

# Efecto de la infección con *Herpesvirus bovino 1* sobre el porcentaje de preñez de vacas de cría en Uruguay

## Effect of *Bovine Herpesvirus 1* infection on pregnancy rate of beef cows in Uruguay



Alonzo, P.<sup>1</sup>, Puentes, R.<sup>2</sup>, Benavides, U.<sup>2</sup>, Iznardi, F.<sup>2</sup>, García, R.<sup>3</sup>, Piaggio, J.<sup>4</sup>, Cavestany, D.<sup>5</sup>, Roses, G.<sup>5</sup>, Maisonnave, J.<sup>2</sup>

### RESUMEN

La infección de vacas con *Herpesvirus bovino 1.1* (BoHV-1.1) está asociada a infertilidad y abortos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la transmisión del virus durante el servicio a campo de vacas de cría seronegativas, utilizando toros infectados con BoHV-1.1 y determinar si el porcentaje de preñez se vio afectado. Las vacas (n = 83) fueron distribuidas al azar en tres grupos: grupo control (GC) servidas con el toro seronegativo, grupo seropositivo (GS) servidas con un toro infectado 60 días antes del servicio (seropositivo) y grupo infectado agudo (GIA) servidas con un toro infectado al momento de comenzar el servicio. La detección de anticuerpos neutralizantes (SN) anti-BoHV-1 fue utilizada como indicador de infección. La evolución del porcentaje de preñez fue evaluada mediante ecografía y tacto rectal hasta los 180 días. La circulación de BoHV-1 se demostró únicamente en el GIA, detectándose anticuerpos SN en el 70% de las vacas. A los 52 días el porcentaje de preñez del grupo GIA (33%) fue menor que el del GC (86%) encontrándose diferencias significativas  $P < 0,0001$ . No se encontraron diferencias entre el GS y el GC. El porcentaje de preñez fue afectado negativamente, durante los 2 primeros ciclos estrales, únicamente cuando se utilizó para el servicio un toro en el periodo agudo de la infección con BoHV-1.

**Palabras clave:** infección natural, BoHV-1, porcentaje de preñez

### SUMMARY

Bovine herpesvirus type 1.1 (BoHV-1.1) can cause infertility and abortions. The objective of the present work was to evaluate the viral transmission with the use of BoHV-1 infected bulls and its influence in the pregnancy rate. Eighty three cows were divided in 3 groups: negative control group (GC) was mated with a seronegative bull, seropositive group (GS) with a seropositive latently infected bull (infected 60 days prior to the experiment) and a third group with a bull with BoHV-1.1 acute infection (GIA). BoHV-1 seroneutralizing antibody detection was used as indication of viral infection. Conception was diagnosed by ultrasonography and rectal palpation every 30 days until 180 days after the end of the breeding period. BoHV-1.1 was rapidly transmitted in the GIA group as specific antibodies were detected in 70% of the cows in the first 30 days of the experiment. At 52 days, the GIA group had a lower pregnancy rate (33%) than the GC group (86%;  $P < 0.001$ ). There were no significant differences on the pregnancy rates between the GS and GC groups. Reproductive losses were observed during the first two cycles only with the BoHV-1 acute infected bull.

**Key words:** natural infection, bovine Herpesvirus BoHV-1, pregnancy rate

### INTRODUCCIÓN

En Uruguay, así como en la mayoría de los países del mundo, la infección con *Herpesvirus bovino 1* (BoHV-1) está ampliamente distribuida. El 99.1% de los establecimientos ganaderos posee al menos un animal positivo y la prevalencia serológica fue estimada en 36,6% (Repiso y col., 2005; Guarino y col., 2008). La prevalencia por categorías es de 11% en vaquillonas, 44% en vacas y 87% en toros. En base a estos resultados, se identifica la época de servicio como un evento importante para la transmisión del virus en rodeos de cría. Los toros tendrían un papel central en la diseminación de la enfermedad, ya que son la categoría de más alta seroprevalencia y pueden excretar el virus y transmitirlo a otros bovinos (Repiso y col., 2005).

La infección natural con BoHV-1 ocurre por entrada del virus a través de las vías aéreas, generalmente por aerosoles o por contacto directo con secreciones nasales u oculares (Engels y Ackermann, 1996). La infección genital ocurre por contacto directo o a través de semen contaminado (Snowdon 1965; Huck

y col., 1971; Deas y Johnston, 1973; Parsonson y Snowdon, 1975; Dennet y col., 1976).

La transmisión indirecta puede ocurrir por agua, alimentos o fomites contaminados. La inactivación del virus en el ambiente varía según la temperatura, pH, luz y humedad. En ambientes cálidos puede permanecer por 5 a 13 días y es sensible a desinfectantes derivados del fenol, amonios cuaternarios y formaldehído (Wentink y col., 1993).

Cuando la infección primaria se produce por vía respiratoria, el virus es usualmente excretado por secreciones nasales y oculares, sin embargo cuando se produce viremia, puede excretarse también por secreciones vaginales o por semen. Si la infección fue por vía venérea el virus puede excretarse en forma intermitente por la mucosa prepucial hasta 6 periodos en un año y la cantidad de virus excretado durante la reactivación es menor que durante la infección primaria (Van Oirschot, 1995). El plasma seminal o semen puede contener BoHV-1.1 por la replicación del virus en la mucosa de pene, prepucio y probablemente en la

<sup>1</sup>DILAVE, MGAP, Uruguay.

<sup>2</sup>Área de Inmunología, Departamento Ciencias Microbiológicas, Facultad de Veterinaria, Uruguay.

<sup>3</sup>Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Uruguay.

<sup>4</sup>Departamento de Bioestadística y Bioinformática, Facultad de Veterinaria, Uruguay.

<sup>5</sup>Departamento de Reproducción, Facultad de Veterinaria, Uruguay. Correo electrónico: jacmaiso@gmail.com o jacmaiso@fvet.edu.uy

Recibido: 20/4/12 Aprobado: 7/5/12

parte distal de la uretra y puede ser excretado por días o semanas (Snowdon, 1965).

Trabajos previos similares al nuestro indican que la infección con BoHV-1 a través de la monta natural en vacas no parece afectar la fertilidad (Parsonson y Snowdon, 1975). Sin embargo, se han comunicado problemas de fertilidad en rodeos seropositivos que han utilizado toros de los cuales se ha aislado BoHV-1 en semen (Biuk-Rudan y col., 1999). Miller y van der Maaten (1986) demostraron que la mortalidad embrionaria observada luego de la infección primaria con BoHV-1 se produce fundamentalmente en las tres primeras semanas de gestación y se debe a la infección del embrión o a las alteraciones secundarias (disminución de los niveles de progesterona) y a la necrosis luteal ocasionada por el proceso inflamatorio a nivel de ovario. En vacas seropositivas a BoHV-1 y sin historia de vacunación (latentemente infectadas), los índices reproductivos y el desempeño productivo no mostraron diferencias respecto a vacas seronegativas, por lo tanto, estos indicadores no fueron influenciados por esta condición (Del Fava, 2001).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la transmisión a campo de BoHV-1 y el efecto sobre el porcentaje de preñez, en vacas de cría seronegativas, utilizando toros infectados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Animales de experimentación:** Se utilizaron 83 vacas de raza Hereford de más de 4 años, con antecedente de parto previo y que se encontraban vacías y ciclando (presencia de cuerpo lúteo y folículos) al examen ginecológico por ultrasonografía. Comenzaron el período de servicio con un promedio de peso de 437 ± 54 kg y un estado corporal no menor a 5 (escala de 1 a 9) (Sanpedro y col., 2003). Se mantuvieron aisladas durante tres meses previo al comienzo del experimento y resultaron negativos a la detección de anticuerpos anti-BoHV-1 por la técnica de sero-neutralización (SN) *in vitro* y ELISA (Civtest, Laboratorio Hypra) durante al menos tres sangrados con intervalos no menores a 21 días.

**Toros (n=3):** raza Hereford, de 3 años de edad, provenientes del mismo establecimiento y sin antecedentes de haber sido utilizados para la reproducción. Al examen andrológico eran aptos para el servicio y tenían características similares de circunferencia escrotal y calidad seminal. Previo al servicio se realizaron tres raspados consecutivos para la detección de *Campylobacter fetus* y *Trichomona foetus* según la metodología descrita por Repiso y col. (2005) con resultado negativo.

**Células y virus:** Se utilizó la línea celular de riñón bovino *Madin Darby bovine kidney* (MDBK) libre del Virus de Diarrea Viral Bovina. Los cultivos fueron mantenidos con Medio Eagle Modificado (MEM-Sigma), 50 mg/mL de Gentamicina y 10% de suero fetal bovino irradiado (GIBCO). La cepa de referencia de BoHV-1.1 Los Angeles (LA) procedente de American Type Culture Collection (ATCC) fue utilizada para la infección de los toros y para la evaluación de anticuerpos neutralizantes por SN *in vitro*. La titulación viral se realizó en microplacas de 96 pozos (NUNC) por el método de Dosis Infectante de Cultivo Celular 50 (DICC<sub>50</sub>) y el título viral se calculó según el método estándar de Reed y Muench (1938) observando la presencia de efecto citopático (ECP) característico de BoHV-1.

**Infección de toros:** dos toros fueron infectados por vía ocular y nasal con una suspensión viral que contenía 10<sup>7.5</sup> DICC<sub>50</sub>/5 mL de BoHV-1.1 (cepa LA) según el protocolo descrito previamente por Guy y Potgieter (1985). Uno de ellos fue infectado 60 días antes del servicio y el otro al comienzo del servicio (toro con infección aguda). El tercero fue inoculado de la misma manera con sobrenadante de cultivo de células MDBK sin infectar (control negativo). El servicio comenzó con la entrada de los toros al rodeo (día 0) y permanecieron en el mismo durante 50 días.

**Grupos experimentales:** Las vacas fueron separadas al azar en 3 grupos y a cada grupo se le asignó uno de los toros:

Grupo control (GC): 28 vacas y toro seronegativo.

Grupo seropositivo (GS): 28 vacas y toro infectado 60 días antes del servicio (ingresa al servicio seropositivo a BoHV-1)

Grupo infección aguda (GIA): 27 vacas y toro infectado al comienzo del servicio.

Cada grupo fue mantenido en un potrero aislado de 33 hectáreas de campo natural (8 m de separación mínima entre grupos) con fuentes de agua no compartidas y suplementado con sales minerales *ad-libitum* (Cobalfosal, Deambrosi SA, Montevideo, Uruguay). Para el trabajo con los animales se compartieron las instalaciones, por lo tanto se tomaron medidas para prevenir la contaminación cruzada entre los grupos del ensayo. El grupo control pasaba primero por las instalaciones y luego se realizaba la desinfección con Cloruro de Benzalconio a la dilución recomendada, previo a la pasada de cada uno de los siguientes grupos. El GC y el GS comenzaron el ensayo al mismo tiempo y las vacas de los tres grupos fueron mantenidas hasta el día 180. Con la finalidad de disminuir el riesgo de transmisión cruzada del BoHV-1 entre los grupos del ensayo el GIA comenzó el servicio 30 días después.

**Sincronización y servicio:** Para concentrar los servicios y poder realizar el monitoreo de la evolución de la gestación en los tres grupos, previo al comienzo del ensayo todas las vacas fueron sincronizadas utilizando doble dosis (con 12 días de intervalo entre ambas) de un análogo sintético de la Prostaglandina F<sub>2α</sub> (d-cloprostenol: Sincron D-L, Laboratorio Uruguay, Montevideo, Uruguay) en la dosis y vía recomendada por el fabricante. La administración de la segunda dosis del análogo sintético de la Prostaglandina F<sub>2α</sub>, coincidió con el comienzo del servicio (día 0).

La respuesta a la sincronización fue evaluada durante el primer ciclo mediante observación directa de signos de celo a campo (2 veces/día) y con pintura en la zona dorsal en base de la cola. Se consideraron en estro aquellas vacas en las que se observaron signos de celo y/o cuando la pintura de la base de la cola estaba completamente borrada. Se calculó la frecuencia de signos de estro en cada uno de los grupos (vacas en celo/total de vacas\*100).

La actividad de monta de los toros fue evaluada durante el primer ciclo mediante la observación a campo (2 veces/día) y con la colocación en los toros de un dispositivo que marca con pintura las hembras servidas (Chin-ball). Se consideraron como servidas aquellas vacas en las que se observó la monta a campo y/o presentaban pintura del Chin-ball en la zona del lomo y flancos. Se calculó la frecuencia de monta en cada uno de los grupos (vacas servidas/vacas ofrecidas \*100).

**Diagnóstico de gestación:** la evolución del porcentaje de preñez (PP) (PP = vacas gestadas/total de vacas\*100) fue evaluada mediante ecografía a los días 35, 52 y 71. Las fechas fueron fijadas tomando en cuenta que transcurrieran al menos 30 días de la actividad cíclica observada en las vacas luego de la sincronización. A partir del cuarto mes el control de la gestación fue realizado por palpación rectal a los días 120 y 180 del ensayo.

**Evolución del peso corporal:** se pesaron todas las vacas los días - 30 (previos al servicio), 0, 30 y 60 post servicio. Se calculó la ganancia promedio tomando como valor inicial el peso individual de los 30 días previos al comienzo del experimento.

**Toma de muestras y aislamiento viral:** En el toro del grupo GS (infectado antes del comienzo del servicio) se tomaron muestras de hisopados nasal y ocular a los días 0, 7, 14, 21, 30 y 53 post-infección, para confirmar que se había infectado.

La excreción de BoHV-1 fue evaluada durante el servicio en los tres toros, por aislamiento viral en muestras de hisopados ocular, nasal, prepucial y líquido seminal tomadas a los días 0, 2, 4, 7, 14, 21, 25, 30, 38 y 49 post-comienzo del servicio. Las muestras de hisopos se transportaron refrigeradas en 2 mL de (MEM) y se centrifugaron a 500 g por 10 minutos. El sobrenadante de estas muestras y el líquido seminal se conservaron en freezer de - 80 °C hasta su procesamiento.

El aislamiento viral se realizó en placas de 24 pozos utilizando el protocolo descrito en el Manual de Estándares para Test Diagnósticos y Vacunas de OIE (2004). Los aislamientos realizados fueron identificados por Inmunofluorescencia directa (IFD) utilizando un anticuerpo policlonal anti-BoHV-1 conjugado con Isotiocianato de Fluoresceína (VMRD-USA). En las muestras que no presentaron ECP se realizaron tres pasajes sobre células frescas antes de considerarlas negativas.

**Serología:** Para determinar anticuerpos neutralizantes anti-BoHV-1, se utilizó la técnica de SN *in vitro*, virus fijo-suero variable (House y Baker 1971). El título de anticuerpos SN se calculó por el método de punto final 50 y se expresó como el recíproco de la mayor dilución de suero que neutralizó al virus y fue capaz de inhibir la aparición del ECP en el 50% de los pocillos.

La detección de anticuerpos SN anti-BoHV-1 fue utilizada como indicador de infección durante el servicio. Las muestras del día 0 de todas las vacas del experimento fueron evaluadas además utilizando un *kit* comercial de ELISA para detectar anticuerpos totales anti-BoHV-1 siguiendo las instrucciones del fabricante (Civtest, Laboratorio Hypra Uruguay). En los GC y GS se tomaron muestras por punción de la vena coccígea a los días 0, 14, 30, 49, 61 y 90 y en el GIA a los días 0, 14, 21, 30, 38, 52, 71 y 87 post-comienzo del servicio. Los tres toros fueron sangrados los días 0, 7, 9, 19, 26, 30 y 49 post-comienzo del servicio.

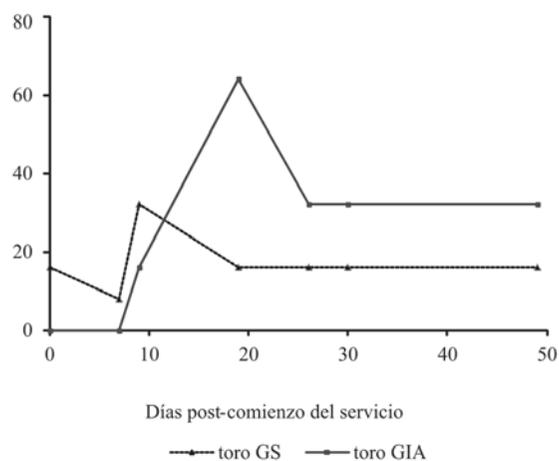
**Análisis estadístico:** Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el Software Intercooled STATA 8.0 (Stata Corp. 2007). Las tablas de frecuencia de la actividad de monta de los toros, presencia de signos de celo en las vacas y el diagnóstico de gestación en cada uno de los grupos fueron analizadas por el test exacto de Fisher, estableciendo un nivel de significación de 5%. Cuando se encontraron diferencias significativas en las tablas de frecuencia se utilizó la corrección de Bonferroni ( $\alpha = 0,0167$ ) para comparar los grupos por separado.

## RESULTADOS

Al comienzo del servicio (día 0) todas las muestras para serología de las vacas (n = 83) y de los toros del GC y el GIA resultaron negativas para la detección de anticuerpos anti-BoHV-1 por las técnicas de SN *in vitro* y ELISA. La seroconversión específica (indicador de infección con BoHV-1) fue comprobada únicamente en las vacas del GIA. Fueron detectadas como seropositivas y por lo tanto infectadas con BoHV-1 el 11% (3/27) a los 14 días, el 41% (11/27) a los 21 días y el 70% (19/27) a 30 días. El título SN más bajo detectado fue de 2 y el más alto de 64. En el 30% (8/27) restante de las vacas no se detectaron anticuerpos anti-BoHV-1. No se detectaron anticuerpos anti-BoHV-1 en las vacas y en el toro del GC y en las vacas del GS durante todo el ensayo.

En el toro del grupo GS (infectado 60 días antes del comienzo del servicio) se observó depresión y corrimiento ocular seroso por 48 horas post-infección. El BoHV-1 fue aislado e identificado del día 7 al día 21 post-infección a partir de muestras de hisopados oculares y nasales. Los anticuerpos SN anti-BoHV-1 fueron detectados los días 10, 21 y 30 post-infección, con títulos SN de 32, 64 y 32 respectivamente. El toro del grupo GIA (infectado al comienzo del servicio, día 0) presentó corrimiento ocular y nasal seroso por 3 días y se detectaron anticuerpos SN anti-BoHV-1 a partir del día 9 con un pico al día 20 post-infección, con títulos SN de 16 y 64 respectivamente. En la figura 1 se presenta la evolución del título SN durante el servicio en los toros del GS y GIA. El BoHV-1 fue aislado e identificado por Inmuno Fluorescencia Directa (IFD) únicamente en las muestras del toro que realizó el servicio en el GIA (infectado al comenzar el servicio). Los resultados del aislamiento viral se muestran en el cuadro 1. Las muestras de hisopos y líquido seminal tomadas de los toros del GC y GS durante el servicio para aislamiento viral resultaron negativas.

Al momento de la primera ecografía (día 35) la PP del GS (50%) y el GIA (26%) fue un 4% y 28% inferior a la encontrada en el GC (54%) respectivamente ( $P=0,092$ ). En la segunda ecografía (día 52) se encontraron diferencias significativas en el PP entre



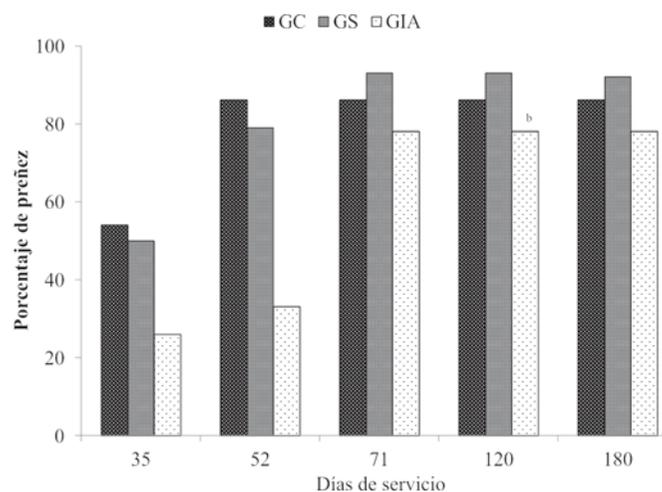
**Figura 1.** Evolución del título de anticuerpos seroneutralizantes (Título SN) anti-BoHV-1 en el toro del grupo seropositivo (GS) e infectado agudo (GIA) durante el periodo de servicio.

**Cuadro 1.** Aislamiento en cultivos celulares de BoHV-1.1 a partir de muestras del toro infectado al comenzar el servicio (GIA).

Muestras	Días									
	0	2	4	7	14	21	25	30	38	49
HO	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
HN	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
HP	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
LS	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

HO = Hisopado ocular; HN = Hisopado nasal; HP = Hisopado prepucial; LS = Líquido seminal; + = presencia de ECP característico de BoHV-1; - = ausencia de ECP.

el GIA (33%) y el GC (86%) ( $P < 0,0001$ ) y no se hallaron diferencias significativas entre el GS (79%) y el GC (86%) ( $P = 0,729$ ;  $\alpha = 0,0167$ ). Se observó por ecografía una reabsorción embrionaria en una vaca infectada con BoHV-1 (seropositiva) del GIA al día 52 del ensayo, no logrando concebir posteriormente. En la tercera ecografía (día 71) la PP del GIA aumentó a 78% y en el GS a 93% no encontrándose diferencias significativas entre los grupos ( $P = 0,313$ ). Luego de la tercera ecografía no se observaron cambios en la PP en el GC y el GIA. En el GS la disminución en la PP observada, fue ocasionada por la muerte de una vaca que se encontraba gestada, por causas ajenas a la enfermedad en estudio, al día 130 del experimento. En la figura 2 se observan los resultados del seguimiento de la gestación realizados en todos los grupos del experimento. Dentro del GIA pudieron definirse dos subgrupos de vacas: seropositivas (infectadas con BoHV-1,  $n = 19$ ) y seronegativas (no infectadas,  $n = 8$ ). Del 57% (12/21) de las vacas preñadas en el GIA, detectadas en la tercera ecografía, el 83% (10/12) de las mismas se infectaron con BoHV-1 (seropositivas). De las vacas que quedaron vacías en el GIA el 83% (5/6) se infectó con el virus (seroconvirtieron). Sin embargo, cuando se buscó asociar la ausencia de gestación con la infección por BoHV-1, no se encontraron diferencias significativas entre los subgrupos definidos anteriormente. Los resultados de la evolución de la gestación en vacas infectadas y no infectadas con BoHV-1 se muestran en el cuadro 2.



**Figura 2.** Evolución del porcentaje de Preñez en el grupo control (GC), seropositivo (GS) e infectado agudo (GIA). a: diferencias no significativas ( $P > 0,05$ ); b: diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

**Cuadro 2.** Evolución acumulada del porcentaje de Preñez (PP) en las vacas del grupo infectado agudo (GIA) según el estado de infección con BoHV-1.

	Ecografía (día 35) <sup>1</sup>		Ecografía (día 52) <sup>2</sup>		Ecografía (día 71) <sup>3</sup>	
	Seropositivas	Negativas	Seropositivas	Negativas	Seropositivas	Negativas
Gestadas	3	4	4	5	14	7
Vacías	16	4	15	3	5	1
PP (%)	16	50	21	63	74	88

<sup>1</sup>P = 0,145; <sup>2</sup>P = 0,072; <sup>3</sup>P = 0,633.

No se encontraron diferencias significativas en la actividad de monta de los toros ya que el 89%, 70% y 71% de las vacas en los GC, GS y GIA respectivamente fueron detectadas como servidas ( $P=0,171$ ). Se detectaron signos de celo en el 100%, 89% y 96% de las vacas del GC, GS y GIA respectivamente, las diferencias observadas no fueron significativas ( $P=0,121$ ). Todas las vacas aumentaron de peso desde el inicio y durante todo el servicio y la ganancia promedio observada fue de  $354 \pm 153$  g/día.

## DISCUSIÓN

El 70% (19/27) de las vacas del GIA fueron detectadas como seropositivas desde el día 14 al día 30 de comenzado el servicio, lo que demuestra que la infección con BoHV-1 se produjo en las primeras semanas del servicio, ya que como fue descrito previamente por Guy y Potgieter (1985) la respuesta humoral puede detectarse por SN *in vitro* entre los 7 a 10 días post-infección. Hage y col. (1996) utilizaron también la serología como herramienta para monitorear la transmisión del virus en un rodeo seronegativo donde se introdujeron bovinos excretando BoHV-1 y encontraron que el 100% de los bovinos expuestos seroconvirtió en 7 semanas. Sin embargo, las condiciones de alojamiento eran notoriamente diferentes ya que los bovinos utilizados se encuentran en un sistema productivo intensivo, con un mayor contacto y no a campo como en el presente ensayo.

Las posibles vías de infección en las vacas del GIA pueden haber sido tanto la respiratoria como la genital, ya que el BoHV-1 fue aislado e identificado en el toro a partir de hisopados oculares, nasales, prepuciales y líquido seminal del día 2 al 30 post-infección. La infección se realizó por vía nasal y ocular y el virus fue excretado en secreciones de una zona alejada a la puerta de entrada lo que implica que se produjo viremia. Este hecho coincide con lo ya reportado por Engels y Ackerman (1996) ya que luego de la infección primaria el virus puede quedar restringido a un área local o distribuirse en órganos alejados de la puerta de entrada por viremia o a través de los axones de neuronas. Wentink y col. (1993) han reportado que durante la infección primaria aguda el virus se excreta por 10 a 17 días y los títulos más altos son a los 4 a 6 días post-infección. En nuestro ensayo, no se tomaron muestras para realizar aislamiento viral en las vacas que fueron infectadas, pero es probable, que estas también hayan transmitido el virus, favoreciendo la diseminación de la infección dentro del GIA.

En el toro infectado 60 días antes del comienzo del servicio, se demostró seroconversión específica y se aisló BoHV-1 a partir de hisopados nasales y oculares. Por lo tanto, se puede afirmar que la infección fue efectiva y probablemente también se encontraba latentemente infectado.

Durante todo el experimento el PP en el GIA fue inferior a la del GC. Sin embargo, las diferencias son significativas únicamente al momento de la segunda ecografía ( $P<0,0001$ ) realizada al día 52. Esta ecografía evaluó las vacas que quedaron gestadas entre los 21 y 25 días del experimento, momento en el que ya se había producido la infección con BoHV-1. Debido a la sincronización realizada, las vacas observadas en celo entre el día 2 a 4 (patrón de respuesta en la sincronización con doble dosis de

análogo sintético de ProstaglandinaF2 $\alpha$ ) y que no quedaron gestadas en el GIA (20/27), repitieron el celo 19 a 21 días después (Dziuk y Bellows 1983). Por lo tanto, los dos primeros ciclos estrales en las vacas del GIA se dieron al mismo tiempo que la circulación de BoHV-1 dentro del grupo. Solo dos vacas lograron concebir en este periodo y se constató una reabsorción embrionaria. Varios trabajos han demostrado que la infección con BoHV-1.1 provoca endometritis, ooforitis, necrosis luteal y como consecuencia disminución de los niveles de progesterona que pueden ocasionar mortalidad embrionaria y afectar el siguiente ciclo estral (Miller y Van Der Maaten, 1985; Miller y Van Der Maaten, 1986; Miller y Van Der Maaten, 1987).

Los resultados obtenidos difieren de los descritos en un trabajo similar realizado por Parsonson y Snowdon (1975), quienes no encontraron pérdidas reproductivas luego del servicio por monta natural a campo de 9 vacas con un toro excretando BoHV-1. Sin embargo, se deben marcar diferencias con el trabajo de estos autores. El número de vacas utilizadas en nuestro ensayo fue notoriamente superior ( $n=27$ ). Por otro lado, la cepa de BoHV-1 empleada para la infección en el trabajo de Parsonson y Snowdon, (1975) posiblemente fuera del subtipo 2b, ya que fue un aislamiento de un toro con Balanopostitis infecciosa como único signo clínico. El subtipo 2b ha sido asociado con Balanopostitis y Vulvovaginitis, pero no con pérdidas reproductivas. En nuestro ensayo, se utilizó la cepa de referencia Los Angeles (BoHV-1.1) que pertenece al subtipo 1.1 y está asociada a cuadros respiratorios e infertilidad en bovinos (Miller y col., 1991).

A los 71 días el PP del GIA aumentó notoriamente y las diferencias con el GC desaparecieron. Algunos autores han señalado que la performance reproductiva no es afectada en vacas seropositivas y latentemente infectadas con BoHV-1 (Castro y col., 1991; Del Fava, 2001). Probablemente las vacas que se infectaron en las primeras tres semanas del servicio desarrollaron una respuesta inmune, controlaron la infección y lograron concebir. Esta afirmación está basada en que el 83% de las vacas que quedaron gestadas al final del servicio seroconvirtieron y por lo tanto se encontraban infectadas con BoHV-1.

Los resultados obtenidos muestran que durante las dos primeras ecografías la mayoría de las vacas infectadas con BoHV-1 (seropositivas) permanecieron vacías. Si bien no fue posible establecer una asociación estadística entre vacas infectadas y la ausencia de gestación al momento de la segunda ecografía, se registró una tendencia ( $P=0,072$ ) a que los resultados obtenidos no fueran debidos al azar. Es probable, que si las diferencias encontradas se mantuvieran y el número de vacas del ensayo hubiera sido mayor esta asociación podría haber sido demostrada. Se han descrito alteraciones en la calidad seminal post-infección con BoHV-1 que pueden haber influenciado los resultados del PP (Deas y Johnston, 1973). En ese trabajo la calidad seminal no fue monitoreada durante el periodo de servicio, por lo que no podemos descartar una posible influencia de este factor en los resultados obtenidos. Sin embargo, otros autores no encontraron alteraciones seminales post-infección y se ha reportado la excreción intermitente de BoHV-1 en el semen de toros utilizados en centros de inseminación sin consecuencias en la calidad seminal (Huck y col., 1971; Van Oirshot y col., 1993; Deka y col., 2005).

El título SN del toro del GS, no varió en más de dos diluciones durante el servicio y BoHV-1 no fue aislado de hisopados o líquido seminal. Por lo tanto, el trabajo de monta durante el servicio, no fue suficiente estrés para que un toro seropositivo y latentemente infectado reactivara el virus y se estimulara la respuesta inmune. El PP del GS no presentó diferencias con el GC. Esto último, sumado a que las vacas del GS permanecieron seronegativas, indicaría que el virus no se reactivó ni re-excretó en este toro y por lo tanto no se transmitió a las vacas durante el servicio. Este resultado está de acuerdo con lo reportado previamente Parsonson y Snowdon (1975).

En Uruguay, los toros han sido propuestos como importantes transmisores de la enfermedad debido a la alta prevalencia serológica encontrada en esta categoría (Repiso y col., 2005). En el presente experimento no fue comprobada la transmisión del virus durante el servicio a través de la monta natural utilizando un toro seropositivo y probablemente latentemente infectado con BoHV-1. Los anticuerpos SN presentes al momento del servicio pueden haber jugado un rol importante en el control de la reactivación y la excreción del virus, como fue reportado por Babiuk y col., (1996). Sin embargo, se ha comunicado la excreción intermitente de BoHV-1 en el semen de toros seropositivos latentemente infectados (Van Oirshot y col., 1995) y la introducción de la enfermedad a rodeos libres por el ingreso de bovinos latentemente infectados (Hage y col., 1996). Si bien, nuestros resultados no demostraron la transmisión de BoHV-1 durante el servicio a campo, está claro que los animales latentemente infectados son un riesgo en la transmisión del virus.

La ganancia de peso, la actividad cíclica de las vacas y la actividad de monta de los toros son factores que han sido reportados por Dziuk y Bellows (1983) como limitantes en la TP. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que no se observaron diferencias significativas en la actividad cíclica de las vacas ( $P=0,121$ ) y en la actividad de monta de los toros ( $P=0,171$ ) durante la primera etapa del servicio. Las condiciones en que fueron mantenidos los bovinos durante el servicio fueron similares, ya que los tres grupos fueron alojados en potreros linderos, accedieron a los mismos con el mismo tiempo de descanso y todas las vacas ganaron peso durante el servicio. Basados en estos resultados, se podría afirmar que el PP no fue influenciado por los factores antes mencionados.

Las medidas de control utilizadas fueron eficaces para prevenir la transmisión del virus entre los grupos ya que en los bovinos del GC, que se ubicó en un potrero central del establecimiento que lindaba con los potreros del GS y el GIA, no se detectó seroconversión. Mars y col. (2000) establecieron que una dis-

tancia mayor de 6,5 metros disminuye significativamente las posibilidades de transmisión del virus a través de aerosoles. En nuestro experimento los grupos se encontraban separados por una distancia mínima de 8 metros y se tomaron medidas de bioseguridad para disminuir el riesgo de transmisión por fomites.

Al momento de comenzar el ensayo se asumió que los bovinos incorporados mediante evaluación serológica (seronegativos) eran realmente no infectados con BoHV-1. Resultados anteriores muestran que debería ser evaluada la posibilidad de que un bovino seronegativo se encuentre latentemente infectado (Huck y col., 1971; Deas y Johnston, 1973; Alonzo y col., 2002). Sin embargo, esto sería difícil de implementar ya que se debería inmunodeprimir a todos los bovinos previo al ensayo y/o monitorear por largos periodos con técnicas moleculares (PCR) para determinar que no son portadores del virus (Grom y col., 2006). Basados en estos antecedentes y con la metodología empleada en el presente trabajo, no se puede rechazar la posibilidad de que alguno de los bovinos utilizados estuviera latentemente infectado con BoHV-1 previo al ensayo. Sin embargo, podemos afirmar que las vacas que se hicieron seropositivas durante el servicio, tuvieron contacto con BoHV-1 en este periodo y probablemente en estas vacas el virus estableció latencia en tejidos nerviosos.

## CONCLUSIONES

El ingreso a un rodeo de cría de un toro en el periodo agudo de la infección con BoHV-1, provocó la transmisión del virus de forma rápida y la mayoría de las vacas expuestas se infectaron.

No se detectó la transmisión del virus, en vacas de cría servidas con un toro seropositivo a BoHV-1 infectado dos meses antes de comenzar el servicio.

En condiciones de campo similares a las utilizadas en nuestro sistema de cría, el PP fue afectado únicamente cuando se utilizó para el servicio un toro en el periodo agudo de la infección con BoHV-1.1.

## Agradecimientos

Al Programa de Posgrado de la Facultad de Veterinaria – UdeLaR, ya que el presente trabajo forma parte de la tesis de Maestría en Salud Animal del Dr. Pablo Alonzo, «Herpesvirus Bovino-1.1: respuesta inmune, transmisión y pérdidas reproductivas post-infección».

Al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Uruguay quien aportó la financiación para este trabajo.

Al Ing. Agr. Juan Luis Algorta de Deambrosi S.A, por la donación de las bateas para sales minerales.

## Referencias bibliográficas

1. Alonzo P, Benavides U, Isnardi F, Puentes R, Carol H, Clavijo A, Del Campo R, Bonnevaux J, Weiblen R, Fondevila N, Romera S, Sadir A, Maisonnave J. (2002). Caracterización de un herpesvirus 1.1 (HVB-1.1) aislado de un bovino con signos nerviosos y sin respuesta inmune humoral específica. *Veterinaria (Montevideo)* 37:15-22.
2. Babiuk L, Van Drunen L, Tikoo S. (1996). Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Vet Microbiol* 53:31-42.
3. Biuk-Rudan N, Cvetnić S, Madić J, Rudan D. (1999). Prevalence of antibodies to IBR and BVD viruses in dairy cows with reproductive disorders. *Theriogenology* 51: 875-881.
4. Castro RSL, Abreu JJ, Coelho S G, Freitas C. (1991). Reproductive performance of serum positive bovine embryo donors naturally infected by BHV-1 and/or BVD viruses. *Rev Bras Reprod Anim* 15:191-198.
5. Deas DW y Johnston WS. (1973). The isolation and transmission of the virus of infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis. *Vet Rec* 92:636-639.
6. Del Fava C. (2001). Índices reproductivos e características de desempenho em bovinos de corte infectados e nao infectados pelo herpesvirus bovinus tipo 1 (HVB-1). Tesis de doctorado en Clínica Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de San Pablo, Brasil.
7. Dennet DP, Barasa JO, Johnson RH. (1976). Infectious bovine rhinotracheitis virus: studies on the venereal carrier status in range cattle. *Res Vet Sci* 20:77-83.
8. Deka D, Ramneek Maiti NK, Oberoi MS. (2005). Detection of bovine herpesvirus-1 infection in breeding bull semen by virus isolation and polymerase chain reaction. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 24:1085-1094.
9. Dziuk PJ y Bellows RA. (1983). Management of reproduction of beef cattle, sheep and pigs. *J. Anim. Sci.* (Suppl. 2): 355-379.
10. Engels M, Ackermann M. (1996). Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Vet Microbiol* 53:3-15.
11. Grom J, Hostnik P, Toplak I, Barlic-Maganja D. (2006). Molecular detection of BHV-1 in artificially inoculated semen and in the semen of a latently infected bull treated with dexamethasone. *Vet J* 171:539-544.
12. Guarino H, Núñez A, Repiso MV, Gil A, Dargatz DA. (2008). Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea virus in beef cattle in Uruguay. *Prev Vet Med* 85:34-40.
13. Guy JS, Potgieter LND. (1985). Bovine herpesvirus-1 infection of cattle: Kinetics of antibody formation after intranasal exposure and abortion induced by the virus. *Am J Vet Res* 46:893-898.
14. Hage JJ, Schukken YH, Barkema HW, Benedictus G, Rijsewijk FAM, Wentink GH. (1996). Population dynamics of bovine herpesvirus 1 infection in a dairy herd. *Vet Microbiol* 53:169-180.
15. House JA, Baker JA. (1971). Bovine herpesvirus IBR/IPV. The antibody virus neutralization reaction. *Cornell Vet* 61:320-335.
16. Huck RA, Millar P G, Evans DH. (1971). Phenopostitis associated with infectious bovine rhinotracheitis/ infectious pustular vulvovaginitis (IBR/IPV) virus in a stud of bulls. *Vet Rec* 88:292-297.
17. Manual de Standards para Test Diagnósticos y Vacunas (2004). Elaborado por la Organización Mundial de Salud Animal (OIE), Cuarta edición, capítulo 2.3.5:1381-1439.
18. Mars MH, de Jong MCM, van Maanen C, Hage JJ, Van Oirschot JT. (2000). Airbone transmission of bovine herpesvirus 1 infection in calves under field conditions. *Vet Microbiol* 76:1-13.
19. Miller JM y van der Maaten MJ. (1985). Effect of primary and recurrent infections bovine rhinotracheitis virus infection on the bovine ovary. *Am J Vet Res* 46:1434-1437.
20. Miller JM, van der Maaten MJ. (1986). Experimentally induced infectious bovine rhinotracheitis virus infection during early pregnancy: effect on the bovine corpus luteum and conceptus. *Am J Vet Res* 47:223-228.
21. Miller JM, van der Maaten MJ. (1987). Early embryonic death in heifers after inoculation with bovine herpesvirus-1 and reactivation of latent virus in reproductive tissues. *Am J Vet Res* 48:1555-1558.
22. Miller JM, Whetstone C, van der Maaten MJ. (1991). Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA. *Am J Vet Res* 52:458-461.
23. Parsonson I, Snowdon W. (1975). The effect of natural and artificial breeding using bulls infected with, or semen contaminated with, infectious bovine rhinotracheitis virus. *Aust Vet J* 51:365-369.
24. Reed LV, Muench H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hyg* 27:493-497.
25. Repiso MV, Gil A, Bañales P, D' Anatro N, Fernandez L, Guarino H, Herrera B, Nuñez A, Olivera M, Osawa T, 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. *Veterinaria (Montevideo)* 40:5-28.
26. Sanpedro D, Galli I, Vogel O. (2003). Condición corporal una herramienta para planificar el manejo del rodeo de cría. Serie técnica INTA, Buenos Aires-Argentina n° 30:10-12.
27. Snowdon WA. (1965). The IBR-IPV virus: reaction to infection and intermittent recovery of virus from experimentally infected cattle. *Aust Vet J* 41:135-142.
28. Stata Corp. (2007). Stata statistical software: release 10, College station TX: Stata Corp. LP.
29. Van Oirschot JT. (1995). Bovine herpesvirus 1 in semen of bulls and the risk of transmission: a brief review. *Vet Q* 17:29-33.

30. Van Oirschot JT, Straver PJ, Van Lieshout JAH, Quack J, Westenbrink F, Van Exel ACA. (1993). A subclinical infection of bulls with bovine herpesvirus type 1 at an artificial insemination centre. *Vet Rec* 132:32-35.
31. Wentink GH, Van Oirschot JT, Verhoeff J. (1993). Risk of infection with bovine herpesvirus 1 (BHV-1): a review. *Vet Q* 15:30-33.

# Estudio retrospectivo para la identificación de agentes infecciosos que provocan encefalitis en bovinos de Uruguay

## Retrospective study to identify infectious agents that cause encephalitis in cattle of Uruguay



Easton, M.C.<sup>1</sup>, Preliasco, M.<sup>2</sup>, Paullier, C.<sup>2</sup>, Marcolongo-Pereira, C.<sup>3</sup>, Nakazato, L.<sup>4</sup>, Rivero, R.<sup>5</sup>

### RESUMEN

Se realizó el estudio retrospectivo del periodo comprendido entre los años 1999 y 2011, con el fin de detectar los principales agentes infecciosos que afectan el sistema nervioso central de bovinos en Uruguay: virus de rabia, *Herpesvirus bovino* (BoHV), *Listeria monocytogenes* y virus de la fiebre catarral maligna (FCM). Del archivo de bloques parafinados del Departamento de Patobiología de la DILAVE «Miguel C. Rubino», fueron seleccionados 117 casos de bovinos con diagnóstico de encefalitis. Se analizaron por inmunohistoquímica (IHQ) 73 casos con lesiones histopatológicas compatibles con rabia, 20 con meningoencefalitis por BoHV, y 12 con lesiones de listeriosis. En el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Federal de Mato Grosso, Brasil, se estudiaron por PCR 12 casos con lesiones histopatológicas compatibles con FCM. Se obtuvo señal positiva a la IHQ en el 89% de los casos clasificados como rabia. De los casos compatibles con meningoencefalitis por BoHV, el 30% fue positivo a IHQ para detección de BoHV-1 y el 20% a BoHV-5. El 92% de los casos con sospecha de listeriosis mostró señal positiva para la detección de *Listeria monocytogenes*. Se detectó *Herpesvirus ovino tipo 2* por PCR en el 41% de los casos clasificados como FCM. Mediante este estudio se confirma la presencia de los citados agentes como causantes de encefalitis en bovinos del Uruguay.

**Palabras clave:** rabia, listeriosis, fiebre catarral maligna, *Herpesvirus bovino*, inmunohistoquímica, PCR

### SUMMARY

A retrospective study from 1999 to 2011 was performed to identify the main infectious agents that affect the central nervous system of cattle: rabies virus, *Bovine Herpesvirus* (BoHV), *Listeria monocytogenes* and virus of Malignant catarrhal fever (MCF). One hundred seventeen cases with bovine encephalitis were selected from the paraffin blocks files belonging to the Pathobiology Department of DILAVE «Miguel C. Rubino», Uruguay. Seventy three cases with histopathological lesions compatible with rabies, 20 with BoHV meningoencephalitis and 12 with lesions of listeriosis were analyzed by immunohistochemistry (IHC). PCR was used to study 12 cases with histopathological lesions consistent with MCF in the Laboratory of Molecular Biology of the Federal University of Mato Grosso, Brazil. Positive signal to the IHC were obtained in 89% cases classified as rabies, 30% of the cases with meningoencephalitis compatible with BoHV were positive for IHC detection of BoHV-1, and 20% to BoHV-5 and 92% of cases with listeriosis lesions showed positive signal for *Listeria monocytogenes* detection. *Ovine herpesvirus type 2* was detected by PCR in 41% of cases classified as FCM. This study confirms the presence of these agents causing cattle encephalitis in Uruguay.

**Key words:** rabies, listeriosis, malignant catarrhal fever, *Bovine Herpesvirus*, immunohistochemistry, PCR.

### INTRODUCCIÓN

Las enfermedades que afectan el sistema nervioso de los bovinos han tenido una importancia creciente desde la aparición de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) a mediados de la década de 1980 y de su posterior vinculación con la nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (Galiza y col., 2010). A partir de esto, los países exportadores de carne como es el caso de Uruguay, han tenido que realizar esfuerzos para demostrar que sus rodeos son libres de EEB. Esto implica necesariamente poseer la capacidad de realizar el diagnóstico diferencial de enfermedades que afectan al sistema nervioso de los bovinos, aún en ausencia de EEB (Barros y col., 2006; Galiza y col., 2010).

Actualmente existen numerosas técnicas disponibles para lograr el diagnóstico de enfermedades infecciosas de los animales.

El diagnóstico patológico se fundamenta en el hallazgo de alteraciones morfológicas en los tejidos, tanto a nivel macroscópico como microscópico, que permiten relacionarlas con determinadas enfermedades (Radostits y col., 2007). Sin embargo, realizar el diagnóstico definitivo requiere la incorporación de técnicas específicas que permitan identificar al agente etiológico. Dichas técnicas pueden basarse en la detección de ácidos nucleicos (Reacción en Cadena de la Polimerasa, Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real) y en la detección de proteínas (Inmunofluorescencia, Inmunohistoquímica, Inmunoblot, Ensayo por Inmunoabsorción ligado a Enzimas) (Knowles y col., 2009).

La técnica Inmunohistoquímica (IHQ) combina técnicas histológicas, inmunológicas y bioquímicas, permitiendo localizar agentes infecciosos definidos «*in situ*» mediante el empleo de anti-

<sup>1</sup>Departamento de Patobiología, División de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) «Miguel C. Rubino», Ruta 8, km 17,5. Montevideo, Uruguay.

Tel.: (598)2222 1063 int. 142. Correo electrónico: mceaston@adinet.com.uy

<sup>2</sup>Departamento de Patobiología DILAVE «Miguel C. Rubino», Montevideo, Uruguay.

<sup>3</sup>Programa de Post-graduación en Medicina Veterinaria, Facultad de Veterinaria, UF Pelotas, Brasil.

<sup>4</sup>Laboratorio de Biología Molecular, Hospital Veterinario de la UFde Mato Grosso, Cuiabá, Brasil.

<sup>5</sup>Laboratorio Regional Noroeste DILAVE «Carlos Freire Muñoz», Paysandú, Uruguay.

Recibido: 8/12/11 Aprobado: 22/3/12

cuerpos específicos y de moléculas marcadoras (Gimeno y col., 2000; Taylor y col., 2006). Es considerada una técnica sensible que permite la identificación de antígenos a partir de tejidos fijados e incluidos en parafina (Gimeno y col., 2000; Taylor y col., 2006).

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se basa en la amplificación exponencial de un determinado segmento de material genético específico, característico y único de un agente determinado, partiendo de material fresco o segmentos de tejidos fijados e incluidos en parafina (Matsubayashi y col., 1998; Crawford y col., 1999; Pelt-Verkuil y col., 2008; Knowles y col., 2009).

Las principales enfermedades infecciosas que afectan al sistema nervioso central de bovinos en la región son rabia, meningoencefalitis por *Herpesvirus bovinum* (BoHV), listeriosis y fiebre catarral maligna (FCM) (Easton y col., 2009; Sanchez y col., 2000; Galiza y col., 2010; Späth y Becker, 2010). La rabia constituye una importante zoonosis, diagnosticada por primera vez en Uruguay en octubre de 2007 (Correa Messuti, 2007), siendo la enfermedad nerviosa de etiología viral con mayor prevalencia en bovinos de Rio Grande do Sul (Sanchez y col., 2000).

El objetivo del presente trabajo fue comunicar los resultados del estudio retrospectivo realizado a partir de materiales recibidos por el Departamento de Patobiología de la DILAVE «Miguel C. Rubino» en el período 1999 – 2011, clasificados como encefalitis de origen infeccioso, determinando su etiología mediante técnicas de IHQ y PCR.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Selección y clasificación de casos

Se seleccionaron 117 casos de bovinos del archivo de bloques parafinados del Departamento de Patobiología de la DILAVE remitidos durante el período enero de 1999 a junio de 2011. El criterio de selección se basó en la historia clínica e información epidemiológica de los casos, las muestras remitidas y resultados de estudios histopatológicos, bacteriológicos y/o virológicos, compatibles con encefalitis de etiología infecciosa. En base a dicha información se clasificaron los materiales de modo de aplicar técnicas que permitieran el diagnóstico etiológico definitivo de la enfermedad sospechada.

Se estudiaron por IHQ para el diagnóstico de rabia todos los casos con lesiones histopatológicas de encefalomielitis no supurativa y/o que resultaron positivos a la técnica de inmunofluorescencia directa (IFD) en el Laboratorio de Biotecnología de la DILAVE.

Se consideraron casos compatibles con encefalitis por BoHV aquellos que presentaron datos epidemiológicos, clínicos y alteraciones histológicas relacionadas a esta enfermedad (encefalitis no supurativa, necrosis cortical, corpúsculos de inclusión intranucleares) y que resultaron negativos a la IHQ para detección de virus de rabia (Summers y col., 1995; Barros y col., 2006; Maxie y Youssef, 2007).

Los casos sospechosos de listeriosis fueron seleccionados en base a las lesiones histopatológicas consistentes en meningoen-

cefalitis supurativa con presencia de microabscesos a nivel de tronco encefálico (Summers y col., 1995; Barros y col., 2006; Maxie y Youssef, 2007).

Se clasificaron como FCM aquellos materiales con encefalitis no supurativa asociada a panvasculitis con degeneración y necrosis fibrinoide (Summers y col., 1995; Barros y col., 2006; Maxie y Youssef, 2007).

### Estudio histopatológico

Se examinaron muestras representativas de las principales regiones del encéfalo (corteza frontal, corteza parietal, corteza occipital, *corpus striatum*, hipocampo, tálamo, mesencéfalo, puente, cerebelo, obex y médula cervical) que fueron fijadas en formol bufferado al 10% y procesadas en forma rutinaria para estudio histopatológico, cortadas a 4 micras de espesor y coloreadas por Hematoxilina y Eosina (H.E.). Se estudiaron las lesiones del sistema nervioso central evaluando su magnitud de acuerdo a la percepción subjetiva obtenida de la observación de dos patólogos. Se acordó su clasificación en cuatro grupos: sin lesiones, encefalitis leve, encefalitis moderada y encefalitis severa. Además se cuantificaron los casos donde se observaron corpúsculos de inclusión, intracitoplasmáticos en rabia e intranucleares en meningoencefalitis por BoHV (Summers y col., 1995; Barros y col., 2006; Maxie y Youssef, 2007).

### Inmunohistoquímica

Se adaptaron y estandarizaron protocolos de IHQ para la detección de los antígenos estudiados a partir de diferentes metodologías descriptas: virus de rabia (Pedroso y col., 2008), BoHV-1 y BoHV-5 (Hübner y col., 2005) y *Listeria monocytogenes* (Domingo y col., 1986; Campero y col., 2002). Se cortaron secciones de 4 micras de espesor a partir de bloques parafinados y se utilizaron láminas tratadas con poli-L-lisina (Sigma®) para mejorar su adhesión. Los protocolos utilizados consistieron en desparafinación y rehidratación de los cortes histológicos, bloqueo de peroxidasa endógena con solución de peróxido de hidrógeno al 3% en metanol, recuperación antigénica por calor y/o reacción enzimática, y bloqueo de reacciones inespecíficas con solución de leche bovina descremada en polvo al 5%. Los métodos de recuperación antigénica, anticuerpo primario, su concentración y tiempo de incubación, así como los sistemas de detección empleados en cada técnica se describen en el Cuadro 1. En todos los casos se empleó 3',3'-diaminobencidina (DAB) como cromógeno.

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la detección de *Herpesvirus ovino tipo 2* (OvHV-2), agente etiológico de la FCM asociada a ovinos, se utilizó la técnica de PCR. Se cortaron secciones de 10 micras de espesor de bloques parafinados correspondientes a 12 casos con diagnóstico presuntivo de FCM por histopatología. Las muestras fueron procesadas y estudiadas por PCR en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad del Hospital veterinario de la Universidad Federal de Mato Grosso, Cuiabá, Brasil, siguiendo la metodología descrita por Mendonça y col., 2008.

Identificación de agentes infecciosos que provocan encefalitis en bovinos

**Cuadro 1.** Descripción de protocolos de IHQ empleados para la detección de los antígenos estudiados.

Agente	Recuperación antigénica	Anticuerpo primario	Concentración (condiciones de incubación)	Sistema de detección
<i>Lyssavirus</i>	Microondas (buffer Citrato pH 6.1)	Millipore® UK N° cat. 5199i	1:1000 (1 hora, 37 °C)	LSAB+System-HRP (DAKO)
BoHV-5	Proteínasa K 0,05% (15 min., 37 °C)	VMRD® USA, L6G	1:1000 (overnight, 4 °C)	Mach 4 Universal HRP-Polymer Kit (Biocare, USA)
BoHV-1	Proteínasa K 0,05% (15 min., 37 °C)	VMRD® USA, F2	1:1000 (overnight, 4 °C)	Mach 4 Universal HRP-Polymer Kit (Biocare, USA)
<i>L. monocytogenes</i>	Actinasa (30 min., 37 °C)	NIAH, Japón	1:5000 (overnight, 4 °C)	LSAB+System-HRP (DAKO)

## RESULTADOS

De los 117 casos seleccionados 73 fueron clasificados como rabia, 20 como encefalitis por BoHV, 12 como listeriosis, y 12 como FCM.

En el caso de encefalitis por rabia, la ponderación de las lesiones histopatológicas reveló que 29 (40%) de los casos presentaron encefalitis severa, 24 (33%) encefalitis moderada, 13 (18%) encefalitis leve y en 7 (9%) no se observaron lesiones (aunque fueron positivas a la técnica IFD para diagnóstico de rabia). Fueron encontrados corpúsculos de Negri en 48 casos (66%). De los 73 casos estudiados, 65 (89%) fueron positivos a rabia por IHQ (Figura 1), mientras que en 8 (11%) no se observó marcación. Todos los casos clasificados por histopatología como severos y moderados fueron positivos a la prueba de IHQ (Cuadro 2).

Se observaron lesiones compatibles con infección por BoHV en 20 casos que fueron negativos a la IHQ para detección de virus de rabia. Se clasificaron 4 casos (20%) como encefalitis leve, 9 casos (45%) como encefalitis moderada y 7 (35%) como encefalitis

severa de acuerdo a las lesiones histopatológicas. En 2 animales pertenecientes a brotes distintos se detectaron corpúsculos de inclusión intranucleares eosinófilos en neuronas y astrocitos. Seis (30%) de los 20 casos estudiados resultaron positivos a la IHQ para detección de BoHV-1. Cuatro (20%) fueron positivos a la IHQ para detección de BoHV-5 (Figura 2), 2 de los cuales se corresponden a los casos donde se observaron corpúsculos de inclusión intranucleares. No existió reacción cruzada entre los anticuerpos utilizados para detección de BoHV-1 y BoHV-5.

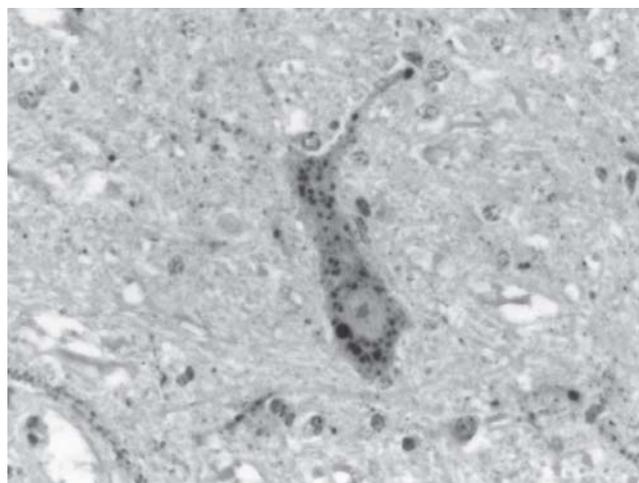
De los 12 casos de encefalitis por listeriosis, 9 (75%) presentaron lesiones severas, 2 moderadas (17%) y uno (8%) lesiones leves. Los microabscesos se localizaron principalmente en las regiones de mesencéfalo, puente, cerebelo, obex y médula cervical. Se obtuvo marcación positiva a la IHQ en 11 (92%) de los 12 casos (Figura 3).

De los 12 casos clasificados como FCM, 6 (50%) presentaron encefalitis severa, 5 (42%) encefalitis moderada y 1 (8%) lesiones leves. En 5 casos (41%) se logró la detección por PCR de OvHV-2.

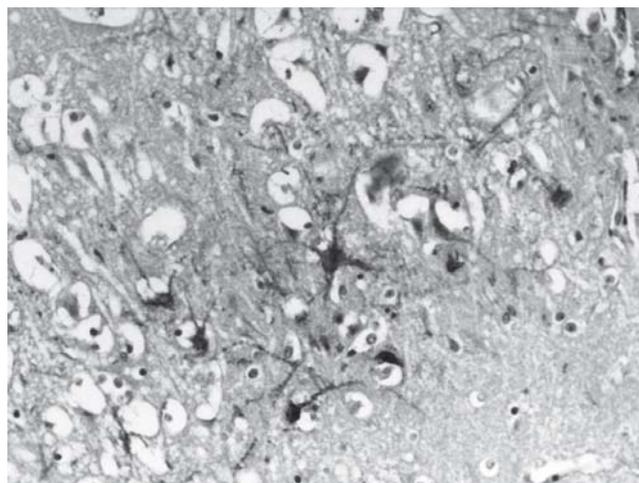
**Cuadro 2.** Casos de encefalitis por rabia. Caracterización de lesiones y su relación con el resultado a la IHQ.

Resultados de IHQ	Evaluación de lesiones histopatológicas en sistema nervioso central (N° casos)				Total
	Sin lesiones (positivos a IFD)	Encefalitis Leve	Encefalitis Moderada	Encefalitis Severa	
Positivo (N° casos)	2	10	24	29	65
Negativo (N° casos)	5	3	0	0	8
<b>Total</b>	<b>7</b>	<b>13</b>	<b>24</b>	<b>29</b>	<b>73</b>

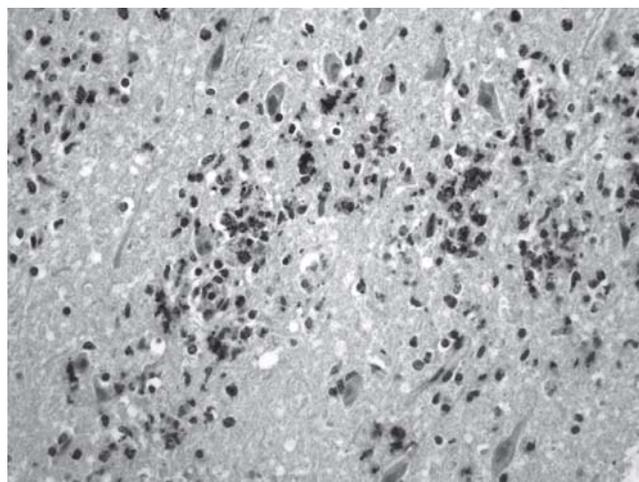
Ref.: IHQ = Inmunohistoquímica; IFD = Inmunofluorescencia Directa.



**Figura 1.** Bovino. IHQ para detección del virus de rabia positiva en neurona de la región del puente (IHQ, DAB, 400X).



**Figura 2.** Bovino. Marcación IHQ positiva a BoHV-5 en neuronas de Corteza Frontal (IHQ, DAB, 200X).



**Figura 3.** Bovino. Focos de necrosis en tronco encefálico con marcación positiva a la IHQ para *L. monocytogenes* (IHQ, DAB, 200X).

## DISCUSIÓN

El presente trabajo permite demostrar que los principales agentes infecciosos asociados a encefalitis en bovinos descriptos en la región (Sanchez y col., 2000; Galiza y col., 2010; Späth y Becker, 2010) se hallan también presentes en Uruguay. Los hallazgos histopatológicos asociados a la acción de dichos agentes son similares con los descriptos (Summers y col., 1995; Barros y col., 2006; Maxie y Youssef, 2007). Si bien se observaron lesiones histológicas de meningoencefalitis no supurativa en la mayoría de los casos (91%) clasificados como rabia, las mismas no son suficientes para realizar el diagnóstico histopatológico si no se hallan acompañadas por la presencia de corpúsculos de inclusión intracitoplasmáticos característicos. En los casos estudiados esta situación sólo se dio en el 66%, resultados similares a lo reportado (Langohr y col., 2003). De este modo, la realización del diagnóstico de rabia a partir de la presencia o ausencia de corpúsculos de inclusión puede resultar en aproximadamente un 30% de falsos negativos (Langohr y col., 2003). La demostración del antígeno viral por IHQ permite la confirmación del diagnóstico de rabia ya que, mediante la utilización de anticuerpos específicos, demuestra la presencia del agente en los tejidos. A su vez, permite el análisis retrospectivo de casos sospechosos, siendo especialmente importante cuando no fue posible estudiar las muestras por inmunofluorescencia directa o inoculación intracerebral de lauchas, además de contribuir al diagnóstico cuando los resultados de dichas pruebas fueron negativos (Pedroso y col. 2009). Dentro de este estudio, comprendido entre los años 1999 y 2011, no se detectaron casos positivos a IHQ para detección de virus de rabia que no hubiesen correspondido a la epidemia registrada en el período 2007 – 2010 en los departamentos de Rivera, Tacuarembó, Artigas y Salto (Correa Messuti, 2007).

En el presente trabajo se diagnosticó rabia por IHQ en el 89% de los casos, existiendo 8 casos negativos a la IHQ que fueron positivos a la IFD y que a su vez no presentaron lesiones o presentaron lesiones leves a la histopatología (HP). Estas posibilidades diagnósticas coinciden con los reportes de la bibliografía disponible (87 - 98% para IHQ y 87% - 100% para IFD según Pedroso y col., 2008).

Meningoencefalitis por BoHV es común en bovinos de la región (Sanchez y col., 2000; Rissi y col., 2007; Easton y col., 2009; Galiza y col., 2010; Späth y Becker, 2010). Brotes esporádicos de esta enfermedad han sido descriptos en Uruguay pero, si bien se ha logrado aislar BoHV, hasta el momento no se ha logrado caracterizar el subtipo del virus actuante. El diagnóstico por HP se basó en la asociación de lesiones específicas con la historia clínica e información epidemiológica. Los corpúsculos de inclusión intranucleares en astrocitos y neuronas son característicos pero no siempre se observan en animales infectados con BoHV, presentándose con mayor frecuencia en las etapas iniciales de la infección (Barros y col., 2006; Rissi y col. 2007). En el presente trabajo se observó que de los 20 casos clasificados como encefalitis por BoHV, el 10% (2 casos) presentaron corpúsculos de inclusión a la histopatología, resultados que coinciden con la bibliografía (Barros y col., 2006; Rissi y col., 2007). Sin embargo, se obtuvo marcación IHQ específica en 10 (50%), demostrando que el uso de anticuerpos monoclonales

contra BoHV-1 y BoHV-5 mejora las posibilidades de realizar un diagnóstico etiológico cuando solo se cuenta con material parafinado. Si bien ya se había reportado la presencia de BoHV-5 en Uruguay mediante la detección de infecciones latentes en ganglios trigéminos de bovinos enviados a faena (Furtado y col., 2011), ésta sería la primera comunicación acerca de la detección de éste antígeno viral asociado a lesiones de encefalitis en bovinos de Uruguay.

Los hallazgos histopatológicos de los casos clasificados como encefalitis asociada a *Listeria monocytogenes* fueron coincidentes con los descritos en la literatura (Summers y col., 1995; Barros y col., 2006; Maxie y Youssef, 2007). En el presente estudio se logró la detección de este agente por IHQ en el 92% de los casos. Dada la dificultad que muestra el aislamiento bacteriológico de *Listeria sp.*, la IHQ se presenta como una técnica importante para la realización del diagnóstico definitivo, siendo incluso considerada una técnica más sensible que el aislamiento bacteriológico (Weinstock y col., 1995).

La lesión característica de FCM es panvasculitis, en base a lo cual se seleccionaron los casos (Garmatz y col. 2004). La gravedad y extensión generalizada de las lesiones determina que el estudio histopatológico constituya un buen método de diagnóstico (Barros y col. 2006). En 11 de los 12 casos estudiados la encefalitis fue moderada a severa, encontrándose solo un caso en que la encefalitis fue leve, siendo fundamental el estudio de otros órganos (hígado, riñón, linfonódulos) para respaldar el diagnóstico. Se logró la detección del virus por PCR en 5 de los 12 casos. La naturaleza de las muestras utilizadas (tejidos fijados e incluidos en parafina), así como el tamaño y la región del segmento de ADN amplificado, son factores que podrían determinar la disminución en la sensibilidad de la PCR (Matsubayashi y col., 1998; Crawford y col., 1999). Esta es la primera instancia en que se logra confirmar la presencia de este virus en Uruguay.

## CONCLUSIONES

Mediante este estudio se confirma la presencia de los agentes estudiados como causantes de encefalitis en bovinos de Uruguay.

La técnica IHQ mostró ser una técnica útil para el diagnóstico etiológico de rabia, pudiendo ser empleada como una herramienta complementaria, principalmente en los casos donde existe solamente meningoencefalitis no supurativa, sin la presencia de corpúsculos de inclusión, en casos en que las técnicas de IFD e inoculación en lauchas sean negativos, y en la realización de estudios retrospectivos a partir de tejidos fijados y embebidos en parafina.

Dentro del período estudiado (enero de 1999 – junio de 2011) no se detectaron casos positivos a IHQ para detección de rabia ajenos a la epidemia registrada en Uruguay entre los años 2007 – 2010.

Se realiza el diagnóstico de encefalitis asociada a BoHV diferenciando los tipos 1 y 5 mediante la utilización de anticuerpos monoclonales. Se identifica por primera vez la presencia del BoHV-5 asociado a encefalitis en bovinos en Uruguay.

Dadas las dificultades para el aislamiento bacteriológico que presenta *Listeria monocytogenes*, la IHQ se presenta como una técnica alternativa para la realización del diagnóstico etiológico.

Se detecta por primera vez el agente etiológico de fiebre catarral maligna asociada a ovinos (OvHV-2) en bovinos del Uruguay por la técnica de PCR a partir de tejidos fijados e incluidos en parafina.

## Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por INIA, en el marco del Proyecto «Estudio prospectivo y retrospectivo para la identificación de agentes infecciosos que provocan encefalitis en bovinos» (Proyecto INIA-FPTA 274).

Para la realización del presente trabajo se contó con la invaluable colaboración de la Sra. Daysi Piñeiro quien tuvo a cargo la realización de las láminas histológicas.

## Referencias Bibliográficas

1. Barros CSL, Driemeier D, Dutra I, Lemos RA. (2006). Doenças do sistema nervoso de bovinos no Brasil. 1a. ed. San Pablo, Ed. AGNES, 207 pp.
2. Campero CM, Odeón AC, Cipolla AL, Moore DP, Poso MA, Odriozola E. (2002). Demonstration of *Listeria monocytogenes* by immunohistochemistry in formalin-fixed tissues from natural cases of ovine and bovine encephalitis. *J Vet Med B.* 49:379-383.
3. Correa Messuti CA. (2007). Informe de notificación de ocurrencia de rabia en Uruguay a la OIE. World Animal Health Information Database Interface (WAHID) [http://web.oie.int/wahis/public.php?page=single\\_report&pop=1&reportid=6404](http://web.oie.int/wahis/public.php?page=single_report&pop=1&reportid=6404).
4. Crawford TB, Li H, O'Toole D. (1999). Diagnosis of malignant catarrhal fever by PCR using formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Vet Diag Invest* 11:111-116.
5. Domingo M, Ramos JA, Dominguez L, Ferrer L, Marco A. (1986). Demonstration of *Listeria monocytogenes* with the PAP technique in formalin fixed and paraffin embedded tissues of experimentally infected mice. *Zentralbl Veterinarmed* 33:537-542.
6. Easton C, Alonzo P, Godiño L, Paullier C. (2009). Diagnóstico de casos con signos nerviosos en bovinos y ovinos remitidos a la DILAVE «Miguel C. Rubino» entre los años 2001 y 2008. *Jornadas Uruguayas de Buiatría.* XXXVII, Paysandú, Uruguay, pp.156-159.
7. Furtado A, Campos F, Llambi S, Maisonnave J, Roehe P, Puentes R. (2011). Detección de infecciones latentes de Herpesvirus bovino 5 (BoHV-5) en ganglios trigéminos de bovinos enviados a faena en el Uruguay. XV Congreso Latinoamericano de Buiatría, Paysandú, Uruguay, 270-271.
8. Galiza GJN, Silva MLCR, Dantas AFM, Simões SVD, Riet-Correa F. (2010). Doenças do sistema nervoso de bovinos no semiárido nordestino. *Pesq Vet Bras* 30:267-276.
9. Garmatz SL, Irigoyen LF, Rech RR, Brown CC, Zhang J, Barros CSL. (2004). Febre catarral maligna em bovinos no Rio Grande do Sul: transmissão experimental para bovinos e caracterização do agente etiológico. *Pesq Vet Bras* 24: 93-106.

10. Gimeno EJ, Massone AR, Portiansky EL. (2000). Manual de Introducción de las Técnicas inmunohistoquímicas y aplicaciones en Patología Veterinaria. Universidad de La Plata, Argentina, 105 pp.
11. Hübner SO, Pescador C, Corbellini LG, Driemeier D, Spilki FR, Roehe PM. (2005). Otimização da imunohistoquímica para detecção de herpesvirus bovino tipo 5 (BHV-5) em tecidos do sistema nervosa central fixados com formaldeído. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 57:1-6.
12. Knowles D, Li H, Pastoret P. (2009). Biotechnology in the diagnosis of infectious diseases and vaccine development. En: OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Cap. 1.1.7; [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/1.1.07\\_BIOTECHNOLOGY.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.1.07_BIOTECHNOLOGY.pdf).
13. Langohr IM, Irigoyen LF, Lemos RAA, Barros CSL. (2003). Aspectos epidemiológicos, clínicos e distribuição das lesões histológicas no encéfalo de bovinos com raiva. *Ciência Rural* 33:125-131.
14. Matsubayashi H, Watanabe H, Nishikura K, Ajioka Y, Maejima T, Kijima H, Saitoh T. (1998). Advantages of immunostaining over DNA analysis using PCR amplification to detect p53 abnormality in long-term formalin-fixed tissues of human colorectal carcinomas. *J Gastroenterol* 33:662-669.
15. Maxie MG, Youssef S. (2007). Nervous system. En: Jubb, K.V.F.; Kennedy, P.C.; Palmer, N.C. Pathology of domestic animals. 5a ed., Ed. Saunders Elsevier Philadelphia, USA. pp 281-457.
16. Mendonça FS, Dória RGS, Schein FB, Freitas SH, Nakazato L, Boabaid FM, Paula DAJ, Dutra V, Colodel EM. (2008). Febre catarral maligna em bovinos no Estado de Mato Grosso. *Pesq Vet Bras* 28:155-160.
17. Pedrosa PMO, Pescador CA, Bandarra PM, Raymundo DL, Borba MR, Wouters F, Bezerra Jr OS, Driemeier D. (2008). Padronização da técnica imuno-histoquímica para raiva em amostras de sistema nervoso central de bovinos fixados em formol e emblocados em parafina. *Pesq Vet Bras* 28:627-632.
18. Pelt-Verkuil E, Belkum A, Hays JP. (2008). Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. 1a ed. Antilles, Ed. Springer, Holanda 325 pp.
19. Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. (2007). Clinical examination and making a diagnosis. En: Radostits, O.M.; Gay, C.C.; Hinchcliff, K.W.; Constable, P.D. Veterinary Medicine. 10a ed. Ed. Saunders Elsevier, Londres, UK pp 3-37.
20. Rissi DR, Rech RR, Flores EF, Kommers GD, Barros CSL. (2007). Meningoencefalite por herpesvirus bovino-5. *Pesq Vet Bras* 27:251-260.
21. SanchezAWD, Langohr IM, Stigger AL, Barros CSL. (2000). Doenças do sistema nervosa central em bovinos no Sul do Brasil. *Pesq Vet Bras* 20:113-118.
22. Späth EJA, Becker BE. (2010). Análisis descriptivo y epidemiológico de 8 años (1997 al 2004) de diagnósticos de enfermedades de los animales realizados en el Grupo de Sanidad Animal. Boletín del SDVE, INTA Balcarce, Argentina; [http://www.inta.gov.ar/balcarce/gsa/sdve/BoletinSDVE1997\\_2004.pdf](http://www.inta.gov.ar/balcarce/gsa/sdve/BoletinSDVE1997_2004.pdf).
23. Summers BA, Cummings JF, de Lahunta A. (1995). Inflammatory diseases of the central nervous system. En: Summers BA, Cummings JF, de Lahunta A. Veterinary Neuropathology. 1a ed. Ed. Mosby, St. Louis, USA pp 95-188.
24. Taylor CR, Shi SR, Barr, NJ, Wu N. (2006). Techniques of Immunohistochemistry: Principles, Pitfalls and Standardization. En: Dabbs D. Diagnostic Immunohistochemistry. 2a ed., Ed. Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, USA. pp 1-42.
25. Weinstock D, Horton SB, Rowland PH. (1995). Rapid diagnosis of *Listeria monocytogenes* by immunohistochemistry in formalin-fixed brain tissue. *Vet Pathol* 32:193-195.

# Respuesta inmune de caninos vacunados contra el virus de la rabia

## Canine immune response to rabies vaccination



TÉCNICO

Moreno, J.<sup>1</sup>, Burghi, N.<sup>1</sup>, Piaggio, J.<sup>2</sup>, Puentes, R.<sup>1\*</sup>

### RESUMEN

La Rabia es una enfermedad infecciosa viral que se caracteriza por cuadros de encefalitis conduciendo a la muerte de los animales afectados. La forma más eficaz para reducir las muertes anuales de casos de rabia en humanos es a través de vacunaciones en perros y gatos. En nuestro país la vacunación en caninos se realiza parcialmente, lo que pone en riesgo la protección de todos los animales susceptibles a la enfermedad, implicando un potencial riesgo para la Salud Pública. El objetivo de este trabajo fue determinar el título de anticuerpos contra la rabia en 140 caninos con historia de vacunación y comparar con los títulos protectores establecidos por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). De las 140 muestras analizadas, 50 (36%, IC 95%: 28 - 44%) presentaron títulos de anticuerpos superiores a 0.5 UI/mL, indicando un nivel de protección aceptable según la OIE. El restante (64%) de los animales con historia de vacunación, no tienen títulos con niveles de protección (mayores o igual a 0.5 UI/mL). Los resultados del presente trabajo, dejan de manifiesto el posible riesgo de infección que tiene la población canina estudiada. Medidas sanitarias más rigurosas deberían ser consideradas para lograr un estado inmunitario aceptable en esta población.

**Palabras clave:** Rabia canina, protección, respuesta inmune, Uruguay

### SUMMARY

Rabies is a viral infectious disease characterized by encephalitis, this leads the affected animals to death. The vaccination of dogs and cats is the most effective measure to reduce the number of human deaths due to this disease. In our country dog's vaccination is done partially, this jeopardizes the protection of all susceptible animals implying a potential risk to public health. The aims of this study were to determine the antibodies titles against rabies in 140 dogs with vaccination history and compare them to the protective levels established by the World Organization for Animal Health (OIE). Out of the 140 samples tested, 50 (36%, 95% CI: 28 - 44%) had antibody titers above 0.5 IU/mL, indicating an acceptable level of protection according to the OIE. The remaining samples (64%) did not show titles with protection levels (greater than or equal to 0.5 IU/ mL). The results presented here, reveals the possible risk of infection in the studied dog population. More rigorous sanitary measures should be considered to achieve an acceptable immune status in this population.

**Key words:** Canine rabies, protection, immune response, Uruguay

### INTRODUCCIÓN

La rabia es una grave enfermedad zoonótica que causa encefalitis mortal. La mortalidad humana por rabia se estima en 55.000 muertes por año en todo el mundo y más del 95% de estas muertes son causadas por perros rabiosos (Knobel y col., 2005). En América Latina la rabia sigue siendo uno de los problemas más importantes de salud pública. Aunque en muchas zonas urbanas se ha interrumpido la circulación del virus en perros con medidas de control apropiadas, incluida la vacunación masiva, las zonas endémicas persisten en varios países debido a las deficiencias en la vacunación y las condiciones sociales y ambientales en que viven las personas (Belotto y col., 2005).

El último caso de rabia humana en Uruguay fue en 1966 y el último caso de rabia canina ocurrió en 1983 en Rocha (OPS, 2005). En el año 2007 se diagnosticó por primera vez rabia pasesiante en herbívoros en el departamento de Rivera, afectando en esa oportunidad a bovinos y equinos de la zona y la fuente de infección yacía en los murciélagos (Vitale y col., 2008).

En el departamento de Rivera, en el año 2008 se hizo el primer diagnóstico de Rabia en murciélagos no hematófagos. Por su comportamiento migratorio y sinantrópico, es probable que éstos lleguen a estar en contacto con perros (González y col., 2009).

En nuestro país, la vacunación en caninos se realiza parcialmente, ya que no es obligatoria, lo que pone en riesgo la protección de todos los animales susceptibles a la enfermedad, implicando un potencial riesgo para la Salud Pública. Por otro lado, no existen controles oficiales sobre el estado inmunitario de la población canina vacunada, de forma que no se conoce si los animales vacunados, están protegidos de una posible exposición al virus o si son necesarias revacunaciones para garantizar esa protección. Al ser esta una enfermedad reemergente en Uruguay, el riesgo de contagio en los caninos es posible.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar el título de anticuerpos contra la rabia en 140 caninos con historia de vacunación y comparar con los títulos protectores establecidos por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE).

<sup>1</sup>Área de Inmunología, Depto. de Ciencias Microbiológicas, Facultad de Veterinaria, UdelaR. Lasplacas 1550. CP11600. Tel. +(598) 2 6281303 – Montevideo – Uruguay. \*Autor para correspondencia: rpuentes@adinet.com.uy

<sup>2</sup>Área de Bioestadística – Facultad de Veterinaria – UdelaR.

Recibido: 19/11/11 Aprobado: 15/5/12

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención de muestras y datos recabados

Se colectaron muestras de sangre sin anticoagulante de 140 caninos hembras y machos con vacunación completa<sup>1</sup> contra la rabia, de distintas razas y edades, procedente del centro hospital veterinario (Facultad de Veterinaria, Universidad de la República) y clínicas veterinarias particulares del Departamento de Montevideo e interior.

Se procedió a la extracción de sangre a través de la vena cefálica. Luego de obtenida la muestra de sangre, se colectaron en tubos para la posterior extracción del suero mediante centrifugación a 3000 rpm. Se rotularon adecuadamente y se conservaron a -20 °C hasta su procesamiento. Paralelo a esto se realizó una ficha para cada animal documentando la edad (menores de 1 año, mayores de 1 año y menores de 3 años, mayores de 3 años y menores de 6 años y mayores de 6 años), raza, sexo, localidad, marca de la vacuna empleada y tiempo transcurrido desde la vacunación hasta la extracción, categorizándolo en menor a 6 meses de vacunados, entre 6 meses y 1 año, y mayor a 1 año de vacunados.

### Detección de anticuerpos antirrábicos

Las muestras fueron procesadas utilizando un kit de ELISA comercial avalado por la OIE, para la detección y valoración *in vitro* de anticuerpos anti-rabia (*Platelia Rabies II Kit ad usum veterinarium Ref.: 355-0180, Marnes-la Coquette, France*) (Feysaguet y col., 2005). Se realizó la técnica, siguiendo las instrucciones del fabricante (Bio Rad, France). Los títulos de suero se expresaron en unidades equivalentes por mL (UE/mL), unidad equivalente a las unidades internacionales (UI/mL) definidas por seroneutralización *in vitro*. Los sueros con títulos mayores o iguales a 0.5 UE/mL fueron considerados protegidos, siguiendo las recomendaciones de la OIE. Además se utilizó el criterio de clasificación recomendado por el kit sobre nivel de protección, donde los títulos mayores a 4 UI/mL se consideran con un nivel elevado, aquellos que están entre 0.5 y 4 UI/mL son considerados con nivel suficiente, los que son menores a 0.5 pero mayores a 0.125 UI/mL con nivel insuficiente y en los menores a 0.125 UI/mL se consideran sin detección de anticuerpos.

### Análisis estadístico

Se realizó el análisis descriptivo de las variables estudiadas a través porcentajes, cuadros y figuras. Las proporciones fueron estimadas con un nivel de confianza del 95 % utilizando la Distribución Binomial. Para hallar la proporción verdadera de los animales protegidos se utilizó la fórmula  $P_v = \frac{PA + (E-1)}{E + (S-1)}$ , donde PA es la proporción aparente, E y S son la especificidad y la sensibilidad de la prueba respectivamente (Rogan y Gladen, 1978).

Para comparar los niveles de protección entre categorías para las variables estudiadas (sexo, edad y tiempo de vacunación previo a la extracción de sangre), se utilizó la prueba de  $\chi^2$  con un nivel de significación de 5% (se usó el  $\alpha$  con corrección de

Bonferroni para las comparaciones entre las categorías). El análisis estadístico fue realizado con el software STATA v 11.2 (StataCorp, 2009).

## RESULTADOS

De las 140 muestras analizadas, 50 (36%, IC 95%: 28 - 44%) presentaron títulos de anticuerpos superiores a 0.5 UI/ mL, indicando un nivel de protección aceptable según la OIE (Figura 1). El restante (64%) de los animales con historia de vacunación, no tienen títulos con niveles de protección (mayores o igual a 0.5 UI/ mL). La proporción verdadera de protección (corregida según especificidad y sensibilidad de la prueba de ELISA) fue de 39,6%.

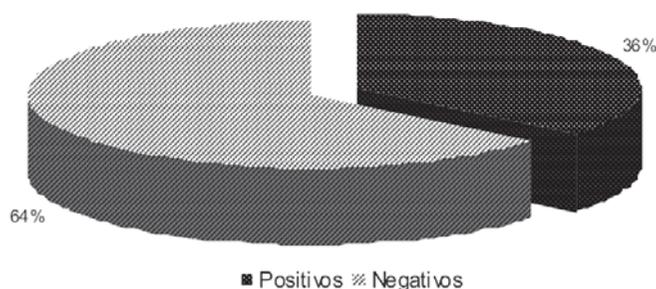


Figura 1. Porcentaje de protección contra la rabia en la población canina estudiada.

Del total de muestras analizadas, sólo 12 (9%) presentaron un título de anticuerpos elevado (>4 UI/ mL), 38 (27%) tuvieron un nivel suficiente de protección (0.5-4 UI/ mL), 35 muestras (25%) tuvieron un nivel insuficiente de anticuerpos para generar protección (0.125-0.5 UI/ mL) y en 55 (39%) no se detectaron niveles de anticuerpos antirrábicos (<0.125 UI/ mL).

De los 140 sueros analizados, 82 fueron sueros de caninos hembras, lo que corresponde al 59% y 58 fueron sueros de caninos machos, que representan el 41% restante. No se encontraron diferencias significativas en cuanto a la protección según el género del animal ( $\chi^2=0,27$   $p=0,33$ ). El 31% y el 37% de machos y hembras respectivamente, estaban protegidos.

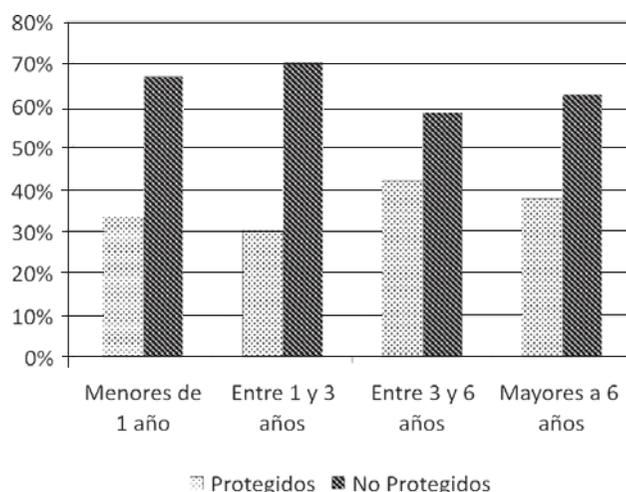
Con respecto a la edad de los animales, en los 20 que eran menores a 1 año de edad, sólo 7 (35%, I.C 95%: 15 - 59%) estaban protegidos a diferencia de los 13 restantes que no lo estaban. De los 41 animales que tenían entre 1 y 3 años, 12 (29,3%, IC 95%: 16 - 45%) estaban protegidos. De la categoría que se encontraba entre los 3 y 6 años de edad, 13 (41,9%, IC 95%: 24 - 61%) de los 31 presentaban un nivel de anticuerpos protectores suficiente. Finalmente, de los 48 perros mayores a 6 años, 18 estaban protegidos (37,5%, IC 95%: 24 - 53%) (Figura 2).

En cuanto a los animales protegidos según tiempo de vacunación previo a la extracción, se pudo observar que de los 66 caninos menores de 6 meses de vacunación, 35 (53%, IC 95%: 40 - 65%) presentaron protección y los restantes 30 (47%)

<sup>1</sup>Se corroboró la vacunación previa de los animales, mediante el certificado sanitario con la firma del profesional actuante.

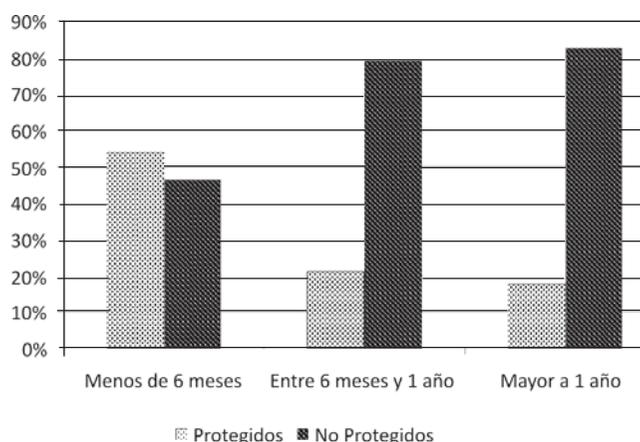
El término vacunación completa significa que los animales habían sido inmunizados siguiendo las recomendaciones del fabricante de las vacunas para lograr una protección adecuada contra la Rabia.

Respuesta inmune de caninos vacunados contra el virus de la rabia



**Figura 2.** Porcentaje de animales protegidos y no protegidos según la edad del animal.

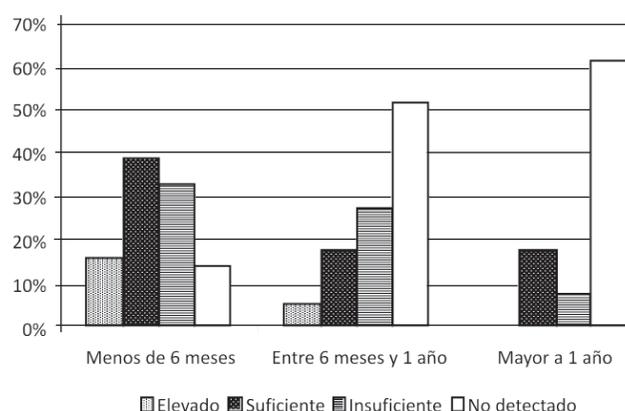
estaban desprotegidos. De los 40 caninos que tenían entre 6 meses y 1 año de vacunados, solo 9 (22,5%, IC 95%: 11 – 38%) presentaban un nivel de anticuerpos suficiente como para brindar protección. De los 34 perros comprendidos en la categoría que tenía más de 1 año de vacunados, solo 6 (17,7%, IC 95%: 6 – 35%) presentaban protección (Figura 3).



**Figura 3.** Porcentaje de protección de los animales según tiempo de vacunación previo.

Si a su vez se analiza por nivel de protección según tiempo de vacunación previo, se puede observar que de los 65 caninos vacunados hacía menos de 6 meses, sólo 10 (15,4%) presentaron un nivel elevado de protección, 25 (38,5%) un nivel suficiente, 21 (32,3%) un nivel insuficiente y 9 (13,8%) no presentaron anticuerpos antirrábicos. De los 41 caninos vacunados hacía más de 6 meses pero menos de 1 año, sólo 2 (4,9%) presentaron un nivel elevado de anticuerpos, 7 (17,1%) un nivel suficiente, 11 (26,8%) nivel insuficiente y en 21 (51,2%) muestras no se detectaron anticuerpos. De los 32 caninos vacunados hacía más de un año, ninguno presentó un nivel de anticuerpos

elevado, 6 (17,6%) un nivel suficiente, 3 (7,3%) un nivel insuficiente de protección y en 25 muestras (61,0%) no se detectaron anticuerpos (Figura 4).



**Figura 4.** Nivel de protección según tiempo de vacunación previo. Los niveles corresponden a títulos de anticuerpos expresados en Unidades internacionales por mL (UI/ mL). Elevado = >4 UI/ mL, Suficiente = 0,5-4 UI/ mL, Insuficiente = 0,125-0,5 UI/ mL, no detectado = <0,125 UI/ mL. Se encontraron diferencia significativa ( $\chi^2=10,82$   $p=0,001$ ) en el nivel de protección entre la categoría menores de 6 meses de vacunación, comparando con las demás categorías (entre 6 meses y 1 año y mayor a 1 año de vacunados).

Si analizamos la significancia estadística de la variable tiempo de vacunación previo a la extracción, observamos que hay diferencia significativas entre las categorías ( $\chi^2=16,5$   $p<0,001$ ). Se observa que existe una diferencia significativa entre los perros con menos de 6 meses de vacunados y los que tienen entre 6 meses y 1 año de vacunados ( $\chi^2=11,61$   $p=0,001$ ). Entre la categoría que está entre 6 meses y 1 año de vacunados y la que tiene más de 1 año de vacunados, no hay diferencias significativas ( $\chi^2=0,26$   $p=0,60$ ). Y para la categoría con menos de 6 meses de vacunación y la que se encuentra con más de un año de vacunados, sí hay diferencia significativa ( $\chi^2=10,82$   $p=0,001$ ).

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Son muchos los factores que pueden influir para que los animales no presenten un nivel adecuado de protección tras la vacunación. Entre ellos podemos incluir la calidad de las vacunas y su capacidad inmunogénica, la forma de conservación de las mismas, la correcta administración, el estado de sanidad del animal, así como su estado nutricional. Por lo tanto, del punto de vista sanitario, esta situación debe ser abordada de forma integral, considerando todos estos aspectos como influyentes en una respuesta inmune adecuada. En este sentido, en cuanto a las marcas de las vacunas que habían sido empleadas por los veterinarios (total 4 marcas comerciales distintas), no se pudo asociar el nivel de protección con ninguna marca en particular, siendo que además el experimento no fue diseñado para tal fin. Por esta razón, no pudimos hacer ninguna apreciación en relación a la calidad de las vacunas empleadas.

En nuestro país, si bien se recomienda la vacunación en perros, la misma no es obligatoria, pudiendo ser ésta una práctica no tan frecuente. Además las revacunaciones en los animales vacunados, muchas veces no se realizan en la forma que corresponde. No se realizan campañas de vacunación masiva y tampoco existen controles oficiales para conocer el status inmunitario de la población canina. Si analizamos esta situación, podemos inferir que podrían ser pocos los caninos que llegan a ser vacunados adecuadamente, limitándose muchas veces sólo a aquellos que reciben atención veterinaria periódicamente. Además, en muchos planes de vacunación, la vacuna contra rabia es una de las últimas que el animal recibe cuando es cachorro, omitiéndose muchas veces al no completarse el plan de vacunación. Si a ésta situación le sumamos que los perros que creemos que están realmente protegidos por haber sido vacunados, no cumplen con el nivel mínimo de protección establecido internacionalmente, es una situación alarmante.

De los 140 sueros de caninos con vacunación previa analizados, sólo el 36% mostró un nivel de protección según lo establecido por la OIE (mayor o igual a 0.5 UI/ mL). Esto es un porcentaje bajo de protección que indica el status inmunológico de los animales frente al virus de la rabia. Si analizamos los resultados según tiempo de vacunación previo a extracción, vemos que los perros con vacunación reciente (menor a 6 meses) mostraron un 53% de protección, entre 6 meses y 1 año de vacunación 22,5% y con más de 1 año de vacunación 17,6%. Estos resultados permiten observar que a mayor tiempo transcurrido desde la vacunación, menor protección de los animales, resultando significativas las diferencias de las categorías 2 y 3 respecto a los recientemente vacunados (menor a 6 meses), pero no fueron significativas las diferencias entre las categorías entre 6 meses y

un año y más de un año de vacunación. La revacunación anual se recomienda comúnmente en nuestro país contra la rabia canina. Este plazo podría no ser suficiente para mantener un nivel de protección adecuado en la población.

Si comparamos los resultados obtenidos en este trabajo con otros realizados en América Latina, vemos que resultados similares se observaron en Perú en 2007, donde sólo el 32% de caninos hacía 3 meses de vacunados, presentaron protección (Lopez y col., 2007). Resultados con menor protección se encontraron en Colombia donde sólo el 24.5% de caninos vacunados hacían 6 meses, estaban protegidos (Paez y col., 2007). Si comparamos los resultados obtenidos en Brasil en perros vacunados hacía un año, donde se encontraron niveles de protección en el 25% de las muestras analizadas (Almeida y col., 1997), fueron muy similares a los resultados obtenidos en nuestro trabajo, donde los perros vacunados entre 6 meses y un año y aquellos vacunados hacía más de un año presentaron niveles de protección de 22% y de 17.1% respectivamente.

Los resultados de éste trabajo, dejan de manifiesto el posible riesgo de infección que tiene la población canina analizada. Considerando que es una enfermedad reemergente en el Uruguay, el virus podría ser transmitido fácilmente entre la mayoría de la población canina en cuestión. Al no presentar un nivel adecuado de protección, constituye sin duda un problema importante para la salud pública.

#### Agradecimientos

Los autores agradecen a la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) de la Universidad de la Republica por financiar el trabajo y a todos los profesionales que colaboraron con la toma de muestras.

#### Referencias bibliográficas

- Almeida MF, Aguilar EA, Martorelli LA, Presotto D, Brendão MM, Pereira AO. (1997). Resposta imune humoral de cães á vacina inativada, de cérebro de camundongos lactentes, utilizada nas campanhas anti-rábicas no Brasil. *Rev Saúde Publica* 31:502-507.
- Belotto A, Leanes LF, Schneider MC, Tamayo H, Correa E. (2005). Overview of rabies in the Americas. *Virus Res* 111:5-12.
- Feyssaguet M, Morize JL, Todorova V, Blanchard I, Bourgeois JP. (2005). Platelia Rabies II, a new ELISA kit for the detection of rabies antibodies in animal and human serum or plasma. OIE First International Conference. En: *Proceedings and abstracts from the 1st International Conference on Rabies in Europe, Kiev, Ukraine, 15-18 June 2005*.
- González JC, Briano D, Guarino H. (2009). Primer registro para el Uruguay de rabia en un murciélago no hematófago *Tadarida brasiliensis*. *Veterinaria (Montevideo)* 45:31-32.
- Knobel DL, Cleaveland S, Coleman PG, Fevre EM, Meltzer MI, Miranda MEG, Shaw A, Zinsstag J, Meslin FX. (2005). Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. *Bull World Health Org* 83:360-368.
- López R, Díaz A, Condori E. (2007). Susceptibilidad canina a rabia después de una campaña de vacunación en zonas endémicas del Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 24:13-19.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). (2005) Eliminación de la rabia humana transmitida por perros en América Latina: análisis de la situación. Washington D.C. PAHO. p 1-71.
- Paéz A, Gómez J, Calvo P, Garzón, P. (2007) Niveles de inmunidad humoral conferidos con la primera dosis de la vacuna antirrábica en caninos con dueño de la ciudad de Bogotá, Colombia. *Revista de Investigación, La Salle*. 7(2): 191-197.
- Rogan WJ, Gladen B. (1978). Estimating prevalence from results of a screening test. *Am J Epidemiol*. 107:71-76.
- StataCorp. (2009). Stata: Release 11. StataCorp LP. College Station, TX: StataCorp LP.
- Vitale E, Días LE, Lagarmilla P. (2008). Estrategia para el control de la rabia herbívora en el Uruguay. En: *Academia Nacional de Veterinaria. Rabia Parálítica*. Montevideo. Tradinco. P 69-74.

# Osteopetrosis letal hereditaria (enfermedad de los huesos de mármol) en terneros Aberdeen Angus en Uruguay

## Hereditary lethal osteopetrosis (marble bone disease) in calves Aberdeen Angus in Uruguay



Dutra, F.<sup>1</sup>, Baroni, L.<sup>2</sup>, Techera, M.<sup>3</sup>, Quinteros, C.<sup>4</sup>

### RESUMEN

Se reporta el primer diagnóstico de osteopetrosis hereditaria letal en terneros Aberdeen Angus negro y colorado en Uruguay. La enfermedad se diagnosticó en dos rodeos de cría comerciales, el primero en el departamento de Cerro Largo en agosto de 2009 (5 casos, 6,8%) y el segundo en Rocha en noviembre de 2010 (3 casos, 7,5%). Ambos rodeos manejaban vacas Red Angus puras (Cerro Largo) o puras por cruce (Rocha), ambas servidas con toros Red Angus adquiridos en cabañas nacionales. Los terneros afectados eran prematuros y nacían muertos excepto un caso en Cerro Largo que sobrevivió 48 horas. Presentaban abombamiento y deformación huesos de cara y cráneo, severo braquignatismo inferior, impacción de molares y ausencia médula ósea en los huesos largos. Histológicamente había osteosclerosis severa con trabéculas condro-óseas densas (esponjosa primaria) que obliteraban la médula ósea de los huesos largos. Uno de los toros y dos vacas, madres de terneros afectados de uno de los rodeos problema resultaron ser portadores de la mutación SLC4A2. La alta incidencia de animales afectados en los rodeos Aberdeen Angus colorado estudiados sugiere que la enfermedad es frecuente en Uruguay.

**Palabras clave:** Osteopetrosis, Bovino, Red Angus, Mutación SLC4A2, Osteoclasto

### SUMMARY

Congenital osteopetrosis was diagnosed in red and black Aberdeen Angus calves from two herds in the east region of Uruguay. Five calves (6.8%) were born dead in a purebred Red Angus herd in August 2009, and 3 (7.5%) in a Red x Black Angus cows in November 2010 (7.5%). Both herds were bred with Uruguayan Red Angus bulls. The major gross findings of two necropsied calves were deformed facial and cranial bones, severe brachygnathia, impacted lower molars, and lack of bone marrow cavities in the long bones. Histopathological examination revealed abnormal bone resorption which resulted in persistence of primary spongiosa obliterating the bone marrow cavities. Blood samples from one bull and two dams from one of the affected herds were identified as carriers for the SLC4A2 mutation. It is suggested that the mutation is widespread in Red Angus herds in Uruguay.

**Key words:** Osteopetrosis, Bovine, Red Angus, mutation SLC4A2, Osteoclast

### INTRODUCCIÓN

Las enfermedades de origen genético son una causa de preocupación creciente en todo el mundo. Los métodos modernos de mejoramiento genético en bovinos se basan cada vez más en tecnologías reproductivas tales como la inseminación artificial, la ovulación múltiple y transferencia de embriones, fertilización *in vitro* y un creciente comercio internacional de gamoplasma de toros y vacas de élite; esto ha permitido propagar rápidamente en todo el mundo características productivas económicamente valiosas de unos pocos animales selectos (Agerholm, 2007; Windsor y col., 2011). Pero como todo individuo es portador de algún gen defectuoso, el progreso genético ha ido acompañado en numerosos países de la aparición con alta incidencia de enfermedades genéticas raras, con gran impacto en la producción y el bienestar animal (Agerholm, 2007; Meydan y col., 2010; Windsor y col., 2011). Uruguay no es ajeno a esto, ya que numerosas enfermedades hereditarias se han detectado en el país en los últimos años (Llambí, 2002; Kelly y col. 2011). Por lo tanto, hoy más que nunca, es importante reportar todo tipo de malformaciones congénitas y desarrollar programas na-

cionales de control de enfermedades hereditarias para evitar la difusión de genes deletéreos (Agerholm, 2007).

La osteopetrosis, también conocida como enfermedad de los «huesos de mármol» o enfermedad de Albers-Schönberg, es un grupo de enfermedades genéticas raras del esqueleto del hombre y los animales (Tolar y col., 2004; Thompson, 2007). Está causada por una falla en la diferenciación o función de los osteoclastos, células multinucleadas de origen hematopoyético responsables de la resorción ósea y el modelado/remodelado del esqueleto (Thompson, 2007; Askmyr y col., 2008). El crecimiento en longitud y la formación de tejido óseo son normales, pero como resultado de la falla osteoclastica las trabéculas de hueso esponjoso primario se acumulan en la cavidad medular, la metafisis no se reduce para formar la diáfisis y la ausencia de modelado óseo causa malformaciones esqueléticas generalizadas, especialmente severas en el cráneo y los huesos largos (Stark y Savarirayan, 2009; O'Toole y col., 2011). A pesar de que son más densos, los huesos son más frágiles y están predispuestos a fracturas patológicas (Thompson, 2007; Stark y Savarirayan, 2009). En el hombre se reconoce una forma congénita, letal, que

<sup>1</sup>DILAVE Miguel C Rubino, Laboratorio Regional Este, Treinta y Tres, Uruguay, fdutra@mgap.gub.uy

<sup>2</sup>Ejercicio liberal, Florencio Sánchez 570, Melo, Uruguay, enlvet@gmail.com

<sup>3</sup>Ejercicio liberal, 25 de Agosto y Misiones, Lascano, Uruguay, agroveterinariaquebracho@hotmail.com

<sup>4</sup>DILAVE Miguel C Rubino, Laboratorio Regional Este, Treinta y Tres, Uruguay, cquinteros@mgap.gub.uy

Recibido: 5/3/12 Aprobado: 14/3/12

se hereda como un carácter autosómico recesivo y una forma más benigna, autosómica dominante, que se manifiesta en la adolescencia o adultez (Van Hu y col., 1997; Stark y Savarirayan, 2009; Tolar y col., 2004). La mayoría de los casos de osteopetrosis descritos en animales son similares a la forma recesiva maligna humana, incluyendo la osteopetrosis bovina (Leipold y col., 1970; Leipold y Cook, 1977; Thompson, 2007), equina (Nation y Klavano, 1986; Berry y col., 1994), murina (Josephsen y col., 2009; Wu y col., 2009), canina (Riser y Fankhauser, 1970) y la de ciervos consanguíneos de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) (Smits y Bubenik, 1990). El proceso de reclutamiento, diferenciación y activación de los osteoclastos es muy complejo y está bajo control de numerosos genes (Tolar y col. 2004), existiendo más de 20 mutaciones diferentes identificadas en la osteopetrosis del hombre, ratones de laboratorio y animales (Askmyr y col., 2008; Stark y Savarirayan, 2009).

En el bovino, la osteopetrosis congénita (<http://omia.angis.org.au>, OMIA 000755) es típicamente una enfermedad autosómica recesiva de la raza Aberdeen Angus, principalmente de la variedad colorada (raza Red Angus en algunos países) y menos frecuente en la variedad negra (Leipold y col., 1970; Huston y Leipold, 1971). Los terneros afectados nacen prematuros (250-275 días de gestación) y usualmente muertos o, raramente, nacen vivos y sobreviven postrados durante 1-7 días (Leipold y Cooke, 1977; O'Toole y col., 2011). Se reconocen fácilmente ya que presentan la frente abovedada, braquignatismo inferior, amontonamiento de los molares y los huesos largos son más densos y carecen de cavidad medular (Leipold y col., 1970; Thompson, 2007). La falla osteoclástica es debida a una mutación del gen SLC4A2, localizado en el cromosoma bovino 4, el cual codifica para una proteína de intercambio aniónico  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  que es fundamental para mantener el pH ácido en las lagunas de resorción (Meyers y col., 2010). Mutaciones similares se han encontrado en ratones de laboratorio, pero no en el hombre (Wu y col., 2008; Josephsen y col., 2009). El fenotipo de osteopetrosis se ha observado también en la raza Hereford, Simmental y Holando (Leipold y Cook, 1974; Thompson, 2007), pero se desconoce si la mutación responsable es la misma que en la raza Angus.

Históricamente, la osteopetrosis en la raza Aberdeen Angus irrumpió con alta incidencia en EE.UU. y Canadá en los años 1960 y 1970; Leipold y col. (1971) reportaron 23 terneros afectados en 3 rodeos en 1967 y 1968, en tanto Greene y col. (1974) registraron más de 120 casos entre 1967 y 1973. La enfermedad luego disminuyó gracias a las pruebas de progenie y la práctica del «escrúpulo de pedigrí», es decir, evitando la compra o uso de líneas de pedigrí sospechosas (Meyers y col., 2010). La enfermedad resurgió en el 2005 en la raza Red Angus, con numerosos casos demostrados en los laboratorios de diagnóstico de Wyoming, Nebraska, Missouri y Kansas en EE.UU. y Saskatchewan en Canadá (Wight-Carter, 2006; Nietfield, 2007; Meyers y col. 2010).

En el presente trabajo se reporta el primer diagnóstico de osteopetrosis letal hereditaria en terneros de raza Aberdeen Angus colorado y negro en Uruguay.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los diagnósticos anatomopatológicos se realizaron en el Laboratorio Regional Este, DILAVE Miguel C. Rubino, Treinta y Tres, Uruguay. Se estudiaron dos terneros mortinatos, el primero de raza Red Angus (caso N° 1) nacido en agosto de 2009 en un predio de la 10ª sección policial de Cerro Largo, y el segundo cruza Aberdeen Angus negro x colorado (caso N° 2) nacido en noviembre de 2010 en un predio de la 3ª sección policial de Rocha. Ambos eran predios de cría, de tipo comercial, que compraban toros en cabañas Red Angus nacionales.

Los animales se sometieron a un examen *post-mortem* completo y a una investigación detallada del esqueleto de acuerdo a la metodología recomendada (Thomson, 2007). Los huesos largos (húmero, radio, cúbito, fémur, tibia, metatarso y metacarpo) y las falanges de uno de los lados del animal se desarticulaban, se bi-seccionaban sagitalmente, se lavaban con cepillo blando y agua a presión, y se examinaban cuidadosamente. El cráneo se separó cuidadosamente nivel de la articulación atlanto-occipital, se retiró la calvaria, se extrajo el encéfalo intacto, se separó la mandíbula entera y luego se cortó longitudinalmente para examinar los huesos de la base del cráneo y los cornetes nasales. Las vértebras cervicales se desarticulaban individualmente, mientras que el resto de la columna vertebral se cortó longitudinalmente. Los huesos enteros restantes y los huesos seccionados se limpiaron de músculo y tejidos blandos, se hirvieron en agua por 1-2 horas y se blanquearon con hipoclorito de sodio diluido. Muestras de distintos huesos, incluyendo cortes de epifisis, placa de crecimiento, esponjosa primaria y metafisis, se fijaron en formol bufferado al 10%, se descalcificaron en ácido fórmico, se incluyeron en parafina, se cortaron a 6-7  $\mu\text{m}$ , y se colorearon con Hematoxilina de Harris y Eosina.

Para confirmar el origen genético de la enfermedad, muestras de sangre de los dos toros y 3 de las 5 vacas del rodeo de Cerro Largo que parieron terneros afectados, incluyendo la madre del ternero N° 1, se impregnaron en papeles de filtro Whatman Cards FTA® y se enviaron a uno de los laboratorios aprobados por la Red Angus Association of America para el diagnóstico molecular por marcadores de ADN de la osteopetrosis (Igenity®, Merial Canada Inc., Calgary, AB).

## RESULTADOS

### Datos clínicos y epidemiológicos

En el primer foco se afectaron cinco (6,8%) terneros en un rodeo de 73 vacas Red Angus de primera cría de 4 años de edad servidas con dos toros de raza Red Angus. Todos los terneros enfermos nacieron en agosto de 2009 al comienzo de la parición, dentro de las primeras 10 vacas paridas, por lo que probablemente eran prematuros. Los neonatos tenían la «mandíbula corta» (braquignatismo) y todos, excepto uno, fueron encontrados muertos; el único ternero nacido vivo quedó caído en el campo, flácido y murió entre 24 a 48 horas posparto. Uno de los toros había sido adquirido en una cabaña Red Angus del departamento de Tacuarembó 6 años antes, por lo que el productor suponía que algunas de las vaquillonas podían ser hijas de ese toro, mientras que el otro reproductor provenía de una cabaña Red

Osteopetrosis letal hereditaria en terneros Aberdeen Angus

Angus de Rocha y era el segundo año que trabajaba en el rodeo. La enfermedad no se había observado anteriormente en el rodeo Aberdeen Angus colorado, ni tampoco en los otros rodeos de vacas Aberdeen Angus negras servidas con toros negros del mismo predio.

El segundo foco, en Rocha, ocurrió en un rodeo de cría de 40 vacas de raza Aberdeen Angus negras y cruza negra x colorada, adultas, servidas con un toro Red Angus adulto adquirido dos años atrás. En noviembre de 2010 nacieron 3 (7,5%) terneros braquignáticos muertos a término. Algunos de los terneros tuvieron que ser ayudados durante el parto observándose por parte del productor que los huesos largos se fracturaban fácilmente al extraerlos. Este predio tenía antecedentes de varios años de neonatos inviábiles que nacían con la «mandíbula corta» y la lengua de afuera. Tres años antes se había comprado un toro en una cabaña Red Angus de la zona, el cual se usó durante dos períodos con vaquillonas Aberdeen Angus negras y cruza negra x colorada, de las cuales nacieron 3 terneros braquignáticos el primer año y otros 2 el segundo año, por lo que el toro fue eliminado.

### Hallazgos patológicos

Los dos neonatos afectados eran machos, tenían el cuerpo corto y grueso, el cráneo abovedado, la cara corta con la nariz desviada y presentaban un severo braquignatismo inferior de aproximadamente 4-5 cm, con los incisivos parcialmente erupcionados y desordenados (Figura 1). La mandíbula tenía los molares amontonados en el medio de la rama mandibular, las apófisis coronoides y condilar estaban parcialmente fusionadas y arqueadas hacia atrás, el ángulo mandibular era muy prominente y faltaba el foramen mental y el cóndilo articular (Figura 2). En el ternero N° 1 la lengua estaba mutilada por carroñeros, mientras que en el caso N° 2 estaba muy protruida. Ninguno de los animales había respirado pero ambos tenían hemorragias, pero no trombos, en las arterias umbilicales, indicando que la muerte se produjo durante el parto o inmediatamente después de nacer. Excepto el cerebro el resto de los órganos internos eran normales.



**Figura 1.** Braquignatia inferior severa en ternero Aberdeen Angus colorado (Caso 1).



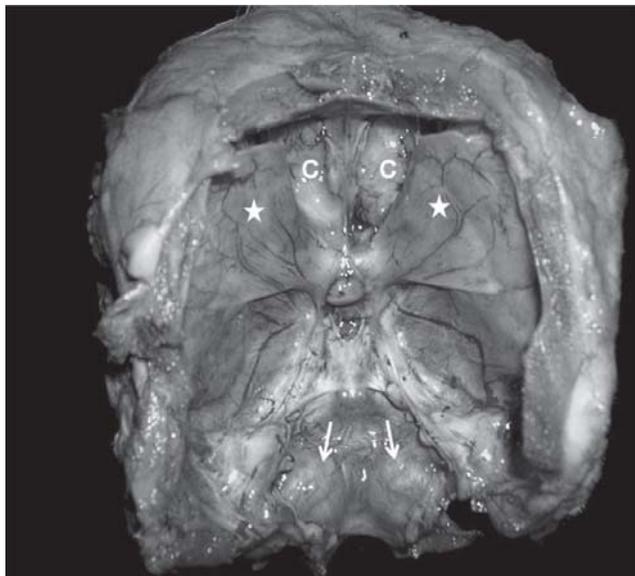
**Figura 2.** Mandíbula con impaccción de molares, arqueamiento y fusión de procesos coronoides y condilar (flecha) (Caso 1).

Ambos animales presentaban malformaciones severas en el cráneo y el encéfalo. La bóveda craneana era más estrecha y tenía numerosas irregularidades y salientes óseas en su interior, principalmente en la fosa craneana rostral y caudal (Figura 3). Ros-tralmente, la lámina cribosa del etmoides era gruesa y estaba parcialmente cubierta por ambas alas del hueso presfenoides, que eran salientes hacia el interior del cráneo (Figura 3). En la fosa craneana caudal, el hueso basi-occipital (*pars basilaris*) - que soporta la médula oblonga y el obex- estaba constreñido por dos grandes engrosamientos internos de los cóndilos occipitales (Figura 3). El encéfalo aparecía aplanado dorso-ventralmente con los lóbulos parietales focalmente abollados por un



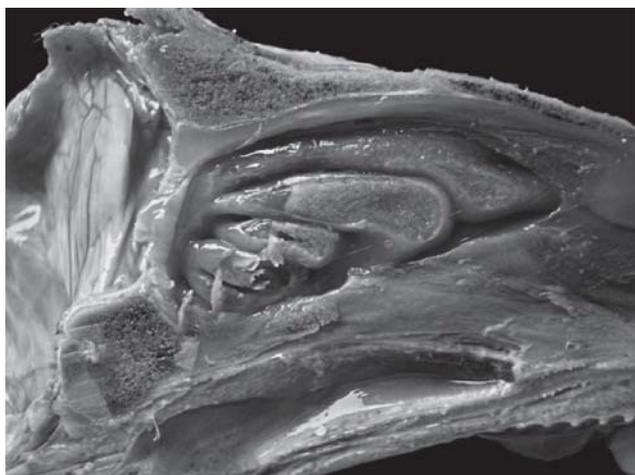
**Figura 3.** Hernia de cerebelo y médula oblonga dentro del *foramen magnun* o malformación de Arnold-Chiari tipo II (Caso 1).

engrosamiento de la sutura fronto-parietal. Como resultado de la estrechez de la cavidad craneana el vermis cerebeloso, obex y médula oblonga en ambos terneros se encontraban herniados dentro del *foramen magnun* (malformación de Arnold-Chiari tipo II) (Figura 4). Al corte sagital, se observó que los huesos frontales y los de la base del cráneo eran gruesos y sólidos faltando el seno esfenopalatino y los senos frontales; el hueso nasal estaba curvado ventralmente y los cornetes nasales eran



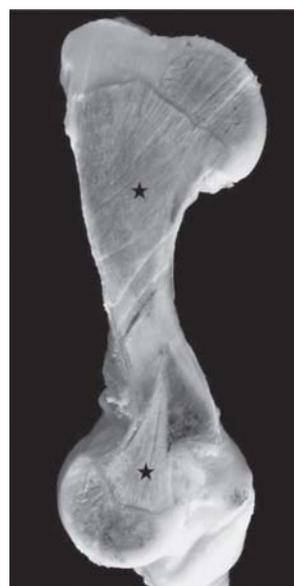
**Figura 4.** Deformaciones óseas severas en interior de la cavidad craneana (Caso 2). Se destacan las imperfecciones de lamina cribosa (C), alas del presfenoides salientes (estrellas) y constricción de la *pars basilaris* por engrosamientos internos de cóndilos occipitales (flechas).

osteocartilaginosos, compactos y llenaban completamente las cavidades nasales obstruyendo los pasajes aéreos (Figura 5). Todos los huesos largos eran sólidos, sin cavidad medular. La diáfisis era estrecha y ambas metáfisis aparecían muy ensanchadas, lo que les daba un aspecto similar a una «pesa de gimnasia» o de «doble matraz de Erlenmeyer» (Faden y col. 2009). Los huesos eran duros pero se fracturaban fácilmente cuando se aplicaba una fuerza de rotación a nivel de la unión del metáfisis-diáfisis. Al corte sagital, la cavidad medular estaba ocupada por hueso esponjoso endocondral que ocupaba completamente la médula ósea formando una estructura característica de «doble-cono» con la base de cada cono en contacto con la placa de

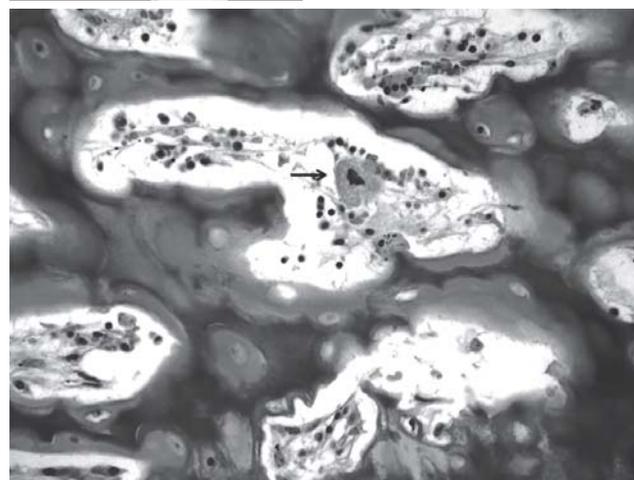


**Figura 5.** Corte sagital de cráneo mostrando ausencia de senos esfenopalatino y senos frontales y cornetes nasales grandes obstruyendo los pasajes aéreos (Caso 2).

crecimiento y el ápice apuntando hacia la diáfisis (Figura 6). La estructura en doble-cono estaba presente en todos los huesos, incluyendo los huesos cortos y las vertebras, pero era más evidente en el húmero. Las articulaciones y las placas de crecimiento de todos los huesos eran normales. Histológicamente, en todos los huesos procesados había osteosclerosis difusa y severa. La superficie cortical externa de los huesos presentaba evidencia de formación ósea mientras que en la superficie interna no había signos de resorción ósea. La epífisis, metáfisis y médula ósea estaban completamente rellenas de múltiples trabéculas condro-óseas persistentes, típicamente formadas por espículas de cartilago hialino en el centro y hueso inmaduro alrededor (esponjosa primaria) (Figura 7). No había lagunas de Howship ni líneas basofílicas de marea (tidemark) ni otros signos de remodelado óseo; los osteoclastos eran escasos, inactivos, estaban libres en los espacios medulares y tenían los núcleos picnóticos (Figura 7).



**Figura 6.** Corte sagital de húmero de Caso 1 mostrando la cavidad medular rellena de esponjosa primaria dispuesta en «doble cono» (estrellas). Las metáfisis están ensanchadas y las placas de crecimientos son normales



**Figura 7.** Corte histológico de metáfisis distal de húmero (Caso 1). Se observan las trabéculas condro-óseas interconectadas, los osteoclastos necróticos (flecha) y la ausencia de lagunas de Howship. H&E, 400x.

### Diagnóstico molecular

Uno de los dos toros que trabajaron en el rodeo de Cerro Largo y dos de las tres vacas madres de los terneros afectados, incluyendo la madre del Caso 1, resultaron portadores de la mutación del gen SLC4A2. La prueba no se pudo realizar en la tercera vaca. El test de PCR empleado para el diagnóstico de esta enfermedad tiene una tasa de error 1 en 10.000 (Meyers y col., 2010). Por lo tanto, la mutación del gen SLC4A2 como la causa de la osteopetrosis queda comprobada en Uruguay.

### DISCUSIÓN

El presente trabajo demuestra por primera vez la existencia de la osteopetrosis letal hereditaria en la raza Aberdeen Angus en Uruguay. La enfermedad se diagnosticó por las lesiones esqueléticas características y se confirmó por técnicas de genética molecular.

La combinación de braquignatia inferior, amontonamiento de los molares y ausencia de cavidad medular en los huesos largos es típica de la osteopetrosis bovina y permite realizar fácilmente el diagnóstico a campo (Leipold y col., 1970; Leipold y Cook, 1977; Thompson, 2007). El húmero parece ser el mejor hueso largo para demostrar en la cavidad medular los típicos «dobles conos» de retención de esponjosa primaria que resultan de una falla en la resorción osteoclástica, por lo que este hueso debería cortarse sagitalmente y examinarse en todos los fetos o neonatos Aberdeen Angus sospechosos. Histológicamente, la persistencia de esponjosa primaria, la ausencia de lagunas de Howship y el escaso número de osteoclastos en los huesos largos son hallazgos diagnósticos de la osteopetrosis bovina (Thompson, 2007; O'Toole y col., 2011). Los pocos osteoclastos encontrados estaban libres en la médula ósea, carecían de borde en cepillo y presentaban degeneración o apoptosis, en contraste con la osteopetrosis recesiva infantil o maligna -la forma de osteopetrosis humana más parecida a la enfermedad bovina (Tolar y col., 2004; Stark y Savarirayan, 2009)- y la osteopetrosis de los potros Paso Peruano (Nation y Klavano, 1988), enfermedades en las cuales los osteoclastos son morfológicamente normales y su número es normal o está aumentado. Los diagnósticos diferenciales son pocos. La osteosclerosis causada por la infección por el virus de BVD en fetos difiere de la osteopetrosis hereditaria en que la retención de hueso esponjoso es zonal en vez de generalizada como en la osteopetrosis (Scruggs y col., 1995), mientras que la displasia metafisaria reportada en fetos y neonatos de diferentes razas se caracteriza por acumulo intramedular de esponjosa secundaria, en vez de esponjosa primaria (Umamura y col., 1988).

Los rodeos investigados mostraron que la enfermedad es letal. La mayoría de los terneros afectados eran mortinatos o abortos a término, excepto un animal que sobrevivió durante 1-2 días caído en el campo. Los animales nacidos vivos en la osteopetrosis son muy raros y nunca sobreviven más de 1-7 días (Leipold y col., 1971; O'Toole y col., 2011). Fenotípicamente estos animales son iguales a los mortinatos, excepto tal vez porque las lesiones encefálicas son algo más leves (O'Toole y col., 2011). Genéticamente, sin embargo, los terneros nacidos vivos son heterocigotos, no homocigotos, para la mutación SLC4A2, abriéndose la posibilidad de que dichos terneros sean en realidad heterocigotos compuestos, es decir, portadores de 2 muta-

ciones diferentes en el mismo locus (O'Toole y col., 2011). Una situación similar ocurre en la osteopetrosis humana debida a diferentes mutaciones en el gen CLCN7 (Tolar y col., 2004; Askmyr y col., 2009). Hay actualmente trabajos de investigación en marcha para determinar las bases moleculares de la osteopetrosis en estos terneros Red Angus heterocigotos para la mutación SLC4A2 (O'Toole y col., 2011).

La compresión de la corteza parietal por las malformaciones craneanas y la hernia de cerebelo/médula oblonga son incompatibles con la vida y explican las muertes perinatales (Leipold y col., 1970; O'Toole y col., 2011). Aunque las lesiones neurológicas son más leves en los terneros nacidos vivos (O'Toole y col., 2011), estos animales parecen igualmente inviables debido a la imposibilidad para levantarse y a la severa deformación orofacial y la estenosis de los meatos nasales que les impide mamar y respirar adecuadamente. Las deformaciones internas de la bóveda craneana, especialmente las salientes del presfenoideas y el engrosamiento de las suturas fronto-parietales, son lesiones únicas de la osteopetrosis bovina y no han sido reportados en humanos ni en otras especies (O'Toole y col., 2011). La especie bovina en general, y la raza Aberdeen Angus en particular, es craneoencefálicamente muy madura al nacimiento (Gore y col., 1994), por lo que es de esperar que una menor resorción ósea por inactividad de los osteoclastos afecte en mayor medida el modelado/remodelado del cráneo en esta especie.

Se determinó que la enfermedad en Uruguay es debida a la mutación del gen SLC4A2, la misma que causa la osteopetrosis en la raza Red Angus en EE.UU y Canadá (Meyers y col., 2010). La mutación SLC4A2 está muy difundida en esos países, reportándose una prevalencia de heterocigotos de 9.4% en toros Red Angus de pedigrí de diferentes líneas de sangre (Meyers y col., 2010) y de hasta 20% en vaquillonas de un rodeo de Wyoming que había usado intensivamente toros portadores de la línea BUF CRK ROMEO (O'Toole y col., 2011). Germoplasma de ésta y otras líneas de toros portadores se han utilizado en cabañas de élite de Uruguay, como puede comprobarse cruzando datos del Catálogo de Pedigrí del Prado del 2010 con el listado de defectos genéticos de la *Red Angus Association of America* (<http://redangus.org/genetics/defects/list/carrier/OS>). En la presente investigación, la osteopetrosis se diagnosticó tanto en rodeos de vacas Aberdeen Angus coloradas puras como en vacas cruza negras x coloradas, todas servidas con toros Red Angus adquiridos en distintas cabañas nacionales. Dado que ambos predios eran de tipo comercial y que la enfermedad ocurrió con relativamente alta incidencia (6,8%, predio N° 1; 7,5%, predio N° 2), es muy factible que el gen de la osteopetrosis haya traspasado los planteles de pedigrí y ya esté difundido en los rodeos generales, tal vez con más frecuencia en el Aberdeen Angus colorado que en el negro. Los defectos deletéreos recesivos sólo se expresan fenotípicamente en estado homocigosis, por lo que pueden pasar años o décadas antes de ser reconocidos, cuando ya están muy diseminados en una población (Agerholm, 2007; Meyers y col., 2010; Windsor y col., 2011). La ocurrencia de la osteopetrosis del gen en ambas variedades se explica porque en Uruguay, a diferencia de EE.UU y otros países, el Aberdeen Angus negro y colorado se mantienen unificados en el mismo registro genealógico, y por lo tanto hay un intercambio más o menos libre de germoplasma entre ambas variedades.

En conclusión, la osteopetrosis letal hereditaria está presente en la raza Aberdeen Angus colorado y negro en Uruguay. La enfermedad es debida a la mutación del gen SLC4A2 y probablemente es más frecuente en la variedad colorada (Red Angus) que en la negra. La mutación probablemente está muy difundida en nuestro país ya que: 1) la enfermedad se presentó en predios comerciales, 2) los toros padres provenían de diferentes cabañas nacionales y 3) la importación de semen de toros portadores que se ha hecho en el país.

### Agradecimientos

Al Dr. Martín Juan, Merial Uruguay, por las gestiones realizadas para el envío de muestras al Laboratorio Igenity, Canadá, a los compañeros de DILAVE Este, Sra. Stella Vergara y Tec. Henry Machado por la ayuda en el procesamiento de los materiales y a los productores Juan Silva y Jorge Graña por permitirnos trabajar en sus establecimientos.

### Referencias Bibliográficas

1. Agerholm JS. (2007). Complex vertebral malformation syndrome in Holstein cattle: the story so far. *Acta Vet Scand* 49 (Suppl 1):S5
2. Askmyr MK, Fasth A, Richter J. (2008). Towards a better understanding and new therapeutics of osteopetrosis. *Br J Haematol* 140:597-609.
3. Berry CR, House JK, Poulos PP, Madigan JE, Woodard JC, Pool RR, Obrien TR, Ackerman N. (1994). Radiographic and pathologic features of osteopetrosis in two Peruvian Paso foals. *Vet Radiol Ultrasound* 35: 355-361.
4. Catálogo de Pedigrí Prado (2010). 105ª Exposición Internacional de Ganadería – Aberdeen Angus. Sociedad Criadores Angus del Uruguay, <http://www.angusuruguay.com/archivos/angus-nom-2010.pdf>
5. Faden MA, Krakow D, Ezgu F, Rimoin DL, Lachman RS. (2009). The Erlenmeyer flask bone deformity in the skeletal dysplasias. *Am J Med Genet A*. 149:1334-1345.
6. Gore MT, Young RB, Claeys MC, Chromiak JA, Rahe CH, Marple DN, Hough JD, Griffin JL, Mulvaney DR. (1994). Growth and development of bovine fetuses and neonates representing three genotypes. *J Anim Sci* 72:2307-2318.
7. Greene HJ, Leipold HW, Hibbs CM, Kirkbride CA. (1974). Congenital osteopetrosis in Angus calves. *JAVMA* 164: 389-395.
8. Huston K, Leipold HW. (1971). Hereditary osteopetrosis in Aberdeen Angus calves. 2. – Genetic Aspects. *Ann Génét Sél Anim* 3:419-423.
9. Josephsen K, Praetorius J, Frische S, Gawenis LR, Kwon T0, Agre P, Nielsen S, Fejerskov O. (2009). Targeted disruption of the Cl-/HCO3- exchanger Ae2 results in osteopetrosis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:1638-1641.
10. Kelly EL, Trenchi G, D' Agosto S, Ravagnolo O, Peraza P, Llambí S, Rivero R, Solares E, Dutra F, Moraes J. (2011). Molecular diagnosis of inherited diseases. XXVI World Buiatrics Congress 2010. Santiago de Chile, Chile. Session Genetics and Breeding. CD.
11. Leipold HW, Cook JE. (1977). Animal model: Osteopetrosis in Angus and Hereford calves. *Am J Pathol* 86:745-748.
12. Leipold HW, Huston K, Dennis SM, Guffy MM. (1971). Hereditary osteopetrosis in Aberdeen Angus calves. 1. - Pathological changes. *Ann Génét Sél Anim* 3:245-253.
13. Leipold HW, Doige CE, Kaye MM, Cribb PH. (1970). Congenital osteopetrosis in Aberdeen Angus calves. *Can Vet J* 11:181-185.
14. Llambí S. (2002). Estudios citogenético-moleculares de la fragilidad del cromosoma sexual X y enfermedades monogénicas en ovinos de la raza Holando-Uruguay (Bos Taurus). Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza, España: 142 pp.
15. McDaniel BT. (2001). Uncontrolled Inbreeding. *J Dairy Sci* 84(E. Suppl.):E185-E186.
16. Márquez GC, Speidel SE, Enns RM, Garrick D, J. (2010). Genetic diversity and population structure of American Red Angus cattle. *J Anim Sci* 88:59-68.
17. Meydan H, Yildiz MA, Agerholm JS. (2010). Screening for bovine leukocyte adhesion deficiency, deficiency of uridine monophosphate synthase, complex vertebral malformation, bovine citrullinaemia, and factor XI deficiency in Holstein cows reared in Turkey. *Acta Vet Scand* 7:52-56.
18. Meyers SN, McDaniel TG, Swist SL y col. (2010). A deletion mutation in bovine SLC4A2 is associated with osteopetrosis in Red Angus cattle. *BMC Genomics*.11:337 <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/337>
19. Nation PN, Klavano GG. (1986). Osteopetrosis in two foals. *Can Vet J* 27:74-77.
20. Nietfield J. (2007). Osteopetrosis in calves. *Diagnostic Insights* 2007:3.
21. OMIA, Online Mendelian Inheritance in Animals. Reprogen, Faculty of Veterinary Science, University of Sydney. MIA Number: 000755-9913. Last edited: 30/03/2011. World Wide Web URL: <http://omia.angis.org.au/OMIA000755/9913/>
22. O'Toole D, Swist S, Steadman L, Johnson GC. (2011). Neuropathology and craniofacial lesions of osteopetrotic Red Angus calves. *Vet Pathol* published Online First on July 18 as doi:10.1177/0300985811412621
23. Riser WH, Fankhauser R. (1970). Osteopetrosis in the Dog: A Report of Three Cases. *Vet Radiol* 11:29-34.
24. Scruggs DW, Fleming SA, Maslin WR, Wayne-Grace A. (1995). Osteopetrosis, anemia, thrombocytopenia, and marrow necrosis in beef calves naturally infected with bovine virus diarrhea virus. *J Vet Diag Invest* 7:555-559.
25. Smits B, Bubenik GA. (1990). Congenital osteopetrosis in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J Wildl Dis* 26:567-571.

26. Stark Z, Savarirayan R. (2009). Osteopetrosis. *Orphanet J Rare Dis* 4:5. <http://www.ojrd.com/content/4/1/5>
27. Thompson K. (2007). Diseases of bone and joints. En: M. Grant Maxie (ed.) *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of domestic animals*. 5a ed. WB Saunders, Edinburgh, Scotland, vol. 1, pp. 2-130.
28. Tolar J, Teitelbaum SL, Orchard PJ. (2004). Osteopetrosis. *N Engl J Med* 351:2839-2849.
29. Umemura T, Fujimoto R, Goryo M, Itakura C. (1988). Persistence of secondary spongiosa in three calves. *Vet Pathol* 25:312-314.
30. Van Hu W, Bollerslev J, Gram J, Van Hul E, Wuyts W, Benichou O, Vanhoenacker F, Willems PJ. (1997). Localization of a gene for autosomal dominant osteopetrosis (Albers-Schönberg disease) to chromosome 1p21. *Am J Hum Genet* 61:363-369.
31. Wight-Carter M. (2006). Inherited and BVD induced osteopetrosis in calves. *Kansas Vet Q* 9:2-3.
32. Windsor P, Kessell A, Finnie J. (2011). Neurological diseases of ruminant livestock in Australia. V: congenital neurogenetic disorders of cattle. *Aust Vet J* 89:394-401.
33. Wu J, Glimcher LH, Aliprantis AO. (2008). HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/Cl<sup>-</sup> anion exchanger SLC4A2 is required for proper osteoclast differentiation and function. *Proc Natl Acad Sci* 105:16934-19939.





Veterinaria (Montevideo) es la revista oficial de la Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay destinada a publicar artículos en idioma español sobre temas científicos, técnicos y otras comunicaciones de interés a las Ciencias Veterinarias. También se aceptan artículos en portugués o inglés, los cuales deben incluir un resumen en inglés y español.

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.

## NORMAS GENERALES

Los trabajos se enviarán exclusivamente por correo electrónico a: [revistavet@yahoo.com](mailto:revistavet@yahoo.com)

El texto debe ser en formato «DOC» o «RTF» y no deberá exceder de 23 páginas tamaño A4 (incluidas referencias), con margen de 2,5 cm a cada lado y con caracteres de 12 puntos, con interlineado doble y **numeración 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:

- 1.Trabajo Científico: artículo original, comunicación corta (reporte o caso clínico), revisión.
- 2.Trabajo Técnico o de Difusión o Nota Técnica (práctica veterinaria, diagnóstico, tecnológico, conferencia).
- 3.Comunicaciones cortas; no deberán exceder las 12 páginas.
4. 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.I, 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 correspon-

da. 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 referen-

ciados. 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.