

VETERINARIA



Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay

Año LXXIII - Volumen 49 - Nº 192 - Octubre-Diciembre de 2013

ISSN 1688-4809 - Indizada en: VET-CD/BEASTCD, Latindex

CONTENIDO:

SOBRE LA REVISTA **2**

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS:

Mixosporidiosis branquial por *Henneguya* sp. (Myxozoa: Myxobolidae) en sábalos
Prochilodus lineatus (Pisces: Prochilodontidae) del Río Uruguay y Río de la Plata
Carnales, D.; Carnevia, D.; Perretta, A. y Venzal, J.M. **4**

ARTÍCULOS TÉCNICOS:

Puesta a punto de la técnica de PCR multiplex para la identificación de
Clostridium chauvoei y *Clostridium septicum*
Cattáneo, M., París, N., Campos, F., Bermúdez, J. **15**

Diagnóstico de *Campylobacter fetus venerealis* por PCR,
en un aborto bovino espontáneo
Bove R, López F, Perera C, Carracelas B, Torres-Dini D, De Souza G,
Azambuja C, Bermúdez J, Alzugaray F, Mederos A. **20**

Neumonía enzoótica asociado al virus respiratorio sincitial bovino (BRSV)
en terneros en Uruguay
Rivero R, Sallis ESV, Callero JL, Luzardo S, Giannechini R, Matto C, Adrien ML, Schild AL **29**

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES **40**

SOBRE LA REVISTA:

Veterinaria (Montevideo) es la revista oficial de la Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay (SMVU) que tiene el objetivo de publicar artículos en idioma español sobre temas científicos, técnicos y otras comunicaciones de interés a las Ciencias Veterinarias. Es una publicación trimestral (versión electrónica – página web de la revista). El volumen completo de cada año (cuatro números) se imprime a fin de año y es distribuido gratuitamente a los socios de la SMVU. La versión electrónica de los números publicados se mantiene en la página oficial de la revista (<http://www.revistasmvu.com.uy>), la que permite la consulta gratuita de los ejemplares de los últimos años. 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 de diciembre de 1988), el Departamento de Documentación y Biblioteca de la Facultad de Veterinaria, se realiza el canje internacional por otras publicaciones científicas.

La revista tiene dos secciones diferenciadas, Científica y Técnica. La inclusión de trabajos enviados en una u otra sección se hará de acuerdo a las especificaciones detalladas más abajo. Los contenidos y opiniones incluidos en los artículos son responsabilidad exclusiva de los autores.

REDACTOR RESPONSABLE:

Dr. Ramiro Díaz (Presidente SMVU).

Cerro Largo 1895, Montevideo teléfono-fax (+598) 2408 6174 - 2409 9458

SECCIÓN CIENTÍFICA:

Editor Jefe:

Dr. Daniel Cavestany (PhD), Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay (UdelaR), Lasplaces 1620, CP 11600, Montevideo, Uruguay

Consejo Editorial:

Dra. Cecilia Cajarville (PhD), Facultad de Veterinaria (UdelaR), Uruguay

Ing. Agr. Pablo Chilibroste (PhD), Facultad de Agronomía (UdelaR), Uruguay

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), Uruguay

Dr. Roberto Kremer (MSc), Facultad de Veterinaria (UdelaR), Uruguay

Dr. Carlos Larsson (PhD), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, USP, Brasil

Dra. Jacqueline Maisonnave (PhD), Facultad de Veterinaria (UdelaR), Uruguay

Dra. Ana Meikle (PhD), Facultad de Veterinaria (UdelaR), Uruguay

Dr. José Luis Repetto (PhD), Facultad de Veterinaria (UdelaR), Uruguay

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), Uruguay
Dra. Carolina Viñoles (PhD), INIA, Uruguay
Dr. Pablo Zunino (PhD) IIBCE, Uruguay

Secretario:

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

SECCIÓN TÉCNICA:

Editor:

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. Ulises Cuore, DILAVE “Miguel C. Rubino” - MGAP
Dra. Valeria Gayo (MSc), DILAVE “Miguel C. Rubino” - MGAP

CONTACTO:

Email: editor@revistasmvu.com.uy

Website: www.revistasmvu.com.uy

Publicación trimestral (versión electrónica)

El volumen completo (números 189 - 192) 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.

Mixosporidiosis branquial por *Henneguya* sp. (Myxozoa: Myxobolidae) en sábalos *Prochilodus lineatus* (Pisces: Prochilodontidae) del Río Uruguay y Río de la Plata

Carnales, D.¹; Carnevia, D.^{1*}; Perretta, A.¹ y Venzal, J.M.²

Recibido: 06/05/2013
Aprobado: 20/07/2013

RESUMEN

Existen numerosos mixosporidios parásitos de peces, dentro de los cuales el género *Henneguya* ha sido descrito parasitando al sábalo (*Prochilodus lineatus*) en el Río Paraná por varios autores en Brasil. El objetivo del presente trabajo fue identificar la o las especies de *Henneguya* presentes en branquias de sábalos del Río Uruguay y Río de la Plata, estableciendo además la prevalencia y lesiones histopatológicas de la parasitosis. Se colectaron 81 sábalos de los cuales 40 resultaron parasitados, lo que supone una prevalencia de 49,4%. Los peces parasitados presentaron en las branquias pequeños quistes ovoideos de 0,5-1 mm de diámetro mayor. Dentro de estos quistes se reconoció la presencia de mixosporas de *Henneguya* sp. caracterizadas por poseer una forma oval, dos cápsulas polares,

SUMMARY

A large number of mixosporidia fish parasites, in which the gender *Henneguya* has been reported parasitizing shads (*Prochilodus lineatus*) in Paraná River by many authors in Brazil. The aim of this research was to identify the species of *Henneguya* in gills of shad in the rivers Uruguay and de la Plata. Furthermore, the prevalence and histological lesions of the parasitosis were established. Eighty one shads were collected, 40 were parasited, representing a prevalence of 49.4%. The presence of the parasites in the gill was observed as small ovoid cysts of 0.5-1 mm of diameter. Inside these cysts myxosporas of *Henneguya* were recognized, characterized by oval shape, two polar capsules, iodophilic vacuole and a bifurcate caudal process. Their measurements were: $34.80 \pm 4.23 \mu\text{m}$ total length; 14.04 ± 1.96

1 Área Acuicultura y Patología de Organismos Acuáticos, Instituto de Investigaciones Pesqueras, Facultad de Veterinaria, UDELAR, Tomás Basañez 1160, Montevideo, Uruguay. 2 Departamento de Parasitología Veterinaria, Facultad de Veterinaria, UDELAR, Uruguay. *Autor de correspondencia: dcarnevia@gmail.com

una vacuola iodófila y un proceso caudal bifurcado. Las medidas registradas fueron: $34,80 \pm 4,23 \mu\text{m}$ largo total; $14,04 \pm 1,96 \mu\text{m}$ largo del cuerpo; $5,53 \pm 0,81 \mu\text{m}$ ancho del cuerpo; $7,25 \pm 1,03 \mu\text{m}$ largo de la cápsula polar y $2,79 \pm 1,27 \mu\text{m}$ ancho de la cápsula polar. A la histopatología se identificó que los plasmodios se localizan en la zona interlaminar de las láminas secundarias produciendo escasa alteración y respuesta del huésped. Las especies de *Henneguya* descritas en sábalos del Río Paraná (*H. caudalongula*, *H. paranaensis* y *Henneguya* sp.) presentan características morfométricas diferentes de la encontrada en este trabajo, por lo que postulamos que podría tratarse de una especie diferente de *Henneguya* la que parasita al sábalo en el Río Uruguay y Río de la Plata. Estos parásitos podrían utilizarse como indicadores biológicos de poblaciones de sábalos en la cuenca del Plata.

PALABRAS CLAVE:

Henneguya sp., branquias, *Prochilodus lineatus*, Río Uruguay, Río de la Plata

INTRODUCCIÓN

El sábalo (*Prochilodus lineatus*) es un pez perteneciente al orden Characiformes, familia Prochilodontidae que habita la cuenca del Río de la Plata extendiéndose su distribución geográfica a los ríos Paraguay, Paraná y Uruguay y sus afluentes

μm body length; $5.53 \pm 0.81 \mu\text{m}$ body width; $7.25 \pm 1.03 \mu\text{m}$ polar capsule length and $2.79 \pm 1.27 \mu\text{m}$ polar capsule width. At histopathology, plasmodia were located in interlamellar area of secondary gill lamellae, producing a minor alteration and response of the host. The species of *Henneguya* reported in shads of Paraná River (*H. caudalongula*, *H. paranaensis* y *Henneguya* sp.) have different morphometric characteristics from that those found by us, therefore we postulated that a different species of *Henneguya* is parasitizing the shad of Uruguay River and De la Plata River. These parasites could be used as biological indicators of shad populations in the Plata Basin.

KEYWORDS:

Henneguya sp., gills, *Prochilodus lineatus*, Uruguay River, De la Plata River.

(Nion y col., 2002). Puede llegar a medir 80 cm de largo total y pesar más de 7 kg, presentando una gran importancia como recurso económico en Brasil, Argentina, Bolivia y Uruguay (Ceccarrelli y col., 2007; Sverlij y col., 1993). Es el pez de agua dulce que más se exporta en nuestro país y su cultivo potencial se está evaluando en la actualidad tanto en Brasil como en Uruguay (Eiras y col., 2004; DINARA, 2010). Existen fenómenos de mortandad natural que afectan periódicamente las poblaciones existentes en

el Río Uruguay y el Río de la Plata, las cuales son de difícil interpretación pero de gran impacto en la pesca artesanal y en la opinión pública. Mediante el conocimiento de los parásitos que afectan al sábalo, se puede contar con información de base que permita valorar el impacto de las parasitosis en las mortandades naturales, así como evaluar los riesgos sanitarios durante el cultivo. El estudio de los parásitos en poblaciones naturales de peces puede además identificar algunos que sirvan como indicadores biológicos de población (Williams y col., 1992). El sábalo en su ambiente natural puede ser afectado por mixosporidios. Los mixosporidios son metazoarios parásitos obligatorios, multicelulares, formadores de esporas y muy especializados que pertenecen al Phylum Myxozoa, Clase Myxosporea (Alvarez y col., 1988; Eiras, 1994; Yokohama, 2003; Woo, 2006). Se caracterizan por causar afecciones nodulares (mixosporidiosis o nodulosis) localizados en piel, músculo, branquias, cartílago y órganos internos como tubo digestivo, cerebro y médula espinal, tanto en peces de agua dulce como marinos. La mayoría de las especies descritas no son muy patógenas para el hospedero, sobre todo si están en bajo número. Sin embargo, se han descrito pérdidas importantes cuando estos mixosporidios atacan a las branquias y a gran parte de la superficie corporal, causando serios daños en la acuicultura y en la industria pesquera (Barassa y col., 2012; Cordero del Campillo, 2002; Eiras y col., 2008). El género

Henneguya (Myxobolidae) se caracteriza por poseer esporas de forma oval con una pared formada por dos valvas, dos cápsulas polares en el extremo anterior y apéndices longitudinales proyectados desde el extremo posterior de las valvas, de aspecto bifurcado (Alvarez y col., 1988; Eiras, 1994; Cordero del Campillo, 2002). A nivel mundial están descritas cerca de 200 especies dentro del género *Henneguya* (Eiras, 2002; Eiras y Adriano, 2012). La mayoría de las especies presentan especificidad de hospedero pudiendo parasitar una sola especie o un grupo de hospederos filogenéticamente próximos. También existe una cierta especificidad de localización dentro del hospedero aunque algunas especies pueden afectar varios órganos (Noga, 1995; Woo, 2006; Adriano y col., 2012). Esta característica hace que pueda pensarse en utilizar estos parásitos como indicadores de poblaciones de peces (Williams y col., 1992). Han sido descritas parasitando el sábalo en el Río Paraná: *H. paranaensis* Eiras, Pavanelli & Takemoto, 2004; *H. caudalongula* Adriano, Arana & Cordeiro, 2005 y *Henneguya* sp. (Adriano y col., 2005; Eiras y col., 2004; Pavanelli, 1998). En Uruguay está descrita la presencia del género *Henneguya* afectando branquias de sábalos del Río Uruguay y Río de la Plata, pero aún no está identificada la especie (Perretta y col., 2010). El presente trabajo tiene por objetivo la caracterización de la parasitosis y comparación de la especie de *Henneguya* que afecta branquias de sábalos del Río

Uruguay y Río de la Plata con las ya descritas para esta especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron 81 sábalos (68 juveniles y 13 adultos) procedentes del Río de la Plata y el Río Uruguay de los departamentos de Colonia, San José, Montevideo y Salto. Los peces fueron obtenidos entre los meses Octubre 2010 - Marzo 2012 de pescadores artesanales, de capturas propias, de fenómenos de mortandad natural y además se realizaron muestreos a partir de cabezas congeladas enviadas desde la Comisión Técnico Mixta de Salto Grande. Los muestreos abarcaron los meses Noviembre, Diciembre, Febrero, Marzo, Junio y Agosto y el número de ejemplares de cada muestreo fue entre diez y treinta. Los ejemplares se trasladaron refrigerados siendo procesados inmediatamente luego del arribo al laboratorio. Los peces fueron medidos y pesados realizándose luego una necropsia de la zona branquial con observación de filamentos en fresco al microscopio. Para estudio y medición de las esporas se realizaron frotis secados al aire y fijados con metanol, los que fueron teñidos con solución de Giemsa al 4% durante 2 minutos (Bruno y col., 2006; Martins y Onaka, 2006). Fueron medidas 128 esporas tomándose las medidas de largo total, largo de la espora, ancho de la espora, largo de la cápsula polar y ancho de la cápsula polar (expresadas en

μm). Para la determinación taxonómica las medidas fueron comparadas con las de otras mixosporas del género *Henneguya* en branquias de sábalos de la región Neotropical y en branquias y otros órganos de otros peces pertenecientes al orden Characiformes y Siluriformes de la región Neotropical según la metodología propuesta por Lom y Arthur (1989) empleada por Adriano y col. (2005) y Eiras y col. (2004).

Se determinó la prevalencia según la talla de los peces (Largo total) y las estaciones del año para la ictiofauna: cálida (Noviembre-Marzo) y fría (Junio-Setiembre) según Guerrero y col. (1997).

En una única oportunidad se obtuvieron 3 ejemplares de peces vivos mediante captura con red de arrastre, procediéndose a sacrificarlos en el lugar e inmediata fijación de arcos branquiales en AFA (alcohol-formol-ácido acético). Para el sacrificio se utilizó una sobredosis de anestésico (Eugenol en solución al 10% en alcohol etílico, en forma de baño a una concentración de 1 mL por litro). Luego de 24 horas en AFA, las muestras fueron conservadas en alcohol 70°. Previo al procesamiento histológico las muestras fueron descalcificadas por inmersión en ácido fórmico al 8% durante dos horas. El procesamiento de la muestra se realizó mediante la técnica estándar de histología para tinción con Hematoxilina y Eosina (Keim, 1982).

Para comparar la prevalencia entre peces juveniles y adultos, así como entre peces capturados en la

estación cálida y fría, se realizó un contraste de hipótesis para proporciones binomiales testando la hipótesis nula de diferencia de proporciones igual 0. En todos los test se consideró un nivel de significación $p < 0,05$.

RESULTADOS

Los sábalos midieron en promedio $26,83 \pm 11,46$ cm de largo total (18,3-58,15) y pesaron en promedio $225,92 \pm 395,83$ gr (56,6-2810).

La necropsia de los peces reveló la presencia de quistes blanquecinos ovoideos de pequeño tamaño (0,5 a 1 mm de diámetro mayor) localizados en branquias. Al examen microscópico en fresco de las laminillas branquiales, se identificaron plasmodios repletos de mixosporas de forma

oval, con dos cápsulas polares, una vacuola iodófila y un apéndice longitudinal bifurcado, por lo que corresponden al género *Henneguya* (Figura 1). Se midieron 128 esporas y las medidas registradas fueron las expresadas en el cuadro 1.

La prevalencia de la parasitosis en los peces examinados fue de 49,4% (40/81). Los peces cuya talla fue 18,3-27 cm (juveniles) tuvieron una prevalencia de 51,5% (35/68), mientras que los peces cuya talla fue 40,5-58,2 cm (adultos) tuvieron una prevalencia de 38,5% (5/13). Al análisis estadístico no hubo diferencias significativas entre las dos prevalencias ($Z=0,959$ con $p=0,39$). En la estación cálida se registró una prevalencia de la parasitosis de 51,3% (38/74) y en las estaciones frías se registró una prevalencia de la parasitosis de 42,8% (3/7). Al análisis estadístico no hubo di-

Cuadro 1. Promedios y desvíos (μm) de las medidas de especies de *Henneguya* presentes en branquias de *Prochilodus lineatus* de la región Neotropical en comparación con las medidas de *Henneguya* registradas en el presente trabajo (datos entre paréntesis corresponden a medidas mínimas y máximas). LT: largo total, LC: largo cuerpo de la espora, AC: ancho del cuerpo de la espora, LCP: largo de la cápsula polar, ACP: ancho de la cápsula polar.

Especie	LT	LC	AC	LCP	ACP
<i>H. caudalongula</i>	$71 \pm 1,4$	$16,6 \pm 0,54$	$4,6 \pm 0,2$	$6,1 \pm 0,19$	$1,6 \pm 0,15$
<i>H. paranaensis</i>	60,4	16,1	6,5	8,4 (8-9)	2
	(56-63)	(14-17)	(6-7)	6,7 (6-7)	
<i>Henneguya sp.</i>	51,1	12,5	4,8	5,8	2
	(51-60,1)	(11,2-15,3)	(4-5,1)	(5,1-7,1)	(1,5-2)
<i>Henneguya sp.</i>	$34,8 \pm 4,23$	$14,04 \pm 1,96$	$5,53 \pm 0,81$	$7,25 \pm 1,03$	$2,79 \pm 1,27$
(presente trabajo)	(30-40,78)	(11,44-17,03)	(4,84-6,47)	(5,86-9,13)	(2,5-3,33)



Figura 1. Respuestas de los parámetros de producción de gas *in vitro* al incremento de la proporción de pulpa de citrus, maíz o cebada en el sustrato. **A:** Producción potencial de gas (“a”). **B:** Tasa de producción de gas (“kd”). **C:** Tiempo de latencia (“L”).

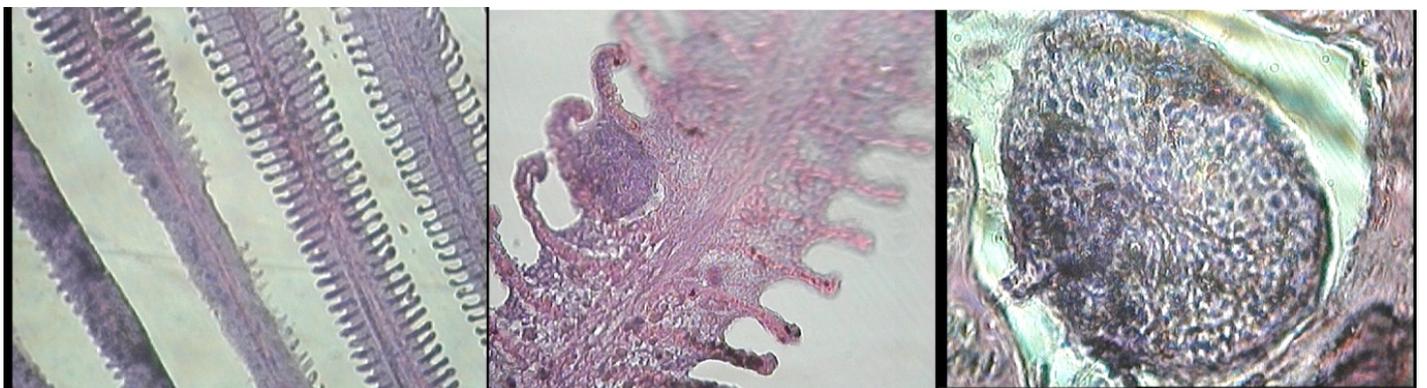


Figura 2. Cortes histológicos de branquias de *Prochilodus lineatus* parasitado con *Henneguya*. **A:** hiperplasia e hipertrofia de base de las laminillas (200x). **B:** plasmodio en branquia a nivel interlaminillar (400x). **C:** plasmodio en branquias (1000x)

diferencias significativas entre las dos prevalencias ($Z=0,404$ con $p=0,68$).

Al estudio histopatológico de branquias se observó hipertrofia e hiperplasia del epitelio en zonas basales de las laminillas secundarias (Figura 2-A). A su vez se identificó la presencia de plasmodios entre las laminillas secundarias branquiales (desarrollo interlaminillar) (Figura 2B). Estos plasmodios están rodeados de células epiteliales y debido a su pequeño tamaño producen poco desplazamiento de las laminillas branquiales. Dentro del plasmodio se observaron diferentes estadios esporogénicos correspondientes a las diferentes etapas de desarrollo del mixosporidio (Figura 2C).

DISCUSIÓN

Si bien el análisis estadístico no arrojó diferencias significativas, parecería que la prevalencia es ligeramente mayor en los peces juveniles y en la estación cálida. Esta falta de diferencias puede deberse a que el número de peces muestreados fue pequeño (se requerirían al menos 197 observaciones en cada grupo asumiendo que las proporciones estén alrededor de 0,5). La prevalencia de la parasitosis (49,4%) ocasionada por *Henneguya* en branquias de sábalo en Uruguay, fue similar a la encontrada en branquias de sábalos infectados por *H. caudalongula* (48,3%) en Brasil (Adriano y col., 2005). En cuanto a la morfometría, la *Henneguya* encontrada en este

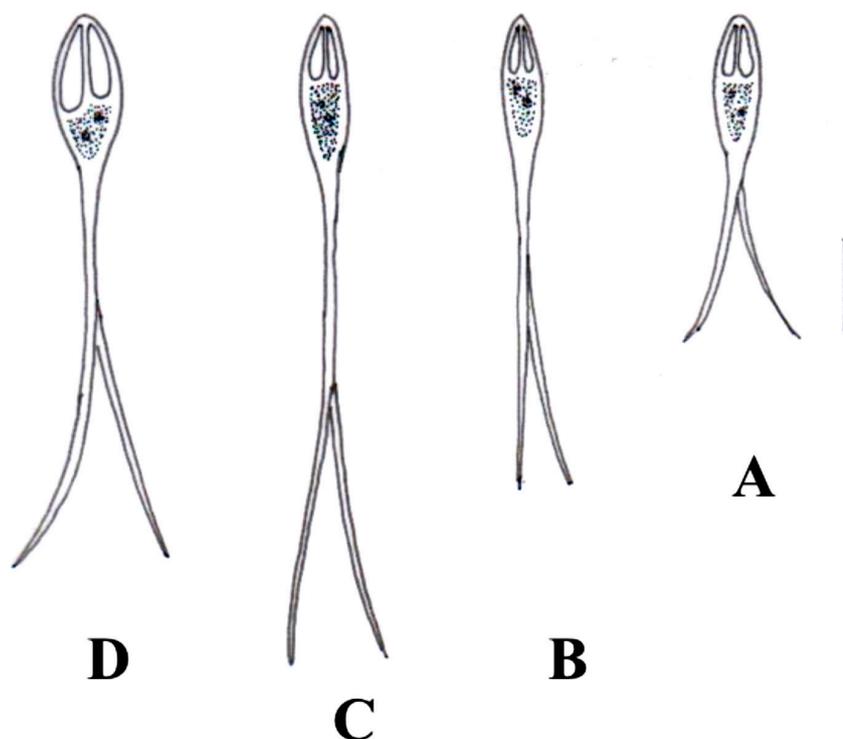


Figura 3. Representación esquemática de esporas maduras de especies de *Henneguya* en branquias de sábalos, en comparación con la *Henneguya* encontrada en el presente trabajo. Bar. 10 μ m. (A= *H. paranaensis*, B= *H. caudalongula*, C= *Henneguya* sp y D= *Henneguya* presente trabajo)

trabajo difiere de las otras descritas para sábalos del Río Paraná (Cuadro 1 y Figura 3). Esto sugiere que la especie de *Henneguya* que parasita sábalos en el Río de La Plata y el Río Uruguay podría tratarse de una diferente. Debido a su hábito migrador y a la fidelidad para con los sitios de desove, así como a una variabilidad morfológica; desde hace tiempo se postula la coexistencia de varias poblaciones de sábalos que comparten las mismas zonas tróficas pero no las zonas de reproducción. Sverlij y col. (1993) señalan la dificultad para distinguir estas poblaciones en base a caracteres morfológicos. Los parásitos pueden utilizarse como indicadores de población de hospederos (McKenzie, 1987, 2002; Williams y col., 1992; Sardella y Timi, 2004; Whiterman y Parker, 2005). Si bien se suelen utilizar Platelmintos, Nematodos o Crustáceos parásitos en el caso de los peces, existen antecedentes de utilización de mixosporidios como indicadores de población (Karasev, 1988). Según Williams y col. (1992) las características que deben reunir los parásitos para ser buenos indicadores son: a) diferente prevalencia e intensidad media de parasitosis entre las poblaciones; b) ser fáciles de detectar con un mínimo de disección, c) que el ambiente de ambas poblaciones de peces sea bueno para el parásito, d) un alto grado de especificidad de sitio de infección, e) una alta especificidad de hospedero y f) una prevalencia estable todo el año. Las distintas especies de *Henneguya* encontradas en

sábalos del Río Paraná y del Río Uruguay podrían utilizarse como indicadores biológicos de población ya que reúnen varias de estas características.

Con respecto a la histopatología, Molnár (2002) estudió la localización de los plasmodios de mixozoarios en las branquias de los peces describiendo cuatro posibles localizaciones: en los vasos sanguíneos, en el epitelio, dentro del tejido conjuntivo y en el cartílago. Una misma especie de pez puede tener mixozoarios de diferentes especies localizados en distintos lugares de la branquia, pero la misma especie de mixozoario parece localizarse siempre en el mismo sitio branquial. Si bien Eiras y col. (2008) postulan que la localización del plasmodio debe considerarse una característica con valor taxonómico, aunque algunos mixozoarios del género *Myxobolus* no tienen una afinidad tan marcada por un tejido en particular y pueden infectar varios tejidos a la vez (Adriano y col., 2009). En el presente trabajo se encontraron plasmodios repletos de mixosporas a nivel de la zona interlaminillar de las branquias en forma similar a los encontrados por Adriano y col. (2005), Rocha (1992) y Vita y col., (2003) para *H. caudalongula*, *H. amazonica* y *H. astyanax*, respectivamente. Los cambios patológicos observados como hiperplasia branquial también fueron descritos por Adriano y col. (2005) y Bruno y col. (2006). Según Meldau de Campos y col. (2011) la hiperplasia es la respuesta común de las branquias frente a las infecciones por parásitos. Los

quistes en los filamentos branquiales comprimen y dilatan el epitelio, ejerciendo presión sobre las laminillas adyacentes y causando deformación así como alteración de la función branquial afectándose la respiración y el intercambio iónico. Estas alteraciones branquiales pueden estar jugando un papel como causa de algunas de las mortandades de sábalos observadas en el Río Uruguay y Río de la Plata.

CONCLUSIONES

Fue encontrada una prevalencia de 49,4 % para la parasitosis branquial por mixozoarios del género *Henneguya* en sábalos del Río Uruguay y Río de la Plata.

Fue constatada la presencia de plasmodios a nivel interlaminillar produciendo alteraciones branquiales que pueden afectar la salud de los peces.

A partir de todos los estudios comparativos (en base a las medidas y morfología de las esporas, así como a la localización y tamaño de los plasmodios) entre la *Henneguya* encontrada en el presente trabajo y las demás especies descritas en sábalos del Río Paraná, postulamos que estamos en presencia de una especie diferente de *Henneguya*, parasitando branquias de sábalos en el Río de la Plata y Río Uruguay, lo que podría utilizarse como indicador biológico de poblaciones.

AGRADECIMIENTOS

A la CIDEC (Comisión de Investigación y Desarrollo Científico de la Facultad de Veterinaria) por la financiación del presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adriano E, Arana S, Cordeiro N. (2005). Histopathology and ultrastructure of *Henneguya caudalongula* sp.n. infecting *Prochilodus lineatus* (Pisces: Prochilodontidae) cultivated in the state of Sao Paulo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 100:177-181.
2. Adriano EA, Arana S, Alves AL, Silva MRM, Ceccarelli PS, Henrique-Silva F, Maia AAM. (2009). *Myxobolus cordeiroi* n. sp., a parasite of *Zungaro jahu* (Siluriformes: Pimelodiade) from Brazilian Pantanal: morphology, phylogeny and histopathology. Vet Parasitol 162:221-229.
3. Adriano E, Carriero M, Maia A, Silva M, Naldoni J, Ceccarelli P, Arana S. (2012). Phylogenetic and host-parasite relationship analysis of *Henneguya multiplasmodialis* n.sp. infecting *Pseudoplatystoma* spp. in Brazilian Pantanal wetland. Vet Parasitol 185:110-120.
4. Alvarez P, Barja J, Blanch A, Estévez A, Figueras A, Giorgetti G, Jofre J, Mcallister E, Sarti M, Villalba A. (1988). Patología en Acuicultura. Plan de Formación de Técnicos Superiores en Acuicultura. Madrid. Comisión Investigación Científica y Técnica. 218:235-236.
5. Barassa B, Adriano E, Cordeiro N, Arana S, Cecca-

- relli P. (2012). Morphology and host-parasite interaction of *Henneguya azevedoi* n. sp., parasite of gills of *Leporinus obtusidens* from Mogi-Guaçu River, Brazil. *Parasitol Res* 110:887-894.
6. Bruno DW, Nowak B, Elliott DG. (2006). Guide to identification of fish protozoan and metazoan parasites in stained tissue sections. *Dis Aquat Org* 70:1-36.
 7. Ceccarelli P, Adriano E, Cursino dos Santos S, Figueiredo do Rego R, Lacerda y Silva L. (2007). Centro de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros Continentais Pesquisas Patológicas y Genéticas em Recursos Pesqueiros da Bacia do Alto Paraguai. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Brasília. 169 p.
 8. Cordero del Campillo M. (2002). *Parasitología Veterinaria*. Madrid, McGraw- Hill- Interamericana de España. 932 p.
 9. DINARA. Dirección Nacional de Recursos Acuáticos. (2010). Boletín Estadístico Pesquero 2009. Montevideo, MGAP-DINARA, 52 p.
 10. Eiras J. (1994). *Elementos de Ictioparasitología*. Porto, Fundación Eng. Antonio de Almeida. 339 p.
 11. Eiras J. (2002). "Synopsis of the species of the genus *Henneguya* Thélohan, 1892 (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae)". *Syst Parasitol* 52:43-54.
 12. Eiras J, Pavanelli C, Takemoto R. (2004). *Henneguya paranaensis* sp. n. (Myxozoa, Myxobolidae), a parasite of the teleost fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the Paraná River, Brazil. *Bull. Eur. Ass Fish Pathol* 24:308-311.
 13. Eiras J, Takemoto R, Pavanelli C. (2008). *Henneguya caudicula* n.sp. (Myxozoa, Myxobolidae) a parasite of *Leporinus lacustris* (Osteichthyes, Anostomidae) from the High Parana River, Brazil, with a revision of *Henneguya* spp. Infecting South American fish. *Acta protozool* 47:149-154.
 14. Eiras J, Adriano E. (2012). A checklist of new species of *Henneguya* Thélohan, 1892 (Myxozoa: Myxosporea, Myxobolidae) described between 2002 and 2012. *Syst Parasitol* 83:95-104.
 15. Guerrero RA, Acha ME, Framiñan MB, Lasta CA (1997). Physical Oceanography of the Rio de la Plata Estuary. *Cont Shelf Res* 17:727-742.
 16. Karasev, A. (1988). Myxosporidian *Myxobolus aeglefini* (Cnidospora: Myxosporea) blue whiting biological tag from the Celtic Sea and adjacent waters. ICES S.M. 16 p.
 17. Keim A. (1982). *Manual de Métodos Parasitológicos e Histopatológicos en Piscicultura*. Instituto Nacional de Pesca. Montevideo, Uruguay. Informe Técnico N° 31. 49 p.
 18. Lom J, Arthur J. (1989). A guideline for the preparation of species description in Myxosporea. *J Fish Dis*. 12:151-156.
 19. Martins M, Onaka E. (2006). *Henneguya garavelli* n. sp. and *Myxobolus peculiaris* n. sp. (Myxozoa: Myxobolidae) in the gills of *Cyphocharax nagelli* (Osteichthyes: Curimatidae) from Rio do Peixe Reservoir, Sao José do Pardo, Sao Paulo, Brazil. *Vet Parasitol* 137:253-261.
 20. McKenzie, K. (1987). Parasites as indicators of host populations. *Int J Parasitol* 17:345-352.
 21. McKenzie, K. (2002). Parasites as biological tags in

- population studies of marine organisms: an update. *Parasitology* 124:153-163.
22. Meldau de Campos C, Rondini J, Ruas F. (2011). Histopathology of gills of *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) infested by monogenean and myxosporea, caught in Aquidauana River, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol.* 20:67-70.
 23. Molnár K. (2002). Site preference of myxosporeans in the gills. *Dis Aquat Org* 48:197-207.
 24. Nion H, Ríos C, Meneses P. (2002). Peces del Uruguay Lista Sistemática y Nombres comunes. Dinara. Infopesca. Montevideo, Uruguay.
 25. Noga E. (1995). *Fish Disease Diagnosis and Treatment*. Raleigh, North Carolina, Mosby. 173-174.
 26. Pavanelli G. (1998). *Henneguya* spp. (Myxozoa, Myxosporea, Myxobolidae) parasitizing fishes from Paraná river, Brazil. *Acta Scientiarum* 20:161-163.
 27. Perretta A, Carnevia D, Letamendía M. (2010). Myxozoarios del género *Henneguya* Thélohan, 1892; parasitando sábalos *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Curimatidae) en el Río Uruguay. Primera Cita. Actas Primer Congreso Uruguayo de Zoología. Mdeo-Uruguay. p. 116.
 28. Rocha E. (1992). *Henneguya amazonica* n.sp. (Myxozoa, Myxobolidae), parasitizing the gills of *Crenicichla lepidota* Heckel, 1840 (Teleostei, Cichlidae) from Amazon River. *Eur J Protistol* 28:273-278.
 29. Sardella N, Timi J. (2004). Parasites of Argentine hake in the Argentine Sea: population and infracommunity structure as evidence for host stock discrimination. *J Fish Biol* 65:1472-1488.
 30. Sverlij S, Espinach A, Ortí G. FAO. (1993). Sinopsis de los datos biológicos del sábalo, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847). 64 p.
 31. Vita P, Corral L, Matos E, Azevedo C (2003) Ultrastructural aspects of the myxosporean *Henneguya astyanax* n.sp. (Myxozoa: Myxobolidae), a parasite of the Amazonian teleost *Astyanax keithi* (Characidae). *Dis Aquat Org* 53:55-60.
 32. Whiterman NK, Parker PG. (2005). Using parasites to infer host populations history: a new rationale for parasite conservation. *Anim Cons* 8:175-181.
 33. Williams HH, McKenzie K, McCarthy AM. (1992). Parasites as biological indicators of the population biology, migrations, diet and phylogenetic of fish. *Rev Fish Biol Fisheries* 2:144-176.
 34. Woo P. (2006). *Fish Diseases and Disorders, Volume 1: Protozoan and Metazoan Infections*. Second Edition. Cap. 8 Phylum Myxozoa. Wallingford, CABI. pp. 230-296.
 35. Yokohama H. (2003). A Review: Gaps in Our Knowledge on Myxozoan Parasites of Fishes. *Fish Pathol* 38:125-136.

Puesta a punto de la técnica de PCR multiplex para la identificación de *Clostridium chauvoei* y *Clostridium septicum*

Development of multiplex PCR for identification of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum*

Cattáneo, M.^{1,2}, París, N.²; Campos, F.³,
Bermúdez, J.^{1,2}

Recibido: 12/03/2012
Aprobado: 13/04/2012

RESUMEN

Se describe la puesta a punto de la técnica de PCR multiplex para detectar el gen que codifica para la flagelina de *Clostridium chauvoei* y el gen que codifica para la toxina alfa de *Clostridium septicum* a partir de cultivos puros. Fueron utilizados primers específicos de los genes que codifican para la flagelina *Clostridium chauvoei* (516 pb) y la toxina alfa de *Clostridium septicum* (270 pb). Las cepas estudiadas de *Clostridium chauvoei* y *Clostridium septicum* fueron detectadas por la técnica de PCR multiplex observándose solamente la amplificación de los productos esperados de 516 pb y 270 pb respectivamente. No se observaron reacciones cruzadas entre *Clostridium chauvoei* y *Clostridium septicum* ni con las otras especies de clostridios estudiadas. El

ABSTRACT

A multiplex PCR to detect the gene encoding the flagellin of *Clostridium chauvoei* and the gene encoding the *Clostridium septicum* alpha toxin from pure cultures was developed. Specific primers were used for genes encoding for *Clostridium chauvoei* flagellin (516 bp) and *Clostridium septicum* alpha toxin (270 bp). The strains of *Clostridium septicum* and *Clostridium chauvoei* were detected by multiplex PCR amplification. The expected products of 516 bp and 270 bp respectively were observed. There were no cross-reactions between *Clostridium septicum* and *Clostridium chauvoei* or with other clostridial species studied. The multiplex PCR was efficient to detect *Clostridium septicum* and *Clostridium chauvoei* separately and together.

¹ Área de Bacteriología. Facultad de Veterinaria. UdelaR. Uruguay. catta1973uy@yahoo.es

² Laboratorio de investigación y desarrollo. CCA. Laboratorios Santa Elena. Uruguay.

³ Facultad de Veterinaria de Porto Alegre. UFRGS. Brasil.

PCR multiplex fue eficiente en detectar *Clostridium chauvoei* y *Clostridium septicum* en forma separada y en conjunto.

PALABRAS CLAVE:

Clostridium chauvoei, *Clostridium septicum*, diagnóstico, PCR multiplex.

INTRODUCCIÓN

Clostridium chauvoei (*C. chauvoei*) es el agente etiológico del carbunco sintomático y *Clostridium septicum* (*C. septicum*) es uno de los agentes etiológicos de la gangrena gaseosa. El diagnóstico de estas enfermedades se realiza en base a los hallazgos clínicos y patológicos, siendo difícil el diagnóstico etiológico a nivel de laboratorio debido a diferentes factores como son la no realización de necropsia, remisión de material en forma equivocada, falta de laboratorios, equipamiento y de personal capacitado para trabajar en bacterias anaerobias (Stern y Batty, 1978; Assis y col., 2002; Radostits y col., 2002). El diagnóstico de laboratorio de estos agentes es complicado y muchas veces lleva a confusión y al diagnóstico etiológico erróneo debido a que *C. septicum* tiene un crecimiento más rápido en los cultivos en placas de agar sangre que *C. chauvoei* lo que enmascara el diagnóstico final (Stern y Batty, 1978; Assis y col., 2001). Con la técnica de PCR

KEYWORDS:

Clostridium chauvoei, *Clostridium septicum*, diagnosis, PCR multiplex.

multiplex se busca tener mayor precisión y rapidez en el diagnóstico de estos agentes (Takeuchi y col., 1997; Kojima y col., 2001). El objetivo de este trabajo es poner a punto la técnica de PCR multiplex para detectar el gen que codifica para la flagelina de *C. chauvoei* y el gen que codifica para la toxina alfa de *C. septicum* a partir de cultivos puros.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas utilizadas en este trabajo se detallan en el cuadro 1.

Las muestras de ADN fueron extraídas con dos métodos, por ebullición a 100 °C durante 20 minutos y con un kit marca SIGMA-NA2100 (Takeuchi y col., 1997; Kojima y col., 2001).

La PCR fue realizada en un volumen final de 25 µl, donde se variaron las concentraciones y volúmenes de MgCl₂ (Invitrogen), primers (ALFA), Taq DNA polimerase (Invitrogen), y ADN genómico hasta la puesta a punto de la técnica. Los primers utilizados para *C. chauvoei* fueron 5'ATCGGAAACATGAGTGCTGC 3' - 5'AGTCTTTATGCTTCCGCTAG 3' y para *C. septicum* 5'AATTCAGTGTGCGGCAGTAG

Cuadro 1. Cepas utilizadas para la puesta a punto de la técnica de PCR multiplex

Identificación	Procedencia
<i>Clostridium chauvoei</i> B017A	Laboratorios Santa Elena S.A. (SESA)
<i>Clostridium chauvoei</i> 10092	ATCC (American Type Culture Collection)
<i>Clostridium septicum</i> B023A	Laboratorios Santa Elena S.A. (SESA)
<i>Clostridium septicum</i> 61.10	Instituto Pasteur, París-Francia
<i>Clostridium novyi</i> tipo B IRP 307	CVB-APHIS, USA
<i>Clostridium sordellii</i> 60.18	Instituto Pasteur, París-Francia
<i>Clostridium haemolyticum</i> IRP 315	CVB-APHIS, USA

3'-5'CCTGCCCAACTTCTCTTTT 3'. El tamaño de los fragmentos esperados de la amplificación serían de 516 bp para *C. chauvoei* y de 270 bp para *C. septicum*. Fue utilizado un ciclo de desnaturalización de 94 °C / 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C / 30 segundos; 54 °C / 30 segundos; 72 °C / 1 minuto, y un ciclo de extensión de 72 °C / 7 minutos. Se trabajó con un termociclador INFINIGEN modelo TC-96CG. Se utilizaron como controles positivos las cepas de *C. chauvoei* 10092 (ATCC) / B017A (SESA) y *C. septicum* 61.10 (Instituto Pasteur, Francia) / B023A (SESA). Para evaluar la especificidad se utilizaron las cepas de *Clostridium sordellii* 60.18 (Instituto Pasteur, Francia), *Clostridium novyi* tipo B IRP 307 (CVB-APHIS-USA) y *Clostridium haemolyticum* IRP 315 (CVB-APHIS-USA). Después de la PCR el material amplificado y separado por electroforesis fue visualizado en gel de agarosa al 1,5 % coloreado con Goodview (Beijing SBS Genetech Co. Ltd) Fue

usado un marcador de peso molecular de 100 pb DNA Ladder (Generuler – Fermentas). Todas las cepas fueron trabajadas con el mismo protocolo.

RESULTADOS

La técnica de PCR se estandarizó para las siguientes concentraciones y volúmenes: PCR buffer 1 x, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 20 pmol de cada primers de *C. chauvoei* y *C. septicum*, 2 ul de ADN genómico de *C. chauvoei*, 1 ul de ADN genómico de *C. septicum* y 1.0 U de Taq DNA polimerase. No se obtuvieron resultados satisfactorios utilizando la extracción de ADN por ebullición para el caso de *C. chauvoei* y si para *C. septicum*. La extracción con kit de SIGMA-NA2100 fue positivo para *C. chauvoei* y *C. septicum* (Figura 1 y 2).

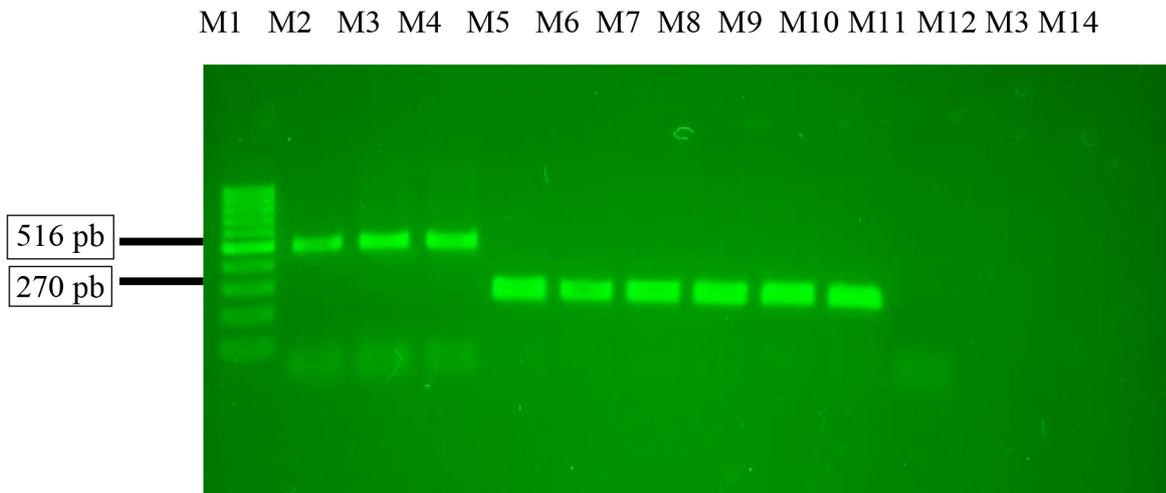


Figura 1:

M1: marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder);

M2 cepa *C. chauvoei* 10092;

M3 cepa *C. chauvoei* B017A;

M4 primers de *C. chauvoei* con ADN de *C. chauvoei* B017A y ADN de *C. septicum* 61.10;

M5 cepa *C. septicum* 61.10;

M6 cepa *C. septicum* B023A;

M7 primers de *C. septicum* con ADN de *C. septicum* 61.10 y *C. chauvoei* 10092;

M8 primers de *C. septicum* con ADN de *C. septicum* 61.10 y *C. chauvoei* B017A;

M9 primers de *C. septicum* con ADN de *C. septicum* B023A y *C. chauvoei* 10092; M9 primers de *C. septicum* con ADN de *C. septicum* B023A y *C. chauvoei* B017A; M11 primers de *C. chauvoei* con ADN de *C. novyi* tipo B;

M12 primers de *C. septicum* con ADN de *C. sordelli*;

M13 primers de *C. septicum* con ADN de *C. haemolyticum*;

M14 Control negativo.

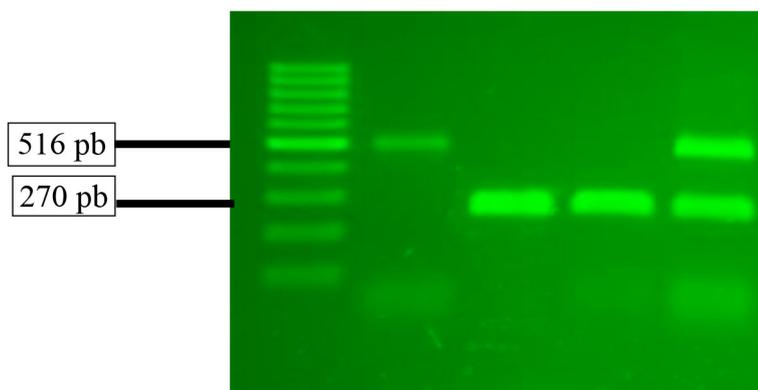


Figura 2:

M1: marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder); M2 cepa de *C. chauvoei* B017A; M3 cepa de *C. septicum* 61.10; M4 cepa de *C. septicum* B023A; M5 primers de *C. chauvoei* y *C. septicum* con ADN de *C. chauvoei* B017A y *C. septicum* B023A.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Las cepas estudiadas de *C. chauvoei* y *C. septicum* fueron detectadas por la técnica de PCR multiplex observándose solamente la amplificación de los productos esperados de 516 pb y 270 pb respectivamente. No se observaron reacciones cruzadas entre *C. chauvoei* y *C. septicum* ni con las otras especies de clostridios estudiadas. El PCR multiplex es eficiente para detectar *C. chauvoei* y *C. septicum* en forma separada y en conjunto. Esta técnica complementará los procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de las enfermedades clostridiales y la identificación molecular de cepas utilizadas en la producción de biológicos. El objetivo a futuro es mejorar esta técnica para la identificación de *C. chauvoei* y *C. septicum* directamente de muestras clínicas.

Rapid detection and identification of *Clostridium chauvoei* by PCR based on flageline gene sequence. *Vet Microbiol* 78:363-371.

4. Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. (2002). *Medicina Veterinaria*. 9a. ed. Ed. McGraw. Enfermedades causadas por bacterias-II. Vol. I, p. 902-907.
5. Sterne M, Batty I. (1978). *Clostridios patógenos*. Editorial Acriba. Zaragoza. España.
6. Takeuchi S, Hashizume N, Kinoshita T. et al. (1997). Detection of *Clostridium septicum* hemolysin gene by polymerase chain reaction. *J Vet Med Sci* 59:853-855.

BIBLIOGRAFÍA

1. Assis RA, Lobato FCF, Martins NE et al. (2002). Surto de gangrena gaseosa em bovinos. *Rev Port Cienc Vet* 7:13-14.
2. Assis RA, Lobato FCF, Dias LD et al. (2001) Producción y evaluación de conjugados fluorescentes para el diagnóstico de mancha y gangrena gaseosa. *Rev Med Vet* 82:68-70.
3. Kojima A, Uchida I, Sekisaki T. et al. (2001).

Diagnóstico de *Campylobacter fetus venerealis* por PCR, en un aborto bovino espontáneo

Diagnosis of *Campylobacter fetus venerealis* in aborted bovine fetus

Bove R¹, López F¹, Perera C¹, Carracelas B²,
Torres-Dini D³, De Souza G², Azambuja C⁴,
Bermúdez J⁵, Alzugaray F⁵, Mederos A² *

Recibido: 25/02/2013
Aprobado: 01/04/2013

RESUMEN

En este trabajo se reporta el diagnóstico de *Campylobacter fetus venerealis* (Cfv) de un aborto bovino espontáneo utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple. La muestra de fluido estomacal fetal fue sometida a otros métodos de diagnóstico para *Campylobacter fetus*: cultivo bacteriano e inmunofluorescencia directa (IFD). Adicionalmente se emplearon marcadores moleculares específicos de CFv que permitieron identificar una banda de 142pb asociada al gen plasmídico parA Cfv. Dicho amplicón fue secuenciado y analizado por blastN. Los resultados de los cultivos bacteriológicos e IFD evidenciaron la presencia de *Campylobacter fetus* y los resultados

SUMMARY

The aim of this study was to report the diagnosis of *Campylobacter fetus venerealis* (Cfv) in a bovine fetus by a multiplex Polymerase chain reaction test (PCR). The sample was submitted to the following diagnostic tests: bacteriological culture and direct immunofluorescence test (DIFT) and specific molecular markers were used for identification of a 142bp segment associated to the Cfv parA plasmid gene. This segment was sequenced and analyzed with BlastN. Results from the bacteriological tests and DIFT demonstrated *Campylobacter fetus* presence, while the molecular methods confirmed Cfv. Sequencing results revealed a 3e-33 e-value with a 99% identity, confirming subspecies *venerealis*.

1 DILAVE Regional Tacuarembó, Ruta 5 km 386, Tacuarembó, Uruguay.

2 Programa Nacional Carne y Lana, INIA Tacuarembó

3 Programa Nacional Forestal, INIA Tacuarembó

4 Laboratorio Genia, Montevideo, Uruguay

5 Departamento de Microbiología, Facultad de Veterinaria, UdelaR, Uruguay.

moleculares identificaron la subespecie *venerealis*. El resultado de la secuenciación reveló un e-value de $3e-33$ con un valor de identidad del 99%, confirmando la subespecie *venerealis*.

PALABRAS CLAVE:

Bovinos, Campylobacter fetus venerealis, aborto, PCR

INTRODUCCIÓN

La *Campylobacteriosis* Genital Bovina (CGB) es una enfermedad de transmisión sexual causada por *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, *C. fetus* subsp. *venerealis* biotipo *intermedius* y *C. fetus* subsp. *fetus* (Campero, 2000). Esta enfermedad se caracteriza por producir infertilidad temporaria en las hembras, mortalidad embrionaria temprana y ocasionales abortos (Campero y col., 2005; Eaglesome y Garcia, 1992). La CGB ha sido reportada en diferentes partes del mundo, en Australia es la principal enfermedad venérea (Aliyu y col., 2005; Hum y col., 2009). En Argentina es considerada la responsable de disminuir la eficiencia reproductiva ocasionando severas pérdidas económicas (Bryner y col., 1964; Campero, 2000). En Uruguay, un estudio realizado por Repiso y col. (2005) reveló una prevalencia de CGB en toros de 28,1% y preñal del 37,0%, usando la técnica de inmunofluorescencia directa (IFD) como prueba de diagnóstico.

KEYWORDS:

Bovine, Campylobacter fetus venerealis, abortion, PCR

El diagnóstico de la enfermedad se realiza comúnmente a partir de muestras de esmegma prepucial de toros, mucus vaginal en vacas o contenido abomasal de fetos abortados (Hum y col., 1994; Lander, 1990; McMillen y col., 2006). Existen diferentes técnicas para el diagnóstico: aislamiento por cultivo bacteriano (Hum y col., 1997; Carter, 1990; Stoessel, 1982), IFD y detección de anticuerpos por ELISA. Sin embargo estas metodologías no permiten diferenciar subespecies *venerealis* de *fetus*, para lo cual se necesitan pruebas adicionales bioquímicas como el test de tolerancia a la glicina. Una opción más reciente para la detección a nivel de subespecie, es el diagnóstico molecular por la técnica de PCR convencional o PCR a tiempo real (Hum et al., 1997; McMillen et al., 2006)

C. fetus subsp. *fetus* habita el tracto intestinal de bovinos y ovinos, y esporádicamente puede causar abortos e infertilidad (On y Harrington, 2001, Campero y col., 2003). En contraste, *C. fetus* subsp. *venerealis* está mejor adaptado al tracto reproductivo de los bovinos y no sobrevive en el tracto intestinal de ovinos y bovinos (Wagenaar y col., 2001). El toro actúa como portador asintomático de la enfermedad con persistencia de la infección genital siendo más

prevalente a mayor edad. Para controlar y erradicar la enfermedad se hace por ello necesario contar con metodologías de diagnóstico altamente sensibles y específicas que permitan detectar a los toros infectados en el rodeo (McMillen y col., 2006).

El objetivo del presente trabajo es reportar el diagnóstico de *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* en un caso espontáneo de aborto bovino mediante una técnica de PCR múltiple.

MATERIALES Y MÉTODOS

Necropsia y obtención de muestras

Este trabajo fue realizado en mayo 2011, en los laboratorios de DILAVE Regional Norte e INIA Tacuarembó, Uruguay.

Se recibió y procesó un feto bovino completo y refrigerado de una vaquillona, proveniente de un rodeo de cría de 116 vacas, 100 vaquillonas y 11 toros de un establecimiento ubicado en la 9ª Sección Policial del departamento de Tacuarembó. La longitud del feto fue medida desde la corona hasta la base de la cola; se observó la presencia de pelos en distintas zonas del cuerpo (Costa, 2001) y se inspeccionó la apariencia externa, grado de autólisis, estado de la piel y mucosas y presencia de eventuales alteraciones morfológicas. La necropsia del feto y la obtención de las muestras se realizaron siguiendo el protocolo de Diagnóstico Integral de Abortos de

DILAVE. Se tomaron muestras de fluido estomacal para cultivo, IFD y PCR.

Técnicas de laboratorio

Las muestras de contenido de abomaso fueron sometidas a las siguientes técnicas de laboratorio: cultivos bacteriológicos; IFD directa y PCR múltiple. Los cultivos bacteriológicos fueron procesados según el manual de procedimientos de la Organización Internacional de Epizootias (OIE, 2008). Brevemente, 2 ml de contenido abomasal fueron sembrados en medio de cultivo selectivo y enriquecimiento de Lander (1990) y en los medios no selectivos caldo cerebro corazón (BHI) y agar sangre sin antibióticos (AS). Los medios fueron incubados a 37 °C durante 5 días, en condiciones de microaerofilia utilizando una jarra de anaerobiosis. El líquido abomasal y las colonias aisladas de los medios de cultivos sólidos, fueron observados al microscopio utilizando extendidos teñidos con técnica de Gram. Las colonias aisladas se conservaron en caldo Mueller Hinton congeladas a -18 °C. La técnica de IFD utilizada fue la descrita por la OIE utilizando el conjugado Campy-azul a una dilución 1:30.

Extracción de ADN bacteriano y condiciones de PCR múltiple

La técnica de PCR fue realizada según Hum y col. (2009). La purificación de ADN a partir del medio

Lander fue realizado de acuerdo al protocolo de CTAB descrito por Mello Groff (2005). Posteriormente y con el fin de realizar la secuenciación se realizó una segunda extracción de ADN a partir de las colonias conservadas en caldo Mueller Hinton. Se utilizaron 500 uL de caldo Mueller Hilton el cual fue centrifugado a 10.000 rpm durante 10 min descartando el sobrenadante. El pellet fue lavado con 500 uL de PBS y centrifugado a 10.000 rpm durante 10 min, descartando el sobrenadante. El pellet final fue resuspendido en 50 uL de agua destilada estéril (Campero, C., 2011)

Condiciones de PCR

Para el diagnóstico molecular se usaron los *primers* específicos de especie MG3 y MG4 y subespecie VenS que producen dos amplicones de 760 y 142 pb respectivamente, en las muestras positivas (Hum y col., 1997). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 µl conteniendo: 1X Buffer, 0.4 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 µM de cada cebador VenS y 1,0 µM de MG3 y MG4, 0,7 U de Taq ADN Polimerasa y 2 uL de ADN molde. El programa de ciclado fue 94 °C, 3min; [36 ciclos (94 °C, 40s; 54 °C, 60s; 72 °C, 40s)]; 72 °C, 5 minutos. Como control de reacción negativo se empleó 2 uL de agua destilada estéril en presencia de la mezcla de reacción. Para el control positivo se usó una cepa de *C. fetus venerealis* proporcionada por Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo, Uruguay.

Secuenciación y análisis de BLAST

Para la secuenciación se realizó una PCR simple con los cebadores VenS. El producto de PCR fue secuenciado en un secuenciador Automático ABI3130 (Applied Biosystem; CA, EEUU). La secuencia fue analizada mediante el empleo del algoritmo BLASTn comparándose contra la base de datos de secuencias nucleotídicas (nr/nt) del NCBI.

RESULTADOS

El feto en estudio provenía de un rodeo compuesto por 126 vacas y 100 vaquillonas entoradas (70 y 30 preñadas respectivamente) y 11 toros.

El feto abortado tenía 5 meses de gestacion midiendo desde la corona a base de cola 46 cm con presencia de pelos en el arco supraciliar, labios y quijadas, punta de cola y rodetes coronarios. El estudio histopatológico reveló un infiltrado polimorfonuclear en pulmón, en hígado focos de necrosis e infiltrado linfocitario en espacios porta y meningitis en sistema nervioso central. En los demás órganos no se encontraron lesiones de significación patológica. Las muestras provenientes del feto y de la madre fueron negativos a Brucelosis, Neorporosis y Leptospirosis bovina. En los cultivos bacteriológicos se observaron colonias compatibles con *C. fetus* en las placas sembradas a partir del BHI y en el AS. Las colonias presentaron morfología típica de dicho

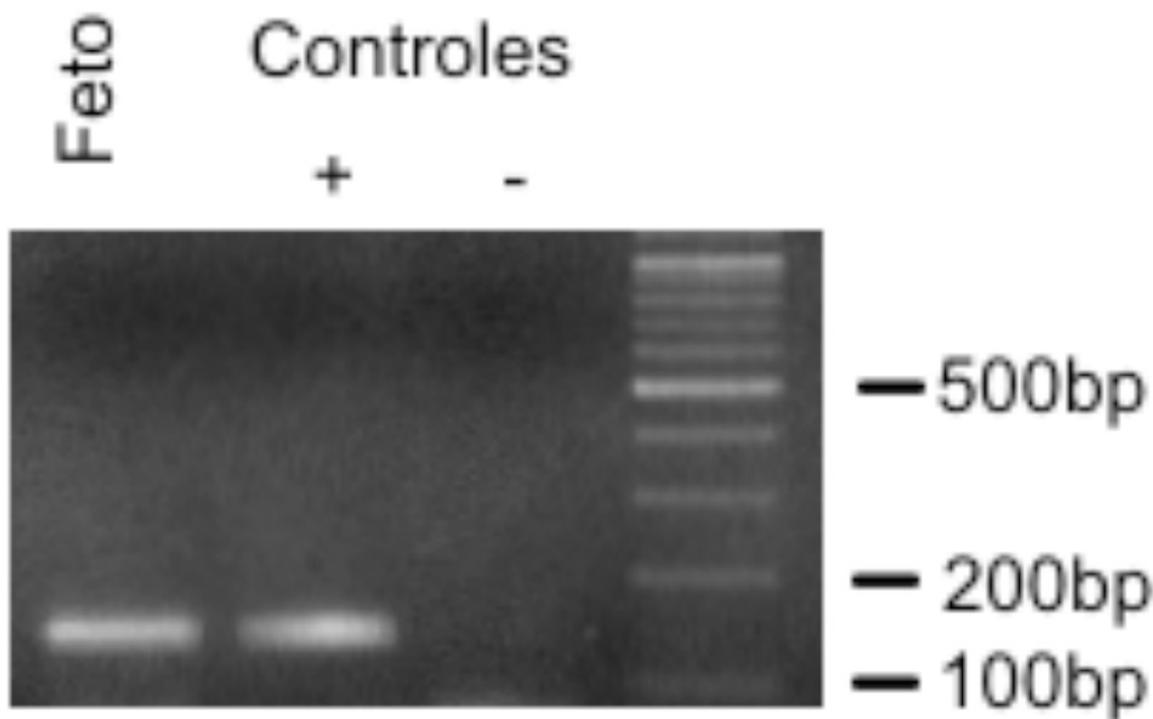


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa donde se observa la presencia de un amplicon de 140bp correspondiente al gen *parA*, en muestra fetal (línea 1), identificando la presencia de *C. fetus* subsp. *venerealis*. La línea 2 (+) corresponde al control positivo *C. fetus venerealis*; la línea 3 al control negativo mezcla de reacción sin ADN y línea 4 al ladder de 100 pb Plus.

microorganismo siendo de 1-3 mm de diámetro, ligeramente grisáceas-rojizas, redondas, lisas y con bordes regulares. Se observó crecimiento bacteriano en pureza. Mediante microscopía óptica y tinción de Gram se confirmó la presencia de bacilos Gram negativos con forma de “S” típicos del género *Campylobacter*.

El análisis de IFD realizado sobre el contenido abomasal también resultó positivo para *C. fetus*.

Diagnóstico molecular: PCR, secuenciación y BLAST

Se logró amplificar dos fragmentos, uno de 760 pb y otro de 142 pb a partir del líquido abomasal así como del control positivo, mientras que no hubo amplificación en el control negativo. En la Figura 1 se observa el resultado de la PCR realizada únicamente con los cebadores VenS a partir de la cual se realizó la secuenciación. El análisis por blastN resultó en un e-value de $3e^{-33}$, con un valor de identidad del 99% al gen *parA* de CFV (Hum y col., 1997; Willoughby y col., 2005).

DISCUSIÓN

Mediante la técnica de PCR múltiple se pudo confirmar el diagnóstico de *C.fetus venerealis* como el responsable del aborto bovino utilizando contenido del abomaso fetal.

Las características biológicas de Cfv hacen que su cultivo y aislamiento como estrategia de diagnóstico resulte un proceso lento, costoso y poco práctico. Las muestras prepuciales y vaginales muestran morfología característica luego de 48hs en condiciones de microaerofilia, pero en este caso no se tuvo acceso a dicho material. Este tipo de cultivos son susceptibles del desarrollo de otros microorganismos debido al lento desarrollo que presentan las colonias de Cfv lo que no le da precisión al diagnóstico (Lander, 1990). Al utilizar en el presente caso fluido abomasal representó una gran ventaja desde el punto de vista microbiológico por su pureza, facilitando aislamiento y caracterización taxonómica, en coincidencia con otros autores (Hum y col., 1997; McMillen y col., 2006). Por ello, una de las estrategias de control es obtener material para diagnóstico prepucial de los toros que se utilizan en el rodeo y el mucus cérvico vaginal de las hembras abortadas

La técnica de IFD resulta de utilidad práctica con adecuada sensibilidad y especificidad para ser utilizada a partir del fluido estomacal permitiendo la detección directa sin el cultivo microbiológico. En

contrapartida, no tiene la capacidad de diferenciar la subespecie de *C. fetus* actuante (Martinez y col., 1986).

La información generada con los métodos moleculares de PCR, secuenciación y blast no solo validó los resultados de las otras técnicas de diagnóstico que se implementaron, sino que además permitió llegar al diagnóstico de subespecie al mostrar un 99% de correspondencia al gen parA de CFV (Hum y col., 1997; Willoughby y col., 2005). A su vez estas metodologías son ajustables a muestras de campo las cuales una vez puestas a punto y validadas no requieren de cultivos bacteriológicos para posteriormente realizar el diagnóstico de subespecie a partir de las colonias sospechosas (McMillen y col., 2006; Tedesco y col., 1977). Esta cualidad es una ventaja en comparación con las técnicas tradicionales ya que permitiría el trabajo con muestras a una escala mayor y a menor tiempo. Uno de los objetivos más importantes del diagnóstico molecular es contar con protocolos de muestreo de campo eficientes que aseguren la presencia de ADN amplificable (McMillen y col., 2006; Mello Groff, 2005; Schmidt, 2008). Una vez definidos dichos protocolos, los tiempos del diagnóstico pueden reducirse a unas pocas horas para el caso de la PCR convencional y más aún si se trata de PCR en tiempo real al poder prescindir de la etapa de electroforesis, logrando además una sensibilidad mayor (McMillen y col., 2006; Pestana

y col., 2010). El contar con técnicas de diagnóstico altamente específicas y sensibles contribuirá a la realización de estudios epidemiológicos y a la aplicación de métodos de control, que contribuyan a reducir las pérdidas económicas ocasionadas en los sistemas de cría bovina de nuestro país.

CONCLUSIÓN

Este trabajo demuestra que es posible llegar a un rápido diagnóstico de Cfv, utilizando métodos moleculares utilizando la técnica de PCR múltiple siguiendo los protocolos descritos en la literatura. Más trabajos son necesarios para poner a punto protocolos de trabajo adaptados a las condiciones de nuestro medio.

Contribución de los autores

R. Bove, F. López y C. Perera fueron responsables de la necropsia del feto, toma de muestras, pruebas de IFD y cultivos bacteriológicos. Carracelas, B.; Torres, D, G. De Souza; F. Alzugaray llevaron adelante los trabajos de PCR; Azambuja, C. realizó los trabajos de secuenciación; Bermúdez, J. asesoró los trabajos de bacteriología y A. Mederos colaboró en la organización del manuscrito y coordinación de los trabajos de laboratorio.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. R. González por realizar el trabajo de campo; a los Dres. B. Nosedá y A. Martínez de Laboratorio Azul de Argentina por asesoramiento en la técnica de IFD; a la Dra. M.C. Agueda Castagna de Vargas de la Universidad de Santa María, Brasil por el asesoramiento en la técnica de PCR y al Dr. C. Campero de INTA Balcarce, República Argentina.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aliyu SH, Yong PF, Newport MJ, Zhang H, Marriott RK, Curran MD, Ludlam H. (2005). Molecular diagnosis of *Fusobacterium necrophorum* infection (Lemierre's syndrome). Eur J Clin Microbiol Infect Dis 24: 226–229.
2. Bryner JH, O'Berry PA, Frank AH. (1964). *Vibrio* infection of the digestive organs of cattle. Am J Vet Res 25:1048-1050.
3. Campero CM, Anderson ML, Walker RL, Blanchard PC, Barbano L, Chiu P, Martínez A, Combessies G, Bardon JC, Cordeviola J. (2005). Immunohistochemical identification of *Campylobacter fetus* in natural cases of bovine and ovine abortions. J Vet Med 52:138-41.
4. Campero CM. (2000). Las enfermedades reproductivas de los bovinos: ayer y hoy. Acad Nacional Agronom Vet Anales 53:88-112.

5. Campero CM, Moore DP, Odeón AC, Cipolla AL, Odriozola E, (2003). Etiology of bovine abortion in Argentina. *Vet Res Comm* 27: 359-369
6. Carter GR, Cole JR. (1990). Diagnostic procedure in veterinary bacteriology and micology. 5th ed. New York, Academic Press, p 268-272.
7. Costa E. (2001). Seminario JICA/DILAVE. INIA Tacuarembó, Uruguay.
8. Eaglesome MD, Garcia MM. (1992). Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. Part I. *Vet Bull* 62:758-768.
9. Errico F, Repiso MV, Herrera B. (1988). Las enfermedades venéreas de los bovinos en el Uruguay. Curso sobre Fisiopatología de la Reproducción Bovina, Asunción, Paraguay, 169-191.
10. Hum S, Hornitzky M, Berg T. (2009). Bovine Genital *Campylobacteriosis*. Australia and New Zealand Standard Diagnostic Procedures, 19 p.
11. Hum S, Quinn K, Brunner J, On SL. (1997). Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. *Aust Vet J* 75:827-831.
12. Hum S, Brunner J, McInnes A, Mendoza G, Stephens J. (1994). Evaluation of cultural methods and selective media for the isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* from cattle. *Aust Vet J* 71:184-186.
13. Lander KP. (1990). The application of a transport and enrichment medium to the diagnosis of *Campylobacter fetus* infections in bulls. *Br Vet J* 146: 334-340.
14. Martinez AH, Bardon JC, Nosoda BP, Cordeviola JM, Sarmiento F, Gau JA. (1986). Herd diagnosis on Trichomoniasis and *Campylobacteriosis* in bovines utilizing the empty cow as indicator. *Vet Arg* 111:962-966.
15. McMillen L, Fordyce G, Doogan VJ, Lew AE. (2006). Comparison of culture and novel 5' Taq nuclease assay for direct detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* in clinical specimens from cattle. *J Clin Microbiol* 44:938-945.
16. Mello Groff ACM. (2005). PCR para o diagnóstico da campilobacteriose genital bovina. Mestrado em Medicina Veterinaria, Universidad de Santa María, Santa Maria, Brasil.
17. OIE (2008) Manual de la OIE sobre animales terrestres. Capítulo 2.4.5. *Campylobacteriosis* genital bovina. http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.04.05.%20Campilobact%20g.%20bovina.pdf. Última visita: julio de 2011.
18. On SL, Harrington CS. (2001). Evaluation of numerical analysis of PFGE-DNA profiles for

- differentiating *Campylobacter fetus* subspecies by comparison with phenotypic, PCR and 16S rDNA sequencing methods. *J Appl Microbiol* 90:285-293.
19. Pestana EA, Belak S, Diallo A, Crowther JR, Viljoen GJ. (2010). Early, rapid and sensitive veterinary molecular diagnostics – Real time PCR applications. Dordrecht, Springer Science+Business Media 310 pp.
20. Repiso MV, Gil A, Bañales P, D'Anatro N, Fernández L, Guarino H, Herrera B, Núñez A, Olivera M, Takeshi O, Silva M. (2005). Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas que afectan el comportamiento reproductivo en la ganadería de carne y caracterización de los establecimientos de cría del Uruguay. INIA. Serie FPTA N° 13.
21. Schmidt T. (2008). Detection of *Campylobacter fetus* in bovine preputial scrapings using PCR and culture assays. Master's Thesis, University of Pretoria, Pretoria, South Africa.
22. Stoessel, F. (1982). Las enfermedades venéreas de los bovinos: trichomoniasis y vibriosis genital. Editorial Acribia, España. 163 pp.
23. Tedesco LF, Errico F, Baglivi LP. (1977). Comparison of three sampling methods for the diagnosis of genital vibriosis in the bull. *Aust Vet J* 53:470-472.
24. Wagenaar JA, van Bergen MA, Newell DG, Grogono-Thomas R, Duim B. (2001). Comparative study using amplified fragment length polymorphism fingerprinting, PCR genotyping, and phenotyping to differentiate *Campylobacter fetus* strains isolated from animals. *J Clin Microbiol* 39:2283-2286.
25. Willoughby K, Nettleton PF, Quirie M, Mallely MA, Foster G, Toszeghy M, Newell DG. (2005). Multiplex polymerase chain reaction to detect and differentiate *Campylobacter fetus* subspecies *fetus* and *Campylobacter fetus* subsp *venerealis*: use on UK isolates of *C. fetus* and other *Campylobacter* spp. *J Appl Microbiol* 99: 758–766.

Neumonía enzoótica asociado al virus respiratorio sincitial bovino (BRSV) en terneros en Uruguay

Enzootic pneumonia associated to bovine respiratory syncytial virus (BRSV) in calves in Uruguay

Rivero R*, Sallis ESV², Callero JL³, Luzardo S³,
Giannechini R¹, Matto C¹, Adrien ML⁴, Schild AL³

Recibido: 25/02/2013

Aprobado: 15/05/2013

RESUMEN

Se describe un foco de neumonía asociado al virus respiratorio sincitial bovino (BRSV) ocurrido en Julio de 2012 en un establecimiento dedicado a cría de terneros, en el Departamento de Flores. La morbilidad fue de 6,71% y la mortalidad 6,57%. Los principales síntomas clínicos fueron tos, disnea, taquipnea, descarga nasal y ocular y fiebre. Se realizó la necropsia de dos animales que murieron por insuficiencia respiratoria. En ambos se destacaba pulmones con consolidación anteroventral, enfisema y edema caudo-dorsal. En la histopatología en pulmón se observó neumonía broncointersticial, bronquiolitis necrotizante y alveolitis exudativa con presencia de sincitios epiteliales. Cortes de

SUMMARY

An outbreak of pneumonia associated with bovine respiratory syncytial virus occurred in July 2012 in a calf-rearing farm in Flores County is described. Morbidity and mortality were 6.71% and 6.57% respectively. Main clinical symptoms were cough, dyspnea, tachypnea, nasal and ocular discharge and fever. Necropsy was performed in two animals which died from respiratory failure. Gross findings in both were antero-ventral consolidation of lungs with caudo-dorsal emphysema and edema. Histopathological study showed bronchointerstitial pneumonia, necrotizing bronchiolitis and exudative alveolitis with syncytial cells in lungs. Lung sections, fixed in formalin, were analyzed by immunohistochemistry.

1 Laboratorio Regional Noroeste DILAVE "Miguel C. Rubino", MGAP, CC 57037, CP 60000, Paysandú, Uruguay.

2 Laboratorio Regional de Diagnóstico, Facultad de Veterinaria, Universidad Federal de Pelotas, Brasil.

3 Médico Veterinario, Ejercicio Liberal, Uruguay.

4 Departamento de Salud en los Sistemas Pecuarios. Facultad de Veterinaria, UdelaR, Paysandú.

*Autor de correspondencia: rrivero@mgap.gub.uy

pulmón fijados en formol fueron analizados por la técnica de inmunohistoquímica. Se comprobó que hubo marcación positiva con el anticuerpo anti-BRSV en las células epiteliales bronquiolares y las células sincitiales de los dos terneros necropsiados, confirmando la presencia del virus en el cuadro de neumonía.

PALABRAS CLAVE:

Virus respiratorio sincitial bovino, complejo respiratorio bovino, confinamiento.

INTRODUCCIÓN

En Uruguay el crecimiento de la agricultura y la intensificación de la producción ganadera y lechera han provocado un incremento en el número de animales en confinamiento, principalmente en la etapa de cría y recría así como en la terminación de bovinos para producción de carne. Concomitantemente, se ha registrado en los últimos años un aumento en el diagnóstico de enfermedades respiratorias, siendo una de las patologías más comunes en el Litoral Oeste y Este de nuestro País¹.

En las enfermedades respiratorias de los terneros, también denominado complejo respiratorio bovino o “neumonía enzoótica”, participan varios agentes virales en asociación con bacterias y *Chlamydia psitaci*. El virus respiratorio sincitial bovino

Using this technique it was found positive labeling with anti-BRSV in bronchiolar epithelial cells and syncytial cells, confirming the presence of virus-associated pneumonia lesions. .

KEYWORDS:

Bovine respiratory syncytial virus, bovine respiratory complex, feedlot.

(BRSV) es el agente más importante, seguido del virus parainfluenza-3 (PI-3), herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1), virus de la diarrea viral bovina (BVDV) y adenovirus tipo 3. Los agentes bacterianos más importantes que causan neumonía secundaria son: *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus pneumoniae* y *Mycoplasma bovis* (Driemeier y Moojen. 2007).

El BRSV es un virus ARN, envuelto, no segmentado, de sentido negativo, que pertenece al género *Pneumovirus* de la familia *Paramyxoviridae* (Lamb y Parks 2007).

Según Valarcher y Taylor (2007) en rodeos lecheros este virus puede ser responsable por más del 60% de las enfermedades respiratorias epizoóticas y hasta un 70% en rodeos de carne. La morbilidad es alta, de 60% a 80%, mientras que la mortalidad puede alcanzar el 20% (Valarcher y Taylor, 2007). La enfermedad se diagnostica más comúnmente en otoño e invierno, aunque puede ocurrir en verano

(Stott y col., 1980). El virus se transmite por contacto directo o aerosoles y el periodo de incubación es entre 2 a 5 días (Valarcher y Taylor. 2007).

El BRSV se distribuye a nivel mundial. En Brasil el virus fue detectado por primera vez en 1988 (Gonçalves y col., 1993), mientras que el cuadro clínico-patológico se describió en 1997 (Driemeier y col., 1997). En Uruguay, si bien la enfermedad no ha sido confirmada, mediante un estudio serológico utilizando la técnica de ELISA, Costa y col. (2000) obtuvieron un 95% de seroprevalencia positiva al BRSV en una población de 100 bovinos.

Los Laboratorios Regionales Este y Noroeste, el Departamento de Patobiología del Laboratorio central de la División de Laboratorios Veterinarios “Miguel C. Rubino”, tienen en sus registros sospechas de brotes de BRSV en base a diagnósticos histopatológicos y presencia de células gigantes sincitiales, sin la comprobación de la presencia del agente viral. -

El objetivo del presente trabajo es describir un cuadro de neumonía en terneros asociado a la presencia del BRSV basado en la epidemiología, hallazgos anatomo-patológicos y confirmación por la técnica de inmunohistoquímica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de datos epidemiológicos y toma de muestras

El brote ocurrió en el mes de julio de 2012, en una propiedad donde se realizaba la suplementación alimenticia en corral, con una población de 730 terneros de entre 6 y 11 meses de edad, ubicada en la 6° Seccional Policial del Departamento de Flores. En dos visitas al predio se recabó información sobre las características del sistema productivo, de la alimentación, del manejo sanitario, así como información sobre el número de animales en riesgo, enfermos y muertos, como consecuencia de la enfermedad.

Patología

Se realizaron dos necropsias y fragmentos de los órganos fueron fijados en formol bufferado al 10%, embebidas en parafina, cortadas en secciones de 5 micras de espesor y teñidas con Hematoxilina y Eosina (HE).

Aislamiento bacteriano

Con el objetivo de detectar posibles agentes bacterianos involucrados con la afección de los animales, se sembraron muestras de los pulmones de ambos animales en medios Agar Sangre (Oxoid, UK) y Agar Mac Conkey (Oxoid, UK), las mismas se incubaron a 37°C durante 72 horas en aerobiosis (Quinn y col., 1994).

1 Comunicación Personal. Dr. Rodolfo Rivero, Laboratorio Regional Noroeste, DILAVE, Paysandú.

Inmunohistoquímica para la detección de antígenos virales

Se realizó la técnica de inmunohistoquímica para la detección de antígenos del BRSV en cortes de pulmón que estaban incluidos en parafina, de ambos terneros. Los cortes histológicos de pulmón de 5 μm de espesor, fueron desparafinados en xilol, luego en alcohol y por último fueron lavados con agua destilada. Seguidamente, se bloqueó la peroxidasa endógena con una solución de peróxido de hidrógeno, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó la recuperación antigénica con citrato (pH 6,0) en horno microondas de uso doméstico por 10 minutos en la potencia máxima (1300 Watt). El bloqueo se realizó con caseína y suero fetal bovino al 5% durante 15 minutos, cada uno. Las muestras fueron incubadas durante 2 horas a 37°C con un anticuerpo primario policlonal anti-BRSV (VMRD, Pullman, WA, USA) en una dilución de 1:50. Posteriormente, los cortes fueron incubados con el anticuerpo secundario con avidina-biotina, usando un kit comercial (ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA), durante 35 minutos a temperatura ambiente. Como cromógeno fue utilizado 3-3-diaminobencidina (DAB, Sigma-Aldrich, MO, USA). Los tejidos fueron coloreados con hematoxilina. Como control negativo fueron sometidos a la misma técnica cortes de pulmón de un animal sano.

RESULTADOS

Datos epidemiológicos

Los animales de raza cruce carnicera, se encontraban en un potrero de campo natural de 20 ha de superficie, con muy poca disponibilidad de materia seca y con acceso al agua a través de bebederos. La dieta era a base de concentrados y estaba compuesta en base materia seca por: 56% ensilaje de planta entera de sorgo, 34% ensilaje grano húmedo de sorgo y 10% núcleo vitamínico-mineral. La misma era administrada en comederos colectivos, de cemento, a razón de un 3% del peso vivo, equivalente a 4,5 kg/animal, dos veces por día. Los animales tenían diversos orígenes y al ingreso eran desparasitados con antihelmínticos. Posteriormente eran vacunados con doble dosis separadas por 21 días, con vacunas contra clostridiosis (*Clostridium chauvoei*, *septicum*, *perfringens* tipo D y C, *sordelli*, *novyi* tipo B y C y *haemolyticum*) y enfermedades respiratorias (*Pasteurella multocida*, *Manheimia haemolytica*, *Salmonella dublin* y *Escherichia coli K99*).

En total enfermaron 49 animales y murieron 48, en un período de 28 días (morbilidad 6,71% y mortalidad 6,57%). Los signos clínicos observados fueron: fiebre, tos, disnea, posición ortopneica, descarga nasal, lagrimeo, taquipnea y algunos presentaban seria dificultad respiratoria, con respiración con boca abierta (Figura 1), viéndose afectados los terneros de menor edad.

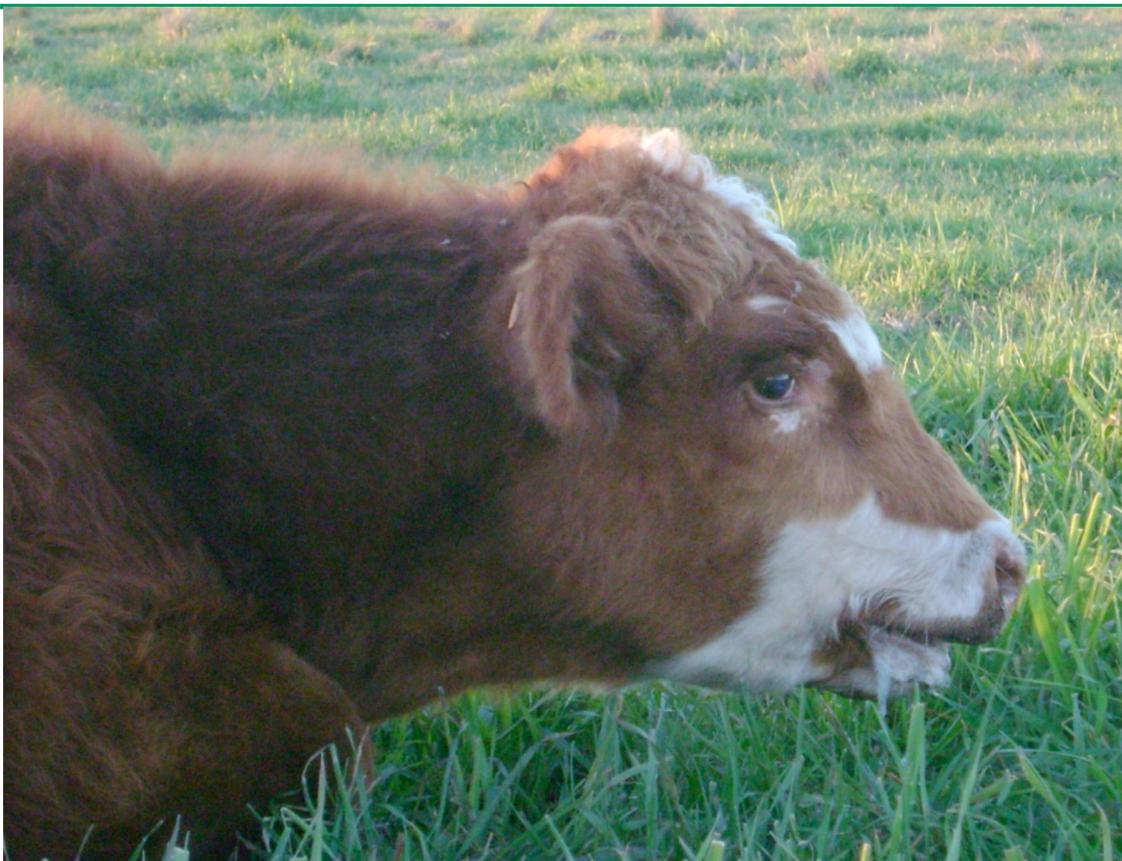


Figura 1. Ternero afectado por BRSV. El animal se encuentra en decúbito esternal, con cuello estirado, respiración a boca abierta (severa disnea) y sialorrea.

Patología

En las necropsias realizadas se observó que las mucosas ocular, bucal y peneana estaban cianóticas. Los principales hallazgos macroscópicos estaban restringidos al sistema respiratorio. En la tráquea se observó abundante espuma en el interior y la mucosa congestiva. Los lóbulos cráneo-ventrales del pulmón estaban consolidados, de color rojo intenso y textura gomosa. Las áreas caudo-dorsales no colapsaban, presentaban edema y áreas de enfisema intersticial. No había lesiones de significado patológico en el resto de los órganos. Los alteraciones histopatológicas más

significativas se restringían a los pulmones, donde se observó bronquiolitis, necrosis del epitelio bronquiolar con formación de sincitios epiteliales, alveolitis exudativa caracterizada por abundante presencia de neutrófilos, macrófagos y células sincitiales con obliteración total de la luz alveolar, severa infiltración del septo alveolar por células mononucleares, granulocitarias y macrófagos alveolares (Figura 2A y 2B). También se encontraron áreas extensas de atelectasia, con áreas de enfisema. En los bronquios y bronquiolos se observó aplanamiento del epitelio respiratorio, con presencia de células necróticas. En el intersticio había severo edema y congestión.

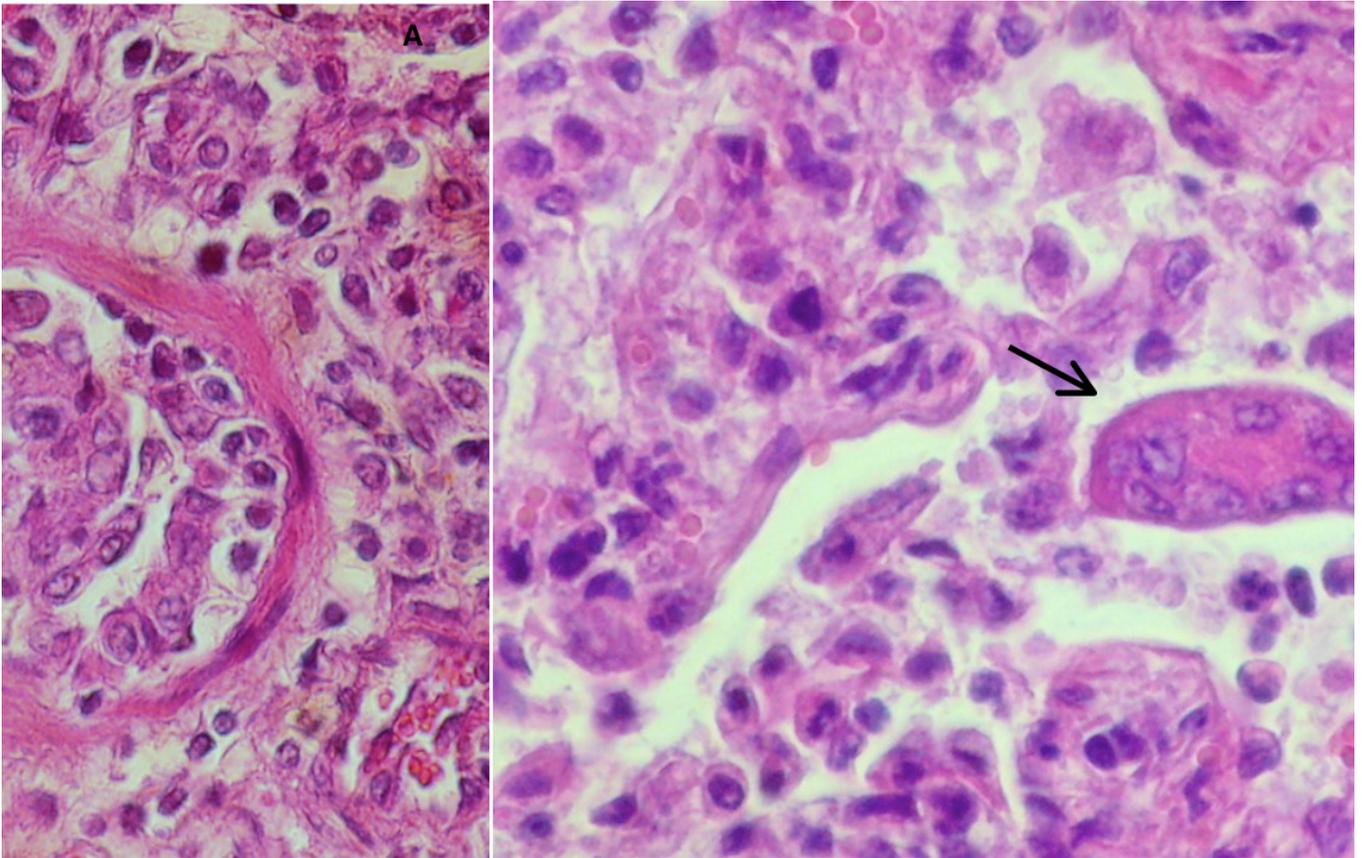


Figura 2. A: Pulmón bovino: Bronquiolitis necrotizante, aplanamiento y metaplasia del epitelio respiratorio con formación de sincitio epitelial (Flecha) HE, 600X. B: Pulmón bovino: Infiltración del septo alveolar por células mononucleares, alveolos con neutrófilos y macrófagos, presencia de sincitio epitelial (Flecha) HE, 600X.

Bacteriología

En las muestras de ambos pulmones no hubo aislamiento de colonias bacterianas de significación patógena.

Inmunohistoquímica

Los pulmones de los dos terneros analizados presentaron marcación positiva para el BRSV que fue observada en las células epiteliales de los bronquiolos y en células gigantes multinucleadas (sincitios) de ambos terneros (Figura 3A y 3B).

DISCUSIÓN

En base a los signos clínicos, hallazgos patológicos y resultados de la inmunohistoquímica se confirma la presencia del BRSV en un cuadro de neumonía enzoótica. Si bien, este es el primer trabajo que detecta la presencia de este virus en cuadros de neumonía, en Uruguay ya fue demostrada la presencia de anticuerpos para el BRSV, determinándose una alta seroprevalencia (95%) en los bovinos (Costa y col. 2000). En otros países, tales como Italia (69%), México (52%) y Ecuador (80%) se ha demostrado, también, una alta prevalencia de animales infectados

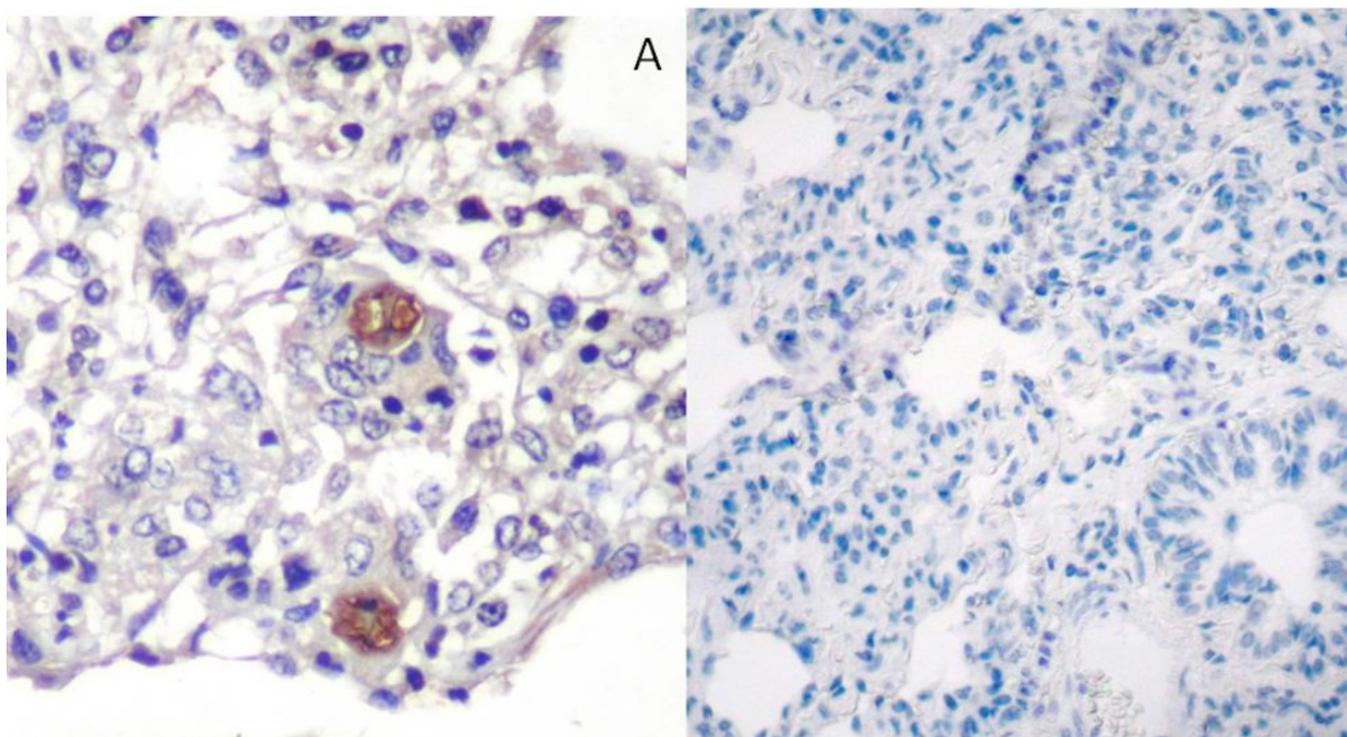


Figura 3. A. Pulmón. Inmunohistoquímica. Nótese la marcación positiva para el anticuerpo anti-BRSV en el citoplasma de células gigantes multinucleadas en la luz de alvéolos (Flechas). 400X. B. Pulmón. Inmunohistoquímica. Control negativo. 200X.

con BRSV (Luzzago y col., 2010, Figueroa-Chávez y col., 2012, Saa y col., 2012).

En este trabajo no fueron aisladas bacterias patógenas que pudieran estar asociados al cuadro de neumonía, probablemente debido a que los animales fueron tratados previamente con antimicrobianos. Es sabido que el BRSV predispone a neumonías bacterianas en animales en corrales de engorde al disminuir los mecanismos de defensa del pulmón (Caswell y Williams. 2007).

El contacto entre los animales de diferentes orígenes probablemente facilitó la transmisión del virus entre los terneros. Si bien, el potrero donde los animales estaban tenía un área de 20 ha, el número de animales era elevado lo que representó una alta carga animal

instantánea (36,5 terneros/ha) que favoreció el contacto entre los mismos. La densidad animal es uno de los factores de riesgo más importantes reportados para la presentación de la enfermedad (Valacher y Taylor. 2010, Luzzago y col., 2010, Figueroa-Chávez y col., 2012). El transporte de animales también fue mencionado como factor de riesgo (Figueroa-Chávez y col., 2012) y probablemente también haya sido de relevancia en estos casos, debido a que los terneros eran transportados desde otras propiedades para hacer la recría en ese lugar.

Factores ambientales que causan estrés y que pueden afectar el estatus inmunológico pueden favorecer la presentación de la enfermedad. Los casos se presentaron durante el invierno, lo que ha

sido reportado como una de las épocas de mayor incidencia, junto con los meses de otoño (Stott y col., 1980, Van der Poel y col., 1993, Radostits y col., 2007, Valarcher y Taylor. 2007, Van Donkersgoed y col., 1993). Otros factores han sido asociados con la enfermedad tales como condiciones higiénicas desfavorables, humedad excesiva, frío, falta de ingestión de calostro en las primeras horas de vida, errores de alimentación, ventilación insuficiente, enfermedades intercurrentes (principalmente diarreas) y otras causas de estrés (Driemeier y Moojen. 2007, Radostits y col., 2007).

La infección por el BRSV puede ser subclínica, leve o altamente fatal (Radostits y col., 2007). Los signos clínicos que presentaron los terneros fueron típicos de la enfermedad y característicos de una enfermedad respiratoria obstructiva (Radostits y col., 2007). Los terneros son los que manifiestan en general estos signos clínicos más severos, pero pueden también observarse en animales adultos (Valacher y Taylor. 2007). También se reporta que solo un porcentaje bajo de la población de terneros manifiesta signos clínicos severos de la enfermedad y los otros se infectan sin manifestarlos (Van der Poel y col., 1993).

En el brote reportado la tasa de morbilidad y mortalidad fue del 6,71% y 6,57%, respectivamente. Valacher y Taylor (2007), establecieron que la morbilidad puede variar de 60% a 80%, mientras que la mortalidad puede alcanzar el 20%. En cambio,

Larsen y col. (2001), reportaron tasas de mortalidad en terneros de 4 a 7 meses de 1,6% y 8%, en dos propiedades que vacunaban contra la enfermedad.

La mayoría de los trabajos reportan datos de relevamientos serológicos a nivel de rodeo (Luzzago y col., 2010, Figueroa-Chávez y col., 2012, Van Donkersgoed y col., 1993), o estudian la incidencia del BRSV como una causa más de neumonía en animales criados en sistemas de confinamiento (feedlot) (Gagea y col., 2006, Fulton y col., 2009), y otros trabajos se basan en la detección del virus en lavados de pulmón de animales enfermos (Uttenthal y col. 1996), pero pocos establecen datos de morbilidad y mortalidad. Gagea y col. (2006) reportaron que el BRSV representó el 9% de las enfermedades virales asociadas a cuadros de neumonía y Fulton y col. (2009) establecieron que en el 4,6% de las neumonías fatales de animales de feedlot se determinó la presencia de BRSV mediante la técnica de PCR.

Para el diagnóstico de la enfermedad, si bien la presencia de sincitios epiteliales a nivel bronquiolar y alveolar en el estudio histológico, es altamente sugestivo de infección por BRSV, no es determinante, ya que las infecciones por virus parainfluenza 3 o cuadros de bronconeumonía fibrinosa también pueden inducir la formación de sincitios a nivel alveolar (Caswell y Williams. 2007, Driemeier y Moojen. 2007). En este trabajo se demostró la presencia del virus en las propias células sincitiales

a través de la técnica de inmunohistoquímica. No fueron observados corpúsculos de inclusión eosinofílicos intracitoplasmáticos en las células sincitiales, ni en epitelio bronquiolar y alveolar como ha sido reportado por otros autores (Caswell y Williams, 2007). El tipo de marcación obtenida mediante la técnica de inmunohistoquímica fue demostrada en trabajos previos (Haines y col., 1989, Peixoto y col., 2000).

El control del BRSV se realiza a través de un manejo ambiental adecuado y la administración de calostro a los terneros en cantidad y calidad. Existe insuficiente información disponible a nivel experimental para la recomendación del uso de vacunas para el control de la neumonía enzoótica en terneros (Radostits y col., 2007). Las vacunas deberían de ser preferencialmente tenidas en cuenta en sistemas intensivos de confinamiento y alta dotación (Radostits y col. 2007).

BIBLIOGRAFÍA

1. Caswell JL, Williams KJ. (2007). Respiratory System. En: Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer NC. Pathology of Domestic Animals. 5a. ed., Philadelphia, Ed. Elsevier, pp. 523-653, Vol 2.
2. Costa M, García L, Yunus AS, Rockemann DD, Samal SK, Cristina J. (2000). Bovine respiratory syncytial virus: first serological evidence in Uruguay. Vet Res 31: 241-246.
3. Driemeier D, Pereira-Gomes MJ, Moojen V, Weiss Arns C, Vogt G, Kessler L, Maciel da Costa U. (1997). Manifestação clínico-patológica de infecção natural pelo vírus respiratório sincitial bovino (BRSV) em bovinos de criação extensiva no Rio Grande Do Sul, Brasil. Pesq Vet Bras 17:77-81.
4. Driemeier D, Moojen V. (2007). Complexo respiratório bovino. En: Riet-Correa F, Schild AL, Lemos RA, Borges JR. Doenças de ruminantes e eqüídeos, 3a. ed., Santa María, Ed. Palotti, Vol 1 pp. 490-496.
5. Figueroa-Chávez D, Segura-Correa JC, García-Márquez LJ, Pescador-Rubio A, Valdivia-Flores AG. (2012). Detection of antibodies and risk factors for infection with bovine respiratory syncytial virus and parainfluenza virus 3 in dual-purpose farms in Colima, Mexico. Trop Anim Health Prod. 44:1417-1421.
6. Fulton RW, Blood KS, Panciera RJ, Payton ME, Ridpath JF, Confer AW, Saliki JT, Burge LT, Welsh RD, Johnson BJ, Reck A. (2009). Lung pathology and infectious agents in fatal feedlot pneumonias and relationship with mortality, disease onset, and treatments. Vet Diagn Invest. 21:464-477.

7. Gagea MI, Bateman KG, van Dreumel T, McEwen BJ, Carman S, Archambault M, Shanahan RA, Caswell JL. (2006). Diseases and pathogens associated with mortality in Ontario beef feedlots. *J Vet Diagn Invest.* 18:18-28.
8. Gonçalves IPD, Simanke AT, Jost HC, Hötzel I, Dal Soglio A, Moojen V. (1993). Detection of bovine respiratory syncytial virus in calves of Rio Grande do Sul, Brazil. *Ciência Rural* 23:389-390.
9. Haines DM, Clark EG, Chelack BJ. (1989). The detection of Bovine Respiratory Syncytial Virus in formalin fixed bovine lung with commercially available monoclonal antibodies and avidin biotin complex immunohistochemistry. *Can J Vet Res* 53:366-368.
10. Lamb RA, Parks GD. (2007). *Paramyxoviridae: the viruses and their replication.* In *Fields Virology*, Fifth Edition, Philadelphia, USA. Eds. David M. Knipe, Peter M. Howley pp. 1449-1496.
11. Larsen LE, Tegtmeier C, Pedersen E. (2001). Bovine respiratory syncytial virus (BRSV) pneumonia in beef calf herds despite vaccination. *Acta Vet Scand* 42:113-121.
12. Luzzago C, Bronzo V, Salvetti S, Frigerio M, Ferrari N. (2010). Bovine respiratory syncytial virus seroprevalence and risk factors in endemic dairy cattle herds. *Vet Res Commun.* 34:19-24.
13. Peixoto PV, Mota RA, Brito MF, Corbellini LG, Driemeier D, Souza MI. (2000). Infecção natural pelo Vírus Sincicial Respiratório Bovino (BRSV) no Estado de Alagoas. *Pesq Vet Bras* 20:171-175.
14. Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. (1994). *Clinical Veterinary Microbiology.* Mosby-Year Book Europe Limited. Linton House 7-12 Tavistock Square, London WC1H 9 LB, England.
15. Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. (2007). *Veterinary Medicine.* 10ma. ed., Ed. Elsevier 2156 pp.
16. Saa LR, Perea A, Jara DV, Arenas AJ, Garcia-Bocanegra I, Borge C, Carbonero A. (2012). Prevalence of and risk factors for bovine respiratory syncytial virus (BRSV) infection in non-vaccinated dairy and dual-purpose cattle herds in Ecuador. *Trop Anim Health Prod* 44:1423-1427.
17. Stott EJ, Thomas LH, Collins AP, Crouch S, Jebbett J, Smith GS, Luther PD, Caswell, R. (1980). A survey of virus infections of the respiratory tract of cattle and their association with disease. *J Hyg Camb* 85:257-270.

18. Uttenthal A, NPB Jensen, Blom JY. (1996). Viral aetiology of enzootic pneumonia in Danish dairy herds: diagnostic tools and epidemiology. *Vet Rec* 139:114-117.
19. Valarcher JF, Taylor G. (2007). Bovine respiratory syncytial virus infection. *Vet Res* 38:153-180.
20. Van der Poel WHM, Kramps JA, Middei WG, Van Oirschot, JT, Brand A. (1993). Dynamics of bovine respiratory syncytial virus infections: a longitudinal epidemiological study in dairy herds. *Arch Virol.* 133:309-321.
21. Van Donkersgoed J, Ribble CS, Boyer LG, Townsend HGG. (1993). Epidemiological study of Enzootic Pneumonia in dairy calves in Saskatchewan. *Can J Vet Res* 57: 247-254.

Instrucciones para los autores

Veterinaria (Montevideo) tiene un sistema de arbitraje externo (peer review) ciego simple. Todos los trabajos recibidos son enviados a dos árbitros de reconocida experiencia en el tema.

Los trabajos recibidos que incluyan experimentación animal, deberán detallar claramente su ajuste a las normas internacionales de ética, así como una declaración que el mismo ha sido elaborado respetando las recomendaciones internacionales sobre investigación clínica (declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, revisión 1996) o, si fuera el caso, sobre investigación con animales de laboratorio.

Normas Generales

Los trabajos se enviarán exclusivamente por correo electrónico a: editor@revistasmvu.com.uy

Se aceptan artículos en portugués o inglés, los cuales deben incluir un resumen en inglés y español.

El texto debe ser en formato “DOC” o “RTF” y no deberá exceder de 25 páginas tamaño A4 (incluidas referencias), con margen de 2,5 cm a cada lado, de preferencia en letra Times New Roman y con caracteres de 12 puntos, con interlineado doble y

numeración continua 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 autoexplicativas. Las leyendas de las figuras también deben ser autoexplicativas 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 horizontales de color negro. En las figuras (cuando corresponda) utilizar tramas en blanco y negro y no en colores.

Se incluirán fotografías o impresiones pueden ser en color o en blanco y negro (con 300 dpi de resolución como mínimo), en un máximo de cinco que serán adjuntadas al original, con leyenda en hoja aparte.

El autor principal o de correspondencia deberá enviar una nota firmada por él y los demás autores por correo electrónico o por fax (2409 9458) indicando dirección postal completa, teléfono, fax y correo electrónico, dejando establecido que se

responsabilizan del contenido del trabajo y que el mismo no se ha publicado ni se ha remitido simultáneamente a ninguna otra publicación periódica. También deberá indicar el tipo de trabajo (Científico o Técnico). Se aceptarán trabajos que hubieran sido publicados como resúmenes 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.

Sin perjuicio de la solicitud del autor, el Editor Jefe clasificará los manuscritos recibidos en:

Trabajo Científico: artículo original, comunicación corta (reporte o caso clínico), revisión.

Trabajo Técnico o de Difusión o Nota Técnica (práctica veterinaria, diagnóstico, tecnológico, conferencia).

Comunicaciones cortas; no deberán exceder las 12 páginas.

Reportes de casos clínicos; no deberán exceder las 10 páginas

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. Una vez publicados, los autores recibirán 10 separatas.

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 especialistas en el tema, nacionales y/o internacionales y que tengan una trayectoria reconocida, dada por sus antecedentes de publicaciones en revistas arbitradas de primer nivel. Las revisiones que tengan un análisis crítico por parte del autor e incluyen 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 Jefe evaluará el trabajo y lo clasificará según su contenido en: Prácticas Veterinarias, Caso Clínico, Diagnóstico, Tecnológico, Conferencia, Educación, u otro según corresponda. Estos trabajos serán evaluados por dos árbitros con reconocida experiencia en el tema.

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 L.1, 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 se incluyen las Palabras clave (máximo cinco).

Summary

Es la traducción al Inglés del Resumen. Incluir keywords.

Resumo

Para artículos en portugués. Incluir Palavras-chave

INTRODUCCIÓN

Debe ser concisa, pero 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 internacional y nacional, eligiendo las informaciones más recientes y más relevantes. Se recomienda evitar una revisión excesivamente detallada de la literatura o un mero resumen de los resultados obtenidos por otros autores. En lugar de esto, se deben dar los fundamentos científicos del estudio y definir claramente las hipótesis de trabajo, a fin de justificar la importancia del artículo. En el

último párrafo deben precisarse los objetivos del trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los autores deben dar suficientes detalles para que otro investigador pueda repetir los experimentos. Debe estar escrito en tiempo pasado y en tercera persona del singular o plural según corresponda. Describir claramente el diseño experimental así como 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 bibliográficamente referenciados detallando las posibles modificaciones de las técnicas. 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 plantearse claramente, incluyendo los efectos considerados, las observaciones y unidad/es experimental/es. Se sugiere incluir los modelos utilizados. Deberán indicarse los niveles de probabilidad utilizados para declarar diferencias significativas y/o tendencias.

RESULTADOS

La descripción de los resultados obtenidos debe presentarse con claridad y en la forma más concisa posible. Primeramente hacer una descripción general de los mismos y luego pueden describirse en cuadros o figuras los datos de los experimentos. No deben presentarse datos repetidos o demasiado extensos. Deben usarse medidas del sistema métrico decimal u otras medidas convencionales. En todos los resultados debe señalarse el nivel de significación. Debe estar escrito en tiempo pasado y en tercera persona del singular o plural según corresponda.

Discusión

La discusión consiste en la búsqueda de una explicación de los resultados obtenidos, para lo cual se recurre a la comparación con datos de la literatura. Debe evitarse la repetición de los resultados en este ítem. Deben mostrarse las relaciones entre los hechos observados, con las hipótesis del propio experimento y/o con las teorías, resultados o conclusiones de otros autores. Formule las conclusiones en forma clara. Deben aplicarse las referencias bibliográficas al experimento y no abundar en detalles no estudiados. Deben exponerse la significación de los resultados y evitar las repeticiones. Escrito en tiempo pasado en tercera persona del singular o plural según corresponda.

CONCLUSIONES

Las conclusiones deben ser claras, concisas y precisas y deben reflejar los datos presentados en función de las hipótesis y los objetivos planteados. Se deben resumir y globalizar las conclusiones parciales que se obtuvieron de diferentes resultados del trabajo. Evitar las conclusiones demasiado generales. Debe existir una total coherencia entre los objetivos, los resultados y las conclusiones, pudiendo incluirse en este ítem recomendaciones o implicancias del trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Deberá constar el nombre de las personas y la institución a la que pertenecen haciendo mención al motivo del agradecimiento. Debe ser escrito en forma concisa y hacer referencia a materiales o equipos y al apoyo financiero.

BIBLIOGRAFÍA

En el texto: El autor o autores (si son dos), el apellido de cada uno separados por “y”, seguido de coma y el año de publicación (Ejemplo: González y Rodríguez, 2005). Si son más de tres autores se usará la forma “y col.”, seguida del año de publicación (Ejemplo: (Riet-Correa y col., 1984). En los casos en que se referencie más de una cita, se ordenarán alfabéticamente y se separarán por punto y coma.

Las citas que se utilicen como respaldo no deberían ser más de cuatro para cada contenido.

En la Bibliografía debe ponerse especial atención al texto de las referencias bibliográficas, no se aceptarán trabajos mal referenciados. Las referencias deben colocarse en orden alfabético de autores, numerando las obras citadas y consultadas en el texto. Deberán citarse de la siguiente manera: Apellido seguido un espacio y luego la(s) inicial(es) seguida(s) de coma. Ej.: González R. Si hubiera varios autores deben separarse entre sí por una coma (.). A continuación, se colocará el año de la publicación entre paréntesis. Ejemplo: González R, López A. (1989). Más de una referencia del mismo autor se ordenará en orden cronológico decreciente. Después del año se escribirá el título del artículo terminado en punto.

Las revistas científicas serán citadas según las abreviaturas convencionales, ej.: Am J Vet Res (sin punto en las abreviaturas), seguido por el volumen y los números de páginas precedidos por dos puntos. Ejemplo: Dobson JM, Samuel S, Milstein H, Rogers K, Wood JL. (2002). Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. J Small Anim Pract 43:240-246.

En el caso de la cita de libros, se indicará Autores (Año) Título, número de edición (salvo la primera), ciudad de edición, Editorial, cantidad de páginas del libro. Ejemplo: Rosemberger G. (1983).

Enfermedades de los bovinos. 2a. ed. Berlín, Ed. Paul Parey 577 p.

En el caso de la cita de capítulo de libros, se indicará Autores (Año) Título del capítulo, En: Autores (editores) del libro, Título del libro, Edición, Lugar de edición, Editor, Páginas inicial y final del capítulo precedido por pp y entre guión. Ejemplo: Dirksen G. (1983). Enfermedades del aparato digestivo. En: Rosemberger G. Enfermedades de los bovinos. 2a. ed. Berlín, Ed. Paul Parey pp. 235-242.

En la cita de congresos: Autores (Año) Título del artículo. Nombre del congreso. Número ordinal del congreso, Ciudad, País, páginas.

En la cita de una tesis: Autores (Año) Título de la tesis. Tipo de tesis (ej.: doctor veterinario), Institución, Ciudad, País.

Cuadros

Los cuadros deben tener un número de identificación correlativo que figurará en el texto y contendrán un texto de título en la parte superior. La leyenda debe situarse encima del cuadro y debe ser autoexplicativa. Los cuadros deben ser simples, sin líneas verticales y líneas horizontales separando título de las columnas de datos y en color negro. Las referencias o símbolos de los cuadros se presentarán al pie del mismo en letra de tamaño 10 puntos. Ejemplo: Cuadro I. Variación de la temperatura en función del tiempo., Ejemplo de pie de cuadro: T = temperatura, t = tiempo (en minutos). Si el cuadro

no es original, citar la fuente (Autor y año) en pie de página.

Figuras

Las figuras deben tener un número de identificación correlativo que corresponda con el texto y contener un texto de definición del contenido, con leyendas y definición de los símbolos utilizados. Las leyendas deben ser autoexplicativas y se situarán en hoja aparte de las figuras, a continuación de la bibliografía y antes de cuadros y figuras. En histogramas o gráficas de líneas usar sólo el blanco y negro y diferenciar barras con diferentes tramas y líneas punteadas, sólidas, etc. Si la figura no es original, citar la fuente (Autor y año) en pie de página.

Los cuadros y figuras deben ser enviados en blanco y negro. En lo posible en formato Openoffice o MSOffice o RTF.

Fotos

Las fotografías deben limitarse al mínimo indispensable y deben contener una escala de referencia. Deben tener un número de identificación correlativo que corresponda con el texto y contener un texto de definición del contenido en la parte inferior, con leyendas y definición de los símbolos utilizados. Si la fotografía no es original, citar la fuente (Autor y año) en pie de página. La SMVU podrá cobrar a los autores por la inclusión de material fotográfico.