que los anticuerpos maternos han disminuido (Pollock y Carmichael, 1982). La respuesta inmune humoral adquirida por los animales inmunizados naturalmente o por vacunación debería estimular preferentemente la producción de Inmunoglobulinas A (IgA) a nivel local. Se ha visto que existe una relación directa entre títulos de IgA entéricos y la recuperación de la enfermedad (Rice y col., 1982). Esto concuerda con observaciones de Bienenstock y Befus (1980), quienes describen una resistencia inmunológica a la infección con CPV a nivel de mucosas en ausencia inclusive de títulos séricos de anticuerpos. Finalmente, en relación a la protección cruzada *in vitro* conferida por los anticuerpos contra las distintas variantes virales, se ha encontrado diferencias significativas entre la respuesta contra virus homólogos y virus heterólogos (Cavalli y col., 2008). Por otro lado, en lo que respecta a la inmunidad

mediada por células, se ha visto que claramente juega un rol importante y tiene que ver fundamentalmente con la recuperación de la enfermedad (Hoelzer y Parrish, 2010).

En la práctica, en cuanto a los títulos de anticuerpos que protegen contra CPV, se ha descrito que títulos hemoaglutinantes iguales o mayores a 1/80 protegen contra la infección. Sin embargo algunos autores han observado que perros con títulos hemoaglutinantes de 1/160, y que fueron infectados experimentalmente con CPV-2b, tienen una replicación activa de virus luego del desafío. Estos resultados demuestran que la infección con CPV puede ocurrir incluso en presencia de títulos mayores o igual a 1/80, usualmente considerados protectores (Elia y col., 2005) y que quizás la hemoaglutinación no sea la técnica más adecuada para evaluar la respuesta humoral en perros infectados con el virus (Cavalli y col., 2008). No existen suficientes trabajos científicos en Uruguay que demuestren los niveles de anticuerpos y el riesgo de contraer infección de la población canina vacunada y/o no vacunada. En un estudio realizado recientemente con 142 sueros de animales adultos provenientes de la ciudad de Montevideo, y sin antecedentes de vacunación, se encontró que un 89,4% y un 91% de los animales fueron seropositivos a CPV-2 y CPV-2c respectivamente, con títulos hemoaglutinantes promedios de 1/930 y 1/1370 (Eliopulos y col., 2010). Por un lado, este trabajo demuestra el alto porcentaje de inmunización natural que ocurre con CPV en estos animales. Si bien ya no se detecta la variante CPV-2 en la naturaleza existen reacciones cruzadas entre esta y las nuevas variantes lo que explica el alto porcentaje encontrado en ese estudio. Por otro lado, si consideramos como títulos protectores por hemoaglutinación aquellos mayores o igual a 1/80, la población estudiada estaría, en promedio, ampliamente protegidos contra la enfermedad.

EFICACIA DE LAS VACUNAS EXISTENTES CONTRA LAS NUEVAS VARIANTES VIRALES

La respuesta inmune contra CPV generada por una vacuna puede estar influenciada por varios factores. Dentro de los que tiene que ver con la vacuna en sí, la viabilidad del virus y el título viral en la misma, el grado de atenuación del patógeno, las propiedades antigénicas de las cepas vacunales y la ruta de administración, son factores importantes (De Cramer y col., 2010). En el Uruguay, no se realizan controles de potencia en las vacunas comerciales que verifiquen la inmunogenicidad de las mismas y la capacidad de inducir una respuesta inmune protectora. Franco y Puentes (2011), evaluaron la capacidad infectante *in vitro* de las vacunas a virus atenuado que se comercializan en el Uruguay, encontrando que 8 de 10 vacunas analizadas tenían al menos el virus viable capaz de replicarse en cultivos celulares. Esto no quiere decir que las vacunas funcionen, pero significa que en un principio el virus se encuentra en condiciones de replicarse en células y potencialmente inducir una respuesta inmune. Por otro lado, factores inherentes al animal como ser el estado nutricional, sanitario y la presencia de los anticuerpos maternos, también pueden condicionar el desarrollo de una adecuada respuesta inmune. La edad para realizar la primera vacunación en cachorros contra CPV y la interferencia de los anticuerpos maternos ha sido discutida en numerosas publicaciones (Pollock y Carmichael, 1982; Iida y col., 1990; Pratelli y

col., 2000; Day, 2007). Lo cierto es que se ha demostrado que en ausencia de la inhibición de los anticuerpos maternos los cachorros son capaces de montar una respuesta inmune protectora a muy temprana edad (Day, 2007). Se ha visto que títulos de anticuerpos hemoaglutinantes maternos $\geq 1:20$, son capaces de interferir con la respuesta inmune luego de la administración de la vacuna en el cachorro pero no son capaces de prevenir la infección por cepas de campo. En contraste, títulos $\geq 1:64$ son considerados suficientes para proteger contra ambos (infección por la vacunación y enfermedad). Por lo tanto, estos títulos pueden interferir con la inmunización y dejar los cachorros susceptibles a la infección (Pollock y Carmichael, 1982). Se ha visto que esta «ventana de interferencia» está entre los 40 y 69 días de edad en los cachorros (Iida y col., 1990). Sin embargo, este período puede variar en caso que los animales se expongan a cepas virulentas de campo de CPV. Un estudio demostró que los títulos de anticuerpos maternos declinan más rápidamente si el cachorro es desafiado con el virus (Macartney y col., 1988). Por este motivo, es que se aconseja vacunar a los cachorros a los 30 días de edad, a fin de acortar esta ventana de susceptibilidad. Además, más recientemente, De Cramer y col. (2010), realizaron un experimento con 86 perros y demostraron que la mayoría de los animales (80%) con presencia de distintas concentraciones de anticuerpos maternos seroconvirtieron favorablemente cuando inmunizados a las 30 días de edad. Estos resultados son algo contradictorios a los desarrollados por Pollock y Carmichael (1982), comentado anteriormente. En lo que se refiere a la protección cruzada de las vacunas actuales contra las nuevas variantes de virus, existen controversias entre distintos trabajos científicos. Es importante recordar que el genotipo original de Parvovirus canino (CPV-2) ya no se detecta en infecciones naturales aunque es todavía utilizado en la gran mayoría de las vacunas comercializadas en Uruguay y gran parte del mundo. Experimentos realizados por Pratelli y col (2001), demostraron que cachorros inmunizados con vacunas con CPV-2 tuvieron títulos de anticuerpos neutralizantes significativamente más altos contra el virus homólogo (CPV-2) que contra el virus heterólogo (CPV-2b). Por otra parte, cachorros inmunizados con vacunas con CPV-2b tuvieron similares títulos de anticuerpos neutralizantes para ambos virus. Sin embargo a pesar de todo, según estos autores, el problema puede no ser tan crítico, teniendo en cuenta que los títulos de anticuerpos heterólogos, alcanzarían para proteger los cachorros inmunizados con vacunas CPV-2. Por otra parte, Ohshima y col. (2008) encontraron que anticuerpos producidos por perros inmunizados con vacunas con cepa CPV-2, no reaccionaron eficientemente con recientes aislamientos de CPV (CPV-2a/2b), cuando fueron comparados con los sueros de animales vacunados con las cepas homólogas. Lo que induciría a pensar de que la respuesta frente a virus heterólogos, no son adecuadas y pueden exponer los animales a la infección a las nuevas variantes. En este sentido, existen evidencias de animales enfermos que tenían historia de vacunación con cepas CPV-2, en los cuales se detectó la presencia de CPV-2c en materia fecal (Pérez y col., 2007; Puentes y col., 2011, Calderón y col., 2011). Contrario a estos resultados, algunos autores afirman que animales inmunizados experimentalmente con vacunas conteniendo la cepa CPV-2, están protegidos del desafío con cepas CPV-2b y CPV-2c (Spibey y col.,

2008; Siedek y col., 2011). Por lo tanto, como se puede observar, aún no son suficientes concordantes los experimentos, para decir a ciencia cierta, si realmente es necesaria la actualización de las cepas utilizadas en las vacunas contra CPV.

CONSIDERACIONES FINALES

Parvovirus canino es una de las principales virosis de los cachorros en varias partes del mundo, incluyendo Uruguay. La severidad del cuadro clínico, acompañado de la falta de tratamientos eficaces y del surgimiento de nuevas variantes virales, han llevado a que en la última década muchos grupos de investigación hayan profundizado los conocimientos sobre esta virosis. Ac-

tualmente la discusión principal a nivel veterinario, se centra en la efectividad de las vacunas disponibles, sobre la protección que las mismas confieren contra las nuevas variantes virales existentes. En el Uruguay, si bien no son suficientes las investigaciones que puedan responder a estos cuestionamientos, en los últimos años se han consolidado algunos grupos de investigación que han generado conocimientos que sin duda han producido un avance para el país en esta área. La cooperación de los colegas veterinarios aportando datos sobre la casuística y facilitando el estudio de los casos clínicos, será clave para avanzar los conocimientos sobre esta enfermedad en el Uruguay en un futuro.

Referencias Bibliográficas

- Bienenstock J, Befus AD. (1982). Mucosal immunology. *Immunology* 41:249-470.
- Blanc A, Negro C, Berois M, Reolon E, Arbiza J. (2011). Isolation and characterization of canine parvovirus type 2c circulating in Uruguay. *Ciência Rural* 41:1436-1440.
- Buonavoglia C, Martella V, Pratelli A, Tempesta M, Cavalli A, Buonavoglia D, Bozzo G, Elia G, Decaro N, Carmichael LE. (2001). Evidence for evolution of canine parvovirus type-2 in Italy. *J Gen Virol* 82:1555-1560.
- Calderón MG, Romanutti C, D'Antuono A, Keller L, Mattion N, La Torre J. (2011). Evolution of canine parvovirus in Argentina between years 2003 and 2010: CPV2c has become the predominant variant affecting the domestic dog population. *Virus Res* 157:106-110.
- Calderón MG, Wilda M, Boado L, Keller L, Malirat V, Iglesias M, Mattion N, La Torre J. (2012). Study of canine parvovirus evolution: comparative analysis of full-length VP2 gene sequences from Argentina and international field strains. *Virus Genes* 44:32-39.
- Carmichael LE. (1994). Canine parvovirus type-2. An evolving pathogen of dogs. *Ann Med Vet* 138:459-464.
- Castro TX, Costa EM, Leite JP, Labarthe NV, Cubel Garcia RC. (2011). Monitoring of canine parvovirus (CPV) strains detected in vaccinated puppies in Brazil. *Res Vet Sci* 90:336-340.
- Cavalli A, Martella V, Desario C, Camero M, Bellacicco A, De Palo P, Decaro N, Elia G, Buonavoglia C. (2008). Evaluation of the Antigenic Relationships among Canine Parvovirus Type 2 Variants. *Clin Vaccine Immunol* 15:534-539.
- Day MJ. (2007). Immune system development in the dog and cat. *J Comp Pathol* 137:10-15.
- De Cramer KG, Stylianides E, van Vuuren M. (2011). Efficacy of vaccination at 4 and 6 weeks in the control of canine parvovirus. *Vet Microbiol* 149:126-132.
- Decaro N, Desario C, Addie DD, Martella V, Vieira MJ, Elia G, Zicola A, Davis C, Thompson G, Thiry E, Truyen U, Buonavoglia C. (2007). The study molecular epidemiology of canine parvovirus, Europe. *Emerg Infect Dis* 13:1222-1224.
- Decaro N, Desario C, Campolo M, Elia G, Martella V, Ricci, D, Lorusso E, Buonavoglia C. (2005a). Clinical and virological findings in pups naturally infected by canine parvovirus type 2 Glu-426 mutant. *J Vet Diagn Invest* 17:133-138.
- Decaro N, Desario C, Elia G, Martella V, Mari V, Lavazza A, Nardi M, Buonavoglia C. (2008). Evidence for immunisation failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c. *New Microbiol* 31:125-130.
- Decaro N, Elia G, Campolo M, Desario C, Lucente MS, Bellacicco AL, Buonavoglia C. (2005c). New approaches for the molecular characterization of canine parvovirus type 2 strains. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 52:316-319.
- Decaro N, Elia G, Martella V, Desario C, Campolo M, Di Trani L, Tarsitano E, Tempesta M, Buonavoglia C. (2005b). A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 DNA in the feces of dogs. *Vet Microbiol* 105:19-28.
- Decaro N, Martella V, Elia G, Desario C, Campolo M, Lorusso E, Colaianni M, Lorusso A, Buonavoglia C. (2007). Tissue distribution of the antigenic variants of canine parvovirus type 2 in dogs. *Vet Microbiol* 121:39-44.
- Desario C, Decaro N, Campolo M, Cavalli A, Cirone F, Elia G, Martella V, Lorusso E, Camero M, Buonavoglia C. (2005). Canine parvovirus infection: Which diagnostic test for virus? *J Virological Methods* 126:179-185.
- Elia G, Cavalli A, Cirone F, Lorusso E, Camero M, Buonavoglia D, Tempesta M. (2005). Antibody levels and protection to canine parvovirus type 2. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 52:320-322.
- Eliopoulos N, Finger P, Nunes C, Castro C, Moreno J, Hubner S, Puentes R. (2010). Immune Response to canine Parvovirus (CPV): Comparison of antibodies to CPV-2 and CPV-2c in unvaccinated dogs. XXI Encontro Nacional de Virologia, V Encontro de Virologia do Mercosul. Gramado, RS, Brasil.
- Esfandiari J, Klingeborn B. (2000). A comparative study of a new rapid and one-step test for the detection of parvovirus in faeces from dogs, cats and mink. *J Vet Med B* 47:145-153.

- Franco G, Puentes R. (2011). Detección y aislamiento de Parvovirus canino a partir de vacunas comerciales. 7mas Jornadas Técnicas de la Facultad de Veterinaria. Montevideo – Uruguay.
- Hirasawa T, Iwaki S, Watanabe K, Mikazuki K, Makino S, Hayashi Y. (1987). Outbreak of canine parvovirus infection and its elimination in a closed beagle dog colony. *Zentralbl Veterinarmed B*. 34:598–606.
- Hoelzer K, Parrish C. (2010). The emergence of parvoviruses of carnivores. *Vet Res* 41:39. Epub 2010 Feb 15.
- Iida H, Fukuda S, Kawashima N, Yamazaki T, Aoki J, Tokita K, Morioka K, Takarada N, Soeda T. (1990). Effect of maternally derived antibody levels on antibody responses to canine parvovirus, canine distemper virus and infectious canine hepatitis virus after vaccinations in beagle puppies. *Jikken Dobutsu* 39:9-19.
- Macartney L, McCandlish IA, Thompson H, Corwell HJ. (1984). Canine parvovirus enteritis 1: clinical, hematological and pathological features of experimental infection. *Vet Rec* 115:201-210.
- Macartney L, Thompson H, McCandlish IA, Cornwell HJ. (1988). Canine parvovirus: interaction between passive immunity and virulent challenge. *Vet Rec* 122:573-576.
- Martella V, Decaro N, Buonavoglia C. (2006). Evolution of CPV-2 and implicance for antigenic/genetic characterization. *Virus Genes* 33:11-13.
- Marulappa S, Kapil S. (2009). Simple Tests for Rapid Detection of Canine Parvovirus Antigen and Canine Parvovirus-Specific Antibodies. *Clin Vaccine Immunol* 16:127–131.
- Moon HS, Lee SA, Lee SG, Choi R, Jeoung SY, Kim D, Hyun C. (2008). Comparison of the pathogenicity in three different Korean canine parvovirus 2 (CPV-2) isolates. *Vet Microbiol* 131:47-56.
- Ohshima T, Hisaka M, Kawakami K, Kishi M, Tohya Y, Mochizuki M. (2008). Chronological analysis of canine parvovirus type 2 isolates in Japan. *J Vet Med Sci* 70:769-775.
- Pérez R, Bianchi P, Calleros L, Francia L, Hernández M, Maya L, Panzera Y, Sosa K, Zoller S. (2011). Recent spreading of a divergent canine parvovirus type 2a (CPV-2a) strain in a CPV-2c homogenous population. *Vet Microbiol*. [Epub ahead of print]
- Pérez R, Francia L, Romero V, Maya L, López I, Hernández M. (2007). First detection of canine parvovirus type 2c in South America. *Vet Microbiol* 124:147–152.
- Pollock RV, Carmichael LE. (1982). Maternally derived immunity to canine parvovirus infection: transfer, decline, and interference with vaccination. *JAVMA* 180:37-42.
- Pratelli A, Cavalli A, Martella V, Tempesta M, Decaro N, Carmichael L, Buonavoglia C. (2001). Canine parvovirus (CPV) vaccination: comparison of neutralizing antibody response in pups after inoculation with CPV2 or CPV2b modified live virus vaccine. *Clin Diag Lab Immunol* 8: 612-615.
- Pratelli A, Cavalli A, Normanno G, De Palma MG, Pastorelli G, Martella V, Buonavoglia C. (2000). Immunization of pups with maternally derived antibodies to canine parvovirus (CPV) using a modified live variant (CPV-2b). *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 47: 273-276.
- Puentes R, Eliopulos N, Finger P, Castro C, Nunes C, Furtado A, Franco G, Hubner S. (2010). Detección viral en cachorros con diagnóstico presuntivo de Parvovirus canino (CPV). *Veterinaria (Montevideo)* 46:47-49.
- Puentes R, Eliopulos N, Pérez R, Franco G, Sosa K, Bianchi P, Furtado A, Hubner S, Esteves P. (2011). Isolation and characterization of canine parvovirus type 2c (CPV-2c) from symptomatic puppies. *Braz J of Microbiol* (in press).
- Rice JB, Winters KA, Krakowka S, Olsen RG. (1982). Comparison of systemic and local immunity in dogs with canine parvovirus gastroenteritis. *Infect Immun* 38: 1003-1009.
- Schmitz S, Coenen C, König M, Thiel H, Neiger R. (2009). Comparison of three rapid commercial Canine parvovirus antigen detection tests with electron microscopy and polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 21: 344–345.
- Siedek EM, Schmidt H, Sture GH, Raue R. (2011). Vaccination with canine parvovirus type 2 (CPV-2) protects against challenge with virulent CPV-2b and CPV-2c. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 124:58-64.
- Spibey N, Greenwood NM, Sutton D, Chalmers WS, Tarpey I. (2008). Canine parvovirus type 2 vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus. *Vet Microbiol* 128:48-55.
- Strassheim ML, Gruenberg A, Veijalainen P, Sgro JY, Parrish CR. (1994). Two dominant neutralizing antigenic determinants of canine parvovirus are found on the threefold spike of the virus capsid. *Virology* 198: 175-184.
- Streck A, Souza C, Goncalves K, Zang L, Pinto L, Canal C. (2009). First detection of Canine parvovirus Type 2C in Brazil. *Braz J Microbiol* 40:465-469.
- Truyen U. (1999). Emergence and recent evolution of canine parvovirus. *Vet Microbiol* 69:47–50.

Análisis del descenso de anticuerpos en el periparto y su impacto en el diagnóstico serológico de la Leucosis Enzoótica Bovina

Antibody Decrease During the Peripartum Period: its Impact on Enzootic Bovine Leukosis Diagnosis



Rama, G.^{1,2}, Pritsch, O.^{2,3}, Adrien, M.L.^{1,4}, Moratorio, G.^{2,5}, Meikle, A.¹

RESUMEN

En el presente trabajo se analizó la presencia de anticuerpos específicos anti-VLB durante el período de periparto en vacas Holando en producción. Para ello se realizó el diagnóstico serológico de LEB a un grupo de vacas preñadas mediante un ELISA comercial. A partir de los resultados obtenidos se seleccionaron tres grupos de cinco vacas cada uno caracterizados como negativo, positivo leve y positivo fuerte. Los animales se sangraron cada 20 días desde el día -50 al +50 (0=parto). Las muestras fueron procesadas por ELISA y las densidades ópticas se analizaron por ANOVA de medidas repetidas en el tiempo. El grupo positivo fuerte permaneció con diagnóstico positivo en todas las observaciones del ensayo. El grupo negativo también permaneció negativo. Sin embargo, en el grupo de positivos leves las densidades ópticas del ELISA descendieron entre 40% y 60% de los niveles iniciales y todos los animales pasaron de un diagnóstico positivo en el preparto a negativo alrededor del parto. Se demostró la existencia de un descenso en los anticuerpos específicos anti-VLB alrededor del parto, que en el grupo de positivos leves implicó falsos negativos desde el día -20 al +60, indicando que debe evitarse tomar muestras para diagnóstico serológico de LEB en este período.

Palabras clave: Leucosis Enzoótica Bovina, diagnóstico, ELISA, anticuerpo, periparto

SUMMARY

The goal of this work was to characterize the evolution of specific anti-BLV antibody titers during the peripartum period in dairy Holstein cows. The experimental design involved 3 groups of 5 cows each characterized as negative, slight positive and strong positive. All animals were bled every 20 days, from -50 to +50 days (0 = calving), and serum samples were analyzed by a commercial ELISA test. The strong positive group remained with a positive diagnosis along all test observations, as the negative group remained as negative. However, in the slight positive group the ELISA optical densities decreased between 40% and 60% of the initial levels and all the animals that were initially positive became negative in the peripartum period. Overall these results show that in the peripartum the physiological decrease in specific anti-BLV antibodies in the slight positive group may produce false negative results from day -20 to +60, indicating that sample extraction should be avoided for serologic diagnosis of EBL during this period.

Key words: Enzootic Bovine Leukosis, diagnosis, ELISA, antibody, peripartum

INTRODUCCIÓN

La Leucosis Enzoótica Bovina (LEB) es una enfermedad infecciosa de carácter crónico producida por un retrovirus denominado Virus de la Leucosis Bovina (VLB). Este virus es un miembro oncogénico del género Deltaretrovirus de la familia Retroviridae, infecta preferencialmente a los linfocitos B y causa una transformación maligna que puede concluir en una leucemia crónica o linfosarcoma (Ferrer, 1980). La mayoría de los animales infectados (60%) no presentan signos de infección y se vuelven portadores asintomáticos del virus de por vida. Aproximadamente un tercio de los bovinos infectados desarrolla una linfocitosis persistente caracterizada por una expansión policlonal no maligna de los linfocitos B y sólo entre 5% a 10% de los animales infectados desarrolla linfoma o linfosarcoma maligno (Kettmann y col., 1994; Burny y col., 1988; Llamas y col., 2001).

La LEB tiene un impacto significativo desde el punto de vista sanitario y económico, la alteración del sistema inmune provo-

cado por la infección viral puede aumentar la incidencia de otras patologías afectando a la producción de leche y originando pérdidas directas por mortandad (Trainin y col., 2005). En ausencia de vacunas efectivas, numerosos países han implementado campañas de control y/o erradicación de esta enfermedad. Por ejemplo, la Unión Europea luego de muchos años ha logrado que 12 de los 15 países originales del bloque se encuentren actualmente libres de LEB (Rodríguez y col., 2011). Asimismo, puede detectarse el ADN proviral integrado en el genoma de linfocitos infectados con VLB en productos cárnicos y lácteos presentes en el mercado (Felmer y col., 2006), por lo que la exigencia libre de Leucosis para la exportación de ganado en pie establecida por algunos mercados podría potencialmente extenderse a estos productos.

La detección de anticuerpos (Ac) específicos contra las proteínas virales gp51 y p24 en suero bovino, mediante inmunodifusión en gel agar (IDGA) y más recientemente por ensayo por

¹Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Lasplacas 1550, Montevideo, Uruguay, tel.:6223106
Correo electrónico: ramosum@pasteur.edu.uy.

²Unidad Biofísica de Proteínas, Instituto Pasteur de Montevideo, Uruguay.

³Departamento Inmunobiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

⁴Departamento de Salud en los Sistemas Pecuarios, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Paysandú, Uruguay.

⁵Laboratorio de Virología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Recibido: 18/11/11 Aprobado: 31/1/12

inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA), constituyen los procedimientos de rutina más utilizados para la identificación de animales infectados asintomáticos (Martin y col., 2000; Tro- noy col., 2001; Rola y Kuzmak, 2002; Gutierrez y col., 2009). Recientemente hemos demostrado que el IDGA detecta 72 % de los positivos detectados por ELISA (Rama y col., 2010). En tanto, existen metodologías más sensibles como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), aunque implican mayor equipamiento y son más laboriosas (Fechner y col., 1996; Martín y col., 2000; Trono y col., 2001; Felmer y col., 2006; Camargos y col., 2007; Rama y col. 2010).

Generalmente, los métodos diagnósticos serológicos comerciales utilizan una única dilución de suero y frecuentemente no contemplan, al momento de extraer la muestra, las variaciones de la concentración total de Ac circulantes relacionada con el estado fisiológico o reproductivo del animal. En el modelo bovino, se conoce desde hace más de 50 años que los niveles de varias globulinas séricas disminuyen en sangre durante el parto (Larson y Kendall, 1957). En particular, durante la calostrogénesis existe un descenso en la concentración de inmunoglobulinas (Ig) totales (principalmente IgG) en la sangre circulante materna, ya que la mayoría de las inmunoglobulinas presentes en el calostro no son sintetizadas en la glándula mamaria sino que provienen directamente de la sangre materna (Larson, 1958). Este descenso de la concentración de Ac totales podría aumentar la presencia de falsos negativos en el periparto (Ferrer, 1979, Burridge y col., 1982; Hübner y col., 1996, Erverman y Jackson, 1997).

Por otro lado, los Ac maternos presentes en el calostro atraviesan el epitelio intestinal del ternero pasando directamente a su circulación sanguínea, por lo que el diagnóstico dentro de los primeros 6 meses de edad puede aumentar la detección de falsos positivos y sobreestimar la transmisión viral por vía vertical (Thurmond y col., 1982; Johnson y col., 1987, Lazausset y col., 1990).

La investigación respecto de la dinámica de los títulos de Ac contra VLB en el periparto es escasa. Se ha reportado la detección de un mayor porcentaje de falsos negativos utilizando IDGA como método de diagnóstico en vacas que se encuentran cercanas al parto (Burridge y col., 1982; Hübner y col., 1996, Tekes 1994), por lo que se ha propuesto que para el diagnóstico de la infección por VLB se utilicen métodos serológicos en un período comprendido entre 2 semanas antes y un mes después del parto. Tekes (1994) reportó que esto no ocurre cuando el ELISA es utilizado como método de diagnóstico.

La hipótesis de trabajo plantea que en el periparto el descenso de la concentración total de Ac en la sangre materna podría llevar al diagnóstico de falsos negativos en animales infectados, aún utilizando un *kit* de diagnóstico de ELISA comercial (VMRD) aprobado por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) y que es utilizado en nuestro país. Para testear la hipótesis, nos proponemos como objetivo analizar la concentración de Ac específicos anti-VLB en función del tiempo durante el período de parto en vacas Holando en producción con diagnósticos positivos y negativos realizados en el parto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

Se realizó un primer diagnóstico serológico de LEB a un grupo de 60 vacas de raza Holando pertenecientes a un tambo del departamento de Paysandú mediante el uso de un *kit* de ELISA comercial diseñado para detectar Ac específicos anti-VLB. De acuerdo a lo recomendado por el fabricante del *kit*, el punto de corte entre resultados negativos y positivos se determinó para cada placa mediante el análisis por triplicado de la densidad óptica (D.O.) de un control positivo diluido y estandarizado para tal fin.

De este grupo se seleccionaron cinco vacas serológicamente negativas (con valores de D.O. por debajo del punto de corte), cinco vacas positivas fuertes (con valores de D.O. mayores al doble del punto de corte) y cinco vacas positivas leves (con valores de D.O. menores al doble del punto de corte). Por otro lado, estas 15 vacas también fueron seleccionadas según fecha de parto prevista (otoño 2009).

A este grupo de 15 vacas se les extrajo sangre mediante venopunción coccígea en tubos BD Vacutainer® (Becton Dickinson, NJ, USA) cada 20 días, se abarcó un rango desde el día 50 previo al parto hasta el día 50 posterior al parto. Las muestras de sangre se almacenaron a 4 °C y se centrifugaron durante 10 min a 2000 rpm antes de las 48 h de la colecta. El suero se almacenó a -20 °C hasta su procesamiento. El total de las muestras (n=90) correspondientes a los 15 animales se analizaron en una misma placa de ELISA perteneciente a un *kit* comercial para Ac contra VLB para suero bovino.

Para estudiar el efecto en la D.O. en función de la variación de la concentración de Ac específicos contra VLB se realizaron dos diluciones seriadas (relación 1:2) de un suero positivo fuerte (con alta D.O.) a partir de la dilución 1/25 hasta 1/1600.

ELISA.

Se utilizó un *kit* comercial para la detección de Ac contra VLB para suero bovino con 98% de sensibilidad y 100% de especificidad (Laboratorio VMRD, cod. 5505.20, WA, USA), aprobado por el USDA. Las muestras se procesaron de acuerdo a las indicaciones del fabricante, utilizando 50 µl de suero diluido a 1/25. La lectura se realizó en un espectrofotómetro de rango visible a 620 nm (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Se utilizaron los tres controles positivos del *kit* comercial por placa, que poseen una baja concentración de Ac contra el virus estableciéndose la línea de corte para cada placa a partir del promedio de sus D.O.

Análisis estadístico

Los datos de D.O. se procesaron con un análisis de medidas repetidas en el tiempo (procedimiento mixto, software SAS, SAS Institute Inc. 2000, Cary, NC, USA). El período se incluyó como variable categórica y se definieron períodos respecto al parto con una duración aproximada de 20 días: período -40 (día -50 al -31), período -20 (día -30 al -18), período -10 (día -17 al 0), período 10 (día 1 al 20), período 30 (día 21 al 40) y período 50 (día 41 al 70). El modelo estadístico incluyó como efectos

fijos el período, la categoría (positivos fuertes, positivos leves y negativos) y sus interacciones. Se consideró $P < 0.05$ como significativo y valores entre $P > 0.05$ y $P < 0.10$ como tendencia.

RESULTADOS

En la Figura 1 se observan los valores de absorbancia de los cinco animales de cada grupo normalizados mediante el cociente de la D.O. con el valor establecido como línea de corte para esa placa de ELISA.

Por otro lado, se determinó por ELISA la variación de la D.O. en función de la concentración de Ac específicos anti-VLB a partir de dos diluciones seriadas de un suero positivo fuerte. En la Figura 2 se representa la curva de titulación obtenida en la cual la D.O. disminuye de forma logarítmica en relación a la dilución del suero.

Se analizaron por ELISA los sueros provenientes de los tres grupos de animales obtenidos en diferentes tiempos, antes y después del parto (Figura 3). La categoría y el período afectaron la D.O ($P < 0.001$ ambos). Para los animales positivos fuertes los valores de D.O. disminuyeron del día -40 y -20 al día -10, previos al parto ($P < 0.01$, Figura 3A); la D.O. aumentó del día -10 al 30 y 50 posparto ($P < 0.05$). Para los animales positivos leves se detecta una disminución de la D.O desde el día -40 que no es recuperada en todo en ensayo. Se observó una tendencia a disminuir entre el día -20 al -10 ($P = 0.10$) y una tendencia al aumento del día -10 al 50 posparto, aunque no a niveles comparables al día -40 (Figura 3B). La D.O. de los animales negativos disminuyó del día -40 al -10 ($P < 0.05$), no existiendo

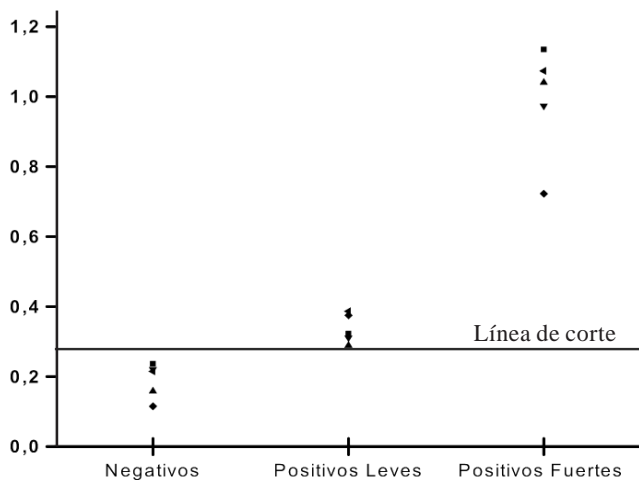


Figura 1. Caracterización serológica por ELISA de cada uno de los grupos de animales: Negativos, Positivos Leves, Positivos Fuertes. En el eje de la izquierda se expresan los valores de absorbancia obtenidos por medida espectrofotométrica de las placas de ELISA, y en el eje de la derecha como Unidades Arbitrarias que corresponden al cociente de la absorbancia para cada una de las muestras, dividida la absorbancia de los controles positivos utilizados por el kit para determinar el punto de corte que discrimina entre positivos y negativos.

mas diferencias entre los demás días. En el Cuadro 1 se muestran los resultados de D.O. normalizados de cada animal perteneciente a los tres grupos en los distintos períodos relativos al parto.

En la Figura 4 se muestran los resultados individuales para cada uno de los cinco animales que integraban el grupo de positivos leves. La D.O. de los mismos disminuyó a medida que se acerca el momento del parto. Es importante destacar que en este descenso del título de Ac específicos para VLB cercano al parto, los animales positivos leves presentaron valores por debajo

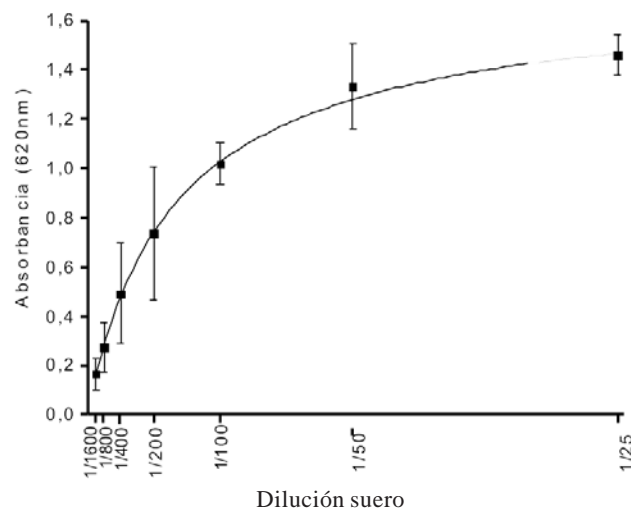


Figura 2. Valores de absorbancia promedio en función de dos curvas de dilución seriada de un mismo suero positivo a VLB (el valor 0,04 corresponde a una dilución del suero 1/25, las diluciones consecutivas se hacen en una relación 1:2.; rango de dilución 1/25 – 1/1600).

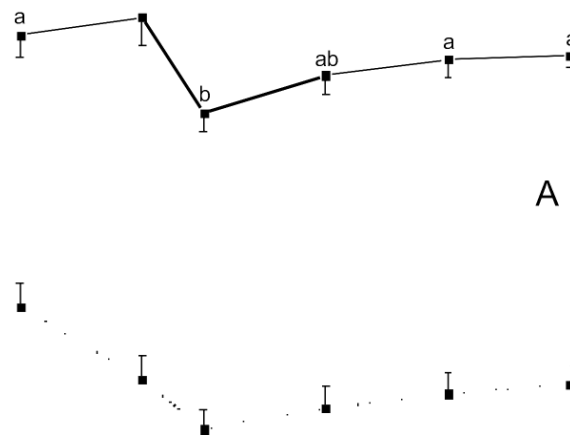


Figura 3. Estudio seriado en el tiempo de la respuesta de anticuerpos anti-VLB para el promedio del período del grupo positivo fuerte (A) y positivo leve (B). (a vs b vs $cP < 0.05$, x vs y $P < 0.1$) En ordenadas UA, Unidades Arbitrarias de absorbancia (\pm SEM) y en abscisas Días, siendo 0 el día del parto.

Cuadro 1. Densidades ópticas normalizadas al control positivo del *kit* VMRD para el diagnóstico de la Leucosis Enzoótica Bovina durante el parto, para todos los animales del ensayo (negativos, positivos leves y positivos). Los períodos se definieron con una duración aproximada de 20 días: período -40 (día -50 al -31), período -20 (día -30 al -18), período -10 (día -17 al 0), período 10 (día 1 al 20), período 30 (día 21 al 40) y período 50 (día 41 al 70).

Grupo	Identificación	Períodos respecto al parto					
		-40	-20	-10	10	30	50
Negativos	543	0,789	0,416	0,488	0,605	0,628	0,580
Negativos	319	0,564	0,443	0,435	0,445	0,492	0,424
Negativos	324	0,768	0,713	0,778	0,375	0,451	0,571
Negativos	526	0,411	0,712	0,490	0,563	0,486	0,643
Negativos	353	0,844	0,457	0,683	0,587	0,834	0,407
Positivos Leves	139	1,381	1,100	0,846	0,912	0,990	1,152
Positivos Leves	259	1,152	0,568	0,624	0,640	0,765	0,731
Positivos Leves	264	1,032	0,661	0,662	0,761	0,852	0,731
Positivos Leves	350	1,111	0,584	0,454	0,706	0,744	0,881
Positivos Leves	223	1,339	0,857	0,681	0,818	0,815	0,821
Positivos	221	2,580	2,844	3,241	3,466	3,420	3,407
Positivos	328	3,477	3,881	3,819	3,898	3,676	4,015
Positivos	416	3,833	3,941	3,771	3,927	4,063	4,036
Positivos	505	4,052	4,006	3,410	3,879	3,460	4,156
Positivos	529	3,717	3,792	3,327	4,047	3,775	3,645

del punto de corte fijado para este ensayo. Por lo tanto, pasaron de un diagnóstico serológico positivo a un resultado negativo. La caída de la D.O. alrededor del parto varió entre un rango de disminución del 40 al 60 %. Solo uno (# 139) de los cinco animales positivos leves presentó D.O. comparables a un diagnóstico positivo al mes posparto, el resto mantuvo D.O. negativas hasta aprox. los 50 días posparto (Figura 4).

DISCUSIÓN

Este es el primer reporte que demuestra que en el período alrededor del parto los títulos de Ac específicos anti-VLB determinados por el *kit* ELISA VMRD (utilizado en nuestro país), se modifican en forma importante. Los animales con altos títulos de Ac anti-VLB mostraron una tendencia a disminuir sus títulos en el parto pero continuaron siendo positivos. Sin embargo, aquellos animales que fueron diagnosticados por ELISA como positivos leves, presentando títulos bajos de Ac específicos anti-VLB, resultaron seronegativos por ELISA en el período del parto. Estos resultados concuerdan con lo que se observa en la curva de titulación en donde la misma variación en la concentración de Ac específicos anti-VLB en un animal positivo fuerte y uno leve no significa el mismo valor en términos de D.O. Los animales positivos fuertes presentan concentraciones de Ac (D.O. cercanos a uno) que se encuentran sobre o próximas a los valores de saturación del sistema. En los animales positivos leves, la disminución en la concentración de Ac debido al parto, representó un mayor descenso del valor de D.O. que los

positivos fuertes, y en estos ejemplos alcanzó valores por debajo de la línea de corte establecida por el *kit*.

La producción eficiente de leche requiere que la vaca lechera pase por una gestación y un parto cada año. La transición desde el estado de preñez sin lactancia al estado de no-preñez con lactancia involucra un cambio dramático para la vaca (Goff y Horst, 1997). Usualmente las vacas se secan al séptimo mes de gestación, lo cual genera una involución de la glándula mamaria donde el epitelio secretorio mamario sufre apoptosis y la glándula es remodelada y renovada preparándose para un nuevo ciclo de lactancia (Strange y col., 1995).

La actividad del sistema inmune de la vaca está fuertemente deprimida alrededor del parto. Se ha descrito la existencia de una leucopenia transitoria después del parto causado por un importante pasaje de neutrófilos hacia el tracto reproductivo. Estos neutrófilos presentan una capacidad fagocítica anti-bacteriana aumentada pero una actividad bactericida (estallido respiratorio) disminuída (Kehrli y col., 1989a; Dettelleux y col., 1995). La capacidad de los linfocitos para responder a mitógenos y la producción de Ac se ve también afectada alrededor del parto (Kehrli y col., 1989b). Aún desconocemos el mecanismo fino que determina la depresión del sistema inmunológico en el parto pero se acepta que factores endócrinos y nutricionales estarían fuertemente involucrados (Goff y Horst, 1997; Vangroenweghe y col., 2005; Lamote y col., 2006). Por otro lado, también ha sido demostrado que el tratamiento con corticoides y prolactina en combinación con insulina estimula la expresión

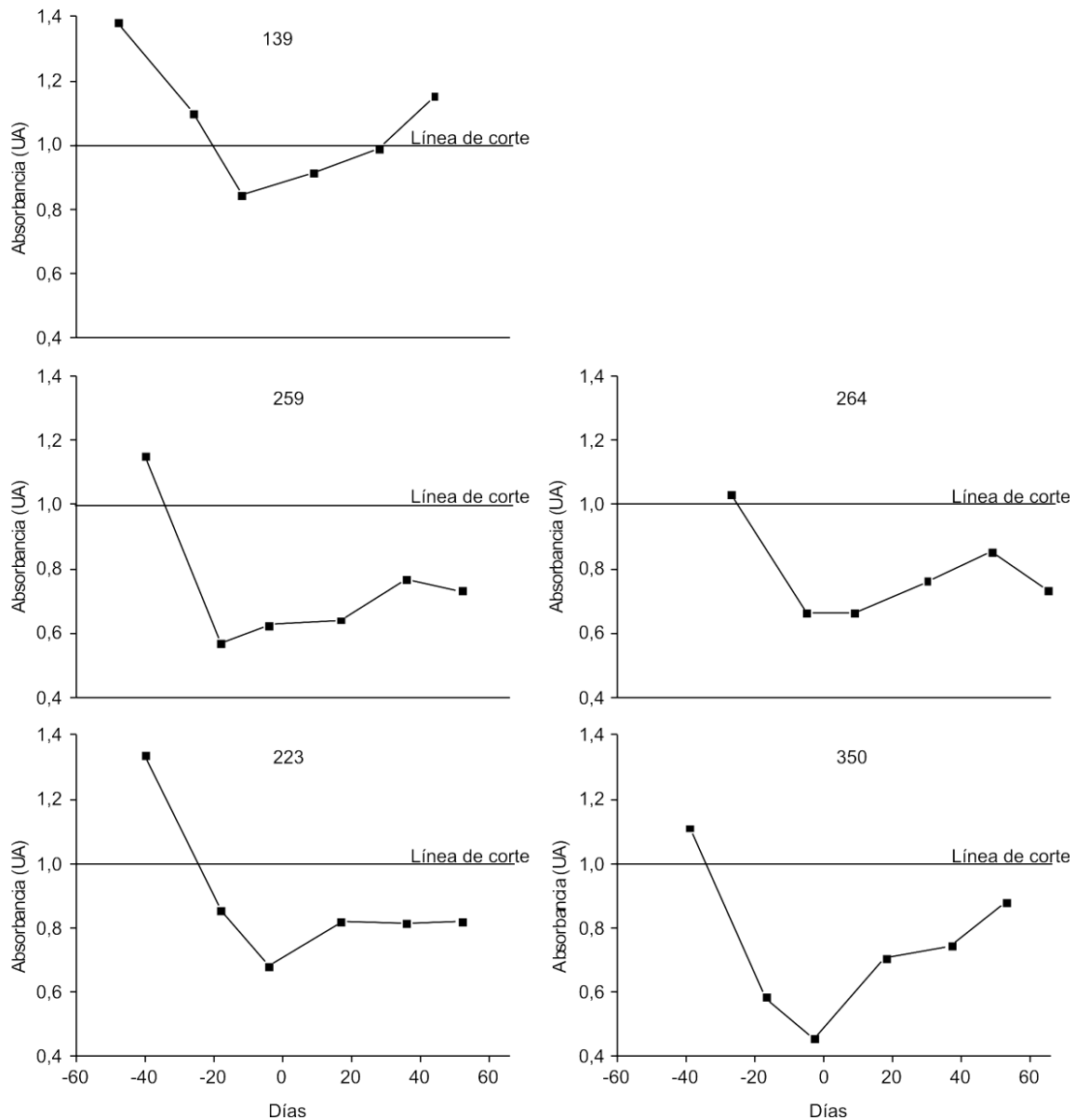


Figura 4. Estudio seriado en el tiempo de la respuesta de anticuerpos anti-VLB para cada uno de los animales caracterizados como positivos leves: 139, 259, 264, 223 y 350. En ordenadas UA, Unidades Arbitrarias de absorbancia y en abscisas Días, siendo 0 el día del parto.

de VLB en ensayos con líneas celulares en cultivo (Niermann y Buehring, 1997) y ambas hormonas aumentan alrededor del parto.

Asimismo, también ha sido demostrado que los niveles de IgG e IgM totales en el suero caen alrededor del parto y que la concentración presente en el calostro, es equivalente a la concentración que desaparece de la sangre circulante en el momento de la calostrogénesis (Dixon, y col., 1961; Larson, 1958). En un trabajo reciente Herr y col (2011) han reportado una disminución dramática de los niveles séricos totales de IgG e IgM en el período entre la semana 8 previa al parto y la cuarta semana post-

parto. El nivel de IgG se recuperó en la cuarta semana posterior al parto y el grado de reducción de la IgG sérica total se correlacionó significativamente con secreción de IgG en el calostro. Por otra parte, una correlación directa entre los niveles de IgG y el recuento de linfocitos también fue detectada. Esto podría explicar también la alta incidencia de enfermedades infecciosas durante este período (Herr y col., 2011). La disminución de los títulos de Ac específicos anti-VLB se podría explicar entonces por el pasaje de los mismos desde la sangre hacia el calostro, y/o por el estado de inmunosupresión generado en la vaca en el período del periparto.

En un trabajo reciente, Gutiérrez y col. (2011) analizan la progresión de la infección por VLB desde el nacimiento hasta la primera lactancia en un rodeo con más de 85% de prevalencia. Reportan que aun realizando medidas para evitar la transmisión vía sanguínea no encontraron cambios en la prevalencia después de 3 años. Esto indicaría que otras vías de transmisión podrían jugar un rol en condiciones naturales. En particular encuentran que la población pasa de aproximadamente 10% de prevalencia antes del primer parto a más de 60% posterior al mismo. Estos resultados permitirían plantear que la inmunosupresión generada en el periparto podría activar infecciones virales controladas por los animales y no detectadas por los métodos diagnósticos usualmente empleados.

En suma, el diagnóstico de VLB por ELISA debe realizarse teniendo en cuenta el estado reproductivo del animal en el momento de obtener la muestra. El diagnóstico en los momentos cercanos al parto aumenta la probabilidad de falsos negativos y por este motivo algunos autores proponen no utilizar métodos serológicos en un período comprendido entre dos semanas antes y un mes después del parto (Burridge y col., 1982; Hübner y col., 1996). Acorde a nuestros resultados este intervalo al menos para este *kit* comercial debe ser mayor, ya que no deberían realizarse diagnósticos para LEB desde los 40 días antes del parto, hasta los 50 días posparto, o incluso más, debido a

que cuatro de los cinco animales positivos leves no habían recuperado los niveles de D.O. a los casi dos meses posparto. Sin embargo, la realidad nacional marca que debido a la planificación de la sanidad de los tambos (momentos puntuales o únicos en la toma de muestra para el diagnóstico de enfermedades infecciosas a todo el rodeo), como al manejo reproductivo de los rodeos lecheros en nuestro país (partos todo el año), productores y técnicos frecuentemente no visualizan que un resultado negativo no implica que ese animal sea verdaderamente negativo.

Como perspectiva consideramos que sería importante estudiar la evolución de la carga proviral de la madre durante el periparto, ya que debido a la inmunosupresión existente en este período el animal podría perder la capacidad de controlar al virus, reactivando la infección y originando como consecuencia un aumento de su carga proviral.

Agradecimientos

A Agustín Furtado del Instituto de Patobiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República por su cooperación en el procesamiento de las muestras y a Federico Carrión de la Unidad de Biofísica de Proteínas del Instituto Pasteur de Montevideo, por su colaboración en la construcción de las figuras.

Referencias Bibliográficas

- Burny A, Cleuter Y, Kettmann R, Mammerickx M, Marbaix G, Portetelle D, Van den Broeke A, Willems L, Thomas R. (1988). Bovine leukemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Adv Vet Sci Comp Med* 32:149-170.
- Burridge MJ, Thurmond MC, Miller JM, Schmerr MJF, Van Der Maaten MJ. (1982). Fall in antibody titer to bovine leukemia virus in the periparturient period. *Can. J. comp. Med.* 46:270-271.
- Camargos MF, Feliziani F, De Giuseppe A, Lessa LM, Reis JKP, Leite RC. (2007). Evaluation of diagnostic test to bovine leukemia virus. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinarias* 102:169-173.
- Detilleux JC, Kehrli ME, Stabel JR, FreemadAE, Kelley DH. (2005). Study of immunological dysfunction in periparturient Holstein cattle selected for high and average milk production. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 44:251-261.
- Dixon FJ, Weingle WO, Vázquez JJ. (1961). Metabolism and mammary secretion of serum proteins in the cow. *Lab Invest* 10:216-237.
- Evermann JF, Jackson MK. (1997). Laboratory diagnostic tests for retroviral infection in dairy and beef cattle. *Vet Clin North Am: Food Anim Pract.* 3:87-106.
- Fechner H, Kurg A, Geue L, Blankenstein P. (1996). Evaluation of Polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. *J Vet Med* 43:621-630.
- Felmer R, Zúñiga J, Recabal M. (2006). Estudio comparativo de un PCR anidado, ELISA, IDGA en la detección del virus de la leucosis bovina en muestras de suero, sangre y leche. *Arch Med Vet* 38:137-141.
- Ferrer J. (1980). Bovine Lymphosarcoma. *Adv Vet Sc Comp Med* 24:1-68.
- Ferrer JF. (1979). Bovine leukosis: Natural transmission and principles of control. *JAVMA* 175:1281-1286.
- Goff JP, Horst RL. (1997). Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J Dairy Sci* 80:1260-1268.
- Gutiérrez G, Alvarez I, Fondevila N, Politzki R, Lomónaco M, Rodríguez S, Dus Santos MJ, Trono K. (2009). Detection of bovine leukemia virus specific antibodies using recombinant p24-ELISA. *Vet Microbiol* 137: 224-234
- Gutiérrez G, Alvarez I, Politzki R, Lomónaco M, Dus Santos MJ, Rondelli F, Fondevila N, Trono K. (2011). Natural progression of Bovine Leukemia Virus infection in Argentinean dairy cattle. *Vet Microbiol* 151:255-263.
- Herr M, Bostedt H, Failing K. (2011). IgG and IgM levels in dairy cows during the periparturient period. *Theriogenology* 75:377-385.
- Hübner SO, Weiblen R, Tobias FL, Cancian N, Botton SA, Oliveira M, Zanini M. (1996). Evolução da imunidade passiva contra o vírus da leucose bovina. *Pesquisa Veterinaria Brasileira.* 16:87-90.
- Johnson R, Kaneene JB, Anderson SM. (1987). Bovine leukemia virus: Duration of colostrum antibodies in calves from commercial dairy herds. *Prev Vet Med* 4:371-376.

- Kehrli ME, Nonnecke BJ, Roth JA. (1989a). Alterations in bovine neutrophil function during the periparturient period. *Am J Vet Res* 50: 207-214.
- Kehrli ME, Nonnecke BJ, Roth JA. (1989b). Alterations in bovine lymphocyte function during the periparturient period. *Am J Vet Res* 50: 215-220.
- Kettmann R, Burny A, Callebaut I, Droogmans L, Mammerick M, Willens L, Portetelle D. (1994). Bovine leukaemia virus, in: Levy JA (Ed.), *The Retroviridae*, Plenum Press, New York, pp. 39-81.
- Lamote I, Meyer E, De Ketelaere A, Duchateau L, Burvenich C. (2006). Expression of the estrogen receptor in blood neutrophils of dairy cows during the periparturient period. *Theriogenology* 65:1082-1098.
- Larson BL, Kendall KA. (1957). Changes in specific blood serum protein levels associated with parturition in the bovine. *J Dairy Sci* 40:659-666.
- Larson BL. (1958). Transfer of specific blood serum proteins to lacteal secretions near parturition. *J Dairy Sci* 41: 1033-1044.
- Lassauzet ML, Johnson WO, Picanso JP. (1990). Factors associated with decay of colostral antibodies to bovine leukemia virus. *Prev Vet Med* 9:45-58.
- Llames L, Goyache J, Doménech A, Arjona A, Suarez G, Gomez-Lucia E. (2001). Evaluation of virus excretion by cells persistently infected with the bovine leukaemia virus (BLV) using monoclonal antibodies. *J Clin Virol* 22: 31-39.
- Martín D, Arjona A, Soto I, Barquero N, Viana M, Gómez-Lucía E. (2000). Comparative study of PCR as direct assay and ELISA and AGID as indirect assays for the detection of Bovine Leukaemia Virus. *J Vet Med* 48: 97-106.
- Niermann GL, Buehring GC. (1997). Hormone regulation of bovine leukemia virus via the long terminal repeat. *Virology* 239:249-258.
- Rama G, Meikle A, Puentes R, Moratorio G, Nicolini P, Pessina P, Furtado A, Pritsch O. (2010). Aspectos sobre el diagnóstico de la Leucosis Enzoótica Bovina. *Veterinaria (Montevideo)*. 46:15-22.
- Rodríguez SM, Florins A, Gillet N, de Brogniez A, Sánchez-Alcaraz M, Boxus M, Boulanger F, Gutiérrez G, Trono K, Alvarez I, Vagnoni L, Willems L. (2011). Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: lessons for HTLV. *Viruses* 3:1210-1248.
- Rola M, Kuzmak J. (2002). The detection of bovine leukemia virus proviral DNA by PCR-ELISA. *J Virol Methods* 99:33-40
- Strange R, Friis RR, Bemis LT, Geske FJ. (1995). Programmed cell death during mammary gland involution. *Methods Cell Biol* 46:355-368.
- Tekes L. (1994). Influence of management technology and parturition on antibody levels in cows with bovine leukosis. *Acta Vet Hung* 42:57-67.
- Thurmond MC, Carter RL, Puhr DM, Burr ridge MJ. (1982). Decay of colostral antibodies to bovine leukemia virus with application to detection of calfhoo d infection. *Am J Vet Res* 43:1152-1155.
- Trainin Z, Brenner J. (2005). The direct and indirect economic impacts of bovine leukemia virus infection on dairy cattle. *Israel J Vet Med* 60:94-105.
- Trono KG, Pérez-Filguiera DM, Duffy S, Borca MV, Carrillo C. (2001). Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. *Vet Microbiol* 83:235-248.
- Vangroenweghe F, Lamote I, Burvenich C. (2005). Physiology of the periparturient period and its relation to severity of clinical mastitis. *Domest Anim Endocrinol* 29: 283-93.



Errecalde, J.O.¹

El hombre, en su lucha frente a la enfermedad, ha elegido un rival formidable. Las bacterias tienen 3500 millones de años de experiencia sobre el planeta contra dos millones de años en el caso de la especie humana. Nos llevan una buena ventaja, ¿no es cierto?

Los antimicrobianos son sustancias naturales o sintéticas capaces de detener el crecimiento o directamente matar microorganismos. Debemos tomar conciencia de que tienen que ser utilizados prudentemente. No enfrentamos a un rival fácil.

El primer antibiótico natural fue la penicilina, que es el ejemplo excluyente, al representar el primer escalón de un grupo enorme de drogas de gran actividad y uso extendido y el inicio de una nueva etapa en la historia de la humanidad. Posteriormente a la penicilina, sulfamidas y tirotricina, en la década del 40 aparecen estreptomomicina, cloranfenicol y clortetraciclina. En la década del 50 eritromicina y vancomicina. En la del 60, gentamicina, ampicilina, cefalotina y amikacina. En la del 70, cefalexina, carbenicilina, cefoxitina y cefaclor. En la del 80, cefotaxima, moxalactam, combinación ácido clavulánico-amoxicilina, combinación imipenem-cilastatina, aztreonam. En los 90 aparecen las fluoroquinolonas, nuevos macrólidos, y nuevas cefalosporinas y agentes antivirales más efectivos. Luego del 2000 registramos la aparición de quinolonas de espectro ampliado. Esto es solamente una muestra parcial que incluye agentes representativos.

Por supuesto que todos estos descubrimientos estuvieron estimulados por algo. Ese algo fue una mezcla de componentes formada por la inquietud de los investigadores y de la industria por una parte, pero innegablemente, por la aparición de diversos niveles de resistencias bacterianas por el otro. Esto dio lugar a una competencia entre los microorganismos, generando resistencias y seleccionándose en pro de éstas y el hombre, por su parte, imaginando, diseñando, tamizando, en la búsqueda de nuevos compuestos más eficaces y más seguros para la lucha antimicrobiana. Si bien el hombre no cede en su lucha, los microorganismos tampoco, y estos últimos van sacando ventaja, lenta e inexorablemente.

A la luz de los conocimientos actuales podemos decir que ante la llegada de un nuevo antibiótico a la clínica, es muy probable que ya existan variedades bacterianas capaces de resistir a su acción, o que éstas aparezcan y se seleccionen con velocidad variable. Será nuestra obligación que la emergencia de resistencia se demore todo lo posible.

¿NECESITAMOS DEL LABORATORIO PARA INSTAURAR UN TRATAMIENTO ANTIMICROBIANO?

Se trata de un tema extremadamente conflictivo. Frente a la instauración de una terapia antimicrobiana tenemos dos alternativas: por un lado el aislamiento, identificación y prueba de susceptibilidad del/los gérmenes actuantes y por el otro, el tra-

tamiento a ciegas (que como veremos más adelante no es algo malo si se lo hace con el criterio necesario).

Es evidente la ventaja que aportan las pruebas de laboratorio cuando están bien interpretadas. Saber de qué microorganismo se trata, a qué antibiótico es susceptible, y aún más, cuál es la concentración inhibitoria mínima para el agente que se está pensando seleccionar para el tratamiento, representan innegablemente enormes ventajas. Pero lejos de ser la solución del problema solamente sirven para ayudar en el diseño del plan terapéutico adecuado.

Si no tenemos resultados de laboratorio para hacer un tratamiento antimicrobiano las cosas cambian respecto de lo anteriormente descrito. Estamos en franca inferioridad de condiciones. Sin embargo, eso no significa que, sin resultados de laboratorio, un tratamiento deba ser necesariamente irracional. Antes de aplicar el medicamento habrá que considerar: ¿Cuál es la sintomatología clínica? ¿Cuál es el foco infeccioso? ¿Qué nos indica la historia del establecimiento en cuanto a frecuencia de infecciones con esa sintomatología en esa especie animal? ¿Disponemos de pruebas de laboratorio previas? ¿Qué datos existen en los registros del establecimiento? ¿Cuáles son los datos que aporta la persona a cargo de los animales? ¿Existe una posibilidad concreta de presencia de flora mixta? ¿Cuál es la historia de uso de antimicrobianos en el establecimiento? ¿Sus éxitos? ¿Sus fracasos? ¿El o los animales enfermos son inmunocompetentes? ¿Existe otra patología concomitante? ¿Se está llevando a cabo alguna otra terapia simultáneamente? Estas son solamente algunas de las preguntas que el profesional actuante necesariamente deberá hacerse antes de pensar en la elección de un agente antimicrobiano, su dosis, esquema de dosificación y tiempo de tratamiento.

Si la terapia no puede basarse en pruebas de laboratorio (y esto es algo que muy frecuentemente ocurre en diversas regiones del mundo), el criterio clínico se vuelve esencial y, combinado con el conocimiento de las características farmacocinéticas y farmacodinámicas del medicamento elegido, aún pueden conducir al éxito terapéutico.

¿EXISTEN RIESGOS POR PRESENCIA DE RESIDUOS DE ANTIMICROBIANOS EN ALIMENTOS?

Clásicamente la presencia de antimicrobianos en alimentos se ha asociado a distintos problemas, a saber:

- Alérgicos.
- Tóxicos.
- Asociados a las resistencias bacterianas.

¹Médico Veterinario. MSc, Dr. en Ciencias Veterinarias. Profesor Titular, Cátedra de Farmacología, Farmacotecnia y Terapéutica y Cátedra de Farmacología Básica y Farmacodinamia, Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLP, Argentina.

Recibido: 1/2/12 Aprobado: 20/2/12

Los problemas alérgicos son conocidos y afectan a la población sensibilizada. En general las bajas concentraciones de antibióticos alérgicos (i.e. beta lactámicos) no alcanzan para sensibilizar pacientes (aunque puede haber excepciones) pero sí para desencadenar reacciones que, en general, no son graves aunque, eventualmente, pueden llegar a serlo (anafilaxia).

Los problemas toxicológicos, por su parte, son bastante difíciles de probar dadas las bajas concentraciones residuales de estas drogas. Los aminoglucósidos, por ejemplo, son productos tóxicos. Su ototoxicidad y nefrotoxicidad han sido clásicamente descritas. Sin embargo, insistimos, a concentraciones residuales es posible que no existan riesgos toxicológicos para este grupo de drogas. Por cierto que si se envían a consumo riñones de animales tratados las concentraciones de droga serán más elevadas, dada la facilidad con que los aminoglucósidos se acumulan en este órgano. De todas maneras y, aún en este caso, será difícil que el consumo de un riñón en estas condiciones pueda generar problemas toxicológicos, dada la baja posibilidad de que un paciente continúe consumiendo riñones con residuos elevados de aminoglucósidos en forma continuada por un tiempo prolongado.

El que sí es capaz de dar lugar a problemas tóxicos es el cloranfenicol y en este caso a dosis probablemente muy bajas. El cloranfenicol es capaz de producir dos tipos de manifestaciones toxicológicas: Una mielodepresión dosis dependiente que se presenta en el curso de un tratamiento con la droga y en segundo lugar, menos frecuente pero mucho más grave, una anemia aplásica que es dosis independiente, que desarrolla en individuos susceptibles y que es irreversible una vez instalada. Los derivados fenicoles tianfenicol y florfenicol, si bien pueden generar algún tipo de mielodepresión dosis dependiente que cede al suprimir el tratamiento o bajar la dosis, no son capaces de producir la anemia aplásica. Esta es la razón por la que el cloranfenicol ha sido prohibido en algunos países y que no haya ocurrido lo mismo con los otros fenicoles.

Como mencionáramos al inicio de esta sección, la resistencia bacteriana ha sido asociada largamente a la presencia de residuos de antibióticos en alimentos humanos. Sin embargo, y pensando lógicamente, las concentraciones residuales de antibióticos presentes en alimentos provenientes de animales tratados difícilmente sean capaces de seleccionar bacterias resistentes, dado que a tan bajas concentraciones los antibióticos no pueden actuar sobre microorganismos resistentes ni sensibles. Especialmente cuando esas concentraciones se encuentran por debajo del NMEL (nivel de no efecto microbiológico).

La resistencia bacteriana es un problema gravísimo que representa una preocupación mundial, que se produce por múltiples causas, que probablemente sea inevitable y con la que tenemos que lidiar en forma multidisciplinaria a efectos de limitar su emergencia y paliar sus efectos al máximo.

El riesgo más grande para la salud de los consumidores de alimentos de origen animal, vinculado con la utilización de antibióticos en animales, no está dado por los residuos de antimicrobianos en el alimento consumido, sino por el desarrollo de resistencias en bacterias de los mismos animales. Estas resistencias pueden, por supuesto, dar lugar a fallos terapéuticos en tratamientos veterinarios, pero también al riesgo de transfe-

ncia de bacterias resistentes de los animales al hombre, o de genes portadores de información que codifica resistencia de bacterias de animales a bacterias humanas.

LOS MECANISMOS Y LA EPIDEMIOLOGÍA DE LA RESISTENCIA MICROBIANA

La base del desarrollo de la resistencia bacteriana está en la selección de cepas resistentes que producen ciertas concentraciones de antibiótico. El antibiótico no induce resistencia, solamente selecciona. Es una interferencia en el proceso de selección natural. Donde antes se seleccionaban las bacterias más aptas para la supervivencia en el sitio del organismo de que se trate, en presencia del antibacteriano, sobrevivirán solamente aquellas variantes capaces de resistir a las concentraciones de antibiótico presentes en ese lugar. El antibiótico se convierte en el primer factor de selección.

Luego de la introducción en la clínica de cada nueva droga, es un proceso probablemente inevitable, que en un plazo variable de tiempo, aparezcan variantes resistentes de la bacteria contra la que se pretende luchar con el nuevo agente. Esto se ha ido cumpliendo inexorablemente con la mayoría de los antimicrobianos. Esto no implica que, con el uso criterioso y racional de los antimicrobianos, no se pueda limitar al máximo la emergencia de resistencias.

La resistencia de una bacteria no es la misma para todos los miembros de la población. Para individuos indiferenciables morfológica o bioquímicamente, puede haber variedades con susceptibilidades totalmente diferentes. Muy susceptibles, o muy resistentes, que son muy difíciles de erradicar, aún administrando el antibacteriano en concentraciones elevadas. Pero cuando se hace un aislamiento de una determinada infección, se supone que se trata de una cepa bastante pura, que es la que produce el proceso morboso. Al estudiar su susceptibilidad a un determinado agente antiinfeccioso a través de su CIM, podremos, al correlacionar este parámetro con sus variables farmacocinéticas, estimar su eficacia «in vivo». Cuando las concentraciones que el antimicrobiano puede alcanzar en el organismo no superan la CIM sustancialmente y durante tiempos prolongados, aunque vinculados al tipo de agente de que se trate, la bacteria tiene todas las posibilidades para sobrevivir y la podemos definir como resistente. En cambio, cuando ocurre lo opuesto, la bacteria es definida como susceptible.

Esto es lo que ocurre con las resistencias adquiridas, aquellas en que el antibacteriano actúa, como se ha explicado, seleccionando entre microorganismo resistentes y susceptibles. Pero hay otro tipo de resistencias, las denominadas resistencias intrínsecas, aquellas que son parte constitutiva de la bacteria. Por ejemplo las diferencias, de membrana entre bacterias Gram positivas y Gram negativas, hacen que los antibióticos beta lactámicos no encuentren el receptor adecuado para fijarse y ejercer su efecto en las últimas.

Sin embargo es la resistencia adquirida la que nos interesa y sobre ella nos vamos a extender más. El origen de la resistencia adquirida es genético. El puntapié inicial de la resistencia es una mutación que permite que la bacteria se haga resistente. Sobre esta mutación actúa luego la selección ejercida por el antibiótico. Mayor importancia aún tiene el mecanismo de la transferencia de material genético.

En términos generales, las resistencias no parecieran tan difundidas en bacterias Gram positivas como en los Gram negativos, en los que el fenómeno es muy grave.

La transmisibilidad de los factores de resistencia puede dar lugar a un problema aún mayor: la multi-resistencia. Estos microorganismos no solamente son resistentes a una serie de drogas, sino que pueden transferir esa capacidad, por lo que se transforman en reservorios de resistencia. La multiresistencia es el mayor problema que la terapia antimicrobiana enfrenta en este momento.

LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

Las bacterias pueden volverse resistentes a los antimicrobianos, pero, ¿por qué mecanismos? Así como el primer mecanismo de acción de un agente infeccioso conocido fue el de las sulfamidas, el primer mecanismo de resistencia conocido también fue el de los microorganismos a estas drogas. Si bien son varios los mecanismos de resistencia a las sulfas que actualmente se conocen, podemos decir que la hiperproducción de ácido paraaminoibenzoico fue el primero en determinarse, siendo el más conocido. Además de la hiperproducción metabólica, otros mecanismos incluyen:

- Inactivación enzimática de los antibióticos.
- Impermeabilidad de la membrana o pared celular bacteriana.
- Expulsión por mecanismos activos del antibiótico.
- Modificación del receptor del antibiótico en la bacteria.

LA LLEGADA DE LAS BACTERIAS ANIMALES A LA POBLACIÓN HUMANA

Escherichia coli multiresistentes, *Salmonella typhimurium* multiresistentes, enterococos vancomicina resistentes, *Campylobacter* quinolonas resistentes, son microorganismos que habrían emergido, por lo menos en parte de explotaciones agropecuarias. Este hecho se debe sumar al conocimiento de la enorme capacidad de intercambio genético existente en el intestino representado por los microorganismos saprófitos que lo pueblan, que, como bien se sabe, bajo presión antibiótica se vuelven extremadamente peligrosos. Esto ha generado una permanente discusión sobre el tema de la transferencia de resistencias de los animales al hombre. En esta discusión el punto central es la utilización de antibióticos a dosis por debajo de las terapéuticas para la prevención de enfermedades o, simplemente para el aprovechamiento de los efectos «productivos» de los antimicrobianos. Sin embargo, este fenómeno de transferencia no es fácil de demostrar, y menos aún, de medir.

EL USO RACIONAL DE LOS ANTIMICROBIANOS

Indiscutiblemente el uso racional de los antimicrobianos es la herramienta fundamental para evitar entrar en la época post-antibiótica. La resistencia a los antimicrobianos es un problema que genera preocupación internacional. Las tres organizaciones internacionales que tienen responsabilidades sobre este tema, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la Organización Internacional de Epizootias (OIE) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), han

mostrado, reiteradamente, su interés en el tema y han producido documentos aportando recomendaciones para la utilización adecuada de este tipo de fármacos.

Estas organizaciones, hasta la fecha han coincidido en una serie de recomendaciones, reflejadas en publicaciones que abarcan las siguientes áreas:

- Responsabilidad de las autoridades regulatorias y otras con poder de decisión.
- Calidad de manufactura.
- Marketing, distribución y ventas de este tipo de productos.
- Agentes promotores del crecimiento.
- Monitorización de resistencia y utilización de antimicrobianos.
- Uso prudente de antimicrobianos.
- Uso profiláctico de antimicrobianos.
- Entrenamiento y educación.
- Investigación.

Además de la organización de grupos de trabajo, publicación de documentos y difusión de material bibliográfico para conocimiento de técnicos y público en general, estas organizaciones internacionales siguen adelante con su política de aportar soluciones a este tema que, como hemos dicho, es una preocupación mundial.

El uso racional de antimicrobianos es una inquietud de nuestro grupo de trabajo desde hace muchos años. Hemos publicado diversos documentos y realizado una serie de comunicaciones y conferencias apuntando a la mejora de los criterios de utilización de antimicrobianos en los animales y en el hombre. La utilización racional de este tipo de medicamentos en establecimientos productores de leche a efectos de optimizar sus acciones previniendo efectos en la salud pública debe ser una prioridad. Para esto, hemos insistido, a través de diversos documentos y reuniones de entrenamiento, en que se deben poner en práctica planes de administración adecuados, respetándose los períodos de retirada correspondientes a cada formulación (Errecalde, 1994, 1996; Mestorino, 2001). Hemos propuesto la utilización de sistemas de HACCP (análisis de riesgos y control de puntos críticos) para la correcta utilización de estos agentes evitando la presencia de residuos indeseables (Errecalde, 2000a). Hemos insistido en la importancia de la calidad de elaboración y control de antimicrobianos para una terapéutica exitosa y la defensa de la salud pública, considerando que la implementación de procedimientos armonizados en el registro (tal como OIE viene trabajando en América a través del programa CAME-VET), buenas prácticas de manufactura (GMP) en la elaboración de medicamentos y buenas prácticas de laboratorio en el desarrollo y control de los mismos son esenciales y se debe seguir avanzando en ese sentido (Errecalde, 1995, 1998, 2003).

La terapéutica racional es un terreno dinámico, en que el avance del conocimiento va volviendo obsoletas las viejas recetas quimioterápicas. Clásicamente, se ha medicado con antibióticos siguiendo planes de administración o regímenes de dosificación, que permitan mantener concentraciones de droga en plasma y tejidos en forma continuada, durante un período suficiente para la total curación de la dolencia. La curación se obtiene por muer-

te bacteriana de una gran parte de la población y eliminación de los miembros sobrevivientes por activa participación del organismo. De allí que sea tan importante el estado de inmunocompetencia del paciente para la curación. Pacientes inmunodeprimidos necesitan especial cuidado, dado que los quimioterápicos, en este caso, actúan sin la ayuda de las defensas del organismo. Es importante considerar algunas cosas:

Terapia por encima de la concentración inhibitoria mínima (CIM). La concentración inhibitoria mínima ha sido el indicador más utilizado, en terapia antimicrobiana, durante décadas. Se la define como la concentración más baja de droga que previene el crecimiento visible de microorganismos. Es intuitivamente fácil de concebir que, si un antibiótico se mantiene en el organismo en concentraciones por encima de la CIM para determinada cepa de un microorganismo, será capaz de inhibir el desarrollo de esa bacteria con comodidad. Este concepto ha iluminado el avance de la ciencia durante mucho tiempo. Aunque últimamente, nuevos conceptos cambian las bases de algunos de los conocimientos que veníamos manejando, la CIM continúa siendo un parámetro fundamental, sin cuyo conocimiento no tendríamos posibilidades de éxito en terapia antibacteriana.

Los efectos persistentes, conjuntamente con la capacidad de muerte bacteriana («killing»), han sido definidos como los mejores parámetros para establecer el óptimo plan de administración de un antimicrobiano (Andes y Craig, 1998). Entre estos parámetros podemos citar el efecto post-antibiótico (PAE), que es el tiempo necesario para que un cultivo bacteriano que estuvo en contacto con un antibiótico a concentraciones por encima de la CIM y que por lavado o dilución deja de estar en contacto con el antibiótico reinicie el crecimiento.

Parámetros farmacocinéticos. Desde hace tiempo que se tiene muy en claro la importancia del conocimiento de la farmacocinética de los medicamentos para una terapia eficaz. El uso racional de los mismos se basa, en forma central, en el conocimiento de su farmacocinética, lo que, coordinado con el conocimiento de farmacodinamia y toxicidad, de las características del paciente y la enfermedad, permitirá una terapia óptima. El comportamiento farmacocinético de un determinado compuesto se caracteriza a través de una serie de parámetros. Entre los parámetros farmacocinéticos que más vinculación tienen con la eficacia antibacteriana, no podemos dejar de mencionar la biodisponibilidad, semivida de absorción, área bajo la curva concentración versus tiempo, concentración máxima obtenida en plasma y tiempo al que esa concentración se alcanza, semivida de eliminación y aclaramiento (clearance) desde plasma (en general a través de riñón).

Parámetros farmacocinético-farmacodinámicos (Pk-Pd). En los últimos años, se ha avanzado en el conocimiento de la relación Pk-Pd. A través de ese análisis, algunos parámetros farmacocinéticos se correlacionan con parámetros farmacodinámicos, a efectos de obtener predictores más robustos de eficacia terapéutica.

Los parámetros Pk-Pd más utilizados son: el área bajo la curva concentración tiempo dividida por la concentración inhibitoria mínima (AUC/CIM), la máxima concentración plasmática dividida por la CIM (Cmax/CIM) y el tiempo en que la concentración del antibiótico excede la CIM (T>CIM). Estos parámetros

son actualmente considerados como determinantes en la eficacia «in vivo» de los agentes antimicrobianos (Craig, 1998). Cada vez se dispone de más datos sobre experimentos «in vitro» y en modelos animales que corroboran la importancia de los parámetros farmacocinético-farmacodinámicos para diferentes antimicrobianos y su capacidad para permitirnos tratar efectivamente infecciones por gérmenes con susceptibilidades menores y prevenir la emergencia de resistencias (Craig, 2001).

A la luz de los nuevos conocimientos aparecen tres tipos de drogas antimicrobianas: a. aquellas que muestran una actividad fuertemente dependiente de la concentración, b. aquellas que no muestran esa dependencia y c. aquellas que son solamente bacteriostáticas (Vogelman y Craig, 1986).

Los parámetros Pk-Pd pueden ser utilizados para evitar la emergencia de resistencias. Es interesante mencionar que de los resultados obtenidos en trabajos llevados a cabo en modelos animales y estudios clínicos en seres humanos, se concluye que la magnitud de los parámetros Pk/Pd no difieren mayormente cuando se salta entre especies. Esto no debería sorprendernos, ya que los receptores para los antimicrobianos se encuentran en la bacteria, que es la misma en humanos o animales. Hay datos que nos sugieren que la magnitud de los parámetros Pk/Pd son similares para diferentes regímenes de dosificación, para diferentes drogas dentro de la misma clase y en diferentes sitios de infección (Leggett y col., 1991).

En el caso de penicilinas y cefalosporinas, el tiempo en que las concentraciones plasmáticas deben estar por encima de la CIM en un intervalo interdosis es del 40% al 50% para una eficacia por encima del 85%. Para los macrólidos ocurriría lo mismo (Craig, 2001).

Los aminoglucósidos, por su parte, son drogas cuya eficacia depende netamente de las concentraciones alcanzadas.

¿SE DEBE SUSPENDER EL USO DE ANTIMICROBIANOS COMO PROMOTORES DEL CRECIMIENTO?

Desde hace tiempo se ha instalado una discusión internacional sobre la conveniencia y la factibilidad de dejar de utilizar antibióticos con fines de promoción del crecimiento. Estos medicamentos son utilizados en dosificaciones bajas, subterapéuticas, en alimentos animales, a los efectos de mejorar la calidad del producto final (una menor proporción de grasa y una mayor proporción de proteínas). Otro beneficio de la utilización de estas drogas en la dieta es el control de patógenos zoonóticos, como Salmonella, Campylobacter, E. coli y enterococos. Por otra parte, hay quienes argumentan que la utilización de cualquier antibiótico en estas condiciones favorece la selección de resistencia en bacterias patógenas, limitando en consecuencia su utilización en casos clínicos.

Muchas han sido las teorías que tratan de explicar el efecto de los antibióticos como promotores del crecimiento. Lo que es indudable es que su efecto está vinculado a la intensificación de la explotación productiva. Se ha pensado en que estos medicamentos pueden suprimir parte de la población bacteriana intestinal que pueden llegar a consumir hasta un 6% de la energía neta en cerdos (Jensen, 1998). Controlando la población bacteriana, probablemente la pérdida energética sea menor. Thomke

y Elwinger (1998), sugieren que las citocinas liberadas durante el proceso inmune estimulan la liberación de hormonas catabólicas que reducirían la masa muscular. Obviamente, una reducción de las infecciones intestinales actuaría en contrario. El efecto de los antimicrobianos sobre bacterias anaerobias puede ser otra explicación (los anaerobios son raramente buscados), esto podría prevenir enfermedades como las enteritis necrotizantes e incluso, al suprimir bacterias capaces de producir exotoxinas, evitar los efectos de éstas.

Independientemente de la teoría que se quiera utilizar, parece innegable que el resultado de la utilización de promotores del crecimiento redundará en aumentos diarios de peso en el rango de 1% a 10% con carnes de mejor calidad.

El que se trate de un tema tan conflictivo, explica, de alguna manera, las diferencias en la utilización de este tipo de drogas en áreas desarrolladas del mundo, así podemos comprobar que, mientras en los EE.UU. utilizan extensivamente una gran cantidad de antimicrobianos como promotores del crecimiento, Suecia, no utiliza actualmente antibióticos con los mismos propósitos. En 1995 el Parlamento sueco prohibió la utilización de antibióticos con fines de promoción del crecimiento. Si bien con un costo en pérdidas productivas importantes, y con mayores costos en instalaciones y manejo, Suecia ha demostrado que se puede producir carne en forma moderna sin utilizar promotores del crecimiento antibacterianos. El Animal Health Institute of America (AHI, 1998), por su parte, considera que, sin la utilización de antimicrobianos como promotores del crecimiento, los EEUU necesitarían 452 millones de pollos, 23 millones de bovinos y 12 millones de cerdos extra, para alcanzar los niveles de producción que se alcanzan con las prácticas actuales. En párrafos anteriores mencionamos la experiencia llevada cabo en Dinamarca (documento WHO), en que se suspendió la utilización de antimicrobianos para la promoción del crecimiento en cerdos y aves. La conclusión de ese documento fue que, en condiciones similares a las de Dinamarca, el uso de antimicrobianos con el único propósito de promoción del crecimiento podría ser discontinuado, sin demasiados complicados efectos colaterales. Aquí debemos remarcar las palabras «en condiciones similares a las de Dinamarca», dado que esas condiciones son, en realidad bastante difíciles de cumplimentar, especialmente en los países del tercer mundo. Las medidas profilácticas implementadas en Dinamarca, permitieron que el programa fuera exitoso con pérdidas mínimas en producción porcina y prácticamente sin pérdidas en explotaciones avícolas. Las pérdidas, según el informe serían completamente compensadas por el aumento de confianza del consumidor en los productos producidos bajo el nuevo sistema y por el valor agregado de las exportaciones danesas. Los expertos concluyen que la experiencia danesa es extrapolable a otros países en similares condiciones de desarrollo agropecuario. Esto significa: elevada intensidad, bioseguridad, alojamiento cerrado y muy elevado estándar sanitario. Es extremadamente discutible la última conclusión del trabajo, en que asegura que: «a la vista de los resultados obtenidos en Dinamarca, es poco probable que una acción similar en países en desarrollo pueda disminuir la producción total de carne». Nosotros pensamos que, desde el punto de vista sanitario, muchas explotaciones tercermundistas no están en condiciones mínimas de resistir un proyecto como el mencionado. Por otra

parte, parece lógico pensar que debemos luchar contra las resistencias bacterianas con las armas más adecuadas, pero que esa lucha no debería basarse en una pérdida de productividad en regiones del globo en que cada gramo de alimento es esencial para paliar el hambre. Por lo tanto, en las actuales condiciones, deberá dedicarse mucho al desarrollo económico, técnico y cultural de ciertas partes del globo, antes de pretender enrostrarlos en programas de mejoramiento de la calidad alimentaria que obedezcan a políticas de mejora de la salud pública global.

¿CUÁLES SON LAS ALTERNATIVAS AL USO DE ANTIBIÓTICOS COMO PROMOTORES DEL CRECIMIENTO?

Cuando se considera la prohibición del uso de antimicrobianos como promotores del crecimiento, se debería considerar paralelamente cuales son las posibles medidas a tomar como alternativas.

Una alternativa lógica sería la de desarrollar drogas con mecanismos de acción similares, lo que no sería más que el descubrimiento de nuevos antimicrobianos con mecanismos de acción diferentes de los críticamente importantes en clínica médica humana. Una ruta más compleja sería el mejoramiento de la sanidad animal. Esto es algo elemental. Fue descrito por Prescott y Bagot (1993), que los promotores del crecimiento funcionan mejor cuanto peores sean las condiciones sanitarias. Pero el mejoramiento de la salud animal no es algo fácil de conseguir, especialmente cuando las condiciones económicas y sanitarias generales correspondientes al país no se conciben con ello.

Una de las alternativas que se manejan corrientemente son las enzimas, que adicionadas a las dietas de pollos y cerdos, mejoran el nivel de digestión de ciertos componentes, incrementado sustancialmente el nivel de aprovechamiento de los nutrientes.

Los probióticos están siendo utilizados de manera variable desde hace tiempo ya. Los probióticos son microorganismos que se incluyen en la dieta o son administrados por otras vías. Consisten en microorganismos o mezclas de los mismos que se comportan de manera «amistosa» con el organismo. Sus mecanismos de acción están en discusión, pero, resumidamente se podría decir que podrían seguir una o más de las siguientes acciones: a. Actuar en función del principio de exclusión competitiva, en que una bacteria a grupo de ellas coloniza el intestino de un paciente, con lo que evita que un patógeno pueda ocupar lo que ya está ocupado. b. Actuar estimulando el sistema inmune del paciente. c. Actuar influenciando el metabolismo intestinal, haciéndolo más eficiente.

Pese a sus teóricas ventajas y a varias demostraciones de eficacia, la actividad de los probióticos sigue generando dudas en la comunidad científica.

Las medidas de manejo que se puedan implementar siempre repercutirán favorablemente en la productividad. En Australia se ha trabajado sobre el sistema llamado «todo adentro, todo afuera», lo que significa que cuando se establece un movimiento en la granja, este es total y no quedan animales en la misma, evitando infecciones cruzadas. Si bien esto es generalmente aplicado en explotaciones avícolas, en explotaciones porcinas se trata de algo más complicado y novedoso, que seguramente una vez implementado generará beneficios.

Los planes de vacunación, por su parte, tampoco pueden ser discutidos y, más allá de los costos involucrados, sus resultados suelen ser satisfactorios.

Sin embargo, pareciera que, por el momento, no aparece una opción realista para suplantar a los antibacterianos como promotores del crecimiento.

LA HIGIENE COMO BARRERA PARA LA PREVENCIÓN DE LA DISEMINACIÓN DE RESISTENCIAS

Hemos aclarado anteriormente que las resistencias microbianas de origen no-humano llegan al hombre directamente a través de bacterias que han emergido como resistentes en animales que han sido tratados con antibióticos, o a través de determinantes genéticos de resistencia que, en algún punto de la cadena alimentaria, saltan y son tomados por bacterias patógenas para el hombre. En todos los casos es necesario un íntimo contacto de las bacterias animales y las humanas. Si bien hemos insistido cuando se habló de la epidemiología de la resistencia de la multiplicidad de vías a través de las cuales las bacterias humanas y animales pueden entrar en contacto, debemos dejar claro aquí, que la vía del contacto con alimentos es fundamental. Es por ello que insistiremos en que el manejo higiénico de los alimentos, base fundamental de la prevención de las enfermedades transmitidas por alimentos, es crucial en este tema.

La Organización Mundial de la Salud ha trabajado fuertemente y desde hace tiempo sobre esto, habiendo elaborado las «Reglas de Oro» para la preparación higiénica de los alimentos. Por tratarse de reglas de extrema trascendencia, las resumimos:

- a. Elegir alimentos tratados con fines higiénicos. La pasteurización de la leche es un ejemplo prácticamente universal. Aquellos alimentos que poseen gran valor alimentario cuando están crudos, como algunas verduras, deben ser cuidadosamente lavadas antes de ser consumidas.
- b. Cocinar bien los alimentos.
- c. Consumir inmediatamente todos los alimentos cocinados.
- d. Guardar cuidadosamente los alimentos cocinados.
- e. Recalentar bien los alimentos ya cocinados.

f. Evitar el contacto entre alimentos crudos y cocinados.

g. Lavarse las manos a menudo.

h. Mantener escrupulosamente limpias todas las superficies de la cocina.

h. Mantener todos los alimentos fuera del alcance de insectos, roedores y otros animales.

i. Utilizar agua pura.

Si estas reglas fueran respetadas en forma generalizada, probablemente representarían un golpe muy duro a la transmisión de resistencias bacterianas de los animales al hombre. Lo que ocurre es que no solamente hay que tener un determinado grado de instrucción para poder aplicarlas, sino que en ciertas regiones del globo hablar de «mantener limpia la cocina» es absurdo porque no hay, en el lugar que se habita, un ambiente a ser utilizado como cocina.

EL FUTURO

Pareciera evidente que para evitar entrar a la «era post-antibiótica», no van a ser las prohibiciones de utilización la llave. Las prohibiciones no harán más que reducir la productividad a niveles alarmantes en regiones del planeta que las necesitan elevadas, aumentar el mercado negro y las fabricaciones ilegales y carentes de todo control, el contrabando y la pérdida de control sobre el flujo de antimicrobianos en el mundo, lo que, paradójicamente, puede impactar negativamente en los niveles de resistencias bacterianas.

El uso racional de los antimicrobianos, por veterinarios bien formados en el tema cuando eso es posible, o por técnicos entrenados en su uso, en otros casos, con instrucciones concretas para la utilización de productos farmacéuticos de elevada calidad, es la única y clara salida para el problema que nos ocupa. Para ello, se deberán destinar recursos a la investigación básica y aplicada, especialmente vinculada a aspectos de la farmacocinética y la farmacodinamia de los antibacterianos, a la investigación clínica de sus efectos y, especialmente a la educación y entrenamiento de todos aquellos involucrados en la elaboración, comercialización, utilización, fiscalización y control de los productos fabricados en base a antibióticos.

Referencias bibliográficas

- Andes D, Craig W. (1998). In vitro activities of amoxicillin and amoxicillin-clavulanate against *Streptococcus pneumoniae*: application to breakpoint determination. *Antimicrob Agents Chemother.* 42:2375-2379.
- Andes D, Craig W. (1998). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of outpatient intravenous antimicrobial therapy. *Infect Dis Clin N Am* 112:849-860.
- Craig W. (1998). Pharmacokinetic-pharmacodynamic parameters: rationale for antibiotic use in mice and men. *Clin Infect Dis* 26:1-12.
- Craig W. (2001). Does the Dose Matter? *Clin Infect Dis* 33(Suppl. 3):S233-237.
- Dahlstrom B, Paalzow L, Segre G et al. (1978). Relationship between morphine pharmacokinetics and analgesia. *J Pharmacokinet Biopharm* 6:41-53.
- Davies J. (1994). Origin, acquisition and dissemination of resistance genes. *Science* 264:375-382.
- Eagle H, Fleischman R, Musselman A. (1950). Effect of schedule of administration on the therapeutic efficacy of penicillin. *Am J Med* 9:280-299.
- Errecalde J. (1988). Bioequivalencia, Ensayos de Fármacos «in vitro» e «in vivo». *Boletín del Centro de Estudios para el Desarrollo de la Industria Químico-Farmacéutica Argentina.* 29:5-10.
- Errecalde J. (1994). Documento sobre productos genéricos. *Boletín Técnico. Pfizer, Sanidad Animal.* Buenos Aires, Argentina. 176:1-6.
- Errecalde J. (1995). Documento sobre productos genéricos (II Parte). *Boletín Técnico. Pfizer Sanidad Animal.* Buenos Aires, Argentina. 180:1-5.
- Errecalde J. (1996). Antimicrobianos en leche: Su importancia en Salud Pública. *Boehringer Ingelheim S.A.* Buenos Aires, Argentina.
- Errecalde J. (2000a). El control de puntos críticos en el tambero: Una alternativa viable en nuestro medio? Segundo Curso de Actualización Profesional Fisiopatología de la Lactancia y Calidad de Leche. *Universidad Nacional de La Plata, INTA y CREA.* Pp 99-105.
- Errecalde J. (2003). La elección del medicamento de calidad. Libro de resúmenes de las XIV Jornadas Ganaderas de Pergamino, Buenos Aires. Argentina. Pp. 72-76.
- Kammer R. (1982). Milestones in antimicrobial therapy. In: Morin R., Gorman M. Eds. *Chemistry and Biology of Beta Lactam Antibiotics.* Academic Press. Orlando, Florida.
- Leggett J, Ebert S, Fantin B, Craig W. (1991). Comparative dose-effect relationship at several dosing intervals for beta-lactams, aminoglycoside and quinolone antibiotics against Gram negative bacilli in murine thigh infection and pneumonitis models. *Scand. J. Infect. Dis. (Suppl. 74):*179-184.
- Mestorino ON. (2001). Control de residuos químicos en animales productores de leche. *Primeras Jornadas Técnicas de Ciencia y tecnología de Carnes y Alimentos.* Montevideo, Uruguay.
- O'Brien T. (1997). The global epidemic nature of antimicrobial resistance and the need to monitor and manage it locally. *Clin Infect Dis* 24(suppl. 1):82:88.
- Prescott J, Baggot J, Walker R. (2002). *Terapéutica Antimicrobiana en Medicina Veterinaria.* Tercera Edición. Intermédica. Buenos Aires.
- Soussy C. (1998). Susceptibility testing of quinolones and links between *in vitro* and *in vivo* resistance. Working paper 2. The use of quinolones in food animals and potential impact in human health. WHO Meeting 2-5 June 1998. Geneva Switzerland.
- Vogelman B, Craig W. (1986). Kinetics of antimicrobial activity. *The Journal of Pediatrics.* 108:835-840.
- Weidermann B, Heisig P. (1999). Bakterielle resistanz gegenüber chinolonen. *Chemotherapie Journal* 8:99-107.
- Woodnut G, Berry V. (1999). Two pharmacodynamic models for assessing the efficacy of amoxicillin-clavulanate against experimental respiratory tract infections caused by strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 43:29-34.



Veterinaria (Montevideo) es la revista oficial de la Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay destinada a publicar artículos en idioma español sobre temas científicos, técnicos y otras comunicaciones de interés a las Ciencias Veterinarias.

Los contenidos y opiniones incluidos en los artículos son responsabilidad exclusiva de los autores.

NORMAS GENERALES

Los trabajos se enviarán exclusivamente por correo electrónico a: revistavet@yahoo.com

El texto debe ser en formato «DOC» o «RTF» y no deberá exceder de 20 páginas tamaño A4 (incluidas referencias), con margen de 2,5 cm a cada lado y con caracteres de 12 puntos, con interlineado doble y numeración de líneas.

Los cuadros (se recomienda usar la palabra cuadro y no tabla) y figuras (se recomienda usar la palabra figura y no gráfica) deben ir al final del manuscrito (cada una en hoja aparte). Las leyendas de los cuadros van arriba de los mismos y deben ser auto explicativas. Las leyendas de las figuras también deben ser auto explicativas y van aparte de las mismas, en una hoja a continuación de la bibliografía y antes de los cuadros y figuras. Los cuadros deben ser simples, con líneas de color negro. En las figuras (cuando corresponda) utilizar tramas en blanco y negro y no en colores.

Las fotografías o impresiones pueden ser en color o en blanco y negro (con 300 dpi de resolución como mínimo al tamaño de 10x7 cm), en un máximo de 5 que serán adjuntadas al original, con leyenda en hoja aparte.

El autor principal o de correspondencia deberá enviar una nota firmada por correo electrónico o por fax (2409 9458) indicando dirección postal completa, teléfono, fax y correo electrónico, dejando establecido que el trabajo no se ha publicado ni se ha remitido a ninguna otra publicación periódica. Se aceptarán trabajos que hubieran sido publicados como resúmenes o comunicaciones cortas en congresos, simposios o jornadas.

Los trabajos recibidos serán leídos por el Editor Jefe, quien designará dos árbitros para su evaluación, pudiendo darle los destinos siguientes: aceptarlos, devolverlos a los autores para su adecuación o rechazarlos.

El Editor Jefe clasificará los manuscritos recibidos en:

- 1.Trabajo Científico: artículo original, comunicación corta (reporte o caso clínico), revisión.
- 2.Trabajo Técnico o de Difusión o Nota Técnica (práctica veterinaria, diagnóstico, tecnológico, conferencia).

Una vez publicados, los autores recibirán 10 separatas. Los trabajos aceptados para publicación pasan a ser propiedad intelectual de la SMVU quedando los derechos de publicación del trabajo a su cargo. Las reproducciones parciales o totales sólo pueden realizarse con la autorización escrita del editor.

1. Trabajos Científicos

Es una publicación que describe resultados originales que contiene suficiente información como para que otro investigador pueda: evaluar las observaciones, repetir los experimentos y comprobar las conclusiones. Un artículo original requiere rigor científico, expresado con lógica, claridad y precisión, con una extensión en función de los resultados y respaldado por citas bibliográficas imprescindibles. Existirá un arbitraje de estos trabajos que serán evaluados por reconocidos especialistas en el tema, nacionales e internacionales. Las revisiones, si tienen un análisis crítico por parte del autor, así como experiencia propia, se consideran trabajos científicos.

2. Trabajos Técnicos

Son aquellos trabajos que no cumplen con las normas de trabajos científicos originales pero que su contenido es de un interés o seriedad tal que merece su publicación. El Editor evaluará el trabajo y lo clasificará según su contenido en: Prácticas Veterinarias, Caso Clínico, Diagnóstico, Tecnológico, Conferencia, Educación, u otro según corresponda.

Normas de redacción para Artículos Originales

Contendrán los siguientes elementos:

Título

Será breve y claro, reflejando exactamente lo que el trabajo contiene. Escrito en minúsculas. Se debe incluir el título en inglés a continuación del título en español.

Nombre de Autores:

Apellido Inicial del nombre, otro/s nombres ejemplo: Vidal L¹, Gómez J^{2*}

Dirección: (en pie de página): ejemplo: ¹Departamento de Bovinos, Facultad de Ciencias Veterinarias, Suipacha 698, Buenos Aires, Argentina; ² Departamento de Bovinos, Facultad de Veterinaria, UdelaR. Se detallará solamente la dirección postal completa del autor responsable o de correspondencia, para los demás autores solamente el nombre de la institución. *Autor para correspondencia (incluir correo electrónico)

Resumen

Dará una idea clara y precisa del contenido del artículo, conteniendo: objetivos, metodología, resultados, conclusión. No debe exceder las 250 palabras, escrito en español y en un sólo párrafo luego del encabezado del título y los autores. Debe estar escrito en tiempo pasado. A continuación poner las Palabras clave (máximo cinco).

Summary

Es la traducción al Inglés del Resumen. Incluir keywords.

Introducción

Los autores deben suministrar antecedentes suficientes sobre el tema para que el lector no deba recurrir a otras publicaciones anteriores y para que comprenda la importancia o trascendencia de la investigación que se comunica. Deben referirse al contexto en general (en el mundo, etc.) y en particular (en el país), eligiendo las informaciones más recientes y más relevantes. Se deben dar los fundamentos científicos del estudio y definir claramente cuál es el propósito de escribir el artículo, precisando en el último párrafo los objetivos del trabajo.

Materiales y métodos

Los autores deben dar suficientes detalles para que un investigador competente pueda repetir los experimentos y definir el diseño experimental. Describir claramente los animales utilizados, su número, especie, género, raza, edad. Mencionar los reactivos, drogas o medicamentos por su nombre genérico o químico o por marcas comerciales patentadas. Los métodos y procedimientos deben ser detallados y bibliográficamente referenciados. Deben precisarse con claridad, tiempos, temperaturas, etc. En caso de procedimientos con animales, se debe mencionar si los mismos fueron realizados de acuerdo a las normas de la autoridad competente (CHEA, etc.). Los métodos de los análisis estadísticos deben señalarse y citarse bibliográficamente. Debe estar escrito en tiempo pasado y en tercera persona del singular o plural según corresponda.



Canine Parvovirus: Current Status and Protection of Vaccines Against New Viral Variants Circulating in the Region

Puentes Palombo, R.¹

RESUMEN

Parvovirus canino (CPV) tipo 2 es uno de los principales agentes causantes de diarreas en cachorros en varias partes del mundo. En los últimos años ha habido un interés trascendente por esta enfermedad debido a que luego del descubrimiento de la misma, a fines de la década del 70, se han encontrado nuevas variantes del virus (CPV-2a, CPV-2b, CPV-2c). En Uruguay esta enfermedad es una de las principales virosis en cachorros y las principales variantes circulantes son los genotipos CPV-2a y CPV-2c. Se ha observado que los síntomas clínicos producidos por la infección con las nuevas variantes virales son levemente diferentes a los producidos por el genotipo original (CPV-2). La forma de controlar CPV es a través de la vacunación de los animales susceptibles. Actualmente, la protección que confieren las vacunas comerciales contra las nuevas variantes es discutida. Algunos autores afirman que las vacunas con CPV-2 protegen eficazmente la enfermedad producida por las nuevas variantes. Sin embargo, otros trabajos demuestran lo contrario. El objetivo de esta revisión es recopilar la bibliografía actual existente de modo de facilitar la interpretación de la situación de la Parvovirus canina en el Uruguay y la región.

Palabras clave: Parvovirus canino, CPV-2c, diagnóstico, Uruguay

SUMMARY

Canine Parvovirus (CPV) type 2 is one of the main causative agents of diarrhea in puppies in different parts of the world. In recent years there has been an important concern about this disease because after its discovery, in the late 70's, new virus variants (CPV-2a, CPV-2b, and CPV-2c) have been found. This disease is associated with a major viral pathogen in puppies; in Uruguay the main circulating variants are CPV-2a and CPV-2c. It has been observed that the clinical symptoms produced by infection with the new viral variants are slightly different from those produced by the original (CPV-2). The way to control CPV is through vaccination of susceptible animals. Currently, the ability of new vaccines to confer protection against new variants is discussed. Some authors assert that the CPV-2 vaccines effectively protect against the disease caused by new variants. Nevertheless, other studies demonstrate the contrary. The goal of this review is to gather existing current literature, in order to facilitate interpretation of the situation of canine parvovirus in Uruguay and the region.

Key words: canine parvovirus, CPV-2c, diagnosis, Uruguay.

EVOLUCIÓN VIRAL

Parvovirus canino (CPV) es un pequeño virus (26 nm de diámetro), desnudo, con una simple hebra de ADN de aproximadamente 5200 nucleótidos que está envuelta por una cápside icosaédrica conformada por dos proteínas, VP1 y VP2 (Strassheim y col., 1994). CPV emergió en el año 1978 y fue denominado CPV-2 para distinguirlo del Virus Diminuto Canino (MVC o CPV-1), responsable de muertes neonatales en cachorros (Carmichael, 1994). El origen de CPV-2 es todavía incierto, aunque la hipótesis es que derivó del virus de la Panleucopenia felina (FPV) o de los FPV-like provenientes de carnívoros salvajes (Fig. 1). CPV-2 pertenece a la familia *Parvoviridae*, la misma que se encuentra el FPV (Truyen, 1999). CPV-2 ha sufrido una rápida evolución a lo largo del tiempo y en pocos años han aparecido nuevas variantes virales, denominadas CPV-2a y CPV-2b. Estos nuevos virus han reemplazado completamente al original tipo 2 (CPV-2) a tal punto que no se detecta más este genotipo en la población canina, mientras que CPV-2a y

CPV-2b están distribuido por todo el mundo (Hoelzer y Parrish, 2010). Más recientemente, en la década del 2000, una nueva variante antigénica emergió en Europa denominándose CPV-2c (Buonavoglia y col., 2001). Este nuevo mutante tiene una sustitución aminoacídica, Asp-426'!Glu, que ocurre en un residuo de la proteína de la cápside viral (VP2), considerada muy importante del punto de vista antigénico. Esta variante (CPV-2/Glu426), primeramente observada en Italia, actualmente ha sido detectada en muchos países en el mundo (Hoelzer y Parrish, 2010). Estas nuevas variantes difieren del CPV-2 original en al menos cinco o seis aminoácidos en la proteína VP2 de la cápside viral. Estas mutaciones afectan residuos importantes de esta proteína incluyendo regiones altamente antigénicas (Martella y col., 2006). Por otro lado, las diferencias antigénicas observadas entre las variantes (CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c) son la consecuencia del cambio en solo un aminoácido (Asn en 2a, Asp en 2b y Glu en 2c) también en el residuo 426 de la VP2.

¹Área Inmunología, Departamento de Ciencias Microbiológicas, Facultad de Veterinaria, UdelaR, Uruguay. Lasplacas 1550, Montevideo CP 11600, Uruguay, Tel: 598-2-6281303, Fax: 598-2-6280130. Correo electrónico: rpuentes@adinet.com.uy

Recibido: 12/7/11 Aprobado: 30/1/12

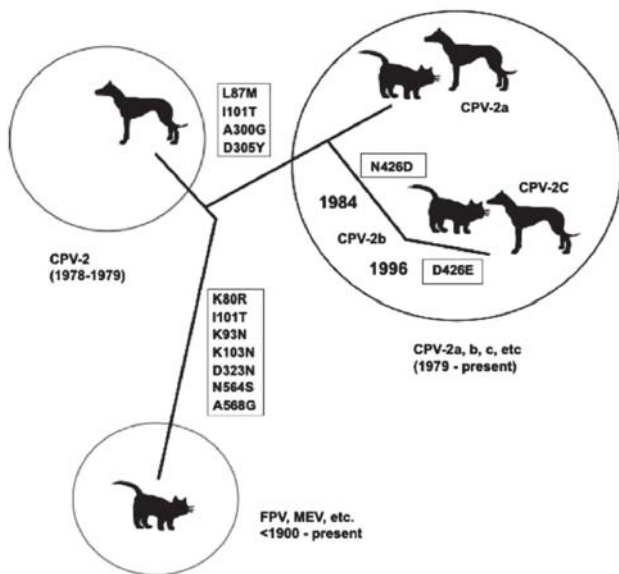


Figura 1. Evolución de Parvovirus canino (CPV). Relación genética, rangos de hospederos y año de aparición del virus de la Panleucopenia Felina (FPV), CPV y parvovirus relacionados. El virus original causante de la Parvovirus canina (CPV-2) se extinguió, y fue reemplazado por las nuevas variantes CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c. Extraído de Hoelzer y Parrish (2010).

VARIANTES CIRCULANTES DE CPV-2 EN EL URUGUAY LA REGIÓN

En cuanto a la distribución de las nuevas variantes a nivel mundial, CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c circulan con diferentes frecuencias en los países de acuerdo a la región geográfica analizada. En Uruguay la enfermedad está presente desde hace varias décadas. El diagnóstico está basado principalmente en la anamnesis y los síntomas clínicos. En un trabajo realizado con 30 muestras provenientes de distintos departamentos (Montevideo, Canelones, San José y Lavalleja) la principal variante viral detectada fue CPV-2c (Pérez y col., 2007). Por otro lado también se han realizado aislamientos y caracterización de CPV-2c en cultivos celulares a partir de animales enfermos (Puentes y col., 2011; Blanc y col., 2011). Recientemente Pérez y col (2011) encontraron una mayor proporción de CPV-2a en muestras provenientes de casos clínicos ocurridos en caninos en el año 2010. Por lo tanto hasta el momento las dos variantes que han sido detectadas con mayor frecuencia en casos clínicos en el Uruguay son CPV-2a y CPV-2c. En referencia a algunos países de la región, en Argentina Calderón y col (2011) encontraron la variante CPV-2c en mayor proporción de muestras positivas analizadas provenientes de distintas partes de ese país. Al analizar la secuencia completa de la VP2 de distintos aislamientos se pudo observar que, a nivel nucleotídico, muestras Argentinas de CPV-2c tienen un 99,3% a 99,9% de identidad con relación a cepas internacionales de CPV-2c, mientras que la identidad a

nivel de aminoácidos es de 99,7% a 100% (Calderón y col., 2012). Esto demuestra que existe un bajo grado de variabilidad en las secuencias analizadas de muestras provenientes de Argentina en relación a cepas internacionales. Sin embargo, los mismos autores encontraron sustituciones a nivel de aminoácidos relevantes en algunas muestras localizadas en regiones expuestas de la VP2 que pueden ser importantes. Por su parte en Brasil, se han detectado las variantes CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c en diferentes proporciones en casos clínicos de las ciudades de Rio de Janeiro y Porto Alegre en los últimos años (Streck y col., 2009, Castro y col., 2011).

PATOGENICIDAD Y CUADRO CLÍNICO ASOCIADO A LAS NUEVAS VARIANTES DE CPV-2

Varios trabajos han descrito los hallazgos clínicos y hematológicos en perros infectados naturalmente (Hirasawa y col., 1987) o experimentalmente (Macartney y col., 1984) con la cepa original CPV-2. Sin embargo son escasas y algo contradictorias las investigaciones que comparan la patogenicidad de las nuevas variantes virales en relación a CPV-2. CPV infecta los perros a través de la ruta oronasal y alcanza la mucosa intestinal luego de una diseminación inicial por tejidos linfoides. La viremia puede ser intensa y persistir por varias semanas, mismo que el virus haya desaparecido del contenido intestinal (Decaro y col., 2007). Los síntomas clásicos producidos por esta enfermedad mas allá de la variante viral presente, están relacionados en mayor o menor medida a cuadros de anorexia, letargia, vómitos y diarreas mucoides a hemorrágicas (Moon y col., 2008). Si comparamos la enfermedad producida por las nuevas variantes en relación al genotipo original, se ha visto que los genotipos CPV-2a y CPV-2b comúnmente causan una enfermedad más severa que CPV-2 (Decaro y col., 2005a). Se ha demostrado además que estas nuevas variantes, son eliminadas en mayor cantidad en materia fecal que el genotipo original (CPV-2) (Carmichael, 1994). Por otro lado, en relación a las diferencias en cuanto a la patogenicidad entre las nuevas variantes, mediante la técnica de *Real Time* PCR, se ha investigado la distribución de ADN viral en diferentes tejidos en perros infectados naturalmente con CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c. En todos los tejidos analizados², se pudo detectar el genoma viral de los tres genotipos, demostrándose una amplia distribución del virus en el organismo y con un comportamiento similar entre las variantes estudiadas. La mayor carga viral fue detectada en tejidos linfoides con máxima cantidad en tonsilas de perros infectados con CPV-2c y en bazo de perros infectados con CPV-2b. Alta cantidad de virus también fue detectado en médula ósea en perros infectados con CPV-2a. Por otro lado, en la vejiga fue donde se encontró la menor cantidad de ADN viral y, sorpresivamente, los autores encontraron ADN viral en tejido nervioso (cerebro, cerebelo y bulbo cerebral). Finalmente, en la materia fecal el número de copias de ADN fue menor que en los órganos internos (Decaro y col., 2007). Este trabajo si bien fue realizado con pocos animales, no encontraron diferencias importantes entre la infección con CPV-2a, 2b o 2c. En contrapartida, en perros infectados experimentalmente, Moon y col. (2008) sí encontraron que

²Se analizaron los siguientes tejidos: Cerebro, cerebelo, bulbo cerebral, tonsilas, nódulos retrofaringeos, timo, pulmón, miocardio, médula ósea, hígado, bazo, vejiga, nódulos mesentéricos, jejunio, colon, recto, materia fecal.

la variante CPV-2a es más patogénica que CPV-2b. En este sentido, también se ha visto que la variante CPV-2c produce síntomas algo diferentes de las causadas por las variantes CPV-2a/2b (por ejemplo diarrea mucoide en lugar de hemorrágica) (Decaro y col., 2005a). En lo que respecta a la patogenicidad de las nuevas variantes en infecciones de células *in vitro*, Puentes y col. (2011) encontraron que la variante CPV-2c produjo menos efecto citopático (CPE) en cultivos celulares de la línea CRFK que en cultivos primarios obtenidos a partir de corazón fetal canino (FCH). La cepa CPV-2 de referencia no mostró diferencias en cuando al CPE producido entre estos dos cultivos celulares. Todos estos trabajos, si bien representan información relevante para la comprensión de la patogenicidad de las nuevas variantes virales de CPV en perros, tienen la limitante del escaso número de animales estudiados y de que algunos de ellos han sido evaluados en infecciones experimentales o *in vitro*. Por lo tanto, aun no son suficientes las investigaciones existentes, para comprender con exactitud la patogenicidad de las nuevas variantes virales de Parvovirus canino, comparando con el genotipo original de la enfermedad (CPV-2). Sin embargo, parece ser que del punto de vista clínico actualmente existe una mayor patogenicidad y severidad de la enfermedad en los animales diagnosticados por veterinarios. Si bien esta apreciación clínica es importante no se tiene información suficiente sobre los posibles cuadros clínicos leves producidos por CPV-2c que no lleguen al consultorio y se recuperan sin atención veterinaria. Finalmente, existe una percepción clínica que solo los cachorros son susceptibles a la infección inducida por CPV-2. En este sentido, se han descrito brotes de esta enfermedad asociado a enteritis y mortalidad en perros adultos, pero la incidencia probablemente sea muy baja (Decaro y col., 2008).

ESTRATEGIAS ACTUALMENTE UTILIZADAS PARA EL DIAGNÓSTICO VIRAL

Si bien la anamnesis y los síntomas clínicos son fundamentales para realizar el diagnóstico, existen distintos patógenos que pueden causar cuadros similares en perros. Por lo tanto es conveniente la realización del diagnóstico definitivo utilizando una técnica de laboratorio. Varios métodos han sido desarrollados para el diagnóstico de CPV-2: aislamiento viral, Hemoaglutinación, SAT (*Slide agglutination test*), ELISA, SNAP (test comercial basado en el método del ELISA) e Inmunocromatografía, son métodos muy utilizados para el diagnóstico a partir de materia fecal de animales enfermos (Desario y col., 2005; Marulappa y Kapil, 2009; Schmitz y col., 2009; Puentes y col., 2010, 2011). Sin embargo, la sensibilidad de algunas de estas técnicas es relativamente baja (Esfandiari y Klingeborn, 2000; Desario y col., 2005; Schmitz y col., 2009). Schmitz y col. (2009), demostraron que los tests rápidos para el diagnóstico en material fecal (ej. SNAP test), tienen una alta especificidad pero pobre sensibilidad, al comparar con técnicas más sensibles. Actualmente otros métodos basados en la detección de ADN viral pueden ser utilizados para el diagnóstico virológico. Se ha demostrado que la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR), la *Real Time PCR* y la MGB (*Minor groove binder*), tienen alta sensibilidad para la detección de CPV-2 (Decaro y col., 2005b, 2005c). Con la *Real Time PCR* y la MGB, es posible además cuantificar el ADN viral presente en la material fecal

de perros infectados y es una técnica con alta especificidad, realizándose en un tiempo menor que la PCR convencional con gel de agarosa (Decaro y col., 2005b, 2005c). En un estudio realizado, de un total de 89 muestras analizadas de perros con diarrea, se encontró que la *Real Time PCR* fue capaz de diagnosticar el mayor número de animales positivos a CPV-2 (n=73), seguidas por PCR (n=68), aislamiento viral (n=54), Hemaglutinación (n=50) e inmunocromatografía (n=41) (Desario y col., 2005). Si bien estos resultados demuestran que la *Real Time PCR* es actualmente el mejor método para diagnosticar CPV-2, no es una técnica realizable a nivel de clínicas veterinarias, lo que dificulta su utilización de rutina por veterinarios. Actualmente una de las técnicas más utilizada para el diagnóstico rápido a nivel de clínicas veterinarias es la Inmunocromatografía. Es un método simple que puede ser realizado por veterinarios y por los propios dueños de las mascotas para confirmar la sospecha clínica de la enfermedad (Esfandiari y Klingeborn, 2000). Sin embargo se sabe que en estados tardíos de la infección los altos niveles de anticuerpos en el lumen intestinal pueden secuestrar la mayoría de los viriones, por lo que los test que se basan en la unión antígeno-anticuerpo (ej. Inmunocromatografía, hemoaglutinación y ELISA) pueden dar resultados falsos negativos (Desario y col., 2005). En este sentido, Puentes y col. (2010), encontraron baja concordancia en un estudio realizado donde se comparó el diagnóstico clínico realizado por veterinarios con el diagnóstico por las técnicas de Inmunocromatografía y Hemoaglutinación. Estos hallazgos advierten sobre las posibles diferencias que se pueden encontrar entre la clínica y estas técnicas actualmente disponibles, debiéndose ser cauteloso en la interpretación de resultados obtenidos para esta enfermedad.

RESPUESTA INMUNE PROTECTORA Y STATUS INMUNITARIO DE LA POBLACIÓN CANINA EN EL URUGUAY

La respuesta inmune protectora contra Parvovirus es predominantemente humoral, siendo los anticuerpos capaces de neutralizar la mayoría de las partículas virales. La importancia de los anticuerpos en la protección contra la infección ha sido demostrada por la efectividad de la inmunidad materna mediada por anticuerpos que confiere eficientemente protección contra Parvovirus en las primeras semanas de crecimiento del cachorro. Por lo que la enfermedad ocurre predominantemente en animales jóvenes luego que los anticuerpos maternos han disminuido (Pollock y Carmichael, 1982). La respuesta inmune humoral adquirida por los animales inmunizados naturalmente o por vacunación debería estimular preferentemente la producción de Inmunoglobulinas A (IgA) a nivel local. Se ha visto que existe una relación directa entre títulos de IgA entéricos y la recuperación de la enfermedad (Rice y col., 1982). Esto concuerda con observaciones de Bienenstock y Befus (1980), quienes describen una resistencia inmunológica a la infección con CPV a nivel de mucosas en ausencia inclusive de títulos séricos de anticuerpos. Finalmente, en relación a la protección cruzada *in vitro* conferida por los anticuerpos contra las distintas variantes virales, se ha encontrado diferencias significativas entre la respuesta contra virus homólogos y virus heterólogos (Cavalli y col., 2008). Por otro lado, en lo que respecta a la inmunidad

mediada por células, se ha visto que claramente juega un rol importante y tiene que ver fundamentalmente con la recuperación de la enfermedad (Hoelzer y Parrish, 2010).

En la práctica, en cuanto a los títulos de anticuerpos que protegen contra CPV, se ha descrito que títulos hemoaglutinantes iguales o mayores a 1/80 protegen contra la infección. Sin embargo algunos autores han observado que perros con títulos hemoaglutinantes de 1/160, y que fueron infectados experimentalmente con CPV-2b, tienen una replicación activa de virus luego del desafío. Estos resultados demuestran que la infección con CPV puede ocurrir incluso en presencia de títulos mayores o igual a 1/80, usualmente considerados protectores (Elia y col., 2005) y que quizás la hemoaglutinación no sea la técnica más adecuada para evaluar la respuesta humoral en perros infectados con el virus (Cavalli y col., 2008). No existen suficientes trabajos científicos en Uruguay que demuestren los niveles de anticuerpos y el riesgo de contraer infección de la población canina vacunada y/o no vacunada. En un estudio realizado recientemente con 142 sueros de animales adultos provenientes de la ciudad de Montevideo, y sin antecedentes de vacunación, se encontró que un 89,4% y un 91% de los animales fueron seropositivos a CPV-2 y CPV-2c respectivamente, con títulos hemoaglutinantes promedios de 1/930 y 1/1370 (Eliopulos y col., 2010). Por un lado, este trabajo demuestra el alto porcentaje de inmunización natural que ocurre con CPV en estos animales. Si bien ya no se detecta la variante CPV-2 en la naturaleza existen reacciones cruzadas entre esta y las nuevas variantes lo que explica el alto porcentaje encontrado en ese estudio. Por otro lado, si consideramos como títulos protectores por hemoaglutinación aquellos mayores o igual a 1/80, la población estudiada estaría, en promedio, ampliamente protegidos contra la enfermedad.

EFICACIA DE LAS VACUNAS EXISTENTES CONTRA LAS NUEVAS VARIANTES VIRALES

La respuesta inmune contra CPV generada por una vacuna puede estar influenciada por varios factores. Dentro de los que tiene que ver con la vacuna en sí, la viabilidad del virus y el título viral en la misma, el grado de atenuación del patógeno, las propiedades antigénicas de las cepas vacunales y la ruta de administración, son factores importantes (De Cramer y col., 2010). En el Uruguay, no se realizan controles de potencia en las vacunas comerciales que verifiquen la inmunogenicidad de las mismas y la capacidad de inducir una respuesta inmune protectora. Franco y Puentes (2011), evaluaron la capacidad infectante *in vitro* de las vacunas a virus atenuado que se comercializan en el Uruguay, encontrando que 8 de 10 vacunas analizadas tenían al menos el virus viable capaz de replicarse en cultivos celulares. Esto no quiere decir que las vacunas funcionen, pero significa que en un principio el virus se encuentra en condiciones de replicarse en células y potencialmente inducir una respuesta inmune. Por otro lado, factores inherentes al animal como ser el estado nutricional, sanitario y la presencia de los anticuerpos maternos, también pueden condicionar el desarrollo de una adecuada respuesta inmune. La edad para realizar la primera vacunación en cachorros contra CPV y la interferencia de los anticuerpos maternos ha sido discutida en numerosas publicaciones (Pollock y Carmichael, 1982; Iida y col., 1990; Pratelli y

col., 2000; Day, 2007). Lo cierto es que se ha demostrado que en ausencia de la inhibición de los anticuerpos maternos los cachorros son capaces de montar una respuesta inmune protectora a muy temprana edad (Day, 2007). Se ha visto que títulos de anticuerpos hemoaglutinantes maternos $\geq 1:20$, son capaces de interferir con la respuesta inmune luego de la administración de la vacuna en el cachorro pero no son capaces de prevenir la infección por cepas de campo. En contraste, títulos $\geq 1:64$ son considerados suficientes para proteger contra ambos (infección por la vacunación y enfermedad). Por lo tanto, estos títulos pueden interferir con la inmunización y dejar los cachorros susceptibles a la infección (Pollock y Carmichael, 1982). Se ha visto que esta «ventana de interferencia» está entre los 40 y 69 días de edad en los cachorros (Iida y col., 1990). Sin embargo, este período puede variar en caso que los animales se expongan a cepas virulentas de campo de CPV. Un estudio demostró que los títulos de anticuerpos maternos declinan más rápidamente si el cachorro es desafiado con el virus (Macartney y col., 1988). Por este motivo, es que se aconseja vacunar a los cachorros a los 30 días de edad, a fin de acortar esta ventana de susceptibilidad. Además, más recientemente, De Cramer y col. (2010), realizaron un experimento con 86 perros y demostraron que la mayoría de los animales (80%) con presencia de distintas concentraciones de anticuerpos maternos seroconvirtieron favorablemente cuando inmunizados a las 30 días de edad. Estos resultados son algo contradictorios a los desarrollados por Pollock y Carmichael (1982), comentado anteriormente. En lo que se refiere a la protección cruzada de las vacunas actuales contra las nuevas variantes de virus, existen controversias entre distintos trabajos científicos. Es importante recordar que el genotipo original de Parvovirus canino (CPV-2) ya no se detecta en infecciones naturales aunque es todavía utilizado en la gran mayoría de las vacunas comercializadas en Uruguay y gran parte del mundo. Experimentos realizados por Pratelli y col (2001), demostraron que cachorros inmunizados con vacunas con CPV-2 tuvieron títulos de anticuerpos neutralizantes significativamente más altos contra el virus homólogo (CPV-2) que contra el virus heterólogo (CPV-2b). Por otra parte, cachorros inmunizados con vacunas con CPV-2b tuvieron similares títulos de anticuerpos neutralizantes para ambos virus. Sin embargo a pesar de todo, según estos autores, el problema puede no ser tan crítico, teniendo en cuenta que los títulos de anticuerpos heterólogos, alcanzarían para proteger los cachorros inmunizados con vacunas CPV-2. Por otra parte, Ohshima y col. (2008) encontraron que anticuerpos producidos por perros inmunizados con vacunas con cepa CPV-2, no reaccionaron eficientemente con recientes aislamientos de CPV (CPV-2a/2b), cuando fueron comparados con los sueros de animales vacunados con las cepas homólogas. Lo que induciría a pensar de que la respuesta frente a virus heterólogos, no son adecuadas y pueden exponer los animales a la infección a las nuevas variantes. En este sentido, existen evidencias de animales enfermos que tenían historia de vacunación con cepas CPV-2, en los cuales se detectó la presencia de CPV-2c en materia fecal (Pérez y col., 2007; Puentes y col., 2011, Calderón y col., 2011). Contrario a estos resultados, algunos autores afirman que animales inmunizados experimentalmente con vacunas conteniendo la cepa CPV-2, están protegidos del desafío con cepas CPV-2b y CPV-2c (Spibey y col.,

2008; Siedek y col., 2011). Por lo tanto, como se puede observar, aún no son suficientes concordantes los experimentos, para decir a ciencia cierta, si realmente es necesaria la actualización de las cepas utilizadas en las vacunas contra CPV.

CONSIDERACIONES FINALES

Parvovirus canino es una de las principales virosis de los cachorros en varias partes del mundo, incluyendo Uruguay. La severidad del cuadro clínico, acompañado de la falta de tratamientos eficaces y del surgimiento de nuevas variantes virales, han llevado a que en la última década muchos grupos de investigación hayan profundizado los conocimientos sobre esta virosis. Ac-

tualmente la discusión principal a nivel veterinario, se centra en la efectividad de las vacunas disponibles, sobre la protección que las mismas confieren contra las nuevas variantes virales existentes. En el Uruguay, si bien no son suficientes las investigaciones que puedan responder a estos cuestionamientos, en los últimos años se han consolidado algunos grupos de investigación que han generado conocimientos que sin duda han producido un avance para el país en esta área. La cooperación de los colegas veterinarios aportando datos sobre la casuística y facilitando el estudio de los casos clínicos, será clave para avanzar los conocimientos sobre esta enfermedad en el Uruguay en un futuro.

Referencias Bibliográficas

- Bienenstock J, Befus AD. (1982). Mucosal immunology. *Immunology* 41:249-470.
- Blanc A, Negro C, Berois M, Reolon E, Arbiza J. (2011). Isolation and characterization of canine parvovirus type 2c circulating in Uruguay. *Ciência Rural* 41:1436-1440.
- Buonavoglia C, Martella V, Pratelli A, Tempesta M, Cavalli A, Buonavoglia D, Bozzo G, Elia G, Decaro N, Carmichael LE. (2001). Evidence for evolution of canine parvovirus type-2 in Italy. *J Gen Virol* 82:1555-1560.
- Calderón MG, Romanutti C, D'Antuono A, Keller L, Mattion N, La Torre J. (2011). Evolution of canine parvovirus in Argentina between years 2003 and 2010: CPV2c has become the predominant variant affecting the domestic dog population. *Virus Res* 157:106-110.
- Calderón MG, Wilda M, Boado L, Keller L, Malirat V, Iglesias M, Mattion N, La Torre J. (2012). Study of canine parvovirus evolution: comparative analysis of full-length VP2 gene sequences from Argentina and international field strains. *Virus Genes* 44:32-39.
- Carmichael LE. (1994). Canine parvovirus type-2. An evolving pathogen of dogs. *Ann Med Vet* 138:459-464.
- Castro TX, Costa EM, Leite JP, Labarthe NV, Cubel Garcia RC. (2011). Monitoring of canine parvovirus (CPV) strains detected in vaccinated puppies in Brazil. *Res Vet Sci* 90:336-340.
- Cavalli A, Martella V, Desario C, Camero M, Bellacicco A, De Palo P, Decaro N, Elia G, Buonavoglia C. (2008). Evaluation of the Antigenic Relationships among Canine Parvovirus Type 2 Variants. *Clin Vaccine Immunol* 15:534-539.
- Day MJ. (2007). Immune system development in the dog and cat. *J Comp Pathol* 137:10-15.
- De Cramer KG, Stylianides E, van Vuuren M. (2011). Efficacy of vaccination at 4 and 6 weeks in the control of canine parvovirus. *Vet Microbiol* 149:126-132.
- Decaro N, Desario C, Addie DD, Martella V, Vieira MJ, Elia G, Zicola A, Davis C, Thompson G, Thiry E, Truyen U, Buonavoglia C. (2007). The study molecular epidemiology of canine parvovirus, Europe. *Emerg Infect Dis* 13:1222-1224.
- Decaro N, Desario C, Campolo M, Elia G, Martella V, Ricci, D, Lorusso E, Buonavoglia C. (2005a). Clinical and virological findings in pups naturally infected by canine parvovirus type 2 Glu-426 mutant. *J Vet Diagn Invest* 17:133-138.
- Decaro N, Desario C, Elia G, Martella V, Mari V, Lavazza A, Nardi M, Buonavoglia C. (2008). Evidence for immunisation failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c. *New Microbiol* 31:125-130.
- Decaro N, Elia G, Campolo M, Desario C, Lucente MS, Bellacicco AL, Buonavoglia C. (2005c). New approaches for the molecular characterization of canine parvovirus type 2 strains. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 52:316-319.
- Decaro N, Elia G, Martella V, Desario C, Campolo M, Di Trani L, Tarsitano E, Tempesta M, Buonavoglia C. (2005b). A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 DNA in the feces of dogs. *Vet Microbiol* 105:19-28.
- Decaro N, Martella V, Elia G, Desario C, Campolo M, Lorusso E, Colaianni M, Lorusso A, Buonavoglia C. (2007). Tissue distribution of the antigenic variants of canine parvovirus type 2 in dogs. *Vet Microbiol* 121:39-44.
- Desario C, Decaro N, Campolo M, Cavalli A, Cirone F, Elia G, Martella V, Lorusso E, Camero M, Buonavoglia C. (2005). Canine parvovirus infection: Which diagnostic test for virus? *J Virological Methods* 126:179-185.
- Elia G, Cavalli A, Cirone F, Lorusso E, Camero M, Buonavoglia D, Tempesta M. (2005). Antibody levels and protection to canine parvovirus type 2. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 52:320-322.
- Eliopoulos N, Finger P, Nunes C, Castro C, Moreno J, Hubner S, Puentes R. (2010). Immune Response to canine Parvovirus (CPV): Comparison of antibodies to CPV-2 and CPV-2c in unvaccinated dogs. XXI Encontro Nacional de Virologia, V Encontro de Virologia do Mercosul. Gramado, RS, Brasil.
- Esfandiari J, Klingeborn B. (2000). A comparative study of a new rapid and one-step test for the detection of parvovirus in faeces from dogs, cats and mink. *J Vet Med B* 47:145-153.

- Franco G, Puentes R. (2011). Detección y aislamiento de Parvovirus canino a partir de vacunas comerciales. 7mas Jornadas Técnicas de la Facultad de Veterinaria. Montevideo – Uruguay.
- Hirasawa T, Iwaki S, Watanabe K, Mikazuki K, Makino S, Hayashi Y. (1987). Outbreak of canine parvovirus infection and its elimination in a closed beagle dog colony. *Zentralbl Veterinarmed B*. 34:598–606.
- Hoelzer K, Parrish C. (2010). The emergence of parvoviruses of carnivores. *Vet Res* 41:39. Epub 2010 Feb 15.
- Iida H, Fukuda S, Kawashima N, Yamazaki T, Aoki J, Tokita K, Morioka K, Takarada N, Soeda T. (1990). Effect of maternally derived antibody levels on antibody responses to canine parvovirus, canine distemper virus and infectious canine hepatitis virus after vaccinations in beagle puppies. *Jikken Dobutsu* 39:9-19.
- Macartney L, McCandlish IA, Thompson H, Corwell HJ. (1984). Canine parvovirus enteritis 1: clinical, hematological and pathological features of experimental infection. *Vet Rec* 115:201-210.
- Macartney L, Thompson H, McCandlish IA, Cornwell HJ. (1988). Canine parvovirus: interaction between passive immunity and virulent challenge. *Vet Rec* 122:573-576.
- Martella V, Decaro N, Buonavoglia C. (2006). Evolution of CPV-2 and implicance for antigenic/genetic characterization. *Virus Genes* 33:11-13.
- Marulappa S, Kapil S. (2009). Simple Tests for Rapid Detection of Canine Parvovirus Antigen and Canine Parvovirus-Specific Antibodies. *Clin Vaccine Immunol* 16:127–131.
- Moon HS, Lee SA, Lee SG, Choi R, Jeoung SY, Kim D, Hyun C. (2008). Comparison of the pathogenicity in three different Korean canine parvovirus 2 (CPV-2) isolates. *Vet Microbiol* 131:47-56.
- Ohshima T, Hisaka M, Kawakami K, Kishi M, Tohya Y, Mochizuki M. (2008). Chronological analysis of canine parvovirus type 2 isolates in Japan. *J Vet Med Sci* 70:769-775.
- Pérez R, Bianchi P, Calleros L, Francia L, Hernández M, Maya L, Panzera Y, Sosa K, Zoller S. (2011). Recent spreading of a divergent canine parvovirus type 2a (CPV-2a) strain in a CPV-2c homogenous population. *Vet Microbiol*. [Epub ahead of print]
- Pérez R, Francia L, Romero V, Maya L, López I, Hernández M. (2007). First detection of canine parvovirus type 2c in South America. *Vet Microbiol* 124:147–152.
- Pollock RV, Carmichael LE. (1982). Maternally derived immunity to canine parvovirus infection: transfer, decline, and interference with vaccination. *JAVMA* 180:37-42.
- Pratelli A, Cavalli A, Martella V, Tempesta M, Decaro N, Carmichael L, Buonavoglia C. (2001). Canine parvovirus (CPV) vaccination: comparison of neutralizing antibody response in pups after inoculation with CPV2 or CPV2b modified live virus vaccine. *Clin Diag Lab Immunol* 8: 612-615.
- Pratelli A, Cavalli A, Normanno G, De Palma MG, Pastorelli G, Martella V, Buonavoglia C. (2000). Immunization of pups with maternally derived antibodies to canine parvovirus (CPV) using a modified live variant (CPV-2b). *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 47: 273-276.
- Puentes R, Eliopulos N, Finger P, Castro C, Nunes C, Furtado A, Franco G, Hubner S. (2010). Detección viral en cachorros con diagnóstico presuntivo de Parvovirus canino (CPV). *Veterinaria (Montevideo)* 46:47-49.
- Puentes R, Eliopulos N, Pérez R, Franco G, Sosa K, Bianchi P, Furtado A, Hubner S, Esteves P. (2011). Isolation and characterization of canine parvovirus type 2c (CPV-2c) from symptomatic puppies. *Braz J of Microbiol* (in press).
- Rice JB, Winters KA, Krakowka S, Olsen RG. (1982). Comparison of systemic and local immunity in dogs with canine parvovirus gastroenteritis. *Infect Immun* 38: 1003-1009.
- Schmitz S, Coenen C, König M, Thiel H, Neiger R. (2009). Comparison of three rapid commercial Canine parvovirus antigen detection tests with electron microscopy and polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 21: 344–345.
- Siedek EM, Schmidt H, Sture GH, Raue R. (2011). Vaccination with canine parvovirus type 2 (CPV-2) protects against challenge with virulent CPV-2b and CPV-2c. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 124:58-64.
- Spibey N, Greenwood NM, Sutton D, Chalmers WS, Tarpey I. (2008). Canine parvovirus type 2 vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus. *Vet Microbiol* 128:48-55.
- Strassheim ML, Gruenberg A, Veijalainen P, Sgro JY, Parrish CR. (1994). Two dominant neutralizing antigenic determinants of canine parvovirus are found on the threefold spike of the virus capsid. *Virology* 198: 175-184.
- Streck A, Souza C, Goncalves K, Zang L, Pinto L, Canal C. (2009). First detection of Canine parvovirus Type 2C in Brazil. *Braz J Microbiol* 40:465-469.
- Truyen U. (1999). Emergence and recent evolution of canine parvovirus. *Vet Microbiol* 69:47–50.

Análisis del descenso de anticuerpos en el periparto y su impacto en el diagnóstico serológico de la Leucosis Enzoótica Bovina

Antibody Decrease During the Peripartum Period: its Impact on Enzootic Bovine Leukosis Diagnosis



Rama, G.^{1,2}, Pritsch, O.^{2,3}, Adrien, M.L.^{1,4}, Moratorio, G.^{2,5}, Meikle, A.¹

RESUMEN

En el presente trabajo se analizó la presencia de anticuerpos específicos anti-VLB durante el período de periparto en vacas Holando en producción. Para ello se realizó el diagnóstico serológico de LEB a un grupo de vacas preñadas mediante un ELISA comercial. A partir de los resultados obtenidos se seleccionaron tres grupos de cinco vacas cada uno caracterizados como negativo, positivo leve y positivo fuerte. Los animales se sangraron cada 20 días desde el día -50 al +50 (0=parto). Las muestras fueron procesadas por ELISA y las densidades ópticas se analizaron por ANOVA de medidas repetidas en el tiempo. El grupo positivo fuerte permaneció con diagnóstico positivo en todas las observaciones del ensayo. El grupo negativo también permaneció negativo. Sin embargo, en el grupo de positivos leves las densidades ópticas del ELISA descendieron entre 40% y 60% de los niveles iniciales y todos los animales pasaron de un diagnóstico positivo en el preparto a negativo alrededor del parto. Se demostró la existencia de un descenso en los anticuerpos específicos anti-VLB alrededor del parto, que en el grupo de positivos leves implicó falsos negativos desde el día -20 al +60, indicando que debe evitarse tomar muestras para diagnóstico serológico de LEB en este período.

Palabras clave: Leucosis Enzoótica Bovina, diagnóstico, ELISA, anticuerpo, periparto

SUMMARY

The goal of this work was to characterize the evolution of specific anti-BLV antibody titers during the peripartum period in dairy Holstein cows. The experimental design involved 3 groups of 5 cows each characterized as negative, slight positive and strong positive. All animals were bled every 20 days, from -50 to +50 days (0 = calving), and serum samples were analyzed by a commercial ELISA test. The strong positive group remained with a positive diagnosis along all test observations, as the negative group remained as negative. However, in the slight positive group the ELISA optical densities decreased between 40% and 60% of the initial levels and all the animals that were initially positive became negative in the peripartum period. Overall these results show that in the peripartum the physiological decrease in specific anti-BLV antibodies in the slight positive group may produce false negative results from day -20 to +60, indicating that sample extraction should be avoided for serologic diagnosis of EBL during this period.

Key words: Enzootic Bovine Leukosis, diagnosis, ELISA, antibody, peripartum

INTRODUCCIÓN

La Leucosis Enzoótica Bovina (LEB) es una enfermedad infecciosa de carácter crónico producida por un retrovirus denominado Virus de la Leucosis Bovina (VLB). Este virus es un miembro oncogénico del género Deltaretrovirus de la familia Retroviridae, infecta preferencialmente a los linfocitos B y causa una transformación maligna que puede concluir en una leucemia crónica o linfosarcoma (Ferrer, 1980). La mayoría de los animales infectados (60%) no presentan signos de infección y se vuelven portadores asintomáticos del virus de por vida. Aproximadamente un tercio de los bovinos infectados desarrolla una linfocitosis persistente caracterizada por una expansión policlonal no maligna de los linfocitos B y sólo entre 5% a 10% de los animales infectados desarrolla linfoma o linfosarcoma maligno (Kettmann y col., 1994; Burny y col., 1988; Llamas y col., 2001).

La LEB tiene un impacto significativo desde el punto de vista sanitario y económico, la alteración del sistema inmune provo-

cado por la infección viral puede aumentar la incidencia de otras patologías afectando a la producción de leche y originando pérdidas directas por mortandad (Trainin y col., 2005). En ausencia de vacunas efectivas, numerosos países han implementado campañas de control y/o erradicación de esta enfermedad. Por ejemplo, la Unión Europea luego de muchos años ha logrado que 12 de los 15 países originales del bloque se encuentren actualmente libres de LEB (Rodríguez y col., 2011). Asimismo, puede detectarse el ADN proviral integrado en el genoma de linfocitos infectados con VLB en productos cárnicos y lácteos presentes en el mercado (Felmer y col., 2006), por lo que la exigencia libre de Leucosis para la exportación de ganado en pie establecida por algunos mercados podría potencialmente extenderse a estos productos.

La detección de anticuerpos (Ac) específicos contra las proteínas virales gp51 y p24 en suero bovino, mediante inmunodifusión en gel agar (IDGA) y más recientemente por ensayo por

¹Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Lasplacas 1550, Montevideo, Uruguay, tel.:6223106
Correo electrónico: ramosum@pasteur.edu.uy.

²Unidad Biofísica de Proteínas, Instituto Pasteur de Montevideo, Uruguay.

³Departamento Inmunobiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

⁴Departamento de Salud en los Sistemas Pecuarios, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Paysandú, Uruguay.

⁵Laboratorio de Virología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Recibido: 18/11/11 Aprobado: 31/1/12

inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA), constituyen los procedimientos de rutina más utilizados para la identificación de animales infectados asintomáticos (Martin y col., 2000; Tro- noy col., 2001; Rola y Kuzmak, 2002; Gutierrez y col., 2009). Recientemente hemos demostrado que el IDGA detecta 72 % de los positivos detectados por ELISA (Rama y col., 2010). En tanto, existen metodologías más sensibles como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), aunque implican mayor equipamiento y son más laboriosas (Fechner y col., 1996; Martín y col., 2000; Trono y col., 2001; Felmer y col., 2006; Camargos y col., 2007; Rama y col. 2010).

Generalmente, los métodos diagnósticos serológicos comerciales utilizan una única dilución de suero y frecuentemente no contemplan, al momento de extraer la muestra, las variaciones de la concentración total de Ac circulantes relacionada con el estado fisiológico o reproductivo del animal. En el modelo bovino, se conoce desde hace más de 50 años que los niveles de varias globulinas séricas disminuyen en sangre durante el parto (Larson y Kendall, 1957). En particular, durante la calostrogénesis existe un descenso en la concentración de inmunoglobulinas (Ig) totales (principalmente IgG) en la sangre circulante materna, ya que la mayoría de las inmunoglobulinas presentes en el calostro no son sintetizadas en la glándula mamaria sino que provienen directamente de la sangre materna (Larson, 1958). Este descenso de la concentración de Ac totales podría aumentar la presencia de falsos negativos en el periparto (Ferrer, 1979, Burridge y col., 1982; Hübner y col., 1996, Erverman y Jackson, 1997).

Por otro lado, los Ac maternos presentes en el calostro atraviesan el epitelio intestinal del ternero pasando directamente a su circulación sanguínea, por lo que el diagnóstico dentro de los primeros 6 meses de edad puede aumentar la detección de falsos positivos y sobreestimar la transmisión viral por vía vertical (Thurmond y col., 1982; Johnson y col., 1987, Lazausset y col., 1990).

La investigación respecto de la dinámica de los títulos de Ac contra VLB en el periparto es escasa. Se ha reportado la detección de un mayor porcentaje de falsos negativos utilizando IDGA como método de diagnóstico en vacas que se encuentran cercanas al parto (Burridge y col., 1982; Hübner y col., 1996, Tekes 1994), por lo que se ha propuesto que para el diagnóstico de la infección por VLB se utilicen métodos serológicos en un período comprendido entre 2 semanas antes y un mes después del parto. Tekes (1994) reportó que esto no ocurre cuando el ELISA es utilizado como método de diagnóstico.

La hipótesis de trabajo plantea que en el periparto el descenso de la concentración total de Ac en la sangre materna podría llevar al diagnóstico de falsos negativos en animales infectados, aún utilizando un *kit* de diagnóstico de ELISA comercial (VMRD) aprobado por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) y que es utilizado en nuestro país. Para testear la hipótesis, nos proponemos como objetivo analizar la concentración de Ac específicos anti-VLB en función del tiempo durante el período de parto en vacas Holando en producción con diagnósticos positivos y negativos realizados en el parto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

Se realizó un primer diagnóstico serológico de LEB a un grupo de 60 vacas de raza Holando pertenecientes a un tambo del departamento de Paysandú mediante el uso de un *kit* de ELISA comercial diseñado para detectar Ac específicos anti-VLB. De acuerdo a lo recomendado por el fabricante del *kit*, el punto de corte entre resultados negativos y positivos se determinó para cada placa mediante el análisis por triplicado de la densidad óptica (D.O.) de un control positivo diluido y estandarizado para tal fin.

De este grupo se seleccionaron cinco vacas serológicamente negativas (con valores de D.O. por debajo del punto de corte), cinco vacas positivas fuertes (con valores de D.O. mayores al doble del punto de corte) y cinco vacas positivas leves (con valores de D.O. menores al doble del punto de corte). Por otro lado, estas 15 vacas también fueron seleccionadas según fecha de parto prevista (otoño 2009).

A este grupo de 15 vacas se les extrajo sangre mediante venopunción coccígea en tubos BD Vacutainer® (Becton Dickinson, NJ, USA) cada 20 días, se abarcó un rango desde el día 50 previo al parto hasta el día 50 posterior al parto. Las muestras de sangre se almacenaron a 4 °C y se centrifugaron durante 10 min a 2000 rpm antes de las 48 h de la colecta. El suero se almacenó a -20 °C hasta su procesamiento. El total de las muestras (n=90) correspondientes a los 15 animales se analizaron en una misma placa de ELISA perteneciente a un *kit* comercial para Ac contra VLB para suero bovino.

Para estudiar el efecto en la D.O. en función de la variación de la concentración de Ac específicos contra VLB se realizaron dos diluciones seriadas (relación 1:2) de un suero positivo fuerte (con alta D.O.) a partir de la dilución 1/25 hasta 1/1600.

ELISA.

Se utilizó un *kit* comercial para la detección de Ac contra VLB para suero bovino con 98% de sensibilidad y 100% de especificidad (Laboratorio VMRD, cod. 5505.20, WA, USA), aprobado por el USDA. Las muestras se procesaron de acuerdo a las indicaciones del fabricante, utilizando 50 µl de suero diluido a 1/25. La lectura se realizó en un espectrofotómetro de rango visible a 620 nm (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Se utilizaron los tres controles positivos del *kit* comercial por placa, que poseen una baja concentración de Ac contra el virus estableciéndose la línea de corte para cada placa a partir del promedio de sus D.O.

Análisis estadístico

Los datos de D.O. se procesaron con un análisis de medidas repetidas en el tiempo (procedimiento mixto, software SAS, SAS Institute Inc. 2000, Cary, NC, USA). El período se incluyó como variable categórica y se definieron períodos respecto al parto con una duración aproximada de 20 días: período -40 (día -50 al -31), período -20 (día -30 al -18), período -10 (día -17 al 0), período 10 (día 1 al 20), período 30 (día 21 al 40) y período 50 (día 41 al 70). El modelo estadístico incluyó como efectos

fijos el período, la categoría (positivos fuertes, positivos leves y negativos) y sus interacciones. Se consideró $P < 0.05$ como significativo y valores entre $P > 0.05$ y $P < 0.10$ como tendencia.

RESULTADOS

En la Figura 1 se observan los valores de absorbancia de los cinco animales de cada grupo normalizados mediante el cociente de la D.O. con el valor establecido como línea de corte para esa placa de ELISA.

Por otro lado, se determinó por ELISA la variación de la D.O. en función de la concentración de Ac específicos anti-VLB a partir de dos diluciones seriadas de un suero positivo fuerte. En la Figura 2 se representa la curva de titulación obtenida en la cual la D.O. disminuye de forma logarítmica en relación a la dilución del suero.

Se analizaron por ELISA los sueros provenientes de los tres grupos de animales obtenidos en diferentes tiempos, antes y después del parto (Figura 3). La categoría y el período afectaron la D.O ($P < 0.001$ ambos). Para los animales positivos fuertes los valores de D.O. disminuyeron del día -40 y -20 al día -10, previos al parto ($P < 0.01$, Figura 3A); la D.O. aumentó del día -10 al 30 y 50 posparto ($P < 0.05$). Para los animales positivos leves se detecta una disminución de la D.O desde el día -40 que no es recuperada en todo en ensayo. Se observó una tendencia a disminuir entre el día -20 al -10 ($P = 0.10$) y una tendencia al aumento del día -10 al 50 posparto, aunque no a niveles comparables al día -40 (Figura 3B). La D.O. de los animales negativos disminuyó del día -40 al -10 ($P < 0.05$), no existiendo

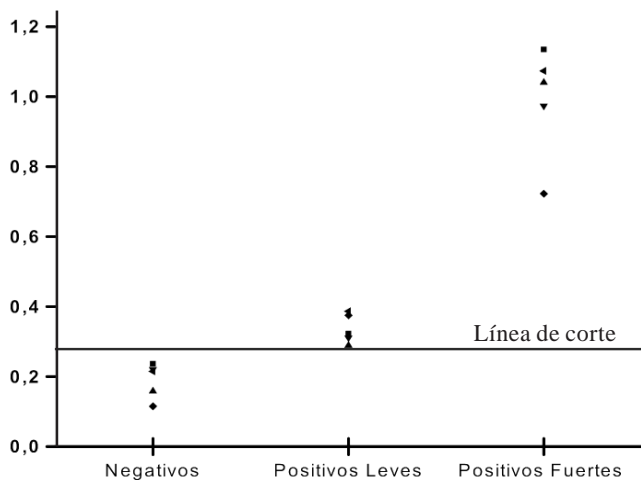


Figura 1. Caracterización serológica por ELISA de cada uno de los grupos de animales: Negativos, Positivos Leves, Positivos Fuertes. En el eje de la izquierda se expresan los valores de absorbancia obtenidos por medida espectrofotométrica de las placas de ELISA, y en el eje de la derecha como Unidades Arbitrarias que corresponden al cociente de la absorbancia para cada una de las muestras, dividida la absorbancia de los controles positivos utilizados por el kit para determinar el punto de corte que discrimina entre positivos y negativos.

mas diferencias entre los demás días. En el Cuadro 1 se muestran los resultados de D.O. normalizados de cada animal perteneciente a los tres grupos en los distintos períodos relativos al parto.

En la Figura 4 se muestran los resultados individuales para cada uno de los cinco animales que integraban el grupo de positivos leves. La D.O. de los mismos disminuyó a medida que se acercaba el momento del parto. Es importante destacar que en este descenso del título de Ac específicos para VLB cercano al parto, los animales positivos leves presentaron valores por debajo

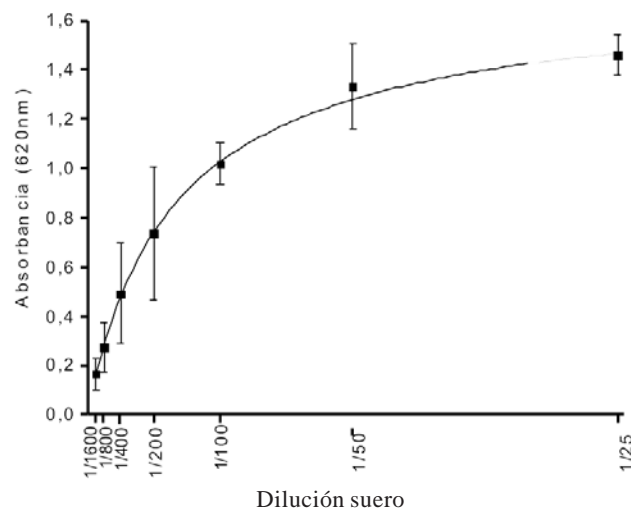


Figura 2. Valores de absorbancia promedio en función de dos curvas de dilución seriada de un mismo suero positivo a VLB (el valor 0,04 corresponde a una dilución del suero 1/25, las diluciones consecutivas se hacen en una relación 1:2.; rango de dilución 1/25 – 1/1600).

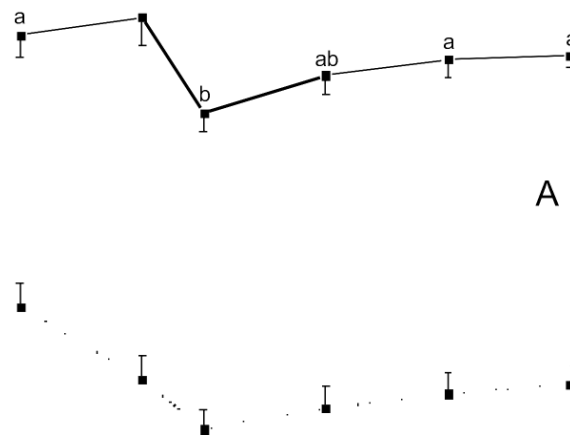


Figura 3. Estudio seriado en el tiempo de la respuesta de anticuerpos anti-VLB para el promedio del período del grupo positivo fuerte (A) y positivo leve (B). (a vs b vs c $P < 0.05$, x vs y $P < 0.1$) En ordenadas UA, Unidades Arbitrarias de absorbancia (\pm SEM) y en abscisas Días, siendo 0 el día del parto.

Cuadro 1. Densidades ópticas normalizadas al control positivo del *kit* VMRD para el diagnóstico de la Leucosis Enzootica Bovina durante el parto, para todos los animales del ensayo (negativos, positivos leves y positivos). Los períodos se definieron con una duración aproximada de 20 días: período -40 (día -50 al -31), período -20 (día -30 al -18), período -10 (día -17 al 0), período 10 (día 1 al 20), período 30 (día 21 al 40) y período 50 (día 41 al 70).

Grupo	Identificación	Períodos respecto al parto					
		-40	-20	-10	10	30	50
Negativos	543	0,789	0,416	0,488	0,605	0,628	0,580
Negativos	319	0,564	0,443	0,435	0,445	0,492	0,424
Negativos	324	0,768	0,713	0,778	0,375	0,451	0,571
Negativos	526	0,411	0,712	0,490	0,563	0,486	0,643
Negativos	353	0,844	0,457	0,683	0,587	0,834	0,407
Positivos Leves	139	1,381	1,100	0,846	0,912	0,990	1,152
Positivos Leves	259	1,152	0,568	0,624	0,640	0,765	0,731
Positivos Leves	264	1,032	0,661	0,662	0,761	0,852	0,731
Positivos Leves	350	1,111	0,584	0,454	0,706	0,744	0,881
Positivos Leves	223	1,339	0,857	0,681	0,818	0,815	0,821
Positivos	221	2,580	2,844	3,241	3,466	3,420	3,407
Positivos	328	3,477	3,881	3,819	3,898	3,676	4,015
Positivos	416	3,833	3,941	3,771	3,927	4,063	4,036
Positivos	505	4,052	4,006	3,410	3,879	3,460	4,156
Positivos	529	3,717	3,792	3,327	4,047	3,775	3,645

del punto de corte fijado para este ensayo. Por lo tanto, pasaron de un diagnóstico serológico positivo a un resultado negativo. La caída de la D.O. alrededor del parto varió entre un rango de disminución del 40 al 60 %. Solo uno (# 139) de los cinco animales positivos leves presentó D.O. comparables a un diagnóstico positivo al mes posparto, el resto mantuvo D.O. negativas hasta aprox. los 50 días posparto (Figura 4).

DISCUSIÓN

Este es el primer reporte que demuestra que en el período alrededor del parto los títulos de Ac específicos anti-VLB determinados por el *kit* ELISA VMRD(utilizado en nuestro país), se modifican en forma importante. Los animales con altos títulos de Ac anti-VLB mostraron una tendencia a disminuir sus títulos en el parto pero continuaron siendo positivos. Sin embargo, aquellos animales que fueron diagnosticados por ELISA como positivos leves, presentando títulos bajos de Ac específicos anti-VLB, resultaron seronegativos por ELISA en el período del parto. Estos resultados concuerdan con lo que se observa en la curva de titulación en donde la misma variación en la concentración de Ac específicos anti-VLB en un animal positivo fuerte y uno leve no significa el mismo valor en términos de D.O. Los animales positivos fuertes presentan concentraciones de Ac (D.O. cercanos a uno) que se encuentran sobre o próximas a los valores de saturación del sistema. En los animales positivos leves, la disminución en la concentración de Ac debido al parto, representó un mayor descenso del valor de D.O. que los

positivos fuertes, y en estos ejemplos alcanzó valores por debajo de la línea de corte establecida por el *kit*.

La producción eficiente de leche requiere que la vaca lechera pase por una gestación y un parto cada año. La transición desde el estado de preñez sin lactancia al estado de no-preñez con lactancia involucra un cambio dramático para la vaca (Goff y Horst, 1997). Usualmente las vacas se secan al séptimomes de gestación, lo cual genera una involución de la glándula mamaria donde el epitelio secretorio mamario sufre apoptosis y la glándula es remodelada y renovada preparándose para un nuevo ciclo de lactancia (Strange y col., 1995).

La actividad del sistema inmune de la vaca está fuertemente deprimida alrededor del parto. Se ha descrito la existencia de una leucopenia transitoria después del parto causado por un importante pasaje de neutrófilos hacia el tracto reproductivo. Estos neutrófilos presentan una capacidad fagocítica anti-bacteriana aumentada pero una actividad bactericida (estallido respiratorio) disminuída (Kehrli y col., 1989a; Detilleux y col., 1995). La capacidad de los linfocitos para responder a mitógenos y la producción de Ac se ve también afectada alrededor del parto (Kehrli y col., 1989b). Aún desconocemos el mecanismo fino que determina la depresión del sistema inmunológico en el parto pero se acepta que factores endócrinos y nutricionales estarían fuertemente involucrados (Goff y Horst, 1997; Vangroenweghe y col., 2005; Lamote y col., 2006). Por otro lado, también ha sido demostrado que el tratamiento con corticoides y prolactina en combinación con insulina estimula la expresión

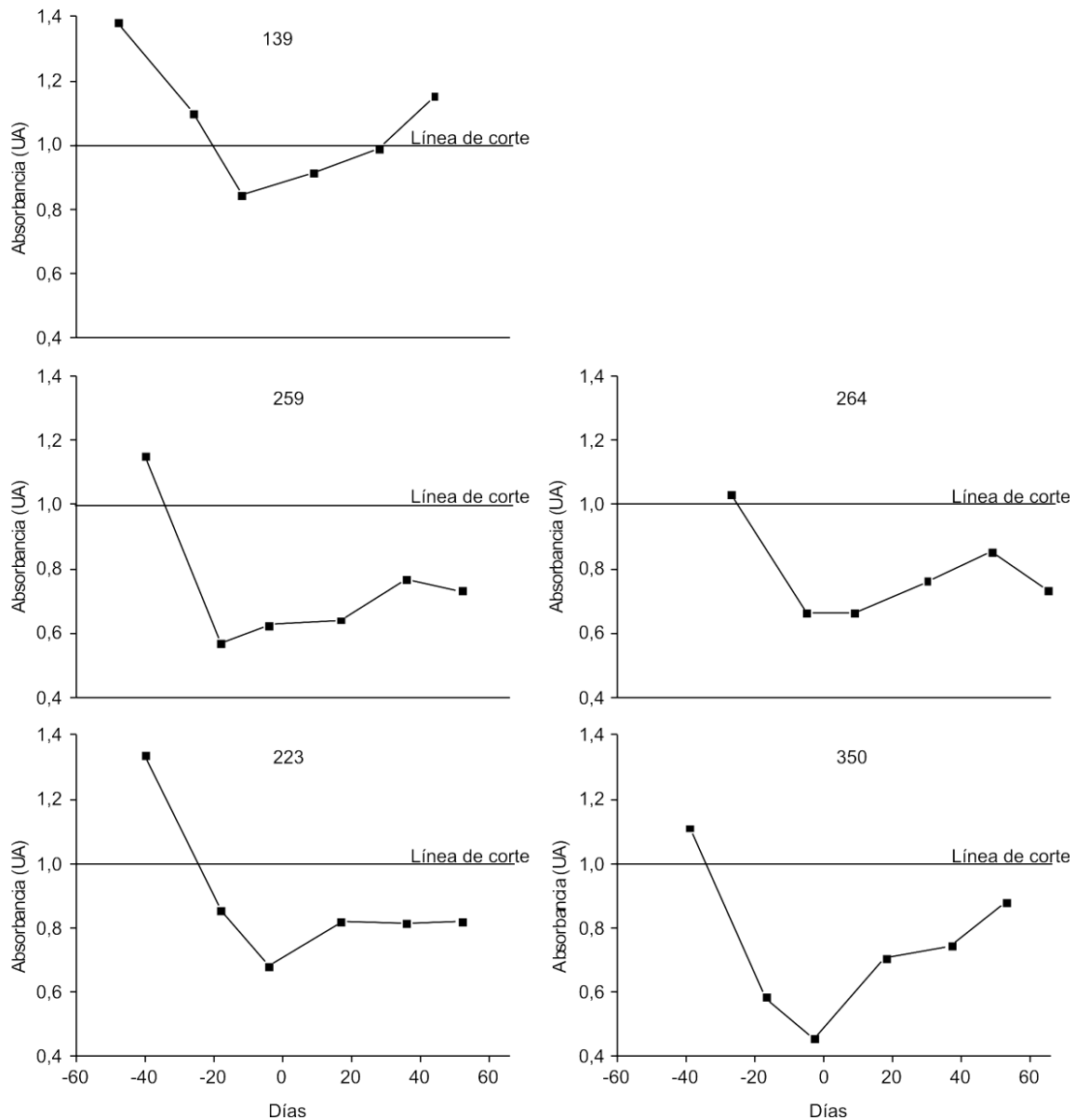


Figura 4. Estudio seriado en el tiempo de la respuesta de anticuerpos anti-VLB para cada uno de los animales caracterizados como positivos leves: 139, 259, 264, 223 y 350. En ordenadas UA, Unidades Arbitrarias de absorbancia y en abscisas Días, siendo 0 el día del parto.

de VLB en ensayos con líneas celulares en cultivo (Niermann y Buehring, 1997) y ambas hormonas aumentan alrededor del parto.

Asimismo, también ha sido demostrado que los niveles de IgG e IgM totales en el suero caen alrededor del parto y que la concentración presente en el calostro, es equivalente a la concentración que desaparece de la sangre circulante en el momento de la calostrogénesis (Dixon, y col., 1961; Larson, 1958). En un trabajo reciente Herr y col (2011) han reportado una disminución dramática de los niveles séricos totales de IgG e IgM en el período entre la semana 8 previa al parto y la cuarta semana post-

parto. El nivel de IgG se recuperó en la cuarta semana posterior al parto y el grado de reducción de la IgG sérica total se correlacionó significativamente con secreción de IgG en el calostro. Por otra parte, una correlación directa entre los niveles de IgG y el recuento de linfocitos también fue detectada. Esto podría explicar también la alta incidencia de enfermedades infecciosas durante este período (Herr y col., 2011). La disminución de los títulos de Ac específicos anti-VLB se podría explicar entonces por el pasaje de los mismos desde la sangre hacia el calostro, y/o por el estado de inmunosupresión generado en la vaca en el período del periparto.

En un trabajo reciente, Gutiérrez y col. (2011) analizan la progresión de la infección por VLB desde el nacimiento hasta la primera lactancia en un rodeo con más de 85% de prevalencia. Reportan que aun realizando medidas para evitar la transmisión vía sanguínea no encontraron cambios en la prevalencia después de 3 años. Esto indicaría que otras vías de transmisión podrían jugar un rol en condiciones naturales. En particular encuentran que la población pasa de aproximadamente 10% de prevalencia antes del primer parto a más de 60% posterior al mismo. Estos resultados permitirían plantear que la inmunosupresión generada en el periparto podría activar infecciones virales controladas por los animales y no detectadas por los métodos diagnósticos usualmente empleados.

En suma, el diagnóstico de VLB por ELISA debe realizarse teniendo en cuenta el estado reproductivo del animal en el momento de obtener la muestra. El diagnóstico en los momentos cercanos al parto aumenta la probabilidad de falsos negativos y por este motivo algunos autores proponen no utilizar métodos serológicos en un período comprendido entre dos semanas antes y un mes después del parto (Burridge y col., 1982; Hübner y col., 1996). Acorde a nuestros resultados este intervalo al menos para este *kit* comercial debe ser mayor, ya que no deberían realizarse diagnósticos para LEB desde los 40 días antes del parto, hasta los 50 días posparto, o incluso más, debido a

que cuatro de los cinco animales positivos leves no habían recuperado los niveles de D.O. a los casi dos meses posparto. Sin embargo, la realidad nacional marca que debido a la planificación de la sanidad de los tambos (momentos puntuales o únicos en la toma de muestra para el diagnóstico de enfermedades infecciosas a todo el rodeo), como al manejo reproductivo de los rodeos lecheros en nuestro país (partos todo el año), productores y técnicos frecuentemente no visualizan que un resultado negativo no implica que ese animal sea verdaderamente negativo.

Como perspectiva consideramos que sería importante estudiar la evolución de la carga proviral de la madre durante el periparto, ya que debido a la inmunosupresión existente en este período el animal podría perder la capacidad de controlar al virus, reactivando la infección y originando como consecuencia un aumento de su carga proviral.

Agradecimientos

A Agustín Furtado del Instituto de Patobiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República por su cooperación en el procesamiento de las muestras y a Federico Carrión de la Unidad de Biofísica de Proteínas del Instituto Pasteur de Montevideo, por su colaboración en la construcción de las figuras.

Referencias Bibliográficas

- Burny A, Cleuter Y, Kettmann R, Mammerickx M, Marbaix G, Portetelle D, Van den Broeke A, Willems L, Thomas R. (1988). Bovine leukemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Adv Vet Sci Comp Med* 32:149-170.
- Burridge MJ, Thurmond MC, Miller JM, Schmerr MJF, Van Der Maaten MJ. (1982). Fall in antibody titer to bovine leukemia virus in the periparturient period. *Can. J. comp. Med.* 46:270-271.
- Camargos MF, Feliziani F, De Giuseppe A, Lessa LM, Reis JKP, Leite RC. (2007). Evaluation of diagnostic test to bovine leukemia virus. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinarias* 102:169-173.
- Detilleux JC, Kehrli ME, Stabel JR, FreemadAE, Kelley DH. (2005). Study of immunological dysfunction in periparturient Holstein cattle selected for high and average milk production. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 44:251-261.
- Dixon FJ, Weingle WO, Vázquez JJ. (1961). Metabolism and mammary secretion of serum proteins in the cow. *Lab Invest* 10:216-237.
- Evermann JF, Jackson MK. (1997). Laboratory diagnostic tests for retroviral infection in dairy and beef cattle. *Vet Clin North Am: Food Anim Pract.* 3:87-106.
- Fechner H, Kurg A, Geue L, Blankenstein P. (1996). Evaluation of Polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. *J Vet Med* 43:621-630.
- Felmer R, Zúñiga J, Recabal M. (2006). Estudio comparativo de un PCR anidado, ELISA, IDGA en la detección del virus de la leucosis bovina en muestras de suero, sangre y leche. *Arch Med Vet* 38:137-141.
- Ferrer J. (1980). Bovine Lymphosarcoma. *Adv Vet Sc Comp Med* 24:1-68.
- Ferrer JF. (1979). Bovine leukosis: Natural transmission and principles of control. *JAVMA* 175:1281-1286.
- Goff JP, Horst RL. (1997). Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J Dairy Sci* 80:1260-1268.
- Gutiérrez G, Alvarez I, Fondevila N, Politzki R, Lomónaco M, Rodríguez S, Dus Santos MJ, Trono K. (2009). Detection of bovine leukemia virus specific antibodies using recombinant p24-ELISA. *Vet Microbiol* 137: 224-234
- Gutiérrez G, Alvarez I, Politzki R, Lomónaco M, Dus Santos MJ, Rondelli F, Fondevila N, Trono K. (2011). Natural progression of Bovine Leukemia Virus infection in Argentinean dairy cattle. *Vet Microbiol* 151:255-263.
- Herr M, Bostedt H, Failing K. (2011). IgG and IgM levels in dairy cows during the periparturient period. *Theriogenology* 75:377-385.
- Hübner SO, Weiblen R, Tobias FL, Cancian N, Botton SA, Oliveira M, Zanini M. (1996). Evolução da imunidade passiva contra o vírus da leucose bovina. *Pesquisa Veterinaria Brasileira.* 16:87-90.
- Johnson R, Kaneene JB, Anderson SM. (1987). Bovine leukemia virus: Duration of colostrum antibodies in calves from commercial dairy herds. *Prev Vet Med* 4:371-376.

- Kehrli ME, Nonnecke BJ, Roth JA. (1989a). Alterations in bovine neutrophil function during the periparturient period. *Am J Vet Res* 50: 207-214.
- Kehrli ME, Nonnecke BJ, Roth JA. (1989b). Alterations in bovine lymphocyte function during the periparturient period. *Am J Vet Res* 50: 215-220.
- Kettmann R, Burny A, Callebaut I, Droogmans L, Mammerick M, Willens L, Portetelle D. (1994). Bovine leukaemia virus, in: Levy JA (Ed.), *The Retroviridae*, Plenum Press, New York, pp. 39-81.
- Lamote I, Meyer E, De Ketelaere A, Duchateau L, Burvenich C. (2006). Expression of the estrogen receptor in blood neutrophils of dairy cows during the periparturient period. *Theriogenology* 65:1082-1098.
- Larson BL, Kendall KA. (1957). Changes in specific blood serum protein levels associated with parturition in the bovine. *J Dairy Sci* 40:659-666.
- Larson BL. (1958). Transfer of specific blood serum proteins to lacteal secretions near parturition. *J Dairy Sci* 41: 1033-1044.
- Lassauzet ML, Johnson WO, Picanso JP. (1990). Factors associated with decay of colostral antibodies to bovine leukemia virus. *Prev Vet Med* 9:45-58.
- Llames L, Goyache J, Doménech A, Arjona A, Suarez G, Gomez-Lucia E. (2001). Evaluation of virus excretion by cells persistently infected with the bovine leukaemia virus (BLV) using monoclonal antibodies. *J Clin Virol* 22: 31-39.
- Martín D, Arjona A, Soto I, Barquero N, Viana M, Gómez-Lucía E. (2000). Comparative study of PCR as direct assay and ELISA and AGID as indirect assays for the detection of Bovine Leukaemia Virus. *J Vet Med* 48: 97-106.
- Niermann GL, Buehring GC. (1997). Hormone regulation of bovine leukemia virus via the long terminal repeat. *Virology* 239:249-258.
- Rama G, Meikle A, Puentes R, Moratorio G, Nicolini P, Pessina P, Furtado A, Pritsch O. (2010). Aspectos sobre el diagnóstico de la Leucosis Enzoótica Bovina. *Veterinaria (Montevideo)*. 46:15-22.
- Rodríguez SM, Florins A, Gillet N, de Brogniez A, Sánchez-Alcaraz M, Boxus M, Boulanger F, Gutiérrez G, Trono K, Alvarez I, Vagnoni L, Willems L. (2011). Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: lessons for HTLV. *Viruses* 3:1210-1248.
- Rola M, Kuzmak J. (2002). The detection of bovine leukemia virus proviral DNA by PCR-ELISA. *J Virol Methods* 99:33-40
- Strange R, Friis RR, Bemis LT, Geske FJ. (1995). Programmed cell death during mammary gland involution. *Methods Cell Biol* 46:355-368.
- Tekes L. (1994). Influence of management technology and parturition on antibody levels in cows with bovine leukosis. *Acta Vet Hung* 42:57-67.
- Thurmond MC, Carter RL, Puhr DM, Burr ridge MJ. (1982). Decay of colostral antibodies to bovine leukemia virus with application to detection of calfhoo d infection. *Am J Vet Res* 43:1152-1155.
- Trainin Z, Brenner J. (2005). The direct and indirect economic impacts of bovine leukemia virus infection on dairy cattle. *Israel J Vet Med* 60:94-105.
- Trono KG, Pérez-Filguiera DM, Duffy S, Borca MV, Carrillo C. (2001). Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. *Vet Microbiol* 83:235-248.
- Vangroenweghe F, Lamote I, Burvenich C. (2005). Physiology of the periparturient period and its relation to severity of clinical mastitis. *Domest Anim Endocrinol* 29: 283-93.



Errecalde, J.O.¹

El hombre, en su lucha frente a la enfermedad, ha elegido un rival formidable. Las bacterias tienen 3500 millones de años de experiencia sobre el planeta contra dos millones de años en el caso de la especie humana. Nos llevan una buena ventaja, ¿no es cierto?

Los antimicrobianos son sustancias naturales o sintéticas capaces de detener el crecimiento o directamente matar microorganismos. Debemos tomar conciencia de que tienen que ser utilizados prudentemente. No enfrentamos a un rival fácil.

El primer antibiótico natural fue la penicilina, que es el ejemplo excluyente, al representar el primer escalón de un grupo enorme de drogas de gran actividad y uso extendido y el inicio de una nueva etapa en la historia de la humanidad. Posteriormente a la penicilina, sulfamidas y tirotricina, en la década del 40 aparecen estreptomomicina, cloranfenicol y clortetraciclina. En la década del 50 eritromicina y vancomicina. En la del 60, gentamicina, ampicilina, cefalotina y amikacina. En la del 70, cefalexina, carbenicilina, cefoxitina y cefaclor. En la del 80, cefotaxima, moxalactam, combinación ácido clavulánico-amoxicilina, combinación imipenem-cilastatina, aztreonam. En los 90 aparecen las fluoroquinolonas, nuevos macrólidos, y nuevas cefalosporinas y agentes antivirales más efectivos. Luego del 2000 registramos la aparición de quinolonas de espectro ampliado. Esto es solamente una muestra parcial que incluye agentes representativos.

Por supuesto que todos estos descubrimientos estuvieron estimulados por algo. Ese algo fue una mezcla de componentes formada por la inquietud de los investigadores y de la industria por una parte, pero innegablemente, por la aparición de diversos niveles de resistencias bacterianas por el otro. Esto dio lugar a una competencia entre los microorganismos, generando resistencias y seleccionándose en pro de éstas y el hombre, por su parte, imaginando, diseñando, tamizando, en la búsqueda de nuevos compuestos más eficaces y más seguros para la lucha antimicrobiana. Si bien el hombre no cede en su lucha, los microorganismos tampoco, y estos últimos van sacando ventaja, lenta e inexorablemente.

A la luz de los conocimientos actuales podemos decir que ante la llegada de un nuevo antibiótico a la clínica, es muy probable que ya existan variedades bacterianas capaces de resistir a su acción, o que éstas aparezcan y se seleccionen con velocidad variable. Será nuestra obligación que la emergencia de resistencia se demore todo lo posible.

¿NECESITAMOS DEL LABORATORIO PARA INSTAURAR UN TRATAMIENTO ANTIMICROBIANO?

Se trata de un tema extremadamente conflictivo. Frente a la instauración de una terapia antimicrobiana tenemos dos alternativas: por un lado el aislamiento, identificación y prueba de susceptibilidad del/los gérmenes actuantes y por el otro, el tra-

tamiento a ciegas (que como veremos más adelante no es algo malo si se lo hace con el criterio necesario).

Es evidente la ventaja que aportan las pruebas de laboratorio cuando están bien interpretadas. Saber de qué microorganismo se trata, a qué antibiótico es susceptible, y aún más, cuál es la concentración inhibitoria mínima para el agente que se está pensando seleccionar para el tratamiento, representan innegablemente enormes ventajas. Pero lejos de ser la solución del problema solamente sirven para ayudar en el diseño del plan terapéutico adecuado.

Si no tenemos resultados de laboratorio para hacer un tratamiento antimicrobiano las cosas cambian respecto de lo anteriormente descrito. Estamos en franca inferioridad de condiciones. Sin embargo, eso no significa que, sin resultados de laboratorio, un tratamiento deba ser necesariamente irracional. Antes de aplicar el medicamento habrá que considerar: ¿Cuál es la sintomatología clínica? ¿Cuál es el foco infeccioso? ¿Qué nos indica la historia del establecimiento en cuanto a frecuencia de infecciones con esa sintomatología en esa especie animal? ¿Disponemos de pruebas de laboratorio previas? ¿Qué datos existen en los registros del establecimiento? ¿Cuáles son los datos que aporta la persona a cargo de los animales? ¿Existe una posibilidad concreta de presencia de flora mixta? ¿Cuál es la historia de uso de antimicrobianos en el establecimiento? ¿Sus éxitos? ¿Sus fracasos? ¿El o los animales enfermos son inmunocompetentes? ¿Existe otra patología concomitante? ¿Se está llevando a cabo alguna otra terapia simultáneamente? Estas son solamente algunas de las preguntas que el profesional actuante necesariamente deberá hacerse antes de pensar en la elección de un agente antimicrobiano, su dosis, esquema de dosificación y tiempo de tratamiento.

Si la terapia no puede basarse en pruebas de laboratorio (y esto es algo que muy frecuentemente ocurre en diversas regiones del mundo), el criterio clínico se vuelve esencial y, combinado con el conocimiento de las características farmacocinéticas y farmacodinámicas del medicamento elegido, aún pueden conducir al éxito terapéutico.

¿EXISTEN RIESGOS POR PRESENCIA DE RESIDUOS DE ANTIMICROBIANOS EN ALIMENTOS?

Clásicamente la presencia de antimicrobianos en alimentos se ha asociado a distintos problemas, a saber:

- a. Alérgicos.
- b. Tóxicos.
- c. Asociados a las resistencias bacterianas.

¹Médico Veterinario. MSc, Dr. en Ciencias Veterinarias. Profesor Titular, Cátedra de Farmacología, Farmacotecnia y Terapéutica y Cátedra de Farmacología Básica y Farmacodinamia, Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLP, Argentina.

Recibido: 1/2/12 Aprobado: 20/2/12

Los problemas alérgicos son conocidos y afectan a la población sensibilizada. En general las bajas concentraciones de antibióticos alérgicos (i.e. beta lactámicos) no alcanzan para sensibilizar pacientes (aunque puede haber excepciones) pero sí para desencadenar reacciones que, en general, no son graves aunque, eventualmente, pueden llegar a serlo (anafilaxia).

Los problemas toxicológicos, por su parte, son bastante difíciles de probar dadas las bajas concentraciones residuales de estas drogas. Los aminoglucósidos, por ejemplo, son productos tóxicos. Su ototoxicidad y nefrotoxicidad han sido clásicamente descritas. Sin embargo, insistimos, a concentraciones residuales es posible que no existan riesgos toxicológicos para este grupo de drogas. Por cierto que si se envían a consumo riñones de animales tratados las concentraciones de droga serán más elevadas, dada la facilidad con que los aminoglucósidos se acumulan en este órgano. De todas maneras y, aún en este caso, será difícil que el consumo de un riñón en estas condiciones pueda generar problemas toxicológicos, dada la baja posibilidad de que un paciente continúe consumiendo riñones con residuos elevados de aminoglucósidos en forma continuada por un tiempo prolongado.

El que sí es capaz de dar lugar a problemas tóxicos es el cloranfenicol y en este caso a dosis probablemente muy bajas. El cloranfenicol es capaz de producir dos tipos de manifestaciones toxicológicas: Una mielodepresión dosis dependiente que se presenta en el curso de un tratamiento con la droga y en segundo lugar, menos frecuente pero mucho más grave, una anemia aplásica que es dosis independiente, que desarrolla en individuos susceptibles y que es irreversible una vez instalada. Los derivados fenicoles tianfenicol y florfenicol, si bien pueden generar algún tipo de mielodepresión dosis dependiente que cede al suprimir el tratamiento o bajar la dosis, no son capaces de producir la anemia aplásica. Esta es la razón por la que el cloranfenicol ha sido prohibido en algunos países y que no haya ocurrido lo mismo con los otros fenicoles.

Como mencionáramos al inicio de esta sección, la resistencia bacteriana ha sido asociada largamente a la presencia de residuos de antibióticos en alimentos humanos. Sin embargo, y pensando lógicamente, las concentraciones residuales de antibióticos presentes en alimentos provenientes de animales tratados difícilmente sean capaces de seleccionar bacterias resistentes, dado que a tan bajas concentraciones los antibióticos no pueden actuar sobre microorganismos resistentes ni sensibles. Especialmente cuando esas concentraciones se encuentran por debajo del NMEL (nivel de no efecto microbiológico).

La resistencia bacteriana es un problema gravísimo que representa una preocupación mundial, que se produce por múltiples causas, que probablemente sea inevitable y con la que tenemos que lidiar en forma multidisciplinaria a efectos de limitar su emergencia y paliar sus efectos al máximo.

El riesgo más grande para la salud de los consumidores de alimentos de origen animal, vinculado con la utilización de antibióticos en animales, no está dado por los residuos de antimicrobianos en el alimento consumido, sino por el desarrollo de resistencias en bacterias de los mismos animales. Estas resistencias pueden, por supuesto, dar lugar a fallos terapéuticos en tratamientos veterinarios, pero también al riesgo de transfe-

ncia de bacterias resistentes de los animales al hombre, o de genes portadores de información que codifica resistencia de bacterias de animales a bacterias humanas.

LOS MECANISMOS Y LA EPIDEMIOLOGÍA DE LA RESISTENCIA MICROBIANA

La base del desarrollo de la resistencia bacteriana está en la selección de cepas resistentes que producen ciertas concentraciones de antibiótico. El antibiótico no induce resistencia, solamente selecciona. Es una interferencia en el proceso de selección natural. Donde antes se seleccionaban las bacterias más aptas para la supervivencia en el sitio del organismo de que se trate, en presencia del antibacteriano, sobrevivirán solamente aquellas variantes capaces de resistir a las concentraciones de antibiótico presentes en ese lugar. El antibiótico se convierte en el primer factor de selección.

Luego de la introducción en la clínica de cada nueva droga, es un proceso probablemente inevitable, que en un plazo variable de tiempo, aparezcan variantes resistentes de la bacteria contra la que se pretende luchar con el nuevo agente. Esto se ha ido cumpliendo inexorablemente con la mayoría de los antimicrobianos. Esto no implica que, con el uso criterioso y racional de los antimicrobianos, no se pueda limitar al máximo la emergencia de resistencias.

La resistencia de una bacteria no es la misma para todos los miembros de la población. Para individuos indiferenciables morfológica o bioquímicamente, puede haber variedades con susceptibilidades totalmente diferentes. Muy susceptibles, o muy resistentes, que son muy difíciles de erradicar, aún administrando el antibacteriano en concentraciones elevadas. Pero cuando se hace un aislamiento de una determinada infección, se supone que se trata de una cepa bastante pura, que es la que produce el proceso morboso. Al estudiar su susceptibilidad a un determinado agente antiinfeccioso a través de su CIM, podremos, al correlacionar este parámetro con sus variables farmacocinéticas, estimar su eficacia «in vivo». Cuando las concentraciones que el antimicrobiano puede alcanzar en el organismo no superan la CIM sustancialmente y durante tiempos prolongados, aunque vinculados al tipo de agente de que se trate, la bacteria tiene todas las posibilidades para sobrevivir y la podemos definir como resistente. En cambio, cuando ocurre lo opuesto, la bacteria es definida como susceptible.

Esto es lo que ocurre con las resistencias adquiridas, aquellas en que el antibacteriano actúa, como se ha explicado, seleccionando entre microorganismo resistentes y susceptibles. Pero hay otro tipo de resistencias, las denominadas resistencias intrínsecas, aquellas que son parte constitutiva de la bacteria. Por ejemplo las diferencias, de membrana entre bacterias Gram positivas y Gram negativas, hacen que los antibióticos beta lactámicos no encuentren el receptor adecuado para fijarse y ejercer su efecto en las últimas.

Sin embargo es la resistencia adquirida la que nos interesa y sobre ella nos vamos a extender más. El origen de la resistencia adquirida es genético. El puntapié inicial de la resistencia es una mutación que permite que la bacteria se haga resistente. Sobre esta mutación actúa luego la selección ejercida por el antibiótico. Mayor importancia aún tiene el mecanismo de la transferencia de material genético.

En términos generales, las resistencias no parecieran tan difundidas en bacterias Gram positivas como en los Gram negativos, en los que el fenómeno es muy grave.

La transmisibilidad de los factores de resistencia puede dar lugar a un problema aún mayor: la multi-resistencia. Estos microorganismos no solamente son resistentes a una serie de drogas, sino que pueden transferir esa capacidad, por lo que se transforman en reservorios de resistencia. La multiresistencia es el mayor problema que la terapia antimicrobiana enfrenta en este momento.

LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

Las bacterias pueden volverse resistentes a los antimicrobianos, pero, ¿por qué mecanismos? Así como el primer mecanismo de acción de un agente infeccioso conocido fue el de las sulfamidas, el primer mecanismo de resistencia conocido también fue el de los microorganismos a estas drogas. Si bien son varios los mecanismos de resistencia a las sulfas que actualmente se conocen, podemos decir que la hiperproducción de ácido paraaminoibenzoico fue el primero en determinarse, siendo el más conocido. Además de la hiperproducción metabólica, otros mecanismos incluyen:

- Inactivación enzimática de los antibióticos.
- Impermeabilidad de la membrana o pared celular bacteriana.
- Expulsión por mecanismos activos del antibiótico.
- Modificación del receptor del antibiótico en la bacteria.

LA LLEGADA DE LAS BACTERIAS ANIMALES A LA POBLACIÓN HUMANA

Escherichia coli multiresistentes, *Salmonella typhimurium* multiresistentes, enterococos vancomicina resistentes, *Campylobacter* quinolonas resistentes, son microorganismos que habrían emergido, por lo menos en parte de explotaciones agropecuarias. Este hecho se debe sumar al conocimiento de la enorme capacidad de intercambio genético existente en el intestino representado por los microorganismos saprófitos que lo pueblan, que, como bien se sabe, bajo presión antibiótica se vuelven extremadamente peligrosos. Esto ha generado una permanente discusión sobre el tema de la transferencia de resistencias de los animales al hombre. En esta discusión el punto central es la utilización de antibióticos a dosis por debajo de las terapéuticas para la prevención de enfermedades o, simplemente para el aprovechamiento de los efectos «productivos» de los antimicrobianos. Sin embargo, este fenómeno de transferencia no es fácil de demostrar, y menos aún, de medir.

EL USO RACIONAL DE LOS ANTIMICROBIANOS

Indiscutiblemente el uso racional de los antimicrobianos es la herramienta fundamental para evitar entrar en la época post-antibiótica. La resistencia a los antimicrobianos es un problema que genera preocupación internacional. Las tres organizaciones internacionales que tienen responsabilidades sobre este tema, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la Organización Internacional de Epizootias (OIE) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), han

mostrado, reiteradamente, su interés en el tema y han producido documentos aportando recomendaciones para la utilización adecuada de este tipo de fármacos.

Estas organizaciones, hasta la fecha han coincidido en una serie de recomendaciones, reflejadas en publicaciones que abarcan las siguientes áreas:

- Responsabilidad de las autoridades regulatorias y otras con poder de decisión.
- Calidad de manufactura.
- Marketing, distribución y ventas de este tipo de productos.
- Agentes promotores del crecimiento.
- Monitorización de resistencia y utilización de antimicrobianos.
- Uso prudente de antimicrobianos.
- Uso profiláctico de antimicrobianos.
- Entrenamiento y educación.
- Investigación.

Además de la organización de grupos de trabajo, publicación de documentos y difusión de material bibliográfico para conocimiento de técnicos y público en general, estas organizaciones internacionales siguen adelante con su política de aportar soluciones a este tema que, como hemos dicho, es una preocupación mundial.

El uso racional de antimicrobianos es una inquietud de nuestro grupo de trabajo desde hace muchos años. Hemos publicado diversos documentos y realizado una serie de comunicaciones y conferencias apuntando a la mejora de los criterios de utilización de antimicrobianos en los animales y en el hombre. La utilización racional de este tipo de medicamentos en establecimientos productores de leche a efectos de optimizar sus acciones previniendo efectos en la salud pública debe ser una prioridad. Para esto, hemos insistido, a través de diversos documentos y reuniones de entrenamiento, en que se deben poner en práctica planes de administración adecuados, respetándose los períodos de retirada correspondientes a cada formulación (Errecalde, 1994, 1996; Mestorino, 2001). Hemos propuesto la utilización de sistemas de HACCP (análisis de riesgos y control de puntos críticos) para la correcta utilización de estos agentes evitando la presencia de residuos indeseables (Errecalde, 2000a). Hemos insistido en la importancia de la calidad de elaboración y control de antimicrobianos para una terapéutica exitosa y la defensa de la salud pública, considerando que la implementación de procedimientos armonizados en el registro (tal como OIE viene trabajando en América a través del programa CAME-VET), buenas prácticas de manufactura (GMP) en la elaboración de medicamentos y buenas prácticas de laboratorio en el desarrollo y control de los mismos son esenciales y se debe seguir avanzando en ese sentido (Errecalde, 1995, 1998, 2003).

La terapéutica racional es un terreno dinámico, en que el avance del conocimiento va volviendo obsoletas las viejas recetas quimioterápicas. Clásicamente, se ha medicado con antibióticos siguiendo planes de administración o regímenes de dosificación, que permitan mantener concentraciones de droga en plasma y tejidos en forma continuada, durante un período suficiente para la total curación de la dolencia. La curación se obtiene por muer-

te bacteriana de una gran parte de la población y eliminación de los miembros sobrevivientes por activa participación del organismo. De allí que sea tan importante el estado de inmunocompetencia del paciente para la curación. Pacientes inmunodeprimidos necesitan especial cuidado, dado que los quimioterápicos, en este caso, actúan sin la ayuda de las defensas del organismo. Es importante considerar algunas cosas:

Terapia por encima de la concentración inhibitoria mínima (CIM). La concentración inhibitoria mínima ha sido el indicador más utilizado, en terapia antimicrobiana, durante décadas. Se la define como la concentración más baja de droga que previene el crecimiento visible de microorganismos. Es intuitivamente fácil de concebir que, si un antibiótico se mantiene en el organismo en concentraciones por encima de la CIM para determinada cepa de un microorganismo, será capaz de inhibir el desarrollo de esa bacteria con comodidad. Este concepto ha iluminado el avance de la ciencia durante mucho tiempo. Aunque últimamente, nuevos conceptos cambian las bases de algunos de los conocimientos que veníamos manejando, la CIM continúa siendo un parámetro fundamental, sin cuyo conocimiento no tendríamos posibilidades de éxito en terapia antibacteriana.

Los efectos persistentes, conjuntamente con la capacidad de muerte bacteriana («killing»), han sido definidos como los mejores parámetros para establecer el óptimo plan de administración de un antimicrobiano (Andes y Craig, 1998). Entre estos parámetros podemos citar el efecto post-antibiótico (PAE), que es el tiempo necesario para que un cultivo bacteriano que estuvo en contacto con un antibiótico a concentraciones por encima de la CIM y que por lavado o dilución deja de estar en contacto con el antibiótico reinicie el crecimiento.

Parámetros farmacocinéticos. Desde hace tiempo que se tiene muy en claro la importancia del conocimiento de la farmacocinética de los medicamentos para una terapia eficaz. El uso racional de los mismos se basa, en forma central, en el conocimiento de su farmacocinética, lo que, coordinado con el conocimiento de farmacodinamia y toxicidad, de las características del paciente y la enfermedad, permitirá una terapia óptima. El comportamiento farmacocinético de un determinado compuesto se caracteriza a través de una serie de parámetros. Entre los parámetros farmacocinéticos que más vinculación tienen con la eficacia antibacteriana, no podemos dejar de mencionar la biodisponibilidad, semivida de absorción, área bajo la curva concentración versus tiempo, concentración máxima obtenida en plasma y tiempo al que esa concentración se alcanza, semivida de eliminación y aclaramiento (clearance) desde plasma (en general a través de riñón).

Parámetros farmacocinético-farmacodinámicos (Pk-Pd). En los últimos años, se ha avanzado en el conocimiento de la relación Pk-Pd. A través de ese análisis, algunos parámetros farmacocinéticos se correlacionan con parámetros farmacodinámicos, a efectos de obtener predictores más robustos de eficacia terapéutica.

Los parámetros Pk-Pd más utilizados son: el área bajo la curva concentración tiempo dividida por la concentración inhibitoria mínima (AUC/CIM), la máxima concentración plasmática dividida por la CIM (C_{max}/CIM) y el tiempo en que la concentración del antibiótico excede la CIM (T>CIM). Estos parámetros

son actualmente considerados como determinantes en la eficacia «in vivo» de los agentes antimicrobianos (Craig, 1998). Cada vez se dispone de más datos sobre experimentos «in vitro» y en modelos animales que corroboran la importancia de los parámetros farmacocinético-farmacodinámicos para diferentes antimicrobianos y su capacidad para permitirnos tratar efectivamente infecciones por gérmenes con susceptibilidades menores y prevenir la emergencia de resistencias (Craig, 2001).

A la luz de los nuevos conocimientos aparecen tres tipos de drogas antimicrobianas: a. aquellas que muestran una actividad fuertemente dependiente de la concentración, b. aquellas que no muestran esa dependencia y c. aquellas que son solamente bacteriostáticas (Vogelman y Craig, 1986).

Los parámetros Pk-Pd pueden ser utilizados para evitar la emergencia de resistencias. Es interesante mencionar que de los resultados obtenidos en trabajos llevados a cabo en modelos animales y estudios clínicos en seres humanos, se concluye que la magnitud de los parámetros Pk/Pd no difieren mayormente cuando se salta entre especies. Esto no debería sorprendernos, ya que los receptores para los antimicrobianos se encuentran en la bacteria, que es la misma en humanos o animales. Hay datos que nos sugieren que la magnitud de los parámetros Pk/Pd son similares para diferentes regímenes de dosificación, para diferentes drogas dentro de la misma clase y en diferentes sitios de infección (Leggett y col., 1991).

En el caso de penicilinas y cefalosporinas, el tiempo en que las concentraciones plasmáticas deben estar por encima de la CIM en un intervalo interdosis es del 40% al 50% para una eficacia por encima del 85%. Para los macrólidos ocurriría lo mismo (Craig, 2001).

Los aminoglucósidos, por su parte, son drogas cuya eficacia depende netamente de las concentraciones alcanzadas.

¿SE DEBE SUSPENDER EL USO DE ANTIMICROBIANOS COMO PROMOTORES DEL CRECIMIENTO?

Desde hace tiempo se ha instalado una discusión internacional sobre la conveniencia y la factibilidad de dejar de utilizar antibióticos con fines de promoción del crecimiento. Estos medicamentos son utilizados en dosificaciones bajas, subterapéuticas, en alimentos animales, a los efectos de mejorar la calidad del producto final (una menor proporción de grasa y una mayor proporción de proteínas). Otro beneficio de la utilización de estas drogas en la dieta es el control de patógenos zoonóticos, como Salmonella, Campylobacter, E. coli y enterococos. Por otra parte, hay quienes argumentan que la utilización de cualquier antibiótico en estas condiciones favorece la selección de resistencia en bacterias patógenas, limitando en consecuencia su utilización en casos clínicos.

Muchas han sido las teorías que tratan de explicar el efecto de los antibióticos como promotores del crecimiento. Lo que es indudable es que su efecto está vinculado a la intensificación de la explotación productiva. Se ha pensado en que estos medicamentos pueden suprimir parte de la población bacteriana intestinal que pueden llegar a consumir hasta un 6% de la energía neta en cerdos (Jensen, 1998). Controlando la población bacteriana, probablemente la pérdida energética sea menor. Thomke

y Elwinger (1998), sugieren que las citokinas liberadas durante el proceso inmune estimulan la liberación de hormonas catabólicas que reducirían la masa muscular. Obviamente, una reducción de las infecciones intestinales actuaría en contrario. El efecto de los antimicrobianos sobre bacterias anaerobias puede ser otra explicación (los anaerobios son raramente buscados), esto podría prevenir enfermedades como las enteritis necrotizantes e incluso, al suprimir bacterias capaces de producir exotoxinas, evitar los efectos de éstas.

Independientemente de la teoría que se quiera utilizar, parece innegable que el resultado de la utilización de promotores del crecimiento redundará en aumentos diarios de peso en el rango de 1% a 10% con carnes de mejor calidad.

El que se trate de un tema tan conflictivo, explica, de alguna manera, las diferencias en la utilización de este tipo de drogas en áreas desarrolladas del mundo, así podemos comprobar que, mientras en los EE.UU. utilizan extensivamente una gran cantidad de antimicrobianos como promotores del crecimiento, Suecia, no utiliza actualmente antibióticos con los mismos propósitos. En 1995 el Parlamento sueco prohibió la utilización de antibióticos con fines de promoción del crecimiento. Si bien con un costo en pérdidas productivas importantes, y con mayores costos en instalaciones y manejo, Suecia ha demostrado que se puede producir carne en forma moderna sin utilizar promotores del crecimiento antibacterianos. El Animal Health Institute of America (AHI, 1998), por su parte, considera que, sin la utilización de antimicrobianos como promotores del crecimiento, los EEUU necesitarían 452 millones de pollos, 23 millones de bovinos y 12 millones de cerdos extra, para alcanzar los niveles de producción que se alcanzan con las prácticas actuales. En párrafos anteriores mencionamos la experiencia llevada cabo en Dinamarca (documento WHO), en que se suspendió la utilización de antimicrobianos para la promoción del crecimiento en cerdos y aves. La conclusión de ese documento fue que, en condiciones similares a las de Dinamarca, el uso de antimicrobianos con el único propósito de promoción del crecimiento podría ser discontinuado, sin demasiados complicados efectos colaterales. Aquí debemos remarcar las palabras «en condiciones similares a las de Dinamarca», dado que esas condiciones son, en realidad bastante difíciles de cumplimentar, especialmente en los países del tercer mundo. Las medidas profilácticas implementadas en Dinamarca, permitieron que el programa fuera exitoso con pérdidas mínimas en producción porcina y prácticamente sin pérdidas en explotaciones avícolas. Las pérdidas, según el informe serían completamente compensadas por el aumento de confianza del consumidor en los productos producidos bajo el nuevo sistema y por el valor agregado de las exportaciones danesas. Los expertos concluyen que la experiencia danesa es extrapolable a otros países en similares condiciones de desarrollo agropecuario. Esto significa: elevada intensidad, bioseguridad, alojamiento cerrado y muy elevado estándar sanitario. Es extremadamente discutible la última conclusión del trabajo, en que asegura que: «a la vista de los resultados obtenidos en Dinamarca, es poco probable que una acción similar en países en desarrollo pueda disminuir la producción total de carne». Nosotros pensamos que, desde el punto de vista sanitario, muchas explotaciones tercermundistas no están en condiciones mínimas de resistir un proyecto como el mencionado. Por otra

parte, parece lógico pensar que debemos luchar contra las resistencias bacterianas con las armas más adecuadas, pero que esa lucha no debería basarse en una pérdida de productividad en regiones del globo en que cada gramo de alimento es esencial para paliar el hambre. Por lo tanto, en las actuales condiciones, deberá dedicarse mucho al desarrollo económico, técnico y cultural de ciertas partes del globo, antes de pretender enrostrarlos en programas de mejoramiento de la calidad alimentaria que obedezcan a políticas de mejora de la salud pública global.

¿CUÁLES SON LAS ALTERNATIVAS AL USO DE ANTIBIÓTICOS COMO PROMOTORES DEL CRECIMIENTO?

Cuando se considera la prohibición del uso de antimicrobianos como promotores del crecimiento, se debería considerar paralelamente cuales son las posibles medidas a tomar como alternativas.

Una alternativa lógica sería la de desarrollar drogas con mecanismos de acción similares, lo que no sería más que el descubrimiento de nuevos antimicrobianos con mecanismos de acción diferentes de los críticamente importantes en clínica médica humana. Una ruta más compleja sería el mejoramiento de la sanidad animal. Esto es algo elemental. Fue descrito por Prescott y Bagot (1993), que los promotores del crecimiento funcionan mejor cuanto peores sean las condiciones sanitarias. Pero el mejoramiento de la salud animal no es algo fácil de conseguir, especialmente cuando las condiciones económicas y sanitarias generales correspondientes al país no se condicen con ello.

Una de las alternativas que se manejan corrientemente son las enzimas, que adicionadas a las dietas de pollos y cerdos, mejoran el nivel de digestión de ciertos componentes, incrementado sustancialmente el nivel de aprovechamiento de los nutrientes.

Los probióticos están siendo utilizados de manera variable desde hace tiempo ya. Los probióticos son microorganismos que se incluyen en la dieta o son administrados por otras vías. Consisten en microorganismos o mezclas de los mismos que se comportan de manera «amistosa» con el organismo. Sus mecanismos de acción están en discusión, pero, resumidamente se podría decir que podrían seguir una o más de las siguientes acciones: a. Actuar en función del principio de exclusión competitiva, en que una bacteria a grupo de ellas coloniza el intestino de un paciente, con lo que evita que un patógeno pueda ocupar lo que ya está ocupado. b. Actuar estimulando el sistema inmune del paciente. c. Actuar influenciando el metabolismo intestinal, haciéndolo más eficiente.

Pese a sus teóricas ventajas y a varias demostraciones de eficacia, la actividad de los probióticos sigue generando dudas en la comunidad científica.

Las medidas de manejo que se puedan implementar siempre repercutirán favorablemente en la productividad. En Australia se ha trabajado sobre el sistema llamado «todo adentro, todo afuera», lo que significa que cuando se establece un movimiento en la granja, este es total y no quedan animales en la misma, evitando infecciones cruzadas. Si bien esto es generalmente aplicado en explotaciones avícolas, en explotaciones porcinas se trata de algo más complicado y novedoso, que seguramente una vez implementado generará beneficios.

Los planes de vacunación, por su parte, tampoco pueden ser discutidos y, más allá de los costos involucrados, sus resultados suelen ser satisfactorios.

Sin embargo, pareciera que, por el momento, no aparece una opción realista para suplantar a los antibacterianos como promotores del crecimiento.

LA HIGIENE COMO BARRERA PARA LA PREVENCIÓN DE LA DISEMINACIÓN DE RESISTENCIAS

Hemos aclarado anteriormente que las resistencias microbianas de origen no-humano llegan al hombre directamente a través de bacterias que han emergido como resistentes en animales que han sido tratados con antibióticos, o a través de determinantes genéticos de resistencia que, en algún punto de la cadena alimentaria, saltan y son tomados por bacterias patógenas para el hombre. En todos los casos es necesario un íntimo contacto de las bacterias animales y las humanas. Si bien hemos insistido cuando se habló de la epidemiología de la resistencia de la multiplicidad de vías a través de las cuales las bacterias humanas y animales pueden entrar en contacto, debemos dejar claro aquí, que la vía del contacto con alimentos es fundamental. Es por ello que insistiremos en que el manejo higiénico de los alimentos, base fundamental de la prevención de las enfermedades transmitidas por alimentos, es crucial en este tema.

La Organización Mundial de la Salud ha trabajado fuertemente y desde hace tiempo sobre esto, habiendo elaborado las «Reglas de Oro» para la preparación higiénica de los alimentos. Por tratarse de reglas de extrema trascendencia, las resumimos:

- a. Elegir alimentos tratados con fines higiénicos. La pasteurización de la leche es un ejemplo prácticamente universal. Aquellos alimentos que poseen gran valor alimentario cuando están crudos, como algunas verduras, deben ser cuidadosamente lavadas antes de ser consumidas.
- b. Cocinar bien los alimentos.
- c. Consumir inmediatamente todos los alimentos cocinados.
- d. Guardar cuidadosamente los alimentos cocinados.
- e. Recalentar bien los alimentos ya cocinados.

f. Evitar el contacto entre alimentos crudos y cocinados.

g. Lavarse las manos a menudo.

h. Mantener escrupulosamente limpias todas las superficies de la cocina.

h. Mantener todos los alimentos fuera del alcance de insectos, roedores y otros animales.

i. Utilizar agua pura.

Si estas reglas fueran respetadas en forma generalizada, probablemente representarían un golpe muy duro a la transmisión de resistencias bacterianas de los animales al hombre. Lo que ocurre es que no solamente hay que tener un determinado grado de instrucción para poder aplicarlas, sino que en ciertas regiones del globo hablar de «mantener limpia la cocina» es absurdo porque no hay, en el lugar que se habita, un ambiente a ser utilizado como cocina.

EL FUTURO

Pareciera evidente que para evitar entrar a la «era post-antibiótica», no van a ser las prohibiciones de utilización la llave. Las prohibiciones no harán más que reducir la productividad a niveles alarmantes en regiones del planeta que las necesitan elevadas, aumentar el mercado negro y las fabricaciones ilegales y carentes de todo control, el contrabando y la pérdida de control sobre el flujo de antimicrobianos en el mundo, lo que, paradójicamente, puede impactar negativamente en los niveles de resistencias bacterianas.

El uso racional de los antimicrobianos, por veterinarios bien formados en el tema cuando eso es posible, o por técnicos entrenados en su uso, en otros casos, con instrucciones concretas para la utilización de productos farmacéuticos de elevada calidad, es la única y clara salida para el problema que nos ocupa. Para ello, se deberán destinar recursos a la investigación básica y aplicada, especialmente vinculada a aspectos de la farmacocinética y la farmacodinamia de los antibacterianos, a la investigación clínica de sus efectos y, especialmente a la educación y entrenamiento de todos aquellos involucrados en la elaboración, comercialización, utilización, fiscalización y control de los productos fabricados en base a antibióticos.

Referencias bibliográficas

- Andes D, Craig W. (1998). In vitro activities of amoxicillin and amoxicillin-clavulanate against *Streptococcus pneumoniae*: application to breakpoint determination. *Antimicrob Agents Chemother.* 42:2375-2379.
- Andes D, Craig W. (1998). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of outpatient intravenous antimicrobial therapy. *Infect Dis Clin N Am* 112:849-860.
- Craig W. (1998). Pharmacokinetic-pharmacodynamic parameters: rationale for antibiotic use in mice and men. *Clin Infect Dis* 26:1-12.
- Craig W. (2001). Does the Dose Matter? *Clin Infect Dis* 33(Suppl. 3):S233-237.
- Dahlstrom B, Paalzow L, Segre G et al. (1978). Relationship between morphine pharmacokinetics and analgesia. *J Pharmacokinet Biopharm* 6:41-53.
- Davies J. (1994). Origin, acquisition and dissemination of resistance genes. *Science* 264:375-382.
- Eagle H, Fleischman R, Musselman A. (1950). Effect of schedule of administration on the therapeutic efficacy of penicillin. *Am J Med* 9:280-299.
- Errecalde J. (1988). Bioequivalencia, Ensayos de Fármacos «in vitro» e «in vivo». *Boletín del Centro de Estudios para el Desarrollo de la Industria Químico-Farmacéutica Argentina.* 29:5-10.
- Errecalde J. (1994). Documento sobre productos genéricos. *Boletín Técnico. Pfizer, Sanidad Animal.* Buenos Aires, Argentina. 176:1-6.
- Errecalde J. (1995). Documento sobre productos genéricos (II Parte). *Boletín Técnico. Pfizer Sanidad Animal.* Buenos Aires, Argentina. 180:1-5.
- Errecalde J. (1996). Antimicrobianos en leche: Su importancia en Salud Pública. *Boehringer Ingelheim S.A.* Buenos Aires, Argentina.
- Errecalde J. (2000a). El control de puntos críticos en el tambo: Una alternativa viable en nuestro medio? Segundo Curso de Actualización Profesional Fisiopatología de la Lactancia y Calidad de Leche. *Universidad Nacional de La Plata, INTA y CREA.* Pp 99-105.
- Errecalde J. (2003). La elección del medicamento de calidad. Libro de resúmenes de las XIV Jornadas Ganaderas de Pergamino, Buenos Aires. Argentina. Pp. 72-76.
- Kammer R. (1982). Milestones in antimicrobial therapy. In: Morin R., Gorman M. Eds. *Chemistry and Biology of Beta Lactam Antibiotics.* Academic Press. Orlando, Florida.
- Leggett J, Ebert S, Fantin B, Craig W. (1991). Comparative dose-effect relationship at several dosing intervals for beta-lactams, aminoglycoside and quinolone antibiotics against Gram negative bacilli in murine thigh infection and pneumonitis models. *Scand. J. Infect. Dis. (Suppl. 74):*179-184.
- Mestorino ON. (2001). Control de residuos químicos en animales productores de leche. *Primeras Jornadas Técnicas de Ciencia y tecnología de Carnes y Alimentos.* Montevideo, Uruguay.
- O'Brien T. (1997). The global epidemic nature of antimicrobial resistance and the need to monitor and manage it locally. *Clin Infect Dis* 24(suppl. 1):82:88.
- Prescott J, Baggot J, Walker R. (2002). *Terapéutica Antimicrobiana en Medicina Veterinaria.* Tercera Edición. Intermédica. Buenos Aires.
- Soussy C. (1998). Susceptibility testing of quinolones and links between *in vitro* and *in vivo* resistance. Working paper 2. The use of quinolones in food animals and potential impact in human health. WHO Meeting 2-5 June 1998. Geneva Switzerland.
- Vogelman B, Craig W. (1986). Kinetics of antimicrobial activity. *The Journal of Pediatrics.* 108:835-840.
- Weidermann B, Heisig P. (1999). Bakterielle resistanz gegenüber chinolonen. *Chemotherapie Journal* 8:99-107.
- Woodnut G, Berry V. (1999). Two pharmacodynamic models for assessing the efficacy of amoxicillin-clavulanate against experimental respiratory tract infections caused by strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 43:29-34.



Veterinaria (Montevideo) es la revista oficial de la Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay destinada a publicar artículos en idioma español sobre temas científicos, técnicos y otras comunicaciones de interés a las Ciencias Veterinarias.

Los contenidos y opiniones incluidos en los artículos son responsabilidad exclusiva de los autores.

NORMAS GENERALES

Los trabajos se enviarán exclusivamente por correo electrónico a: revistavet@yahoo.com

El texto debe ser en formato «DOC» o «RTF» y no deberá exceder de 20 páginas tamaño A4 (incluidas referencias), con margen de 2,5 cm a cada lado y con caracteres de 12 puntos, con interlineado doble y numeración de líneas.

Los cuadros (se recomienda usar la palabra cuadro y no tabla) y figuras (se recomienda usar la palabra figura y no gráfica) deben ir al final del manuscrito (cada una en hoja aparte). Las leyendas de los cuadros van arriba de los mismos y deben ser auto explicativas. Las leyendas de las figuras también deben ser auto explicativas y van aparte de las mismas, en una hoja a continuación de la bibliografía y antes de los cuadros y figuras. Los cuadros deben ser simples, con líneas de color negro. En las figuras (cuando corresponda) utilizar tramas en blanco y negro y no en colores.

Las fotografías o impresiones pueden ser en color o en blanco y negro (con 300 dpi de resolución como mínimo al tamaño de 10x7 cm), en un máximo de 5 que serán adjuntadas al original, con leyenda en hoja aparte.

El autor principal o de correspondencia deberá enviar una nota firmada por correo electrónico o por fax (2409 9458) indicando dirección postal completa, teléfono, fax y correo electrónico, dejando establecido que el trabajo no se ha publicado ni se ha remitido a ninguna otra publicación periódica. Se aceptarán trabajos que hubieran sido publicados como resúmenes o comunicaciones cortas en congresos, simposios o jornadas.

Los trabajos recibidos serán leídos por el Editor Jefe, quien designará dos árbitros para su evaluación, pudiendo darle los destinos siguientes: aceptarlos, devolverlos a los autores para su adecuación o rechazarlos.

El Editor Jefe clasificará los manuscritos recibidos en:

- 1.Trabajo Científico: artículo original, comunicación corta (reporte o caso clínico), revisión.
- 2.Trabajo Técnico o de Difusión o Nota Técnica (práctica veterinaria, diagnóstico, tecnológico, conferencia).

Una vez publicados, los autores recibirán 10 separatas. Los trabajos aceptados para publicación pasan a ser propiedad intelectual de la SMVU quedando los derechos de publicación del trabajo a su cargo. Las reproducciones parciales o totales sólo pueden realizarse con la autorización escrita del editor.

1. Trabajos Científicos

Es una publicación que describe resultados originales que contiene suficiente información como para que otro investigador pueda: evaluar las observaciones, repetir los experimentos y comprobar las conclusiones. Un artículo original requiere rigor científico, expresado con lógica, claridad y precisión, con una extensión en función de los resultados y respaldado por citas bibliográficas imprescindibles. Existirá un arbitraje de estos trabajos que serán evaluados por reconocidos especialistas en el tema, nacionales e internacionales. Las revisiones, si tienen un análisis crítico por parte del autor, así como experiencia propia, se consideran trabajos científicos.

2. Trabajos Técnicos

Son aquellos trabajos que no cumplen con las normas de trabajos científicos originales pero que su contenido es de un interés o seriedad tal que merece su publicación. El Editor evaluará el trabajo y lo clasificará según su contenido en: Prácticas Veterinarias, Caso Clínico, Diagnóstico, Tecnológico, Conferencia, Educación, u otro según corresponda.

Normas de redacción para Artículos Originales

Contendrán los siguientes elementos:

Título

Será breve y claro, reflejando exactamente lo que el trabajo contiene. Escrito en minúsculas. Se debe incluir el título en inglés a continuación del título en español.

Nombre de Autores:

Apellido Inicial del nombre, otro/s nombres ejemplo: Vidal L¹, Gómez J^{2*}

Dirección: (en pie de página): ejemplo: ¹Departamento de Bovinos, Facultad de Ciencias Veterinarias, Suipacha 698, Buenos Aires, Argentina; ² Departamento de Bovinos, Facultad de Veterinaria, UdelaR. Se detallará solamente la dirección postal completa del autor responsable o de correspondencia, para los demás autores solamente el nombre de la institución. *Autor para correspondencia (incluir correo electrónico)

Resumen

Dará una idea clara y precisa del contenido del artículo, conteniendo: objetivos, metodología, resultados, conclusión. No debe exceder las 250 palabras, escrito en español y en un sólo párrafo luego del encabezado del título y los autores. Debe estar escrito en tiempo pasado. A continuación poner las Palabras clave (máximo cinco).

Summary

Es la traducción al Inglés del Resumen. Incluir keywords.

Introducción

Los autores deben suministrar antecedentes suficientes sobre el tema para que el lector no deba recurrir a otras publicaciones anteriores y para que comprenda la importancia o trascendencia de la investigación que se comunica. Deben referirse al contexto en general (en el mundo, etc.) y en particular (en el país), eligiendo las informaciones más recientes y más relevantes. Se deben dar los fundamentos científicos del estudio y definir claramente cuál es el propósito de escribir el artículo, precisando en el último párrafo los objetivos del trabajo.

Materiales y métodos

Los autores deben dar suficientes detalles para que un investigador competente pueda repetir los experimentos y definir el diseño experimental. Describir claramente los animales utilizados, su número, especie, género, raza, edad. Mencionar los reactivos, drogas o medicamentos por su nombre genérico o químico o por marcas comerciales patentadas. Los métodos y procedimientos deben ser detallados y bibliográficamente referenciados. Deben precisarse con claridad, tiempos, temperaturas, etc. En caso de procedimientos con animales, se debe mencionar si los mismos fueron realizados de acuerdo a las normas de la autoridad competente (CHEA, etc.). Los métodos de los análisis estadísticos deben señalarse y citarse bibliográficamente. Debe estar escrito en tiempo pasado y en tercera persona del singular o plural según corresponda.
