

# VETERINARIA



Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay

Año LXIII Vol. 38 N° 152 - 153 Julio - Diciembre de 2003

Cerro Largo 1895 - Montevideo - Uruguay - Tel-Fax (598-2) 408 6174 - 409 9458 - E-mail: smvet@adinet.com.uy

Página Web: www.smvu.com.uy

## Contenido

### Editorial

### Artículo Original

Intoxicación por larvas *Perreyia flavipes* en bovinos y ovinos. Caracterización de la enfermedad y biología del insecto

*Fernando Dutra* ..... 7

### Diagnóstico

Aborto Bovino: casuística y optimización del diagnóstico en la DILAVE «Miguel C. Rubino», Uruguay

*Easton, C.; Paullier, C.; Bañales, P.* ..... 25

### Academia Nacional de Veterinaria

Informe sobre vacunas y vacunación contra *Brucelosis bovina*

*Raúl Casas Olascoaga* ..... 31

Homenaje al Dr. Carlos Carlevaro ..... 42

### Instrucciones para los autores

Esta edición consta de 1600 ejemplares y se distribuye sin costo a todos los socios de la SMVU.

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

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

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



# VETERINARIA

ISSN 0376 - 4362 - Indizada en: Vet-CD/BEASTCD

**REDACTOR RESPONSABLE:**

Analia Cobo, DMV

**CONSEJO EDITOR "Profesor Walter García Vidal":**

Pedro Arotce DMV

Pedro Bañales, DMV

Gonzalo Leaniz, DMV

Jacqueline Maisonnave, DMV, PhD

María A. Solari, DV

**Asesor Bibliotecológico:**

Elba Domínguez

## ARBITROS de los TRABAJOS CIENTÍFICOS (1997 - 2003)

Berthelot, X.	(DMV)	FRANCIA	Lazaneo, E.	(DMV)	URUGUAY
Camarotte, D.	(DMV)	URUGUAY	Leites, O.	(DMV)	URUGUAY
Cajarville, C.	(DMV)	URUGUAY	Martin, E.	(DMV)	URUGUAY
Cardelino, R.	(Ing. Agr.)	URUGUAY	Pérez Clariget, R.	(DMV)	URUGUAY
Cardozo, E.	(DMV)	URUGUAY	Pimentel, C.	(DMV)	BRASIL
Cardozo, H.	(DMV)	URUGUAY	Riet Correa, F.	(DMV)	BRASIL
Castells, D.	(DMV)	URUGUAY	Rodríguez, H.	(DMV)	SUECIA
Cattaneo, G.	(DMV)	CHILE	Theis, J.H.	(DVM)	USA
Cuore, U.	(DMV)	URUGUAY	Traldi, A.	(DMV)	BRASIL
Eddi, C.	(DMV)	ARGENTINA	Trejo González, A.	(DC)	MÉXICO
Feinstein, R.	(DMV)	SUECIA	Trica, G.	(DMV)	URUGUAY
Fernández, G.	(DMV)	URUGUAY	Tortora, J.	(DMV)	MÉXICO
Flores, E.	(DMV)	CHILE	Uriarte, G.	(DMV)	URUGUAY
Gil, A.	(DMV)	URUGUAY	Weiblen, R.	(DMV)	BRASIL

## CONSEJO DIRECTIVO (2000 - 2004)

**Presidente:**

Analia Cobo Leturia

**Presidente Suplente:**

Jorge Salavica

**Vice Presidente**

Guillermo Piferrer

**Titulares:**

Juan Dibarboure

Carlos Morón

Jorge Marra

**Comisión Fiscal:**

Oscar Ferreira

Daniel Alza

Omar Landeira

## CENTROS VETERINARIOS DE LA SMVU

### CANELONES

Julio César Paternostro  
vrussi@adinet.com.uy

### CERRO LARGO

Viterbo Gamarra  
vgamarra@adinet.com.uy

### COLONIA

Guillermo Piferrer  
pife@adinet.com.uy

### CHUY

Carlos Aristimuño  
carlosar@adinet.com.uy

### DURAZNO

Ana Acuña  
fedefe@adinet.com.uy

### FLORES

Mónica Oholeguy  
gld@adinet.com.uy

### FLORIDA

Oscar González Muracciole  
memoli@adinet.com.uy

### LA LÍNEA

Diego Rega  
dicla@adinet.com.uy

### LAVALLEJA

Susana Camaño  
sandraru202@hotmail.com

### MALDONADO

Luis García  
cevema@yahoo.com

### PASO DE LOS TOROS

Carlos Casadei  
rucacasadei@hotmail.com

### PAYSANDÚ

Miguel Dubra  
cmvpu@adinet.com.uy

### PANDO

Javier Pereyra  
seguibar@adinet.com.uy

### RÍO BRANCO

José Ignacio Olascuaga  
jolascua@montevideo.com.uy

### RÍO NEGRO

Gustavo Fischer  
pminoli@adinet.com.uy

### RIVERA

José Saravia Muñoz  
Tel: 0622 4916

### ROCHA

Raúl Serveto  
juanjoguadrelli@hotmail.com

### ruta 7

Clever Cardozo  
Tel: 0464 5304

### SALTO

Pedro Herrmann  
vetdondo@adinet.com.uy

### SAN JOSÉ

Joaquín Rossi  
cvetsj@adinet.com.uy

### SORIANO

Ruben Carricaburu  
rarricaburu@hotmail.com

### TACUAREMBÓ

Guzmán López  
guzmanlopez@hotmail.com

### TREINTA Y TRES

José Luis Ferrari  
ferrarijose Luis@hotmail.com

## ASOCIACIONES ESPECIALIZADAS QUE INTEGRAN LA SMVU

Comisión de Reproducción e Inseminación Artificial (CRIA)

Sociedad de Buiatría del Uruguay

Soc. Uruguaya de Vet. Especialistas en  
Pequeños Animales (SUVEPA)

Soc. Uruguaya de Vet. Especialistas en  
Animales Silvestres (SUVEAS)

Soc. Veterinaria Especialistas en Cerdos (SVEC)

Asoc. Uruguaya de Veterinarios Laboratoristas (AUVELA)

Asoc. Vet. Esp. Protección Alimentos (ANEPA)

## INTEGRACIÓN de COMISIONES

### SEDE SOCIAL

Rafael Varela  
Jorge Butthyany

### MERCOSUR

Hugo Fontaña  
Julio García Lagos  
Ignacio Pereira  
Eugenio Perdomo  
Angela Rista  
Luis Barros  
Jorge Baraibar  
Orgelio Cabrera

### FESTEJOS

Elbio Sosa  
Rafael Varela  
Cecilia Corso

### FINANZAS

Hugo Fontaña  
Juan Dogliotti

### BOLETÍN Y R.R.P.P.

Daniel Alza  
Alvaro Fernández

### CULTURA Y DEPORTE

Walter Faliveni  
Raquel Pérez

### REVISTA

María Solari  
Jacqueline Maisonnave  
Pedro Bañales  
Gonzalo Leaniz  
Pedro Arotce  
Elba Domínguez

### ESTATUTOS Y REGLAMENTO

Margarita de Miquelerena  
Adriana Rodríguez  
Marcelo Rodríguez

### ASUNTOS

**UNIVERSITARIOS**  
Eduardo Martín  
Carlos Estévez

**DECRETO 160/97**  
Griselda de Gregorio  
Luis Delucchi  
Alvaro Trinidad

### REPRODUCCIÓN

Luis Cuenca  
Guillermo de Navas  
Sergio Kmaid

### RABIA

Cristina Filippini  
Daniel Rossi  
Alvaro Fernández  
Ernesto Giambruno

### PODALES

Roberto Acuña  
Daniel Alza

### BRUCELOSIS

Virginia Diana  
Analía Cobo Leturia  
Ricardo Segundo  
Darío Hirigoyen  
Ignacio Pereyra

### BIOTECNOLOGÍA

Carlos Azambuja  
Eduardo Terranova  
Lucía Kelly  
Silvia Llambi  
Analía Cobo Leturia

### PÁGINA WEB Y MULTIMEDIA

Humberto Tomassino  
Oscar Caponi  
Juan Dogliotti  
Dreiner Farías

### TRIBUNAL ARBITRAL DE HONOR Y DISCIPLINA

Adolfo Bortagaray  
Julio García Lagos  
Juan José Mari  
Cecilia Martín  
Adriana Rodríguez



Montevideo, 23 de octubre de 2003

Estimados colegas: La necesidad de una colegiación, que brinde un marco a nuestra actuación profesional, las crecientes dificultades económicas, la realidad que nos golpea día a día, hace que con frecuencia pensemos en el tema de las incumbencias Profesionales o actividades reservadas a la Profesión Veterinaria. ¿Cuáles son algunas de las preguntas que los colegas nos hacemos, al ver la realidad, al ver la relación de convivencia de nuestra Profesión con otras Profesiones del área agraria? ¿Por qué siempre estamos tan dispuestos a enseñar a los demás, lo que en realidad debemos hacer nosotros? Con el argumento de mejorar la producción, desde los distintos escenarios, como los Laboratorios, Escuelas Agrarias, Agronomía, Cursos de Inseminación, Castración, Asistente Veterinario etc. , los propios Veterinarios enseñamos lo que necesariamente deberíamos hacer nosotros. ¿No sería bueno pensar en esto?, Dejamos el debate abierto, pero nosotros pensamos, que en el fondo es un problema de irresponsabilidad o mal formación como se le quiera llamar. Enumeraremos algunos de los aspectos que podríamos contemplar planteadas éstas interrogantes : 1-Formación de los Veterinarios: sólo tenemos que ver los programas de esos Centros de Estudios, que hoy compiten de alguna manera con nosotros, muchas veces aprovechando las carencias de nuestra formación a través de la Facultad de Veterinaria . Algo que por cierto es de nuestra responsabilidad , dado que por diferentes motivos hemos perdido de vista el objetivo de formar un buen profesional, por el hecho de que en vez de ver esto estemos pensando en como obtener o defender un cargo o una postura de un grupo político, o porque vienen las elecciones y queremos prevalecer sobre el resto para el reparto de la torta. 2-Desde los Laboratorios: que con el tema extensión y venta, informamos a todo el mundo, de cómo usar los productos, ¿ahora me pregunto? Que pasaría si a todos los humanos, los laboratorios de producción y venta de fármacos y biológicos, nos enseñaran esto mismo y además hubiese venta libre en las farmacias, que pasaría con los médicos?, Sería una situación anárquica, de la cual a largo plazo sólo obtendríamos perjuicios, dado que terminaríamos por mal uso de los productos, agotando los recursos que hoy tenemos y que no son tantos. 3-Podríamos agregar como forma de comparar, que los Veterinarios hemos estado muy preparados en los temas de zoonosis, pero nunca esto nos dió derecho a invadir las incumbencias del área de la Medicina Humana, siempre hemos indicado a las personas consultar a su médico, informándolo de los diagnósticos hechos por el area Veterinaria en los animales con los que ellos conviven o trabajan, con esto intentamos aclarar un concepto a nuestro modo de ver equivocado, que dice, los Veterinarios dejaron los espacios libre, y así otras profesiones actuaron en ellas. 4-Cursos ad- libitum, nuevas carreras, cursos con contenidos que no corresponden, que a nuestra forma de ver exceden los límites de sus propias incumbencias, haciendo suyas las de otras profesiones, ¿qué pasa con esto?, Para el País es más caro enseñar en tres o cuatro lados lo mismo, que hacerlo en el lugar indicado, y si en éste lugar está mal, el tema está en mejorar esa situación y cuando hablamos de País hablamos de nosotros, que somos los que pagamos los impuestos para generar la organización Social que tenemos. ¿Quién Autoriza y Controla la Educación Terciaria?, Éste es un buen año, en América los Estudios Veterinarios cumplieron 150 años y en Uruguay se cumplen 100 años, pensemos que estamos haciendo al obtener un título, que por cierto no es gratis. Según estudios hechos en éste y otros países, es la “Carrera que requiere de más inversión”, sea Estatal o Privada. Formar a un Veterinario, es más caro que formar a un Médico , y esto es bueno saberlo porque debe relacionarse en forma directa con nuestra responsabilidad como Profesionales.

**Dra. Analia Cobo Leturia**  
Presidenta Sociedad de Medicina  
Veterinaria del Uruguay



# Intoxicación por larvas de *Perreyia flavipes* en bovinos y ovinos, caracterización de la enfermedad y biología del insecto

Primer Premio Academia Nacional de Veterinaria 1997

Fernando Dutra<sup>1</sup>

## RESUMEN

Se describe la intoxicación por larvas de *Perreyia flavipes* (Hymenoptera; Pergidae; Perreyiinae) en bovinos y ovinos. Entre junio y octubre de 1993, 1994 y 1995, se observaron 46 brotes de una enfermedad altamente letal en la región central del Uruguay. Durante 1995 murieron más de 1000 bovinos y mortalidades de hasta 28% ocurrieron en algunos establecimientos. Los ovinos fueron afectados con menor frecuencia que los bovinos. La mayoría de los animales eran encontrados muertos. Los animales con signos clínicos presentaban debilidad, depresión y temblores musculares, otros excitación y agresividad, muriendo la mayoría antes de los 2 días. Ictericia y fotosensibilización se observaron en los bovinos que sobrevivían por más días. Las lesiones macroscópicas y microscópicas se caracterizaron por necrosis hepática aguda, periacinar o masiva, y edema de la vesícula biliar. También se observó hemorragias de las membranas serosas, ascitis y contenido seco de omaso y recto. Restos de larvas de *P. flavipes* se encontraron en los pre-estómagos de los 10 bovinos necropsiados. El diagnóstico se confirmó por la intoxicación experimental de 3 ovinos y 2 bovinos, con dosis de 9 a 40 g de larvas frescas por kg de peso vivo. Los estudios epidemiológicos mostraron una correlación negativa ( $P < 0.05$ ) entre la dotación animal y la morbilidad. En los 3 años en que ocurrió la enfermedad, las lluvias fueron abundantes en la primavera y verano y escasas en otoño e invierno. Los mapas de superposición mostraron que los establecimientos afectados se localizaban en suelos de Cristalino, entre 100 a 300 metros de altitud, donde el crecimiento de las pasturas naturales es muy sensible a las lluvias, la dotación animal y la relación lanar/vacuno. Se describe el ciclo biológico de *Perreyia flavipes*. Los adultos se observaron entre febrero y marzo. Las hembras mueren inmediatamente luego de la postura, viviendo entre 16 a 30 horas. Los huevos se depositan en grupos de 200 a 700, en el suelo, abajo de la vegetación y eclosionan en 27-70 días. La falta de humedad destruye los huevos en 10 días. La presencia de vegetación en descomposición es importante para la alimentación de las larvas jóvenes. Las larvas desarrolladas se alimentan de pasto verde, pasto seco y heces bovinas secas; son de color negro y presentan hábito gregario, desplazándose sobre la pastura en grupos compactos de hasta 188 individuos. En los meses de septiembre y octubre penetran hasta 10 cm bajo el suelo para pupar. El acúmulo de pasturas en el otoño favorece la sobrevida de gran número de larvas y explica la ocurrencia de los brotes.

**Palabras clave:** *Perreyia-flavipes* Pergidae necrosis-hepática-aguda bovinos ovinos.

## SUMMARY

Intoxication by a sawfly larvae identified as *Perreyia flavipes* (Hymenoptera; Pergidae; Perreyiinae), is reported in Uruguay. From June to October of 1993, 1994 and 1995, 46 outbreaks of a highly lethal disease occurred in cattle and sheep in the central region of the country. During 1995 total losses of cattle exceeded 1000. The reported mortalities were 1.6%, 7.0% and 1.3% for calves, yearlings and adults, respectively, but mortalities up to 28% occurred on some farms. Sheep were less frequently affected than cattle. Most animals were found dead. Cattle with clinical signs showed weakness, muscular tremors, depression, stupor and death. Others became highly excited and aggressive. Most affected cattle died in two days. Jaundice and mild photosensitization were also observed in some cattle that survived up to 7 days. Gross and microscopic lesions were characterized by severe peri-acinar or massive necrosis of hepatocytes with prominent edema of the gallbladder wall. Edema, ecchymosis and petechiae on serous membranes, ascites and dry content of the omasum and rectum were also observed. Invariably larval body fragments and heads of *P. flavipes* were found in the forestomach of 10 cattle necropsied. Diagnosis of sawfly poisoning was confirmed by experimental poisoning of three sheep and two calves with 9 to 40g of sawfly larvae per kg body weight. Epidemiological studies showed a significant ( $P < 0.05$ ) negative correlation between stocking rate and morbidity. During the 3 years of occurrence of the disease the rainfalls were excessive in spring and summer and scarce in autumn and winter. Spot maps showed that affected farms were located on superficial Crystalline soils, between 100 and 300 meters of altitude, where the growth of native grasses is very sensitive to summer rainfall. The life history of *Perreyia flavipes* is also described. Adults were seen in February and March, soon after the summer rains. Females died immediately after oviposition, living only 16-30 hours. The eggs are deposited in clusters, of 100 - 500 eggs each, on the soil, under dead vegetation. Egg hatching occurs in 27-70 days. Dead and decaying vegetation in autumn are important for eggs and young larvae to survive. Last instar larvae feed either on green, dry grass leaves or dry cattle feces. They have an unusual gregarious habit, crawling along the ground in compact masses containing up to 188 larvae, each larva about 2.5 cm long and of glossy black in color. In September and October pupation take place at 0-10cm under the soil surface. The accumulation of senescent vegetation in autumn probably explains the large increase of larvae population and the occurrence of outbreaks.

**Key Words:** sawfly-larval-poisoning *Perreyia-flavipes* Pergidae acute-liver-disease cattle-poisoning

<sup>1</sup>DILAVE "Miguel C Rubino", Laboratorio Regional Este Rincón 203. Treinta y Tres, Uruguay

## INTRODUCCIÓN

La intoxicación por larvas de mosca sierra ("sawfly") es una enfermedad hepatóxica aguda de los bovinos y ovinos, caracterizada porque las toxinas responsables se encuentran presentes en las larvas de insectos del orden Hymenoptera. En Australia, donde la intoxicación es causada por la ingestión de la larva de *Lophyrotoma interrupta* (Pergidae), los brotes están limitados a aquellos distritos de Queensland donde existen grandes bosques de *Eucalyptus melanophloia*, el árbol huésped de la larva.<sup>12</sup> La enfermedad es un serio problema dado que grandes pérdidas de animales pueden ocurrir en cada brote. En Australia, los brotes de intoxicación se presentan casi todos los años, siendo la enfermedad una causa importante de pérdidas económicas para la ganadería de la región. El costo de la enfermedad, calculado por el número de muertes que ocurren, la menor dotación que resulta y las medidas de control usadas, se ha estimado en 1.100.000 dólares Australianos anuales (valores de 1981).<sup>6</sup>

Históricamente, la segunda mosca sierra reportada como tóxica fue *Perreyia lepida* (Pergidae). Importantes pérdidas de cerdos han sido atribuidas a este insecto en Rio Grande del Sur y Santa Catarina, Brasil, donde las larvas se conocen popularmente con el nombre de "mata porco". Las larvas son de color negro, miden hasta 2.5 cm de largo y muestran un inusual hábito gregario. En los días fríos y nublados del invierno grupos compactos de larvas se observan desplazándose sobre la pastura, momento en el cual pueden ser ingeridas por los cerdos.<sup>20</sup> No se conoce los hábitos alimentarios de esta especie, aunque las larvas han sido vistas alimentándose de hojas de gramíneas y de plantas arbustivas como *Eryngium* sp ("cardilla"), así como en heces secas bovinas.<sup>5, 20</sup>

En Dinamarca se describió por primera vez la intoxicación por larvas de la mosca sierra *Arge pullata* (Argidae), en el cual murieron 50 de un total de 250 ovinos mantenidos sobre pasturas donde habían bosques de abedules (*Betula pendula*, Betulaceae), fuertemente infestados con larvas de *Arge pullata*.<sup>23</sup>

Insectos adultos identificados como *Perreyia flavipes* (Pergidae) han sido reportados en Argentina, en las provincias de Buenos Aires y Entre Ríos, y en Brasil en los estados de Río Grande del Sur, Santa Catarina, Espírito Santo y Distrito Federal. El adulto es de color totalmente negro que contrasta con patas de color naranja.<sup>21</sup> No existen estudios sobre la biología y el ciclo biológico de *Perreyia flavipes*. Las larvas, previamente desconocidas, son de color negro, miden hasta 2.5-3cm de largo y tienen el mismo hábito gregario de desplazamiento que las larvas de *Perreyia lepida*. Entre junio y septiembre, período de máxima actividad, grupos de larvas de aproximadamente 20-50 g de peso promedio se observan desplazándose sobre la pastura, formando una columna ordenada de hasta 15-20 cm de largo y 8 cm de ancho (Figura 1).

En este trabajo se describe por primera vez la epidemiología, sintomatología y la patología de casos espontáneos de intoxicación por larvas de *Perreyia flavipes* ocurridos en bovinos y ovinos en Uruguay. Se describen también la obtención de adultos en el laboratorio para su identificación, así como el ciclo biológico, los hábitos alimenticios de las larvas y la dinámica poblacional de la especie.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### Los insectos y su vegetación huésped

Los insectos del orden Hymenoptera cuyas larvas son tóxicas para los anima-



Figura 1. Grupo de larvas de *Perreyia flavipes* moviéndose sobre la pastura. Durazno, Uruguay, 1995.

les pertenecen a las familias Pergidae (*Lophyrotoma interrupta*, *Perreyia lepida*, y *Perreyia flavipes*) y Argidae (*Arge pullata*). La familia Pergidae es originaria de Australia y América del Sur y secundariamente se ha extendido en América del Norte. Se conocen alrededor de 150 especies de moscas sierras de la familia Pergidae en Australia y más de 250 en América del Sur. Especies de la familia Argidae se encuentran presentes tanto en Europa como en América del Sur.<sup>21</sup>

*Lophyrotoma interrupta* (Pterygophorinae; Pergidae) (Figura 2) es nativa de Australia, donde su distribución geográfica sigue casi con exactitud la de su principal árbol huésped, el *Eucalyptus melanophloia*.<sup>6,12</sup> Ella ha sido reportada principalmente en Queensland, Nueva Gales del Sur, Victoria, Australia del Sur y Tasmania. En la literatura veterinaria se la ha conocido también con los nombres de *Pterygophorus analis* (Costa), *Pterygophorus interrupta* (Klug) y *Platysectra interrupta*.<sup>12,19</sup> *L. interrupta* presenta una gran variedad de formas, por lo que posteriores estudios podrían demostrar varias especies separadas dentro de la actual, de las cuales solamente una resulte ser la causa de la enfermedad. Dado que no existen claves para las larvas, la obtención de adultos es imprescindible para la correcta identificación de la especie. Sin embargo, es bastante dificultoso obtener moscas adultas en el laboratorio, aún alimentando numerosas larvas bajo condiciones controladas. Esta situación determina que la identificación de las larvas en el campo sea solo tentativa, lo que ha dificultado

los estudios sobre la distribución y dinámica poblacional de éste insecto.<sup>12</sup>

La mosca adulta tiene el tórax de color azul oscuro con los lados amarillos, mientras el abdomen es amarillo con pequeñas manchas azules. Las patas son de color amarillo pálido, excepto en la base donde son azul oscuro. Como otros Hymenoptera, el adulto tiene 4 alas,





**Figura 2.** Larvas de *Lophyrotoma interrupta* sobre hojas de *Eucalyptus melanophloia* Queensland, Australia. (Foto cedida por el Dr. Peter Oelrichs).

que son oscuras y aparecen negras cuando están totalmente plegadas. La hembra mide 15-20mm de largo y sus antenas son negras y segmentadas similar a un collar de cuentas. El macho es fácilmente reconocible por ser más pequeño (10mm) y por sus antenas típicamente pectinadas, similares a una pluma.<sup>4,14</sup> *L. interrupta* tiene una definitiva preferencia por cierto tipo de vegetación, siendo el *Eucalyptus melanophloia* su principal árbol huésped.<sup>12</sup> La mayor población de *E. melanophloia* crece entre 150 y 450 m sobre el nivel del mar en la costa este de Australia (22°-33° S).<sup>6</sup> El hallazgo de larvas en otras especies de árboles ocurre únicamente luego de haber consumidas totalmente las hojas de los *E. melanophloia* y el traspaso consiguiente de las larvas hambrientas a los árboles vecinos.<sup>4</sup> En áreas muy infestadas, *E. melanophloia* totalmente desnudos de hojas pueden ser vistos a lo largo de varios kilómetros a fines del invierno.<sup>12</sup> En esas condiciones, las larvas han sido vistas alimentándose, también, en el *Eucalyptus crebra*, *E. fibrosa*, *E. rostra*, *E. gummifera*, *E. mollucana*, *E. populnea* y el *E. scabra*, e incluso en árboles tan diferentes como la *Acacia melanoxilum*. Sin embargo, *L. interrupta* depende bastante estrechamente del *E. melanophloia* ya que la hembra deposita los huevos sólo en esta especie.<sup>12</sup>

*Arge pullata* (Argidae) (Figura 3) fue reportada en 1974 en el sudeste de Dinamarca, donde se cree fue introducida desde las islas ubicadas sobre el mar Báltico.<sup>9,23</sup> Las larvas de *Arge pullata* mues-

tran, también, una definitiva preferencia por cierto tipo de árboles, siendo su huésped específico el abedul (*Betula pendula*).<sup>23</sup> Los bosques de abedules son comunes en las tierras marginales de Dinamarca donde se practica la cría extensiva de ovinos y bovinos.<sup>18</sup>

*Perreyia lepida* es un Hymenoptera perteneciente a la familia Pergidae,

subfamilia Perreyiinae. Esta subfamilia se encuentra exclusivamente en América del Sur. La taxonomía de este grupo se basa casi exclusivamente en los individuos machos, que son colectados más frecuentemente que las hembras, las cuales son más grandes y robustas que los machos, de hábitos más sedentarios y de poco vuelo. *P. lepida* ha sido reportada en Argentina (Corrientes), Paraguay, Brasil (Matto Grosso, Paraná, Río Grande del Sur, Santa Catarina, Río de Janeiro, San Pablo, Pernambuco, Espírito Santo), Bolivia y Venezuela.<sup>21</sup> La hembra mide 1.1 cm de largo y las antenas, los tarsos y la cabeza son de color negro. Esta especie tiene multitud de sinónimos (*Lophyroides dorsuarria* y *Paraperreyia dorsuarria*, entre otros) atribuible a la variación de color que presenta, especialmente la extensión del rojo y blanco en el tórax.<sup>21</sup> Esta es la única especie de *Perreyia* que las antenas del macho son segmentadas simples, sin ningún tipo de proyecciones en los segmentos (no pectinadas).<sup>20</sup> A diferencia de las especies anteriores, no se conocen los hábitos alimentarios de *P. lepida* ni los lugares donde la hembra realiza la postura de los huevos. La mosca adulta ha sido

observada sobre pequeñas plantas arbustivas como *Senecio* sp., *Baccharis* sp. y *Eryngium* sp., y se ha sugerido estas puedan ser las plantas huéspedes de los primeros instares de las larvas.<sup>20</sup> Las larvas más grandes parecen alimentarse de hojas de gramíneas,<sup>5</sup> así como de heces secas bovinas.<sup>20</sup>

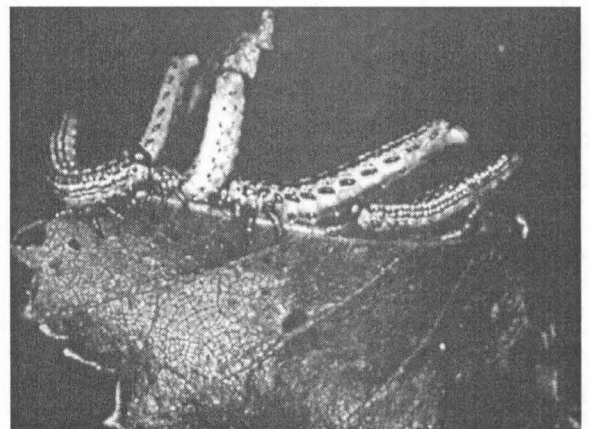
### Ciclo biológico de las moscas sierras tóxicas

Como en la mayoría de los insectos, se reconocen 4 diferentes fases en el ciclo biológico de las moscas sierras: huevo, larva, pupa y adulto.

#### *Lophyrotoma interrupta*

Los adultos aparecen inmediatamente luego de las lluvias de fines de verano y su período de actividad se extiende de febrero hasta abril (Hemisferio Sur). Tienen una vida muy corta y son muy susceptibles a las bajas temperaturas, causando unas pocas horas de frío la muerte de gran cantidad de individuos.<sup>4</sup>

La hembra deposita los huevos en las hojas jóvenes pero bien formadas del *E. melanophloia*. Los huevos son de color verde pálido y de forma oblonga. Cada hembra deposita hasta 12 huevos en una sola hoja, uno al lado del otro, en pequeños cortes que realiza en el borde de la misma con su órgano de oviposición en forma de sierra. El período de incubación de los huevos es de aproximadamente



**Figura 3.** Larvas de *Arge pullata* sobre hojas de *Betula pendula*, Dinamarca. (Foto cedida por el Dr. Peter Oelrichs).

3 semanas, pero la falta de humedad retarda la eclosión y los destruye en grandes cantidades si se prolonga.<sup>4</sup>

Las larvas son de color verde pálido o amarillo, con numerosas manchas circulares blancas en el dorso, mientras la cabeza es de color rojo oscuro o marrón; el cuerpo se adelgaza paulatinamente hacia posterior, finalizando en un apéndice alargado semejante a una espina de color rojizo (Figura 2). Inmediatamente luego de eclosionar, las larvas forman pequeños grupos o colonias y comienzan a alimentarse en los bordes de las hojas donde nacieron. Las larvas se alimentan vorazmente, pudiendo unas cuantas larvas grandes consumir una hoja en pocas horas. A medida que las larvas crecen, los grupos tienden a dispersarse y las larvas más grandes pueden encontrarse entonces aisladamente. En condiciones normales, su período de desarrollo se extiende desde julio a septiembre (invierno, hemisferio sur), finalizando su crecimiento entre agosto y comienzos de octubre. Las larvas que completan su desarrollo, pierden su apéndice posterior y descienden al pie de los árboles para pupar. La exposición directa al sol a medida que las hojas de los árboles son consumidas, y el aumento de temperatura de inicios de primavera se cree estimulan el descenso de las larvas.<sup>4, 12, 14</sup>

Las larvas pupan bajo la superficie del suelo, generalmente al pie del mismo árbol que les sirvió de alimento. La larva evoluciona a la fase de prepupa, produce una secreción viscosa que adhiere las pequeñas partículas de tierra, y forma una cáscara oval, compacta, de aspecto coriáceo. La profundidad a la que ocurre la pupación depende en gran medida del tipo de suelo. En suelos arenosos, las pupas pueden encontrarse individualmente hasta 25 cm bajo el suelo, mientras que en suelos compactos se encuentran más superficialmente, generalmente agrupadas o adheridas unas a otras.<sup>4, 14</sup> La mayor parte del tiempo bajo tierra transcurre en el estado de prepupa, estadio en el que puede incluso permanecer por más de un año a la espera de condiciones favorables para eclosionar.<sup>12</sup> Eventualmente la prepupa evoluciona a la fase de pupa, formándose entonces las alas y las otras estructuras de la fase adulta.

Una vez formado, el adulto rompe la cáscara que lo protegía y se libera a través de una galería que horada en el suelo.<sup>4, 14</sup>

#### *Arge pullata*

El ciclo biológico de *Arge pullata* es muy similar al de *L. interrupta*. Sin embargo, debido al largo invierno del norte de Europa, el período de permanencia de las pupas bajo el suelo es más prolongado, permitiendo que los adultos y las larvas tengan su período de actividad en los meses más benignos de verano.<sup>18</sup> Los adultos emergen en junio (verano, hemisferio norte), y la hembra deposita los huevos en los bordes de las hojas jóvenes de los abedules. Las larvas eclosionan en julio y agosto y son de color amarillo con líneas negras punteadas en el dorso. Ellas se alimentan hasta fines de setiembre, cuando descienden al suelo para pupar bajo la superficie del suelo, cerca del árbol que les sirvió de alimento.<sup>18, 23</sup>

#### *Perreyia lepida*

Los adultos emergen entre noviembre y abril. No existe información sobre el lugar de postura de las hembras ni sobre los hábitos de los primeros instares de las larvas.<sup>20</sup>

Las larvas desarrolladas son de color negro, miden hasta 2.5 cm de largo y muestran un inusual hábito gregario. Entre junio y septiembre, grupos de larvas se observan desplazándose sobre la pastura, formando una columna alargada. Los grupos son particularmente numerosos los días lluviosos y nublados. Esta forma tan característica de desplazamiento es probablemente usado con éxito por la especie para buscar más alimentos. Hábitos de desplazamiento similares han sido reportados en otros miembros de la familia Pergidae en América del Sur, incluyendo a la mosca sierra *Syzygonia cyanocephala* en Río de Janeiro, Brasil, y a una especie no identificada, perteneciente posiblemente a la subfamilia Perreyiinae, observadas en Guyana y Bolivia. Las larvas de esta última se desplazaban sobre el suelo en grupos compactos de unos 200 individuos, de forma elíptica-elongada y de aproximadamente 25x10x5cm.<sup>21</sup>

La larva totalmente desarrollada sufre una metamorfosis, en la cual la piel se rompe en una abertura antero-posterior que alcanza al primer segmento del tórax. Por esta abertura sale la prepupa, de color blanco-amarillo y de 12,5 mm de largo. Una vez bajo la superficie del suelo la prepupa expele una sustancia clara y viscosa, con la que adhiere pequeñas partículas de tierra y forma una cáscara de protección, de textura coriácea y color negro. La pupa se forma aproximadamente 5 cm bajo la superficie del suelo, donde pasa la mayor parte del tiempo en la fase de prepupa. En un período de alrededor de 6 meses la prepupa se transforma en pupa y 15 días después emerge el insecto adulto.<sup>20</sup>

### La intoxicación por larvas de mosca sierra

#### Epidemiología

La intoxicación por larvas de *Lophyrotoma interrupta* ha sido observada desde fines del siglo XIX en Queensland, Australia. Los bovinos se introdujeron en esta región en 1862 y la primera sospecha de casos se reportó en 1887, realizándose su confirmación definitiva en 1911.<sup>12</sup> Brotes de la enfermedad se han comunicado periódicamente desde entonces, registrándose casos en 1911, 1913, 1914, 1917, 1921, 1922, 1924, 1926-28, 1931, 1936-38, 1940, 1954, 1955, 1959, 1961-63 y en 1972-81.<sup>6, 12</sup>

La enfermedad es un serio problema en la región dado que numerosas pérdidas de animales ocurren en cada brote. En 1911 se reportaron 100 muertes de bovinos, 200 en 1913, 556 en 1914, "miles" en 1921, 60 en 1954 y 150 en 1962.<sup>12</sup> En 1979 más de 1800 bovinos murieron en 16 propiedades afectadas, y pérdidas de más de 800 cabezas se presentaron en 1980 en un sólo establecimiento.<sup>14</sup> Un estudio más reciente reportó 5254 animales muertos en 37 predios entre 1972-81, siendo 1975 y 1979 los peores años, en los cuales murieron 956 y 1895 bovinos, respectivamente.<sup>6</sup>

Casos espontáneos de la enfermedad en bovinos y ovinos se han observado únicamente en los distritos ganaderos de Maranoa, Warrego y Leichhardt, en áreas donde existen grandes bosques de

*Eucalyptus melanophloia*.<sup>4,6</sup> Hay una relación directa entre la intoxicación y la densidad de árboles de *E. melanophloia*. Dadswell y col. (1985) reportaron casos de enfermedad en el 22%, 50% y 65% de los predios con densidades de *E. melanophloia* de 0-30%, 30-60% y 60-100%, respectivamente. Los mismos autores mencionan también que la enfermedad nunca fue observada en otros distritos donde se encuentran larvas de *L. Interrupta*, ni en el 52% de los predios de los distritos donde la intoxicación está presente.<sup>6</sup> En base a esto se ha sugerido que algunas áreas pueden catalogarse de seguras, aún cuando existan árboles de *E. melanophloia* infestados.<sup>14</sup>

La mayoría de las muertes ocurren entre julio y comienzos de octubre.<sup>6</sup> La enfermedad se presenta en años de infestación severa, cuando las larvas consumen totalmente las hojas de los eucaliptos antes de madurar lo suficiente para pupar. Las larvas hambrientas descienden prematuramente en busca de más alimentos, y se acumulan en grandes cantidades al pie de los árboles en grupos de hasta 60 cm de largo y 30 cm de profundidad.<sup>4, 12</sup> Muchos de estos grupos de larvas mueren y se transforman en una masa gelatinosa, de color negro y olor desagradable. Estas masas de larvas, vivas o muertas y en descomposición, son buscadas e ingeridas ávidamente por el ganado. La competencia entre los bovinos por este tipo de alimento es intensa, al punto de observarse los animales luchando entre árbol y árbol para obtenerlo.<sup>4</sup> No se conoce la razón de la avidez que muestran los animales por las larvas. Se ha sugerido una deficiencia de fósforo y/o proteínas para explicar esa atracción, especialmente teniendo en cuenta que los brotes ocurren en un período del año cuando la pastura está seca y madura.<sup>4</sup> El alto contenido de proteína cruda de las larvas, de hasta 40%, podría hacerlas aún más atractivas para los animales; sin embargo la suplementación con fósforo, calcio y proteínas ha sido ineficaz para prevenir los brotes, siendo lo más probable que los animales ingieran las larvas simplemente porque ser palatables.<sup>12</sup> Los animales trasladados de áreas donde ocurren brotes a las áreas donde existen larvas, pero no brotes de enfermedad, pierden el hábito de ingerir

las larvas. Esto sugiere la existencia de un factor químico en las larvas del área problema que las hace palatables para el ganado.<sup>14</sup>

No se conocen los factores que regulan la dinámica poblacional del insecto y que pudieran servir para predecir los años de gran cantidad de larvas. No se ha encontrado ninguna relación entre la pluviosidad anual o mensual y la ocurrencia de la enfermedad. De 21 brotes examinados, 13 ocurrieron en años de pluviosidad normal, 4 en años secos y 4 en años lluviosos.<sup>6</sup> Otras variables que podrían influenciar la población de larvas, tales como la temperatura y humedad del suelo o la tasa de infección por hongos, no fueron examinados.<sup>6</sup>

Casos espontáneos de intoxicación por larvas de *Arge pullata* se describieron en Dinamarca, en ovinos<sup>23</sup> y en un perro<sup>3</sup>. Experimentalmente la toxicidad de *Arge pullata* se comprobó también en cabras.<sup>23</sup> Al igual que los brotes en bovinos en Australia, el brote en ovinos se caracterizó por una alta mortalidad, muriendo 50 borregos y ovejas de un total de 250 en un período de 4 días. La enfermedad ocurrió en la isla de Sjaelland, sobre el mar báltico, luego de que los animales fueran movidos a un potrero donde existían gran cantidad de árboles de abedules (*Betula pendula*), fuertemente infestados con larvas de *A. pullata*. El brote se produjo luego que las larvas consumieron totalmente las hojas de los abedules y descendieron de los árboles en busca de más alimentos.<sup>23</sup> A diferencia de *L. interrupta*, en Dinamarca las larvas de *Arge pullata* no se congregan en grandes masas al pie de los árboles, sino que permanecen dispersas entre la pastura en gran número, aumentando así el riesgo de exposición de los animales.<sup>17</sup> En Dinamarca, todas las larvas de *A. pullata* son tóxicas, no existiendo evidencia de áreas "tóxicas" y "no tóxicas" como en Queensland.<sup>17</sup>

Hasta la introducción de los métodos más modernos de producción porcina, las larvas de *P. lepidia* causaban grandes pérdidas económicas a los criadores de cerdos de Río Grande do Sul y Santa Catarina, Brasil. Las muertes se producían en los días fríos y lluviosos o nublados de invierno, cuando aumentan considerable-

mente el número de grupos de larvas desplazándose sobre la pastura.<sup>5, 20</sup> En tales circunstancias, los cerdos ingieren las larvas que causan la muerte de numerosos animales. Debido a esto, las larvas son conocidas popularmente en la región con el nombre de "mata porco".<sup>20</sup>

### Signos Clínicos

Clínicamente los animales intoxicados con larvas de *Lophyrotoma interrupta* presentan síntomas variables y poco específicos. Algunos muestran excitación y fasciculaciones musculares, seguidos por convulsiones y agresividad. Otros pierden estado corporal rápidamente y presentan debilidad, acentuada depresión del sensorio y temperatura elevada, mayor a 40,2 °C, un hallazgo poco frecuente en una enfermedad tóxica.<sup>4, 13</sup> La mayoría de los animales mueren dentro de las 48 horas de enfermar, siendo frecuentemente los animales encontrados muertos. Los que sobreviven por varios días presentan ictericia leve y fotosensibilización. Los animales pueden también recuperarse, aunque una vez en decúbito generalmente evolucionan al coma y la muerte.<sup>4, 13</sup> Otros síntomas que han sido descritos son poliuria persistente, heces secas, rechinar de dientes y dolor abdominal, ceguera, opistótonos y movimientos de pedaleo previo a la muerte.<sup>4, 12, 13, 14</sup>

Los signos clínicos de los ovinos y cabras intoxicados por larvas de *Arge pullata* son muy similares a los observados en bovinos intoxicados por larvas de *L. Interrupta*, observándose depresión, anorexia, dolor abdominal, incoordinación y decúbito. En ninguno de los animales se observó ictericia y los animales que sobreviven tienen un prolongado período de convalecencia.<sup>23</sup>

No existen datos detallados sobre el cuadro clínico de los cerdos intoxicados con las larvas *Perreyia lepidia* ("mata porco"), ni referencias de intoxicación de otras especies animales. En condiciones naturales, la muerte se produce 8 a 12 horas o más luego de ingerir las larvas, mostrando previamente los animales signos de debilidad, decúbito y movimientos de pedaleo.<sup>20</sup>

### Patología

Las primeras descripciones de los hallazgos de necropsia de bovinos intoxicados



por larvas de *L. interrupta* resaltaban la congestión y hemorragias del tracto digestivo.<sup>4, 19</sup> Más recientemente McKenzie y col. (1985b) caracterizaron la enfermedad como una necrosis hepática tóxica. En los casos severos el hígado se presenta de color rojo oscuro y de bordes redondeados, con un edema prominente de la vesícula biliar y el hilio hepático. En casos menos severos el hígado es pálido, con un moteado oscuro en la superficie de corte, lo que le confiere un aspecto característico de "nuez moscada". Restos de larvas, especialmente las cabezas, se encuentran siempre en los pre-estómagos de los animales muertos de la enfermedad. Otros hallazgos macroscópicos menos consistentes son petequias subepicárdicas y subendocárdicas, hemorragias generalizadas de serosas y subcutáneo, e ictericia.<sup>13</sup>

A la histopatología, la principal lesión encontrada es una necrosis hemorrágica de distribución periácinar a panácinar (masiva), presentándose los hepatocitos peri-portales sobrevivientes con degeneración y vacuolización citoplasmática. Otros hallazgos que le dan cierta especificidad a la histopatología de la intoxicación son la necrosis y depleción de linfocitos en la pulpa blanca del bazo y ganglios linfáticos y desaparición casi completa de los centros germinales.<sup>13</sup> En casos experimentales se describen también vacuolización del epitelio de los túbulos renales proximales con presencia de cilindros hialinos. Esta nefrosis, aunque leve, podría ser importante, en condiciones de campo, donde es más probable que la deshidratación condicione la supervivencia de los animales. Experimentalmente, la nefrosis es una lesión más importante en pollos que en bovinos.<sup>12</sup>

En la necropsia de ovinos intoxicados con larvas de *Arge pullata* se encuentran hemorragias petequiales subepicárdicas y en la serosa del esófago, así como edema y hemorragias en la región ventral del cuello. Los animales presentan, también, líquido sero-hemorrágico en las cavidades abdominal y torácica y congestión y edema pulmonar. En todos los casos se encuentran restos de larvas, especialmente las cabezas, en el tracto gastrointestinal. El órgano más afectado es el hígado, que presenta hemorragias y un aspecto

característico en "nuez moscada". A la histopatología se encuentra necrosis hepática aguda masiva, degeneración de los túbulos renales y necrosis de linfocitos en la pulpa blanca del bazo y ganglios linfáticos.<sup>23</sup>

No existen datos sobre la patología de los casos espontáneos de la intoxicación por larvas *Perreyia lepida*, ni reproducciones experimentales de la enfermedad.

### **Reproducción Experimental**

Los hallazgos clínicos y la patología de terneros intoxicados experimentalmente con larvas de *L. interrupta* en dosis de 0.75, 1.5 y 3g de materia seca por kg de peso vivo (g MS/kg), son idénticos a los observados en los casos de campo.<sup>12</sup> Excepto los animales que recibieron 0.75 g/kg y uno que recibió 1.5 g MS/kg, que se recuperaron, el resto evolucionó al coma y la muerte dentro de las 72 horas. Todos los animales presentaron a la necropsia hígados pálidos con áreas oscuras y hemorrágicas y aspecto típico en "nuez moscada" y a la histopatología se encontró necrosis periácinar hemorrágica de grado variable.<sup>12</sup> La dosis letal media en bovinos es de 1.8 g MS/kg, y los límites superior e inferior de confianza con 95% de probabilidad son 1.3 y 2.5 g MS/kg. El contenido de materia seca de las larvas es de 30%.<sup>13</sup>

La concentración de bilirrubina, fosfatasa alcalina, gama-glutamyltransferasa (GGT), transaminasa glutámico oxalacética (GOT) y creatinina en suero y amonio en plasma, aumentan en los animales intoxicados experimentalmente. Estas alteraciones son explicadas por una severa lesión hepática y una leve alteración de la función renal. Los niveles reducidos en la concentración de fibrinógeno plasmático, y los tiempos de protrombina y tromboplastina alargados, explican las hemorragias severas observadas en los casos de campo. La concentración elevada de amonio y glutamina en el líquido cefaloraquídeo y los bajos niveles de glucosa en sangre, indican un cuadro de encefalopatía hepática.<sup>13</sup>

La intoxicación con larvas de *Arge pullata* se reprodujo experimentalmente en ovinos con dosis de 1.6 y 4.5g de larvas frescas por kg de peso vivo, y en cabras en dosis de 7.5 g/kg.<sup>23</sup> El cuadro clínico y la pa-

tología son similares a los casos de campo. Las alteraciones bioquímicas y hematológicas muestran que el hígado es también el principal órgano afectado. La actividad sérica y plasmática de la aspartato aminotransaminasa (ASAT), alanina aminotransaminasa (ALAT), fosfatasa alcalina (AP) y gama glutamiltransferasa (GGT) se incrementan entre 50 y 100 veces. El aumento significativo observado en los niveles de ALAT no corresponden a una severa necrosis hepática en rumiantes y se deben probablemente a una lesión muscular severa causada por las convulsiones. Los niveles de bilirrubina también aumentan de 2.9 a 25.8 mol/litro 36 horas luego de la dosificación, mientras los niveles de urea plasmática, hemoglobina y hematocrito no muestran variación. Una neutrofilia y linfocitopenia moderada se observa en todos los animales previo a la muerte.<sup>18, 23</sup>

Experimentalmente se ha demostrado un antagonismo entre la intoxicación por larvas de *Arge pullata* y la parasitosis aguda por larvas de *Fasciola hepatica*.<sup>18</sup> El estudio de tal interacción podría tener no solo importancia teórica sino también relevancia práctica, ya que ambas enfermedades ocurren conjuntamente en la misma región de Dinamarca. El efecto antagónico de la *Fasciola hepatica* es probablemente debido a su acción inhibidora de las enzimas oxidativas microsomales del hígado, que serían las responsables de la transformación del principio activo de las larvas en metabolitos tóxicos.<sup>18</sup>

Recientemente, la toxicidad de las larvas de *Perreyia flavipes*, fue comprobada en cerdos dosificados con 5 y 10 g de larvas por kg de peso vivo. En ese trabajo se demostró también que el principio activo de las larvas no tiene un efecto acumulativo.<sup>22</sup>

### **La Toxina**

Un octapéptido hepatotóxico conteniendo 4 D-aminoácidos y denominado lophyrotomina, ha sido aislado de las larvas de *L. interrupta* y de *A. pullata* en concentraciones de hasta 0.07% de la materia seca.<sup>9, 16</sup> La DL50 de la lophyrotomina es de 2 mg/kg por inyección intraperitoneal en ratones.<sup>16</sup> El efecto hepatotóxico de la lophyrotomina se ha comprobado además en pollos, ratas y



terneros.<sup>25</sup> La toxina, soluble en agua y en alcohol, es estable a 100 C hasta por 3 días y, en solución acuosa neutra, su toxicidad puede conservarse por varios meses.<sup>25</sup> La lophyrotomina esta compuesta por 6 aminoácidos en relación molar de 1:1:1:1:2:2, y su fórmula es:



- (D)Alanina - (D)Fenilalanina - (L)Valina - (L)Ileoluecina - (D)Asparagina - (L)Asparagina - (D)Glutamina - (L)Glutamina.<sup>25</sup> La presencia de 4 ácidos dicarboxílicos en el extremo C-terminal de la molécula (2 asparagina y 2 glutamina) explica sus propiedades fuertemente ácidas. Los 4 D-aminoácidos y el grupo benzoico bloqueando el extremo N-terminal le confieren a la molécula una gran resistencia frente a enzimas hidrolíticas, como la papaína, quimiotripsina, carboxipeptidasa-A, carboxipeptidasa-Y, termolisina y combinaciones de diversas proteasas y aminopeptidasas no específicas.<sup>25</sup> Se ha sugerido esto sea la razón por la que el péptido no sea degradado en el tubo digestivo y mantenga su toxicidad luego de ingerido.<sup>17</sup>

La presencia de D-aminoácidos en un péptido aislado de un animal es un hecho único y sin precedentes. Existen diversos péptidos tóxicos naturales con D-aminoácidos, pero todos ellos provienen del reino vegetal (como los ciclopéptidos hepatotóxicos de la cianobacteria *Microcystis aeruginosa* o los péptidos hepatotóxicos del hongo *Amanita*).<sup>25</sup> Los estudios biosintéticos realizados sugieren que la lophyrotomina no es sintetizada por los microorganismos que viven simbióticamente con la larva o concentrado por ésta de su fuente alimenticia, sino que las larvas elaboran el tóxico de *novo*.<sup>17</sup> Es probable que la lophyrotomina se haya desarrollado con fines defensivos ya que, cuando agredidas, las larvas de *L. interrupta* secretan un fluido oleoso conteniendo 10 veces la concentración de lophyrotomina. El carácter fuertemente ácido de este fluido es suficiente para disuadir la mayoría de los predadores.<sup>17</sup> La resistencia a las enzimas hidrolíticas y el efecto hepatotóxico de la lophyrotomina probablemente sirvan también para detener o matar los grandes predadores.<sup>9, 17</sup>

Pequeñas cantidades de lophyrotomina y grandes cantidades de otro polipéptido hepatotóxico, compuesto por 7 aminoácidos y un grupo fosfato terminal, fueron identificados recientemente en las larvas de *Perreyia flavipes* provenientes del departamento de Durazno, Uruguay, una zona donde ocurren brotes de intoxicación.<sup>15</sup> A este nuevo heptapéptido altamente hepatotóxico se lo se ha denominado *pergidina*.<sup>15</sup>

El sitio y el mecanismo de acción de estos péptidos tóxicos en la célula no se conoce. La lophyrotomina tiene efecto directo sobre los hepatocitos, el epitelio tubular renal y los linfoblastos de los centros germinales del bazo y ganglios linfáticos.<sup>13</sup> La estructura de la lophyrotomina sugiere que el extremo N-terminal, hidrófobo y liposoluble, interacciona con la membrana celular, mientras que la porción C-terminal hidrofílica lo hace con los iones metálicos dentro del citoplasma.<sup>25</sup> La lophyrotomina probablemente ejerce su efecto sobre el hepatocito a través del sistema microsómico de oxidasas de función mixtas.<sup>18</sup> El mecanismo de acción de la pergidina es aparentemente similar, aunque su acción es más severa.<sup>15</sup>

La administración oral a terneros de dosis crecientes de lophyrotomina no induce una respuesta inmune significativa.<sup>13</sup> Este escaso poder inmunógeno es debido al bajo peso molecular de la toxina.<sup>17</sup> Para desarrollar un toxoide con fines de protección a campo, la toxina se debería unir a una molécula portadora de mayor peso molecular,<sup>12</sup> lo que probablemente sea demasiado costoso.<sup>6</sup>

#### Control de la intoxicación

En Queensland para controlar o prevenir los brotes, el 21% de los ganaderos trasladan los animales a potreros donde no existen o son escasos los *E. melanophloia*. La mayor dificultad de este método es que los animales no regresan a los potreros hasta principios de octubre, por lo que los potreros quedan sin pastorear justo en un período del año con escasez de forraje.<sup>6</sup> Otros productores (29%) eliminan parcial o totalmente los árboles, pero problemas de erosión severos pueden ocurrir al exponer el suelo, y en algunas áreas la deforestación no

es posible.<sup>6</sup> El 17% de los productores suministran suplementos conteniendo fósforo, calcio y proteínas, pero ésta medida ha resultado ser poco efectiva en la práctica ya que no existe evidencia que compruebe que las larvas son ingeridas por carencia nutricional.<sup>6</sup> Los datos disponibles sugieren, por el contrario, que los bovinos simplemente apetece las larvas.<sup>12</sup> Aunque todos estos métodos han sido efectivos en algunos establecimientos, las pérdidas totales de animales no han disminuido desde que la enfermedad fue investigada por primera vez. Una de las razones de esto, es la poca viabilidad económica del área endémica y el escaso incentivo y recursos económicos de los ganaderos para aplicar métodos de prevención. Así, hasta el 48% de los productores que reportaron tener muertes de animales no toman ninguna acción.<sup>6</sup>

Otro método de control sugerido ha sido el uso de antidotos similares a los usados en la intoxicación por *Amanita* spp. Las toxinas de *Amanita* spp. son octapéptidos hepatotóxicos, similares a la lophyrotomina.<sup>14</sup> A pesar de existir resultados experimentales promisorios con el antidoto silymarina, un compuesto aislado de la planta *Silybum marianum*,<sup>24</sup> su uso es impracticable en condiciones de campo, ya que cuando los animales muestran signos de intoxicación la lesión del hígado es severa e irreversible.<sup>12</sup>

La inmunización de los bovinos con la toxina purificada y unida a una molécula de gran tamaño es técnicamente posible, pero probablemente muy costosa. El mercado potencial para una vacuna de tal tipo sería, en Australia, de sólo 16 a 20 establecimientos ganaderos con 40.000 a 50.000 cabezas de ganado.<sup>6, 12</sup> La efectividad de tal vacuna es también cuestionable dado el repentino y elevado nivel de toxina en sangre que se da en los animales intoxicados y que fácilmente sobrepasaría la inmunidad lograda (Ross A. McKenzie, comunicación personal, 1996).

Como mejor forma de controlar los brotes y disminuir el impacto económico de la enfermedad, en Australia se ha propuesto profundizar el estudio de la dinámica poblacional de las larvas y los fac-

tores que las afectan, a los efectos de predecir los años cuando el número de larvas aumenten.<sup>6</sup>

Según Rodrigues Camargo (1955) el combate sistemático de las larvas de *Perreya lepidota* sería difícilmente realizable, ya que las mismas se encuentran en pequeños grupos dispersos y nunca en grandes aglomeraciones. El control de los adultos tampoco sería posible dado que los mismos siempre aparecen en escaso número y son raramente observados.<sup>20</sup>

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Estudio de los casos espontáneos

Entre junio y septiembre de 1993, 1994 y 1995, numerosos brotes de una enfermedad altamente letal ocurrieron en la región centro-sur del Uruguay en ovinos y bovinos. La información presentada en este trabajo se obtuvo de 6 establecimientos visitados en los que ocurrieron brotes de la enfermedad en los años de 1994 y 1995, y en los cuales se realizó como mínimo 1 necropsia para confirmar el diagnóstico. Se realizaron un total de 10 necropsias y muestras de diferentes órganos se fijaron en formol bufferado al 10%, se incluyeron en parafina y cortes de 5 micras de espesor se colorearon por la técnica de hematoxilina y eosina.

### Intoxicación experimental

#### Experimento 1

En agosto de 1995, larvas vivas se recogieron de dos predios donde estaba ocurriendo la enfermedad. Las larvas se mantuvieron refrigeradas a aproximadamente 5° C hasta su administración. Las larvas vivas fueron administradas por vía oral, en dosis de 40 g por kg de peso vivo (g/kg), a un ternero Hereford destetado (N° 1) de 70 kg de peso. Otro animal (N° 2), cruza Brahman x Charolais, de 1 año de edad y 100 kg de peso, recibió 9 g/kg de larvas, las que al momento de la administración se encontraban muertas; 7 días luego de la administración se obtuvo del animal una biopsia hepática.

#### Experimento 2

Este experimento se realizó con las mismas larvas del experimento anterior. Tres ovinos (N° 3, 4 y 5) de 15, 35 y 32 kg de

peso fueron dosificados por vía oral con 40, 20 y 10 g/kg de larvas, respectivamente. El animal N° 3 recibió larvas vivas. Las larvas administradas a los animales N° 4 y 5 se conservaron a 5° C por 72 horas y estaban muertas al momento de la administración.

Todos los animales experimentales se observaron por lo menos 2 veces al día, controlándose la frecuencia respiratoria, cardíaca y ruminal hasta la muerte o eutanasia. Los animales muertos espontáneamente o sacrificados *in extremis* fueron necropsiados. Muestras de diferentes órganos, así como la biopsia del animal N° 2, se fijaron en formol bufferado al 10% y se procesaron para estudio histopatológico de la misma forma descrita para los casos espontáneos.

### Estudio epidemiológico de la enfermedad

Para estudiar la relación de la enfermedad con algunos factores geográficos, climáticos y de manejo, se usó la información disponible sobre cinco brotes de intoxicación ocurridos en 1993, tres en 1994 y seis en 1995. Para el análisis se dispuso también de la información epidemiológica obtenida en una encuesta realizada sobre 32 predios afectados en 1995, y que fuera amablemente cedida por Díaz y col. (1995).

La asociación entre la ocurrencia de la intoxicación y la presencia de bosques de *Eucalyptus* spp., se estudió a través de un mapa de superposición. Los brotes de la enfermedad (N=41) se superpusieron sobre las secciones judiciales de los departamentos de Durazno, Flores y Florida, discriminadas según superficies forestadas de 0, 1-200, 201-500, 501-1000, 1001-3000 y 3001-6500 hectáreas. Las representaciones cartográficas y la información de las áreas forestadas se obtuvo de la Dirección Forestal, División Planeamiento, del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca.

Para estudiar la relación de la enfermedad con la topografía y el tipo de suelos, los focos (N=37) se superpusieron en un mapa hipsográfico del Uruguay en escala 1:500.000, con curvas de nivel cada 50 metros, así como en un mapa de suelos del Uruguay en escala de 1:1.000.000 (N=40). La carta geográfica usada se ob-

tuvo del Servicio Geográfico Militar, Ministerio de Defensa Nacional, y el mapa de suelos de la Dirección de Suelos del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca.

Los datos de temperatura mensual media y de precipitaciones mensuales totales de los años 1993, 1994 y 1995, de los departamentos de Durazno y Florida, se obtuvieron de la Dirección Nacional de Meteorología. Los datos se compararon con los promedios mensuales de los 10 años previos a la ocurrencia de la enfermedad (1982 - 1992), y se examinaron buscando alguna correlación que explicara los brotes.

La dotación animal de los predios afectados, calculada en unidades ganaderas por hectárea (UG/Ha), se comparó con la dotación respectiva de los departamentos de Durazno y Florida. La influencia de la dotación y de la relación lanar/vacuno en la morbilidad de la enfermedad (N° bovinos enfermos/total de bovinos en el predio), se analizó por regresión lineal simple y cuadrática en el software EPIINFO6, siendo la morbilidad la variable dependiente. Los datos de dotación y la relación lanar/vacuno al 30 de junio de 1995, tanto de los predios afectados como de los departamentos de Durazno y Florida, fueron proporcionados por la Dirección de Contralor de Semovientes (DICOSE) del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca.

### Identificación del insecto

En septiembre de 1996, grupos de larvas se colectaron en un predio ubicado a 50 km del área donde el año anterior se produjeron casos de intoxicación. La toxicidad de las larvas vivas se comprobó por su administración oral a un ovino adulto en dosis de 30 g/kg, que murió 24 horas más tarde con un cuadro clínico y patológico similar al observado en los casos de campo.

En el laboratorio las larvas se colocaron en recipientes de un m<sup>2</sup>, conteniendo césped de campo de 20 cm de espesor de tierra. Con el fin de que las larvas dispusieran de abundante vegetación, tanto verde como seca y en descomposición, los cultivos se recortaron y regaron periódicamente para mantener la altura de la pastura en 10-15 cm. Los recipientes

se cubrieron con una malla de nylon fina para evitar el escape de los adultos luego de la emergencia y se mantuvieron siempre a la intemperie. De los adultos obtenidos, 6 machos y 6 hembras se enviaron para su identificación al Dr David R. Smith del Systematic Entomology Laboratory, National Museum of Natural History, MRC 168, Smithsonian Institution, Washington, D.C. 20560, USA.

### Observaciones sobre la biología y ciclo biológico de *Perreya flavipes*

Las observaciones de campo se realizaron en el mismo potrero del que se obtuvieron otras 12 moscas adultas (6 machos y 6 hembras) identificadas por el Dr. D. R. Smith como *Perreya flavipes*. En el mes de septiembre de 1996, esta área se visitó cada 3 ó 4 días para coleccionar y observar el comportamiento de las larvas. En febrero y marzo de 1997 se realizaron nuevamente visitas periódicas para observar y coleccionar los individuos adultos.

Para obtener datos cuantitativos, se colectaron 31 grupos de larvas que se transportaron rápidamente al laboratorio en bolsas de nylon para evitar su desecación. Los grupos se pesaron por separado y se contabilizó el número de larvas de cada uno. Las larvas de 10 de los grupos se pesaron individualmente hasta una exactitud de 0.01 g. Se calculó la media y la desviación estándar del peso de las larvas, peso de los grupos y N° de larvas por grupo, y se calcularon los coeficientes de correlación respectivos y sus límites de confianza al 95%.

Para estudiar las fuentes alimenticias, 10 grupos de 30 larvas totalmente desarrolladas (2-2,5 cm) se colocaron en recipientes conteniendo 10 cm de tierra suelta. A cada cultivo se agregó un substrato alimenticio diferente: 1) hojas secas de pastura (gramíneas), 2) hojas verdes, 3) heno de alfalfa, 4) heces bovino secas desmenuzadas y 5) restos vegetales en descomposición. Se realizaron 2 repeticiones y los substratos se renovaron cada 2 días. Los cultivos permanecieron a la intemperie y se les agregó agua periódicamente para mantener su humedad, aunque se evitó su encharcamiento. Las larvas se observaron todos los días en su vitalidad y se pesaron cada

3 hasta 0.01 g de exactitud. El alimento se consideró apropiado para el desarrollo de las larvas cuando se encontró, al menos, 1 capullo, y si además no hubo diferencia significativa en su curva de crecimiento ( $P < 0.05$ ). Luego de la pupación de las larvas, se contaron los capullos, registrándose la profundidad en que la fueron encontrados (0-5 cm o 5-10 cm).

En febrero y marzo de 1997 se recogieron en el campo, 19 hembras y 56 machos, registrándose el tipo de vegetación y altura de la pastura sobre la que fueron encontradas las hembras.

Para lograr la cópula y la oviposición, 18 grupos, de 1 hembra y dos o tres machos, se colocaron recipientes de vidrio. En cada recipiente se colocaron verticalmente varias hojas verdes de gramíneas, de 10-15 cm de altura, lo suficientemente rígidas para sostener el peso de la hembra y el macho durante la cópula. Fueron fertilizadas hembras colectadas tanto en el campo como en el laboratorio Para favorecer la postura se colocó, en el fondo de cada recipiente, tierra suelta y restos vegetales secos. Los cultivos se cubrieron con malla fina de hilo para evitar el escape de los insectos.

Una vez realizado el desove, los huevos se colocaron en cajas de Petri conteniendo tierra fina suelta ( $N=16$ ). Cinco de esos cultivos se humedecieron periódicamente e incubaron en estufa a 25-27 °C; 10 se humedecieron y se dejaron dentro del laboratorio a temperatura ambiente; el cultivo restante se mantuvo a temperatura ambiente sin humedad. Los huevos se observaron diariamente bajo lupa binocular ( $\times 10$ ), y el período de incubación se estimó cuando se observó la primera larva.

Pasto seco, pasto en descomposición, pasto verde y heces secas bovinas, en diferentes proporciones y cantidades, se ofrecieron a las larvas jóvenes recién eclosionadas con el fin de encontrar el mejor alimento para su desarrollo. Las larvas se observaron bajo lupa diariamente, y la longitud de 3-8 individuos obtenidos al azar del cultivo se midió en milímetros cada 5 días. El período de tiempo que demoran en alcanzar el tamaño que tienen cuando están total-

mente desarrolladas y se observan en grupos en el campo (2-2.5 cm), se estimó en base a la regresión lineal simple calculada con los datos de crecimiento de los primeros 35 días de vida de las larvas jóvenes. El largo de vida total de las larvas se estimó, sumando al resultado de la regresión, el período de tiempo durante el cual las larvas desarrolladas, recogidas en el campo, permanecieron activas en el laboratorio hasta la pupación.

## RESULTADOS

### Casos espontáneos

La tasa de incidencia en los 6 predios visitados varió de 3% a 28%, siendo la categoría de sobreaños la más frecuentemente afectada. La enfermedad fue vista en bovinos de diferentes razas y ambos sexos. Una característica de los brotes eran las grandes pérdidas de animales en un período muy corto de tiempo, usualmente 4 a 8 días. En los predios A y B la enfermedad reapareció luego de un período de 7 ó 15 días en el que no se constataron muertes de animales. Excepto en el establecimiento B, la enfermedad se presentó en un sólo potrero (Cuadro 1). El cambio de animales a otro potrero era, aparentemente, una medida efectiva para detener las muertes.

En todos los establecimientos existía, en los potreros afectados, un exceso de pasturas secas y en descomposición, del crecimiento de verano (ver Figura 4). Aunque en los establecimientos A y C murieron también ovinos, principalmente capones y ovejas, no fue posible obtener ningún animal para necropsia.

La mayoría de los animales eran encontrados muertos. Los que mostraron signos clínicos, presentaban debilidad y marcada depresión (Figura 4), o bien excitación, agresividad y temblores finos de cuello, cabeza y orejas. Los más severamente afectados evolucionaban a la postración y muerte en 2 días. Los animales en los que la enfermedad se prolongaba por hasta una semana, mostraban ictericia y fotosensibilización discreta.

El hígado era el principal órgano afectado en todos los animales necropsiados. En algunos animales era de color amarillo pálido y presentaba en la superficie de corte un prominente patrón acinar, caracterizado por la presencia de pequeñas áreas os-



**Cuadro 1.** Bovinos afectados, mortalidad, duración de los brotes y N° de potreros afectados en 6 brotes de intoxicación por larvas de *Perreya flavipes*.

Predio*	Bovinos	N° de muertes y mortalidad (%)	Duración del brote (días)#	Potreros afectados
A	Vaquillonas 1-2 años	17 (12%)	2 (7) 4	1
B	Novillos 1-2 años	16 (11%)	3 (15) 5	2
C	Novillos 2-3 años	55 (28%)	5	1
D	Vaquillonas 2-3 años	70 (15%)	5	1
E	Novillos >3 años	6 (4%)	8	1
F	Vaquillonas 1-2 años	4 (3%)	7	1

\* En los predios B-F los brotes ocurrieron en agosto de 1995, en el establecimiento A el brote ocurrió en agosto y setiembre de 1994.  
# Números entre paréntesis indica los días en que no ocurrieron casos.



**Figura 4.** Ternero con depresión y debilidad por intoxicación con larvas *P. flavipes*. Notar el abundante acumulo de pasto seco. Agosto de 1995, 8<sup>va</sup> de Durazno.



**Figura 5.** Intoxicación por larvas de *P. flavipes*. Hígado con aspecto de «nuez moscada», de color oscuro con lóbulo derecho y amarillo en izquierdo.

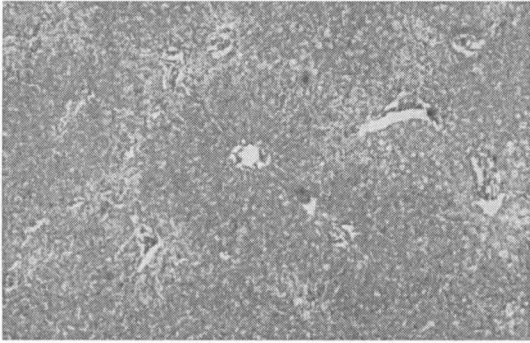
curas y hemorrágicas, colapsadas bajo una trama reticular de parénquima sobreviviente de color amarillo ("hígado en nuez moscada"). En otros, el órgano era de color rojo oscuro, de bordes redondeados, y al corte presentaba apariencia en mosaico, caracterizado por áreas de parénquima de color amarillo que sobresalía por sobre extensas áreas rojo-oscureas, colapsadas, de necrosis hemorrágica. Edema de vesícula biliar y del hilio hepático, que se extendía hasta el páncreas y el duodeno, era prominente en éstos casos. Ambos patrones morfológicos del hígado en "nuez moscada", el acinar y el mosaico, fueron vistos incluso en el mismo órgano, predominando el primero en el lóbulo izquierdo y el segundo en el derecho (Figura 5).

Las lesiones macroscópicas en otros órganos eran de aparición menos regular que las del hígado, pero más llamativas y obvias cuando se encontraban presentes. Hemorragias petequiales y sufusiones se observaban en las serosas y eran especialmente marcadas en el corazón (hemorragias subendocárdicas y subepicárdicas). Los vasos peritoneales estaban congestivos y prominentes, y hemorragias difusas se veían en el omento y en la luz del abomaso e intestinos. El recto contenía heces secas, duras, cubiertas por mucus y estriadas de sangre, y la mucosa se presentaba edematosa, con congestión y hemorragias longitudinales. Moderada cantidad de líquido ascítico, de color amarillo-pálido fue visto también

en algunos casos. Ictericia leve se observó en los casos de curso clínico más prolongado.

Invariablemente se encontraron restos de larvas en el rumen y omaso de todos los animales necropsiados. Los restos, especialmente las cabezas de las larvas, flotaban en pocos minutos si se colocaba contenido ruminal en agua.

Las lesiones histológicas se caracterizaban por necrosis hemorrágica del hígado, de distribución periacinar a masiva. En los hígados en "nuez moscada", las áreas de necrosis hemorrágica se distribuían alrededor de las venas centrolobulillares (necrosis periacinar o centrolobulillar) y los hepatocitos sobrevivientes periportales se mostraban tumefactos y con citoplasma claro y vacuolado (Figura 6). Los



**Figura 6.** Hígado con necrosis hemorrágica panacinar (masiva) con escasos hepatocitos periportales sobreviviente. Lesión que corresponde macroscópicamente a hígados oscuros en «mosaico». Bovino, caso espontáneo.

hígados con aspecto macroscópico en mosaico presentaban necrosis masiva del acino hepático, salvo algunas escasas células degeneradas remanentes alrededor de los espacios Porta (Figura 7).

La pulpa blanca del bazo de algunos animales presentaba necrosis de linfocitos y ausencia de centros germinales de los folículos linfáticos. En la lámina propia del colon se observó congestión, edema superficial y descamación focal del epitelio, y la luz del órgano presentaba abundante mucus y eritrocitos.

En los establecimientos no fueron encontradas plantas hepatotóxicas (*Cestrum parqui*, *Xanthium* spp. y *Wedelia glauca*), excepto en un establecimiento en el que se encontró *Cestrum parqui*. En uno de los establecimientos se descartó la presencia de algas verde-azuladas tóxicas (*Microcystis* spp.), las que tampoco se encontraron en otros pre-

diós en los que se buscó su presencia (Dr. Fernando Riet Alvariza, comunicación personal, 1995).

### Intoxicación Experimental

#### Experimento 1

El ternero N° 1 presentó diarrea profusa 9 horas luego de la administración de las larvas y a las 14 horas mostraba depresión y anorexia. Decúbito, temblores musculares y heces normales se observaron a las 21 horas, y a las 24 horas fue sacrificado cuando estaba en coma. El ternero N° 2 presentó anorexia los

días 4 y 5 luego de la administración de las larvas. Entre el 5° y 9° día se observó diarrea oscura discreta y al 10° día estaba clínicamente recuperado.

El hígado del animal N° 1 se encontraba agrandado, con un moteado oscuro en la superficie y presentaba los bordes redondeados. El lóbulo derecho era de color rojo oscuro y la superficie de corte presentaba pequeñas áreas de color amarillo. El lóbulo izquierdo era de color amarillo claro y la superficie de corte presentaba un moteado rojo-oscuro, con apariencia de "nuez moscada". Edema seroso marcado se observaba en la pared de la vesícula biliar, serosa del duodeno y páncreas, así como entre el hígado y el riñón derecho. El corazón pre-

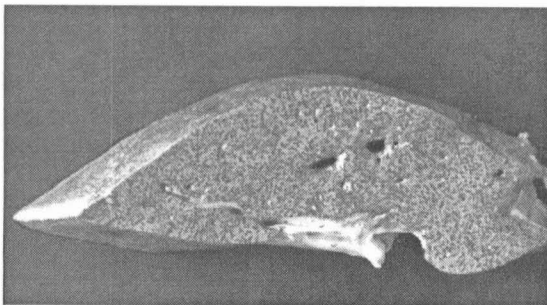
sentaba hemorragias subendocárdicas y subepicárdicas.

A la histología se observó necrosis hemorrágica restringida alrededor de las venas centrolobulillares del lóbulo izquierdo del hígado. El lóbulo derecho presentaba necrosis masiva con células de Kupffer prominentes y abundantes restos nucleares picnóticos. Linfocitos necróticos se observaron en la pulpa blanca del bazo y ganglios mesentéricos. La biopsia del hígado del ternero N° 2 presentaba hepatocitos vacuolizados y con edema intracelular en las áreas periportales. Los cordones hepáticos de la región periacinar estaban distorsionados y con numerosas células apoptóticas y algunas mitosis.

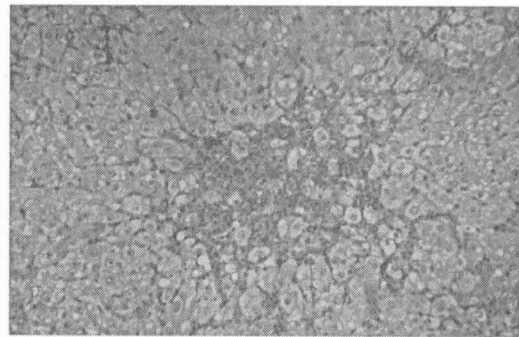
#### Experimento 2

El cordero N° 3 mostró depresión y frecuencia respiratoria de 120 por minuto, 12 horas luego de ingerir 40 g/kg de larvas. Dos horas más tarde se observó temblores musculares, movimientos de pedaleo, y muerte. El ovino N° 4 mostró, 20 horas luego de la administración, depresión, anorexia y heces secas con estrias de sangre y mucus. A las 43 horas el animal fue sacrificado *in extremis*. El ovino N° 5 presentó depresión 54 horas luego de ingerir 10 g/kg de larvas muertas. El animal murió a las 68 horas, habiendo presentado previamente, decúbito, opistótonos y convulsiones.

A la necropsia el ovino N° 3 se observó el hígado agrandado, de color rojo púrpura, y de bordes redondeados. El hígado de los animales N° 4 y 5 era de color amarillo pálido y la superficie de corte



**Figura 7.** Hígado en «nuez moscada», ovino, caso experimental N° 5 (10 g/kg de larvas de *P. flavipes*).



**Figura 8.** Hígado, necrosis hemorrágica centrolobulillar y hepatocitos vacuolizados. Lesión que corresponde macroscópicamente a hígados amarillos en «nuez moscada». Ovino, caso experimental N° 5 (Figura 7).

tenía la apariencia de "nuez moscada" (Figura 8). Los 3 animales tenían edema marcado en la pared de la vesícula biliar, páncreas y duodeno, así como escasa cantidad de líquido amarillento en cavidad abdominal.

En los tres animales la lesión hepática se caracterizó por severa necrosis hemorrágica masiva en el animal N 3 (40 g/kg) y de distribución periacinar en los animales N° 4 y 5 (20 y 10 g/kg, respectivamente). Numerosos macrófagos con hemosiderina estaban presentes en las áreas hemorrágicas de los animales N° 4 y 5. No se observaron centros germinativos en la corteza de los ganglios mesentéricos del ovino N° 5, y las áreas paracorticales y los cordones medulares eran delgados y con pocos linfocitos. El cerebro presentaba edema perivascular y vacuolización de la sustancia blanca, y los astrocitos se observaban tumefactos y vacuolizados.

### Epidemiología

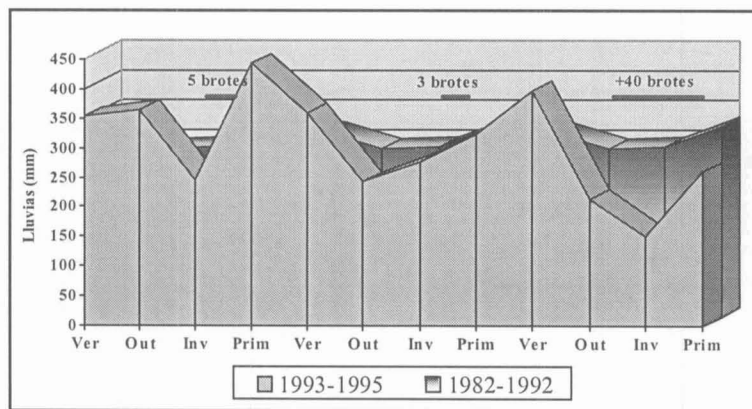
No se encontró ninguna relación entre la superficie forestada y el número de brotes. Ocurrieron 2 brotes en secciones judiciales sin forestación, 16 en secciones con 1-200 hectáreas forestadas, 3 en secciones con 201-500 hectáreas forestadas, 4 brotes en secciones con 501-1000 hectáreas forestadas, 6 brotes en secciones con 1001-3000 hectáreas forestadas y 10 brotes en las seccionales donde existían entre 3001-6500 hectáreas forestadas.

La localización geográfica de los brotes, en los 3 años estudiados, se presenta en la Figura 9. Nueve brotes ocurrieron entre los 100-150 metros de altitud, 16 entre los 150-200 metros, 11 entre los 200-250 metros y 1 entre los 250-300 metros. Los predios ubicados entre 100-150, 150-200 y 200-250 metros tuvieron morbilidades de 2.23%, 3.54% y 3.55% respectivamente, no siendo la diferencia estadísticamente significativa (test de Kruskal-Wallis,  $P > 0.05$ ). Excepto uno, ubicado en la unidad Tacuarembó, todos los focos se localizaron en suelos de las unidades Santa Clara, Sierra de Polanco, Cerro Chato y San Gregorio-Guaycurú.

Las precipitaciones pluviométricas de los 3 años en que ocurrieron brotes se caracterizaron por un exceso de lluvias en pri-



**Figura 9.** Mapa del Uruguay mostrando la distribución geográfica de la enfermedad. Todos los brotes ocurrieron en la zona de sierras del centro del país, a lo largo de la Cuchilla Grande, Grande de Durazno, y Grande Inferior. Cada punto dentro del área delimitada por líneas corresponde a un establecimiento donde ocurrieron brotes.



**Gráfica 1.** Precipitaciones pluviométricas por estación en los 3 años de ocurrencia de la enfermedad, y la media de los últimos 10 años.

mavera y verano y escasas precipitaciones en otoño e invierno (Gráfica 1). No se observaron diferencias entre las temperaturas mensuales medias de los años que ocurrieron los brotes y el promedio respectivo de los años 1982-1992, encontrándose la temperatura máxima en enero con 24 C y la mínima en julio con 10.2 C.

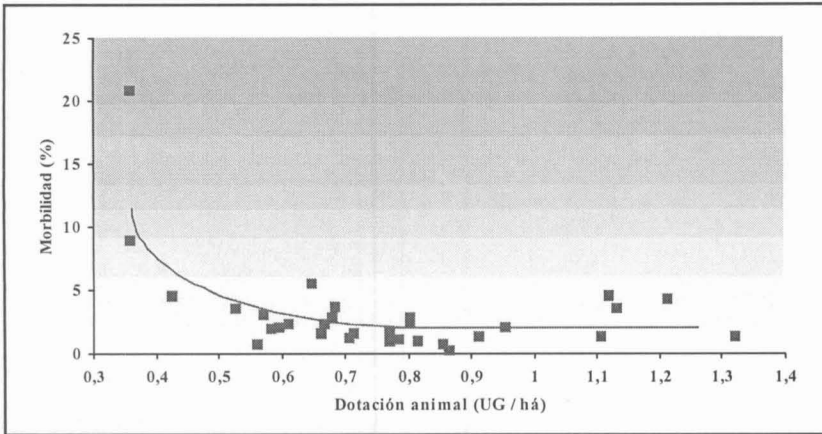
En promedio, la dotación de los predios afectados fue menor que la dotación de los departamentos de Durazno y Florida (0.73 vs 0.78 UG/ha). Se encontró una correlación negativa entre la dotación y la morbilidad, aunque la dotación sólo explica el 19% de la variación en la morbilidad ( $r = -0.43$ ;  $r^2 = 0.19$ ;  $P < 0.05$ ). La regresión cuadrática de la morbilidad so-

bre la dotación fue altamente significativa ( $P < 0.01$ ) (Gráfica 2). Aunque no significativa, existió también una tendencia hacia una mayor morbilidad en los predios con una mayor relación lanar/vacuno ( $r = 0.33$ , límites confianza 95% = -0.03 a 0.62).

### Identificación del insecto

En los primeros días de octubre, 18-25 días luego de colectadas en el campo, todas las larvas evolucionaron a la fase de prepupa y penetraron bajo tierra, donde formaron el capullo. En los recipientes donde el suelo estaba más compacto, algunos cocones se encontraron también en la superficie.

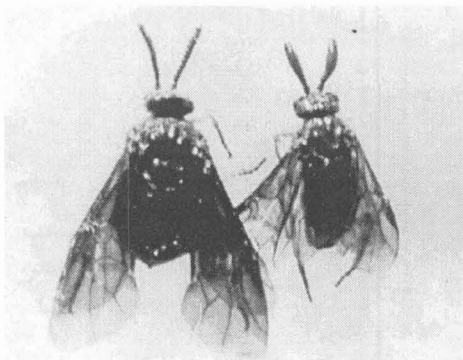




**Gráfica 2.** Regresión cuadrática de la morbilidad en función de la dotación animal, en 31 establecimientos en los que ocurrió la enfermedad (P<0,05).

Entre el 20 de febrero y 13 de marzo emergieron 35 adultos (16 hembras y 19 machos), siendo que 27 de ellos (75%) lo hicieron entre el 4 y 7 de marzo. La gran mayoría de los insectos emergieron entre las 8 y 13 horas.

Todos los insectos adultos enviados al Dr. D. R. Smith, incluido los colectados en el campo, fueron identificados como *Perreyia flavipes* Konow (familia Pergidae, subfamilia Perreyiinae; sinónimos: *Lophyroides flavipes* y *Brachytoma flavipes*). El adulto es de color totalmente negro y las patas son de color naranja (Figura 10). El largo de hembra, desde el extremo de las antenas a la punta de las alas, fue de 1,4cm (N=15; cv = 10,1%), mientras que el tamaño de los machos fue de 1,1cm (N=10; CV=7,8%). En el



**Figura 10.** Adultos hembra (izquierda) y macho (derecha) de *Perreyia flavipes*.

macho, la relación largo de la antena/largo total fue de 27,5%, significativamente mayor que la hembra, que fue 20,3% (P<0,05). Las antenas poseen 14-15 segmentos y son pectinadas en el macho, con 2 proyecciones largas en cada segmento, y serradas en la hembra, sin proyecciones en los segmentos.

### Biología y ciclo biológico de *Perreyia flavipes*

En el campo, grupos de larvas se observaron en gran cantidad algunos días, mientras que pocos o ningún grupo se observó otros días.

El peso promedio de los 31 grupos de larvas colectados fue de 19,6g, variando de 2,3-51g (CV=38,8%). El número medio de larvas en cada grupo fue de 63, con un rango de 8-188 (CV=59,7%).

El número de larvas por grupo explica casi toda la variación observada en el peso de los grupos ( $r^2=0,96$ ). El peso promedio de las larvas (N=160) fue de 0,35g, variando de 0,14 a 0,57g (cv = 25,5). El 69,4% de las larvas pesaban entre 0,31 y 0,5g. El contenido en materia seca de las larvas fue de 17%.

Todas las larvas de los diferentes cultivos se escondieron bajo tierra o murieron en los primeros días de octubre, 18-25 días luego de colectadas. Las larvas en el campo desaparecieron también en el mismo período.

Las larvas evolucionaron a la fase de prepupa y formaron al menos un capullo en todos los substratos usados como fuente alimenticia (pasto seco, pasto verde, pasto en putrefacción, heno de alfalfa y heces secas bovinas). No se observó diferencia en la vitalidad ni en la evolución de peso de las larvas entre los diferentes cultivos. El porcentaje de cocones recuperados varió entre 10 y 55% de las larvas entre cada substrato. En 3 cultivos, en los que fueron contabilizadas las exúvias, solamente 12 de 90 larvas (13,3%) cambiaron de estadio durante el período de observación.

Antes de la pupación, la larva sufre una ecdisis que la transforma en prepupa, de color blanco-amarillo y más pequeña que la larva de origen. Los cocones son ovales, miden 1 x 0,6cm y son de color negro opaco (Figura 11). De 59 capullos recuperados, 52 (88%) se encontraron entre 0-5cm bajo la superficie del suelo y 7 (12%) entre 5-10cm. En el campo, los cocones se encontraron únicamente en

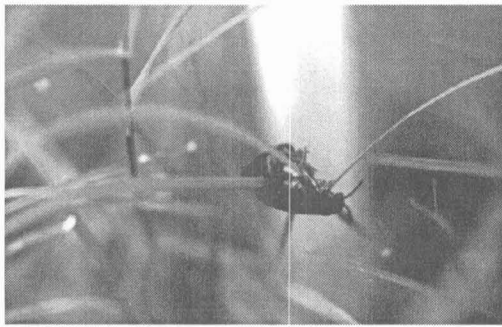


**Figura 11.** Grupo de cocones (pupas) de *Perreyia flavipes*.

lugares de tierra poco compacta, especialmente bajo las malezas y los restos secos de pasto.

En el campo, los adultos se observaron siempre en escaso número. Las hembras se encontraron siempre posadas sobre las hojas de pastos lo suficientemente rígidas para sostener su peso, especialmente en áreas empastadas. De 17 hembras que se recogieron en una mañana, 14 (82%) se encontraron en pastos de más de 20 cm de alto, mientras sólo 3 (18%) en pastos de menor altura. Las hembras no se observaron casi nunca en vuelo, y se capturaron fácilmente con la mano. Inmediatamente luego de la emer-

gencia, las hembras obtenidas en el laboratorio intentaban numerosas veces estacionarse en lo alto de las hojas de pasto colocadas a tal efecto, hasta lograr estacionarse en alguna hoja o tallo lo suficientemente rígido para sostener su peso y copular (Figura 12). La cópula duraba aproximadamente 5 minutos y se realizaba con 1 o más machos. Luego de la cópula la hembra se dirigía rápidamente hacia el fondo del recipiente, realizaba una pequeña depresión en la tierra y se cubría con restos secos de pasto o tierra y realizaba la postura. En 2 oportunidades las hembras realizaron el desove 1-



**Figura 12.** Cópula entre hembra (abajo) y macho (arriba) de *Perreyia flavipes*. La cópula se realiza sobre hojas de pastura lo suficientemente rígidas para sostener su peso.

2cm bajo la tierra. La hembra moría inmediatamente luego de la oviposición, luego de haber vivido 16 a 30 horas (N=6).

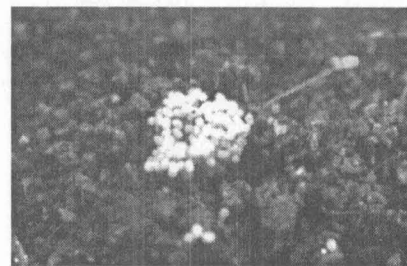
Numerosos machos se observaron sobrevolando alrededor de las pasturas donde se localizaba alguna hembra, por lo que en el campo se colectaron en mayor cantidad que estos (razón 3:1; 56 machos y 19 hembras). Los machos poseen gran capacidad para localizar las hembras, pues aún en días de mucho viento eran atraídos por hembras que a propósito se llevaron en una jaula al campo. Los machos obtenidos en el laboratorio vivieron entre 2 y 3 días y, al igual que las hembras, no se los observó alimentarse, aunque eran fuertemente atraídos por el agua azucarada puesta a su disposición.

Los huevos miden aproximadamente 0,8-1 mm de largo, son ligeramente ovales y de color amarillo claro (Figura 13). Cada

hembra deposita un único conglomerado de 200 a 700 huevos, adheridos entre sí por una secreción pegajosa transparente.

El período de incubación de los huevos incubados a 25-27 C fue de 31 días (N=4), variando de 27 a 38 días. Los huevos mantenidos fuera de la estufa tuvieron un período de incubación promedio de 39 días y un rango de 31 a 44 días. La diferencia entre ambos métodos no fue estadísticamente significativa ( $P > 0.05$ ). La eclosión no se produjo simultáneamente en todos los huevos del mismo conglomerado, sino que continuaron eclosionando por 25-30 días. Los últimos huevos en eclosionar lo hicieron a los 70 días aproximadamente. Los huevos mantenidos sin humedad se desecaron rápidamente, y a los 10 días se los observó arrugados y de color amarillo oscuro, no obteniéndose ninguna larva de ellos.

Al emerger, las larvas miden 2-2.5 mm de largo, son de color gris, y, luego de alimentarse, de color gris oscuro o negro. El alimento compuesto por restos secos, hojas verdes desmenuzadas y heces secas bovinas, permitió el desarrollo de las larvas solamente hasta los 15-18 días de edad, momento en que se las observó apáticas, delgadas y de color gris pálido, muriendo gran parte de ellas. Luego del agregado de restos vegetales en descomposición, las larvas recuperaron su color negro, turgencia y vitalidad. Las larvas sobrevivientes se observaron alimentándose con preferencia de restos vegetales en descomposición,



**Figura 13.** Huevos de *Perreyia flavipes* (cultivo en laboratorio).

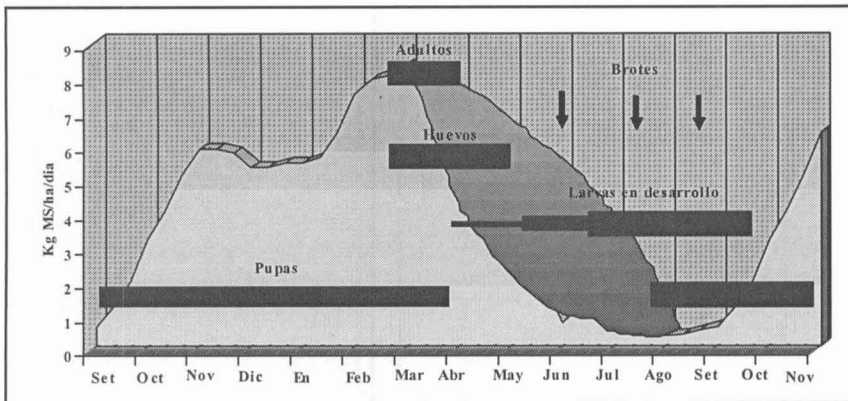
pasando por encima de las partes secas y verdes de los vegetales y deteniéndose a comer por varios minutos en las partes más blandas y oscuras en putrefacción. El primer grupo compacto, similar al de las larvas más grandes, se observó a los 18-25 días de edad. La primera ecdisis se observó a los 31 días de edad. La máxima sobrevivencia lograda en el laboratorio fue de 40 días. El período total de la fase larvaria (eclosión-pupación) se estimó entre 128 y 151 días para  $x$  equivalente a 20 o 25mm, respectivamente ( $y = -10,9 + 5,79 * X$ ).

En la Gráfica 3 se esquematiza el ciclo biológico del insecto en base a los resultados del presente trabajo.

## DISCUSIÓN

La marcada ocurrencia estacional de la enfermedad, los hallazgos macroscópicos e histopatológicos del hígado, la ausencia de otros agentes hepatotóxicos y el hallazgo constante de restos de larvas en los pre-estómagos de los animales muertos sugirieron una intoxicación por larvas de mosca sierra. Ambos trabajos experimentales mostraron concluyentemente la toxicidad de las larvas de *Perreyia flavipes* para los bovinos y los ovinos, siendo por tanto la causa de las mortalidades. Los hallazgos histopatológicos y de necropsia de los casos de campo y experimentales mostraron que la necrosis hepática es el principal efecto tóxico de las larvas de *P. flavipes*. La lesión hepática varió de una leve necrosis hepática periacinar con recuperación en el ternero N° 2, dosificado con 9 g/kg, hasta una severa necrosis masiva y muerte sobreaguda en 24 horas en el ternero N° 1 y 14 horas en el ovino N° 3, con 40 g/kg de larvas de *P. flavipes*. Dado que el contenido en materia seca de *P. flavipes* es 17%, la dosis de 9 g/kg es similar a la dosis letal media de 1.8 g de materia seca de larvas/kg de peso vivo reportada con las larvas de *L. interrupta*.<sup>13</sup> Los signos neurológicos de excitación o depresión y el edema y vacuolización de la sustancia blanca, encontrados en los casos naturales y experimentales, son del tipo de los encontrados en la encefalopatía hepática aguda.<sup>10</sup> Las hemorragias generalizadas en serosas, muy prominentes en algunos casos de campo, se presentan también en animales con necrosis





**Gráfica 3.** Ciclo biológico de *Perreyia flavipes*, según resultados de la presente investigación, y su relación con el crecimiento de las pasturas sobre suelos de cristalino.<sup>11</sup> Se observa el marcado crecimiento primavera-estival y el consiguiente acumulo de forraje en descomposición en otoño, del que se alimentan las larvas jóvenes. Los brotes ocurren en invierno, los años que aumenta la población de larvas.

hepáticas severas.<sup>2</sup> Así, el cuadro clínico y patológico de los animales intoxicados con *P. flavipes* es idéntico al de los bovinos intoxicados con larvas de *L. interrupta* y de los ovinos que ingieren larvas de *A. pullata*.<sup>13, 23</sup>

Severas pérdidas de animales ocurrieron por la ingestión de larvas de *Perreyia flavipes* en 1993, 1994 y 1995. Al menos 5 propiedades fueron afectadas en 1993 (Dr. Rodolfo Rivero, comunicación personal, 1995) y 3 en 1994, y en un relevamiento de predios afectados entre junio y julio de 1995 se informaron de 511 bovinos afectados en 32 predios ganaderos sobre un total de 25373 cabezas de ganado.<sup>7</sup> Las mortalidades brutas reportadas fueron de 1.6%, 7% y 1.3% en las categorías de terneros, sobreños y adultos, respectivamente.<sup>7</sup> Mortalidades de hasta 28% se comprobaron en los potreros afectados de algunos establecimientos (Cuadro 1). Más establecimientos se vieron afectados entre agosto y principios de octubre de 1995, por lo que las pérdidas totales de vacunos probablemente excedieron las 1000 cabezas. Muertes de ovinos, con una incidencia de 2.5% y 4.5% fueron reportadas en 2 de los establecimientos relevados.<sup>7</sup> Tanto en Dinamarca como en Australia, numerosas pérdidas de animales ocurren también en cada brote, siendo en Australia los sobreños también la categoría más afectada. En 1936, en Queensland, se observaron más de 800 cabezas de vacunos

muertos en un sólo establecimiento,<sup>14</sup> y un estudio más reciente reportó 5254 animales muertos en 37 predios entre los años 1972-81.<sup>6</sup>

El cuadro epidemiológico de la intoxicación por *P. flavipes* es el típico de una epidemia a fuente común o común repetida.<sup>7</sup> Similar a lo reportado en *Perreyia lepida*, ("mata porco"), cuyas larvas se observan preferentemente los días fríos o nublados, 20 numerosos grupos activos de larvas de *P. flavipes* se observaron algunos días mientras que pocos o ningún grupo se observó los siguientes días. Como la toxicidad de las larvas de *P. flavipes* no presenta efecto acumulativo, 22 parecería que una rápida ingestión de las larvas ocurre en el momento en que estas son abundantes en la pasturas. Así, el curso corto y explosivo de los brotes, la alta mortalidad y la aparición repetida de la enfermedad en los predios A y B (Cuadro 1) pueden ser explicados por la rápida ingestión de las larvas los días que estas son numerosas. Características similares han sido reconocidas en Australia, donde los animales parecen adquirir un gusto especial por las larvas de *L. interrupta*.<sup>4</sup> Se ha sugerido incluso la presencia de un factor químico, distinto a la toxina, causante de la palatabilidad que hace que los animales busquen e ingieran las larvas.<sup>14</sup>

A pesar de que *Perreyia flavipes* se distribuye ampliamente en el sur de Brasil

y en Argentina,<sup>21</sup> la enfermedad se ha visto hasta ahora limitada a la región centro-sur del Uruguay, principalmente en los departamentos de Durazno y Florida. Brotes de la enfermedad se han visto también en Flores, Lavalleja, Tacuarembó y Cerro Largo (Figura 9). El mapa de superposición mostró que no existía ninguna relación entre la densidad forestal (principalmente en base a *Eucalyptus* spp.) y la aparición de los brotes, a diferencia de lo que ocurre en Australia con el *Eucalyptus melanophloia* y en Dinamarca con los abedules (*Betula pendula*).<sup>13, 23</sup> En cambio, en los 3 años de ocurrencia, los brotes se localizaron a lo largo de la Cuchilla Grande, Cuchilla Grande Inferior y Cuchilla de Durazno, en áreas de suelos sobre basamento cristalino (Figura 9). Las pasturas asociadas a estos suelos tienen un ciclo de crecimiento marcadamente primavera-estival, y son muy sensibles a condiciones climáticas y de manejo, tales como las precipitaciones, la carga animal, el sistema de pastoreo y la relación lanar/vacuno.<sup>8</sup> La sensibilidad a estas variables es aún más acentuada en los suelos más superficiales, que generalmente predominan en las zonas más altas.<sup>8</sup> En este tipo de suelos, el exceso de lluvias constatado en primavera y verano de los años que ocurrió la enfermedad (Fig. 10), la menor dotación animal (Fig. 11) y la mayor relación lanar/vacuno de los predios afectados, causó el acumulo de pasturas observados en los potreros donde ocurrió la enfermedad. Esto sugiere que el acumulo de restos vegetales secos es un factor de riesgo importante en la ocurrencia de la intoxicación, modificando, de alguna forma, la dinámica poblacional del insecto. En Australia grandes mortalidades de animales ocurren asociadas siempre a la aparición de grandes cantidades de larvas de *L. interrupta*.<sup>14, 4</sup> No existen estudios anteriores la dinámica poblacional de *P. flavipes*, pero los estudios realizados en la presente investigación sobre la biología del insecto pueden ayudar a explicar los años que las larvas se presenta en gran número y desencadenan la ocurrencia de la enfermedad.

Esta es la primera vez que se comunica la presencia de *Perreyia flavipes* en el Uruguay. Las larvas eran previamente desconocidas y no existían estudios pre-

vios sobre la biología del insecto. Similar a lo que ocurre con *L. interrupta* y *A. pullata*,<sup>4,23</sup> existe una sola generación al año de *P. flavipes*. Los adultos de *P. flavipes* aparecen a fines del verano, tienen una vida muy corta y no necesitan de ninguna fuente de alimento. A diferencia de *L. interrupta* y *A. pullata*,<sup>4,23</sup> *P. flavipes* no tiene una vegetación huésped específica. Las larvas más grandes de *P. flavipes* sobreviven indistintamente con hojas de gramíneas verdes, restos vegetales secos o en descomposición o incluso heces bovinas, similar a lo reportado para *Perreyia lepida*.<sup>20</sup> Las larvas jóvenes, por el contrario, son más exigentes en su alimentación, ya que la mayor sobrevivencia se constató cuando fueron alimentadas con restos vegetales en descomposición. Los huevos requieren también para su sobrevivencia de condiciones de humedad adecuadas, por lo que la hembra de *P. flavipes* los protege de la desecación depositándolos en el suelo, bajo restos vegetales. Por lo tanto, la dinámica poblacional de *Perreyia flavipes* probablemente se regula por la mayor o menor sobrevida de los huevos y de las larvas más jóvenes, mucho más exigentes a las condiciones de humedad y alimentación, respectivamente. Así, el exceso de lluvias de primavera y verano, que causó el gran crecimiento de las pasturas, y la sequía y heladas del otoño e invierno siguiente, que provocaron la formación de abundantes restos vegetales en descomposición, creó las condiciones favorables para la sobrevida de los huevos y las larvas jóvenes, y provocó el aumento de la población larvaria causante de los brotes de intoxicación de 1993, 1994 y 1995 (Fig. 16). Obviamente, la baja dotación animal, la mayor relación lanar/vacuno y la mayor sensibilidad a condiciones climáticas y de manejo de las pasturas de cristalino de las zonas altas, contribuyen también a generar condiciones favorables al acumulo de restos vegetales en descomposición y ayudan a explicar la aparición de la enfermedad en una región limitada del país. Los datos de esta investigación evidencian que, para evitar un aumento crítico en la población de larvas y prevenir los brotes de intoxicación, deberá evitarse el acumulo de forraje al final del verano y principios de otoño, de forma de dismi-

nuir la cantidad de materia vegetal muerta que sirve de alimento a las larvas jóvenes y disminuir la humedad que preserva los huevos. Esto podría ser alcanzado mediante el pastoreo con altas dotaciones, al menos en aquellos potreros donde la enfermedad ocurrió anteriormente. En Australia se ha sugerido la suplementación con fósforo o proteínas para evitar la intoxicación,<sup>4</sup> pero estas medidas no resultaron eficientes en la práctica ya que los animales continúan ingiriendo las larvas.<sup>13</sup> El uso de antidotos utilizados para tratar la intoxicación por hongos del género *Amanita*, que poseen similar principio activo que *L. Interrupta*, *A. pullata*, y *P. flavipes*,<sup>15, 16, 17</sup> es impracticable en condiciones de campo ya que los animales son generalmente encontrados muertos o con lesiones hepáticas irreversibles. Aunque técnicamente posible, desarrollar métodos de inmunización con la toxina de las larvas se considera muy costoso,<sup>6</sup> y su efectividad es también cuestionable dado el repentino y elevado nivel de toxina en sangre que se da en los animales intoxicados (Ross A. McKenzie, comunicación personal, 1996). La continuación de los estudios epidemiológicos y de la biología de *P. flavipes* permitirá establecer formas de prever la intoxicación y desarrollar nuevos métodos de control.

Un octapéptido hepatotóxico conteniendo 4 D-aminoácidos, denominado lophyrotomina, ha sido identificado en las larvas de *L. interrupta* y *A. pullata* (Oelrichs y col., 1977; Kannan y col., 1988).<sup>9, 16</sup> Pequeñas cantidades de lophyrotomina y grandes cantidades de otro polipéptido hepatotóxico, compuesto por 7 aminoácidos y un grupo fosfato terminal, fueron también identificados en las larvas de *P. flavipes* (Oelrichs y col., 1997). El nuevo heptapéptido de *Perreyia flavipes* de Uruguay se denominó pergidina, y el mismo se encuentra presente en pequeñas cantidades también en *Lophyrotoma interrupta* y *Arge pullata*.<sup>15</sup> Nuevos estudios deberían aclarar la importancia biológica y taxonómica de éste nuevo polipéptido tóxico y determinar su relación con la lophyrotomina, así como la ventaja evolutiva que le proporciona a la especie. La evidencia disponible sugiere que la lophyrotomina y la pergidina son sintetizadas de novo por la larva, y no

obtenida del alimento o biosintetizada por microorganismos que viven simbióticamente con la misma.<sup>15, 17</sup> El stress provocado a larvas de *L. interrupta* provoca la descarga de un fluido oleoso que contiene hasta 10 veces más concentración de lophyrotomina que la larva entera,<sup>17</sup> y un fluido oleoso similar es segregado también por las larvas de *P. lepida* ante la agresión.<sup>5</sup> Esto sugiere que la toxina puede haberse desarrollado con fines de defensa frente a los predadores, dado que la misma es fuertemente ácida y presenta varios D-aminoácidos y el extremo N-terminal bloqueado, características que la hacen resistente a la hidrólisis en el tubo digestivo.<sup>17, 25</sup> La identificación de la lophyrotomina y pergidina en especies con hábitos alimenticios tan diferentes como *L. interrupta*, *A. pullata* y *P. flavipes* es una fuerte evidencia de que ésta clase de insectos sintetiza la hepatotoxina de novo, por lo que, probablemente, nuevos géneros y/o especies tóxicas de moscas sierras serán reconocidos en el futuro.

## CONCLUSIONES

1. Las larvas de *Perreyia flavipes* son tóxicas para bovinos y ovinos, y fueron la causa de los brotes ocurridos en la región centro-sur de Uruguay en 1993, 1994 y 1995.
2. El principal efecto tóxico de las larvas es una necrosis hepática aguda de distribución periacinar o masiva.
3. La enfermedad se presenta en los meses de junio a septiembre, cuando existen gran cantidad de larvas, y los brotes se caracterizan por la muerte de numerosos animales en pocos días.
4. El ciclo biológico de *Perreyia flavipes* se caracteriza por presentar una generación al año.
5. El acumulo de forraje en descomposición durante el otoño favorece la supervivencia de los huevos y las larvas jóvenes y explica la ocurrencia de los brotes de intoxicación del siguiente invierno.
6. El exceso de lluvias en primavera y verano y el acumulo consiguiente de forraje en otoño pueden ser in-

dicadores de riesgo y predecir la ocurrencia de brotes el siguiente invierno

7. Medidas de manejo que eviten el exceso de forraje en otoño permitirá controlar la aparición de la enfermedad.

### Agradecimientos

El autor agradece a Franklin Riet-Correa y Carmen Méndez, por la oportunidad, incentivo, y gran ayuda en la realización de este estudio. Solamente con su apoyo fue posible la conclusión de este trabajo. Al ayudante de laboratorio de DILAVE "Miguel C Rubino" de Treinta y Tres,

Sr. Henry Machado, por la colaboración en la colecta y cultivo de las larvas. Al colega Dr. Rúben Araujo de Cerro Chato por la confianza puesta en el Laboratorio Regional y por facilitar el acceso a diversos predios afectados, y al Dr. Norberto Paiva por la donación del ternero para la reproducción experimental.

### Referencias Bibliográficas

1. **Azevedo Marques, L.A.** (1933). Tenthredinidae "Mosca de Serra" cuja larva, ou "falsa lagarta" é nociva a várias espécies do gênero *Tibouchina* (Biologia de Bergiana cyanocephala (Klug, 1824) Konow, 1899. **Min. Agric., Inst. Biol. Defesa Agric** Rio de Janeiro, 11p.
2. **Badylak, S.F.** (1988). Coagulation disorders and liver disease. **Vet. Clin. North. Am.: Small Anim. Pract.**, 18:87-93.
3. **Brummerstedt, E.; Kristensen, E.; Nielsen, A.; Belle-Hansen, A.** (1987). Death of a puppy after eating sawfly larvae. Case report. **Dansk-Veterinaertids**, 70(15):758-760.
4. **Callow, L.L.** (1955): Sawfly poisoning in cattle, **Qld. J. Agric. Sci.**, 81: 155-161.
5. **Costa Lima, A.** (1941). Bichos "Mata Porcos". **Chácaras e Quintais**, 63:43
6. **Dadswell, L.P.; Abott, W.D.; McKenzie, R.A.** (1985). The occurrence, cost and control of sawfly larval (*Lophyrotoma interrupta*) poisoning of cattle in Queensland 1972-81. **Australian Veterinary Journal**, 62:94-97.
7. **Diaz, L.E., Vitale, E., Etchegaray, F., Seoane, L.** (1995). Informe epidemiológico de casos en los departamentos de Durazno, Flores, Florida y Lavalleja. **M.G.A.P. (URUGUAY), D.S.A., Division Campañas Sanitarias I.**
8. **Formoso, D.** (1991). Productividad y manejo de pasturas naturales en Cristalino. **INIA, Serie Técnica N° 13**, 51-58, 1991.
9. **Kannan, R.; Oelrichs, P.B.; Thamsborg, S.M.; Williams, D.H.** (1988). Identification of the octapeptide lophyrotomin in the european birch sawfly (*Arge pullata*). **Toxicon**, 26:224-226.
10. **Little, P.B.** (1990). Schedule fo graduate neuropathology. **XVth SIDA Course on Veterinary Pathology**, Uppsala, Sweden. July 1990, p. 59.
11. **Mas, C.; Bermúdez, R.; Ayala, W.** (1991). Crecimiento de las pasturas naturales en dos suelos de la región Este. **INIA, Serie Técnica N° 13**, 59-67, 1991.
12. **MCKenzie, R.A.; Rogers, R.J.; Oelrichs, P.B.** 1985a. Sawfly larvae poisoning of cattle in Queensland. **Plant Toxicology. Proceedings of the Australia-U.S.A. Poisonous Plants Symposium**, Brisbane, Australia, May 14-18, 524-532. Yeerongpilly, Australia; Animal Research Institute.
13. **MCKenzie, R.A.; Dunster, P.J.; Twist, J.O.; Dimmlock, C.K.; Oelrichs, P.B.; Rogers, R.J.; Reichmann, K.G.** (1985b). The toxicity of sawfly larvae (*Lophyrotoma interrupta*) to cattle. **Qld. Dept. Prim. Ind. Bull.** QB85001.
14. **Oelrichs, P.B.** (1982). Sawfly poisoning of cattle. **Qld. Agric. J.**, 108:110-112.
15. **Oelrichs, P.B.; MacLeod, J.K.; Seawright, A.A.; Ng, J.C.; Dutra, F.; Riet-Correa, F.; Méndez, M.C.** (1997). The purification and isolation of two hepatotoxic compounds from uruguay sawfly (*Perreyia lepida*). **5th International Symposium on Poisonous Plants**. Santa Angelo, Texas, USA, May 19-23, p.132.
16. **Oelrichs, P.B.; Vallely, P.J.** (1977). Lophyrotomin, a new octapeptide from the larvae of sawfly, *Lophyrotoma interrupta*. **Lloydia**, 40:209-214.
17. **Oelrichs, P.B.; Williams, D.H.; Thamsborg, S.M.** (1989). Identification of the octapeptide lophyrotomin in the european birch sawfly (*Arge pullata*) and some studies on its role and biosynthesis.
18. **Olaechea, F.V.; Thamsborg, S.M.; Chistensen, N.O.; Nansen, P.; Robles, A.** (1991). Interference with sawfly (*Arge pullata*) poisoning in Fasciola hepatica-infected lambs. **J. Comp. Path.**, 104:419-431.
19. **Roberts, F.H.S.** (1932). The cattle-poisoning sawfly (*Pterygophorus analis* Costa). **Qd. Agric. J.**, 37:41-52.
20. **Rodrigues Camargo, O.** (1955). Contribuição ao estudo do Tenthredinideo "Mata Porcos", *Paraperreya dorsuaria* (Konow, 1899), No Rio Grande Do Sul. **TESE, Escola de Agronomia e Veterinaria da Universidade do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, RS, Brasil.
21. **Smith, D.R.** (1990). A synopsis of the sawflies (Hymenoptera, Symphyta) of America South of the United States: Pergidae. **Rev. Bras. Ent.**, 34(1): 7-200.
22. **Soares, M.P.** (1997). Intoxicação por larvas de *Perreyia lepida* em suínos. **Tese de Mestrado, Faculdade de Veterinaria, Universidade Federal de Pelotas**, Pelotas, RS, Brasil.
23. **Thamsborg, S.M.; Jorgesen, R.J.; Brummerstedt, E.** (1987). Sawfly poisoning in sheep and goats. **Vet. Rec.**, 12:253-255.
24. **Thamsborg, S.M.; Jorgensen, R.J.; Brummerstedt, E.; Bjerregard, J.** (1996). Putative effect of Silymarin on sawfly (*Arge pullata*)-induced hepatotoxicosis in sheep". **Vet. & Human Toxicology**, 38 (2):89-91.
25. **Williams, D.H.; Santikarn, S.; DE Angelis, F.; Smith, R.J.; Reid, D.G.** (1983). The structure of a toxic octapeptide from the sawfly larvae. **J. Chem. Soc. Perkin Trans. I**:1869-1878.





## Aborto bovino: casuística y optimización del diagnóstico en la DILAVE “Miguel C. Rubino”, Uruguay

Easton C.<sup>1</sup>, Paullier C.<sup>1</sup>, Bañales P.<sup>1</sup>

### RESUMEN

Se presentan los diagnósticos realizados a los fetos bovinos remitidos al Laboratorio “Miguel C. Rubino”, Uruguay, en el período 1996 / 2002. Se estudiaron 255 fetos, en los que se realizaron estudios histopatológicos, bacteriológicos y serológicos.

En un primer período, que va de 1996 a 1998, se estudiaron 51 fetos, habiéndose diagnosticado la etiología en el 50.9 % de los casos: 43.1 % de etiología bacteriana, 5.9 % etiología viral, 1.9 % etiología micótica. En este período no se llegó a un diagnóstico etiológico en el 49.1 % de los casos. En 1998 se fija como objetivo aumentar el porcentaje de abortos en los que se llega a un diagnóstico, planteándose un cambio en el protocolo de trabajo y la incorporación de nuevas técnicas de diagnóstico. A partir de enero de 1999 se incorporan a la rutina diagnóstica técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) para detección de antígeno de *N. caninum* y Diarrea Viral Bovina (BVD), así como técnicas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y de ELISA para detección de anticuerpos anti *N. caninum*. En el período que va de 1999 al 2002 se estudiaron 204 fetos, habiéndose diagnosticado el agente causal en un 61,8 % de los casos: 38.2 % de etiología bacteriana, 0.5 % de etiología micótica, 1 % de etiología vírica y 22 % de etiología parasitaria (*N. caninum*). En un 38.2 % de los casos no se llegó al diagnóstico etiológico.

**Palabras Clave:** Aborto, bovino, etiología, diagnóstico, Uruguay

### SUMMARY

This paper presents the diagnosis of bovine aborted fetuses submitted during 1996/2002 to the DILAVE “Miguel C. Rubino” main laboratory. A total of 255 fetuses were studied by means of histopathological, bacteriological and serological tests.

During a first period from 1996 to 1998, 51 fetuses were studied and an etiological diagnosis was obtained in the 50.9 % of those fetuses: 43.1 % bacteriological, 5.9 % viral, and 1.9 % fungal etiology. During this first period 49.1 % of the abortions submitted remained undiagnosed. In 1998 the decision of improving the diagnosis of the submitted fetuses was taken; changes in the working protocol were done, as well as new diagnostic techniques were included.

Since January 1999 immunohistochemical (IHC) techniques for the detection of *N. caninum* and Bovine Viral Diarrhea antigens as well as an indirect fluorescence antibody test (IFAT) and ELISA test for *N. caninum* became available at the Laboratory. During a second period from 1999 to 2002, 204 fetuses were studied and an etiological diagnosis was obtained in the 61,8 % of the fetuses: 38.2 % bacteriological, 0.5 % fungal, 1 % viral and 22 % parasitic etiology (*N. caninum*). During this second period 38.2 % of the abortions remained undiagnosed.

**Key words:** abortion, bovine, etiology, diagnosis, Uruguay.

### INTRODUCCIÓN

Las pérdidas de la preñez se clasifican como mortalidad embrionaria si ocurren antes del día 42 de gestación (placentación), aborto cuando ocurren entre el día 42 y el 260, y parto prematuro si la pérdida es posterior al día 260 (23).

Los abortos figuran como causantes de las mayores pérdidas económicas en la industria ganadera a nivel mundial, siendo numerosos los agentes etiológicos que los provocan (2, 6, 17). La identificación de las causas sólo se logra en menos de la mitad de los fetos abortados remitidos a los laboratorios de diagnóstico (2, 17, 18). Estudios realizados en USA

sobre las más importantes etiologías diagnosticadas revelan una variedad de causas infecciosas con diferencias regionales. Clima, tipo de producción, alimentación, movimientos de animales, prácticas de manejo, poblaciones de animales silvestres, programas de vacunación, así como la calidad de las muestras remitidas a los laboratorios de diagnóstico y los exámenes que allí se realicen, van a influir en la clasificación de causas de abortos en el área (2).

Diferentes autores estiman como normales variados porcentajes de aborto, promediando un 2-5% de aborto cuando consideramos solamente los abortos obser-

vados y de un 5-8% sumando abortos observados o no observados en un rodeo (16).

Con nuevos conocimientos y mejorando las pruebas diagnósticas, nuevas causas de aborto están emergiendo como significativas en algunas regiones en el mundo, por ejemplo la infección por *Neospora caninum*. En 1989 se describe a este protozoo como causante de aborto en bovinos (22) y dos años más tarde ya es descrita como causando importantes pérdidas (1). Hoy en día es una de las principales etiologías diagnosticadas a nivel mundial (10), existiendo diagnósticos en lo que a la región se refiere, en Brasil (13), Argentina (8, 24) y también en Uruguay (3, 4).

Recibido: 17/03/03 Aprobado: 15/09/03

<sup>1</sup> DILAVE “Miguel C. Rubino, Departamento de Patobiología, Montevideo, Uruguay. Email: [reprodilave@adinet.com.uy](mailto:reprodilave@adinet.com.uy)

En el Laboratorio "Miguel C. Rubino" se ha trabajado, desde su creación, en el diagnóstico etiológico de aborto bovino. En el marco del proyecto JICA/DILAVE (1996/2002), uno de los principales objetivos fue el mejoramiento de las técnicas de diagnóstico de las enfermedades abortivas y cuantificación de la importancia de las mismas. A fin de lograr un diagnóstico más eficaz se cambió el protocolo de trabajo y se incorporaron nuevas técnicas. Dada la importancia que estaba adquiriendo la *N. caninum* como causante de aborto en numerosos países y la evidencia serológica de su presencia en Uruguay (5), existía la presunción de que podía estar causando problemas en nuestros rodeos, por lo que una de las prioridades fue la puesta a punto las técnicas diagnósticas para este agente.

La identificación de los agentes etiológicos del aborto requiere el trabajo de un equipo multidisciplinario con experiencia en una variedad de procedimientos. En la DILAVE y ya desde hace unos años, se ha conformado un equipo así, con técnicos especializados en las distintas áreas diagnósticas, a fin de optimizar el diagnóstico de los casos de aborto.

Se debe confeccionar una historia clínica completa, estudiar los tejidos fetales y placenta, realizar estudios microbiológicos y serológicos, tanto del suero materno como de los fluidos fetales. En algunos casos es necesario contar con muestras de suero pareadas a fin de estudiar seroconversión de la madre frente a determinados patógenos. Sin embargo la serología de una sola muestra de una vaca abortada puede dar valiosa información para determinar exposición o no a determinados patógenos.

La elaboración de un protocolo en donde se recabe siempre toda la información pertinente a este tipo de patología, la toma adecuada de las muestras y su remisión a las diferentes secciones especializadas con que debe contar un laboratorio de diagnóstico (serología, bacteriología, virología, histopatología e inmunohistoquímica), son puntos necesarios para mejorar la respuesta y poder acumular información sobre este grave problema. A partir de ese conocimiento adquirido se pueden establecer diferencias regionales que permitirán mejorar la

calidad y efectividad de las medidas de manejo, así como la adecuación de las estrategias de control.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se presentan las principales etiologías diagnosticadas en la DILAVE "Miguel C. Rubino", en el período 1996/2002. No se trata de un muestreo o de un estudio programado, sino que se estudiaron los fetos bovinos abortados remitidos al Laboratorio.

Se estudiaron 255 fetos bovinos entre los años 1996 y 2002. Según la metodología diagnóstica empleada se distinguen dos períodos.

Durante un primer período, comprendido entre los años 1996 a 1998, la rutina diagnóstica consistía en realizar la autopsia de los fetos bovinos, toma de muestras para realizar estudios histopatológicos (hígado, riñón, pulmón) y bacteriológicos (hígado, contenido de cuajo, pulmón) para descartar *Campylobacter fetus* sp. y *Tritrichomonas foetus*. En caso de sospecha de Leptospirosis se realizaba la técnica de tinción argéntica de Levaditi para visualizar espiroquetas en riñón e hígado y con el suero de la vaca abortada la técnica de micro aglutinación (MAT) para identificación y titulación de anticuerpos. En este período se estudiaron 51 fetos.

A partir de 1999 se modificó la metodología en la toma de muestras para histopatología, incluyendo muestras de corazón, lengua, timo y, fundamentalmente, de sistema nervioso central, aun cuando éste se encontrara autolítico. También se incorporaron las técnicas de inmunohistoquímica por el método de complejo peroxidasa avidina-biotina (15). En este segundo período, 1999 / 2002, se estudiaron 204 fetos. El protocolo actual de trabajo comprende:

**Patología e histopatología:** Se realiza la autopsia del feto recibido y se efectúan estudios macro e histopatológicos. Algunos agentes infecciosos provocan lesiones características que permiten un diagnóstico presuntivo, mientras muchas veces sólo se logra orientar el diagnóstico. Se pueden realizar estudios inmunohistoquímicos para detectar o confirmar el agente infeccioso. Por este último método en la Sección Histopatología se reali-

za el diagnóstico de Neospora (20), BVD (7, 12) e IBR (15).

**Bacteriología:** Las muestras retiradas durante la necropsia son remitidas a la Sección Bacteriología, en donde son sembradas en medios específicos para aislamiento e identificación de *Salmonella* sp., *Brucella* sp., *Campylobacter fetus*, *Trichomonas foetus*, *E. coli*, *Actinomyces pyogenes*, *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Pasterurella* sp., *Pseudomonas* sp. y *Listeria monocytogenes*.

**Leptospirosis:** En la Sección Leptospirosis se realiza el test de micro aglutinación (MAT) para la determinación de anticuerpos anti *Leptospira* (11).

**Brucelosis:** En la Sección Brucelosis se realiza el test Rosa de Bengala y pruebas complementarias para su diagnóstico serológico.

**Neosporosis:** En el Departamento de Patobiología (Patología Clínica/Reproducción) se realizan dos técnicas para la determinación de anticuerpos anti *N. caninum*: test de inmunofluorescencia indirecta (9, 21, 26) y test de ELISA (19).

**Virología:** En el Departamento de Virología se realizan estudios serológicos para IBR y BVD (tests de ELISA indirecto, Herd Chek, IDEXX, USA), así como la técnica de la reacción de polimerasa en cadena (PCR) para detectar el virus de IBR (25) y de BVD (13) presentes en los tejidos fetales.

Las pruebas serológicas para Leptospirosis, Brucelosis, Neosporosis, IBR y BVD se realizan tanto en suero de la vaca abortada como en fluidos fetales. En lo que refiere a los resultados en fluidos fetales, siempre debe tenerse en cuenta la edad del feto; fetos muy jóvenes pueden no ser inmuno competentes y por lo tanto no producir anticuerpos.

## RESULTADOS

Durante el primer período, que va del año 1996 al 1998, se estudiaron 51 fetos, habiéndose podido establecer la causa de aborto en 26 casos (50.9 %) (Cuadro 1).

Las etiologías diagnosticadas en este período fueron las siguientes:

\*Etiología bacteriana: 22 de los abortos (43.1 %), discriminados de la siguiente

manera: 5 por *Campylobacter fetus* (9.8 %), 13 por *Leptospira* sp. (25.5 %), 1 por *Streptococcus* sp. (1.9 %) y 3 de etiología bacteriana sin identificación del agente (5.9 %).

•Etiología viral: 3 abortos (5.9 %), 2 por IBR (3.9 %) y 1 por BVD (1.9 %).

•Etiología micótica: 1 aborto (1.9 %).

En 25 (49.1 %) de los 51 fetos abortados recibidos, no pudo arribarse a ningún diagnóstico.

En el segundo período, al agregarse nuevas técnicas diagnósticas y modificarse el protocolo de trabajo, mejoró la capa-

cidad de respuesta de la DILAVE, lo que se tradujo en un porcentaje mayor de diagnósticos etiológicos y posiblemente la mayor cantidad de fetos remitidos para su estudio (Gráfica 1).

Las etiologías diagnosticadas en este segundo período fueron las siguientes (Cuadro 2):

•Etiología bacteriana: 78 de los abortos (38,2%), discriminados de la siguiente manera: 22 por *Campylobacter fetus* (11%), 3 por *Brucella abortus* (1,5%), 48 por *Leptospira* sp. (24%) y 5 de etiología bacteriana sin identificación del agente (2,5%).

•Etiología viral (BVD): 2 abortos (1%)

•Etiología micótica: 1 aborto (0.5%).

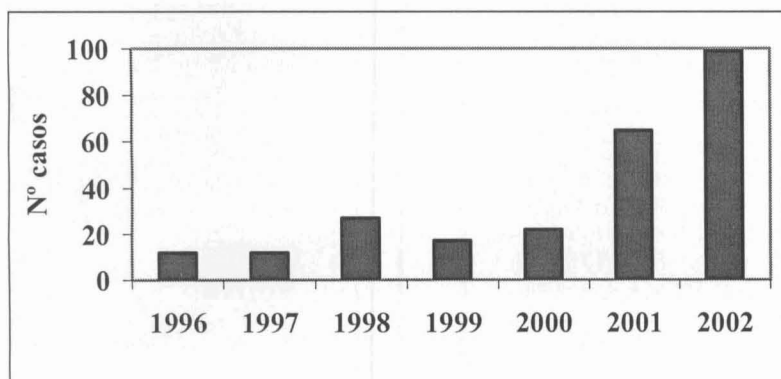
•Etiología parasitaria, *Neospora caninum*, 45 abortos (22%).

En 78 (38,2 %) de los 204 fetos abortados recibidos, no pudo arribarse a ningún diagnóstico.

Se han encontrado varios patógenos presentes en un mismo feto abortado. Así por ejemplo se han visto asociaciones de *N. caninum* con *Campylobacter* sp.; *N. caninum* con *Leptospira* sp. y *Campylobacter* sp. con *Leptospira* sp.

Cuadro 1. Etiologías diagnosticadas en el período 1996 – 1998.

Etiología diagnosticada	Nº de fetos (n)	Porcentaje sobre el total estudiado
<b>BACTERIANA</b>	22	43.1 %
<i>Campylobacter fetus</i> sp.	5	9.8 %
<i>Brucella abortus</i>	0	0 %
<i>Leptospira</i> sp.	13	25.5 %
<i>Streptococcus</i> sp.	1	1.9 %
Sin identificar	3	5.9 %
<b>VIRAL</b>	3	5.9 %
IBR	2	3.9 %
BVD	1	1.9 %
<b>MICOTICA</b>	1	1.9 %
<b>SIN DIAGNOSTICO</b>	25	49.0 %
<b>TOTAL</b>	51	100 %



Gráfica 1. Fetos abortados estudiados por año.

## CONCLUSIONES

Lo primero que surge del estudio de ambos períodos considerados es la mayor efectividad diagnóstica del Laboratorio en el segundo período considerado en este trabajo, es decir, a partir de 1999. Varios factores influyeron en esa mejora: cambios en el protocolo que se sigue en todos los casos, incorporación de nuevas técnicas y equipos, entrenamiento del personal, y por sobre todo, el establecimiento de mejores comunicaciones entre el laboratorio y el veterinario en ejercicio liberal.

Resulta imprescindible seguir sistemáticamente el protocolo de trabajo; de esta manera fue posible diagnosticar la presencia de más de un patógeno en un mis-

**Cuadro 2.** Etiologías diagnosticadas en el período 1999 – 2002.

Etiología diagnosticada	Nº de fetos (n)	Porcentaje sobre el total estudiado
<b>BACTERIANA</b>	78	38.2 %
<i>Campylobacter fetus</i> sp.	22	10.8 %
<i>Brucella abortus</i>	3	1.5 %
<i>Leptospira</i> sp.	48	23.5 %
Sin identificar	5	2.4 %
<b>VIRAL - BVD</b>	2	1 %
<b>MICOTICA</b>	1	0.5 %
<b>PARASITARIA (N. caninum)</b>	45	22 %
<b>SIN DIAGNOSTICO</b>	78	38.2 %
<b>TOTAL</b>	204	100 %

mo feto. No es fácil determinar en esos casos cuál fue el microorganismo causante de la muerte del feto; para ello es necesario considerar la edad del feto, la historia del rodeo, otros síntomas clínicos en el mismo y la extensión de las lesiones en el feto producidas por cada uno de los microorganismos actuantes. Hay microorganismos que actúan en forma crónica y otros en forma aguda, pudiendo ser estos últimos los desencadenantes del aborto, mientras los primeros podrían estar actuando como predisponentes.

Es necesario aclarar aquí nuevamente que los datos presentados no provienen de un muestreo o de un estudio programado; son los datos obtenidos a partir de los fetos bovinos remitidos al Laboratorio. Esto lleva a que la mayoría de los fetos estudiados tengan un desarrollo de 4-5 meses o más, los fetos de menos desarrollo son difíciles de encontrar. Por esto mismo es posible que algunas etio-

logías pueden aparecer en bajos porcentajes, por ejemplo las etiologías víricas. Esto se debe a que estas últimas muchas veces producen mortalidad embrionaria y aborto temprano, no remitiéndose al Laboratorio feto alguno en esos casos.

En el primer período se llegó a un diagnóstico en el 50.9 % de los casos, pasándose a un 61.8 % en el segundo período. Se debe remarcar el impacto de la incorporación de técnicas diagnósticas. Es quizás éste el camino a seguir para mejorar el diagnóstico de otros agentes como los de etiología viral, que muy posiblemente estén subestimados debido a la complejidad de su detección.

Se destaca la importancia que tuvo el trabajo en un equipo multidisciplinario, conformado por técnicos con experiencia en técnicas histopatológicas, inmunohistoquímicas, bacteriológicas, virológicas y serológicas, para estudiar y llegar a un diagnóstico en un problema tan

complejo como es el aborto bovino. El trabajo coordinado de todas las secciones especializadas del área diagnóstica de la DILAVE es fundamental para llegar a un diagnóstico etiológico en los casos de aborto.

La actualización permanente de las técnicas es imprescindible; ya hemos visto en este trabajo como recién a partir de 1999 fue posible diagnosticar a la *Neospora caninum* como causa de aborto, cuando muy probablemente este agente ha estado actuando en el medio con bastante anterioridad a esa fecha.

#### Agradecimientos

Nuestro agradecimiento a quienes integran el equipo multidisciplinario que hizo posible este trabajo: los colegas María V. Repiso, María A. Olivera, Blanca Herrera, Mariela Silva, Helena Guarino, Néstor D'Anatro y Milton Pizzorno, así como también a sus ayudantes técnicos.

#### Referencias Bibliográficas

- Anderson, M.L.; Blanchard, P.C.; Barr, B.C.; Dubey, J.P.; Hoffman, R.L.; Conrad, P.A. (1991). Neospora-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc., 198: 241-244.
- Anderson, M. (2000) Fetal infection and abortion in cattle. Proceedings XXI World Buiatrics Congress, Punta del Este, Uruguay.
- Bañales, P.; Easton C.; Haritani, M.; Kashiwazaki, Y.; Paullier C.; Pizzorno, M. (2000) Bovine Abortion in Uruguay caused by *Neospora caninum*: First Diagnosis. Proceedings XXI World Buiatrics Congress., Punta del Este, Uruguay.
- Bañales, P.; Easton, C.; Paullier, C.; Pizzorno, M. (1999). Aborto bovino por *Neospora caninum* en el Uruguay: primeros diagnósticos. Veterinaria 34 (139-140): 28-32.
- Barber, J.S.; Glasser, R.D.; Ellis, J. (1997). Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations. J Parasitol 83 (6): 1056-1058.
- Barr, B.C. et al. (1993) Infectious diseases causing bovine abortion and fetal loss. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, volume 9, Number 2, July 1993.



7. **Baszler, T.V.; Evermann, J.F.; Kaylor, P.S.; Byington, T.C.; Dilbeck, P.M.** (1995). Diagnosis of Naturally Occurring Bovine Viral Diarrhea Virus Infections in Ruminants Using Monoclonal Antibody- based Immunohistochemistry. *Vet. Pathol.* 32: 609-618.
8. **Campero, C.M.; Anderson, M.L.; Conosciuto, G.; Odriozola, H.; Bretschneider, G.; Poso M.A.** (1998) *Neospora caninum* associated abortion in a dairy herd in Argentina. *Veterinary Record* 143: 228-229.
9. **Dubey, J.P.; Lindsay, D.S.; Adams, D.S.; Gay, J.M.; Baszler, T.V.; Blagburn, B.L.; Thulliez, P.** (1996). Serological responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. *A.J.V.R.*, 57 (3), 329-336.
10. **Dubey, J.P.; Lindsay, D.S.** (1996) A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Veterinary Parasitology*, 67: 1-59
11. **Faine, S.; Adler, B.; Bolin, C.; Perolat, P.** (1999). *Leptospira* and *Leptospirosis*, 2<sup>nd</sup> Edition. MediSci, Melbourne, Australia, pp 164-189.
12. **Haines, D.M.; Clark, E.G.; Dubovi, E.J.** (1992). Monoclonal Antibody-based Immunohistochemical Detection of Bovine Viral Diarrhea Virus in Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissues. *Vet Pathol.* 29: 27-32.
13. **Hyndman, L.; Vilcek S.; Conner J.; Nettleton P.C.** (1998). A novel nested reverse transcription PCR detects bovine viral diarrhea virus in fluid from aborted fetuses. *J. Virol. Methods*, 71:69-76.
14. **Gondim, L.F.P.; Sartor, I.F.; Hasegawa, M.; Yamane I.** (1999). Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. *Veterinary Parasitology* 86:71-75.
15. **Hsu, S.M.; Raine, L.; Fanger, H.** (1981). Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem* 29: 577-580.
16. **Kinsel, M.L.** (1999). An epidemiologic approach to investigating abortion problems in dairy herds. *The Bovine Proceedings* 32:132-155.
17. **Kirkbride, C.A.** (1992) Etiologic agents detected in a 10-year study of bovine abortions and stillbirths. *J.Vet.Diagn.Invest.* 4:175-180 .
18. **Murray, R.D.** (1990). A field investigation of causes of abortion in dairy cattle. *Vet. Rec.* 127: 543-547.
19. **Osawa, T.; Wastling, J.; Maley, S.; Buxton, D.; Innes, E.A.** (1998) A multiple antigen ELISA to detect *Neospora*-specific antibodies in bovine sera, bovine foetal fluids, ovine and caprine sera. *Veterinary Parasitology*, 79:19-34.
20. **Otter, A.; Jeffrey, M.; Scholes, S.F.E. et al.** (1997). Comparison of histology with maternal and fetal serology for the diagnosis of abortion due to bovine neosporosis. *Veterinary Record*, 141: 487-489.
21. **Reichel, M.P.; Drake, J.M.** (1996). The diagnosis of *Neospora* abortions in cattle, New Zealand *Veterinary Journal*, 44: 151-154.
22. **Thilsted, J.P.; Dubey, J.P.** (1989). Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle, *J Vet Diagn Invest*, 1: 205-209.
23. **Thurmond, M.C.; Picanso, J.P.; Jameson, C.M.** (1990). Considerations for use of descriptive epidemiology to investigate fetal loss in dairy cows. *JAVMA*, 197:1305-1312.
24. **Venturini, M.C.; Venturini, L.; Bacigalupe, D. et al.** (1999). *Neospora caninum* infections in bovine foetuses and dairy cows with abortions in Argentina, *International Journal of Parasitology* 29: 1705-1708.
25. **Vilcek, S.; Nettleton, P.F.; Herring, J.A.; Herring, A.J.** (1994). Rapid detection of bovine herpesvirus 1 (BHV 1) using the polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol* 42 (1): 53-64.
26. **Wouda, W.; Dubey, J.P.; Jenkins, C.** (1997). Serological Diagnosis of Bovine Fetal Neosporosis. *J. Parasitol.* 83 (2): 545-547.



## Informe sobre vacunas y vacunación contra Brucelosis bovina

Raul Casas Olascoaga<sup>1</sup>

Informe técnico elaborado a solicitud del Centro Médico Veterinario de San José, presentado en la Jornada sobre Brucelosis el 19/08/03 en San José. La revista VETERINARIA agradece la autorización de su publicación por parte de el autor y de el presidente del Centro Médico.

### VACUNA CEPA RB51

#### INTRODUCCIÓN

De acuerdo a información personal recibida del Dr. Steve Olsen el objetivo inicial de la investigación para la búsqueda de una nueva vacuna contra la brucelosis para reemplazar la vacuna Cepa 19, fue eliminar el problema causado por la retención de títulos serológicos generados por la vacunación de terneras con la cepa 19. En EE.UU. la edad de vacunación de terneras con cepa 19 es de 4-12 meses. El proyecto de investigación no fue diseñado para comparar la vacunación de terneras con cepa 19 y cepa RB51. Sin embargo, la cepa 19 fue usada en el inicio del proyecto como control positivo. Se obtuvieron datos limitados para ambas vacunas (n=29 y 20 animales vacunados respectivamente para cepa RB51 y Cepa 19) los cuales sugieren aproximadamente 8% menor infección en los vacunados con Cepa 19 y 3% menor tasa de abortos que con la cepa RB51. Debido al número reducido de animales utilizados en este estudio existen dudas de que la diferencia de animales que abortaron sea significativa mientras que para la tasa de infección la diferencia es significativa. El criterio de infección en el examen bacteriológico fue estricto ya que el aislamiento de una sola colonia de la cepa virulenta de desafío en el momento de la necropsia (en el momento del parto o el aborto) determinó la clasificación del animal como infectado. Es necesario destacar que en el estudio pareado, en el grupo de la RB51, con la excepción de un aborto la recuperación del número de bacterias de la cepa virulenta de desafío fue extremadamente bajo, predominan-

temente de los ganglios linfáticos que drenan el ojo. La cepa virulenta de desafío fue la cepa *Brucella abortus* 2308, administrada conjuntamente a la dosis de  $1 \times 10^7$  UFC (unidades de bacterias formadoras de colonias) entre 170 y 180 días de gestación, aproximadamente 12 semanas previas a la parición.

El beneficio verdadero de la RB51 es la capacidad de permitir identificar serológicamente los animales infectados aún cuando ellos hayan sido vacunados con la cepa RB51. Sin embargo, es necesario informar que animales vacunados con la RB51 pueden seroconvertirse cuando son expuestos a las cepas virulentas de campo de *Brucella abortus*; mientras que la incidencia de los abortos será muy baja.

La vacuna *B. abortus* Cepa 19 confiere protección completa contra la infección en 65-75% de los animales vacunados y en el 25-35% restante una protección relativa. En un porcentaje superior al 95% la vacunación evita el aborto en hembras que se han infectado. El aborto constituye un alto peligro para la propagación de la infección en el rodeo afectado y en los rodeos de establecimientos vecinos, cuando no hay un aislamiento correcto entre los rodeos colindantes o hay intercambio de animales.

La vacunación con la vacuna RB51, al igual que con la vacuna Cepa 19, tiene un doble beneficio: disminuye la susceptibilidad a la infección al conferir protección inmunitaria y reduce el nivel de exposición a la infección al disminuir el número de animales excretores de *Brucella abortus* y reducir substancialmente el número de abortos en los rodeos infectados.

Tanto la vacuna RB51 como la Cepa 19 son estables y no se propagan de un animal a otro y su virulencia no aumenta por pasajes seriados en animales. La protección conferida por ambas vacunas es mediada por células.

La Cepa 19 posee cierta patogenicidad para los humanos y debe usarse con precaución para evitar la infección del operador. También han ocurrido infecciones accidentales con la cepa RB51 pero no hay conocimiento de signos adversos causados por la infección. La patogenicidad de la cepa RB51 para los humanos esta aún pendiente de determinación.

Ambas vacunas deben ser administradas bajo la responsabilidad de un veterinario.

La ventaja de la RB51 comparada con la cepa 19 es que no induce la formación de anticuerpos los cuales son detectados por las pruebas estándar de diagnóstico de brucelosis. Por lo tanto, los animales infectados pueden ser más fácilmente identificados.

La vacuna RB51 ha sido aprobada recientemente como vacuna oficial para el bovino por el Animal and Plant Health Inspection Services/ Departamento de Agricultura de Estados Unidos (APHIS/USDA).

En EE.UU. a partir de 1980, se ha usado las dosis reducidas de Cepa 19 las cuales figuran en el cuadro que precede. La dosis tradicional de Cepa 19 era muy alta: 50-60 mil millones de bacterias viables en el momento de la aprobación de la serie de vacuna y 25 mil millones hasta la fecha de expiración de la vacuna. A fin de disminuir las reacciones serológicas residuales causadas por esta alta concen-

<sup>1</sup>Miembro Titular de la Academia Nacional de Veterinaria.

## COMPARACIÓN DE DOSIS DE APLICACIÓN DE LAS VACUNAS

La comparación de las dosis de vacuna de Cepa RB51 y Cepa 19 son las siguientes:

	Bovinos jóvenes (dosis bacterias viables) Vía subcutánea	Bovinos adultos (dosis bacterias viables) Vía subcutánea
Vacuna Cepa RB51	1-3.4 x 10 <sup>10</sup>	1-3.4 x 10 <sup>9</sup>
Vacuna Cepa 19 (dosis reducida usada desde 1980)	3-10 x 10 <sup>9</sup>	3-10 x 10 <sup>8</sup>

tración de células viables contenidas en la dosis de vacuna, luego de estudios experimentales en bovinos, se determinó el uso de la dosis reducida. La vacunación de las terneras con dosis reducida se estableció en 4-12 meses de edad siendo la dosis óptima de 5 mil millones de bacterias viables administrada subcutáneamente y la edad óptima de vacunación 5 meses.

En las hembras adultas la dosis reducida óptima es de 500 millones de bacterias viables por vía subcutánea.

En Uruguay, la vacuna Cepa 19 se usó únicamente a la dosis alta tradicional para la vacunación de terneras (3-8 meses de edad), desde 1964 hasta la suspensión de la vacunación a fines de 1996. La cepa 19 a dosis alta inducía inmunidad durante la vida útil de la hembra, ya que las ternera vacunadas mantenían la resistencia a la infección frente a cepas virulentas de *Brucella abortus* por siete años y probablemente por un tiempo mayor. Por lo tanto, no era necesaria la revacunación, lo cual reducía significativamente el costo de la vacunación en la vida del animal. La dosis alta induce una mayor protección pero la formación y persistencia de anticuerpos residuales se prolonga mayor tiempo cuando se vacunan animales mayores de 8 meses de edad. En terneras de 3-8 meses de edad vacunadas con dosis alta de Cepa 19, el 90% se convierte en sero-negativas 9 meses después de la vacunación. En terneras vacunadas con Cepa 19 a edades superiores a 9

meses de edad los títulos serológicos de anticuerpos persisten por mayor tiempo. En Uruguay el uso de la dosis alta y el no cumplimiento estricto de la edad de vacunación provocó un aumento y mayor persistencia de anticuerpos residuales en las poblaciones de terneras vacunadas por encima de los 8 meses de edad.

Los datos sobre la persistencia de la inmunidad conferida por la vacunación con RB51, durante la vida útil en hembras bovinas vacunadas desde terneras, son aún limitados y deberán ser complementados mediante investigaciones experimentales futuras e informaciones de su uso en campo.

En EE.UU. se ha sustituido gradualmente la vacuna Cepa 19 por la Vacuna RB51 que actualmente es la vacuna oficial.

### VACUNACIÓN DE ANIMALES ADULTOS

La vacunación del rodeo de hembras adultas (vaquillonas y vacas) se puede aplicar selectivamente para la prevención y control de la brucelosis bovina.

La vacunación de hembras adultas en establecimientos infectados o en establecimientos sometidos a alto riesgo de infección debe combinarse con pruebas serológicas previas a la vacunación para la identificación y eliminación por sacrificio de los animales infectados. Las hembras no reaccionantes en las pruebas serológicas estándar corrientes serán vacu-

nadas con vacuna RB51. Durante el acto de la vacunación las hembras adultas deben ser identificadas en forma permanente ya sea por tatuaje o por la aplicación de caravanas.

En cada establecimiento infectado debe aplicarse un Plan de Saneamiento preparado y ejecutado según lo establecido en el Artículo 16º por el Poder Ejecutivo en el Decreto del 22 de Enero de 1998 sobre Programa de Erradicación de la Brucelosis y Tuberculosis en todo el territorio nacional. La vacunación debe ser autorizada por la Dirección General de Servicios Ganaderos (DGSG /MGAP).

Un inconveniente importante de la vacunación de hembras adultas es el estado de preñez.

La vacunación de hembras en estado avanzado de preñez podría causar aborto. A medida que avanza el período de gestación la administración de vacuna ofrece mayores peligros de causar abortos. Por lo tanto, es aconsejable vacunar las hembras serológicamente negativas antes del servicio. Cuando el plan de control de la brucelosis en el establecimiento lo establezca, los animales preñados se vacunarán preferentemente en el inicio de la gestación, en el cual el peligro de aborto es muy bajo.

En rodeos con infección activa y creciente la vacunación de hembras preñadas puede ser conveniente y oportuna para disminuir y/o evitar la serie de abortos que suele causar la brucelosis.

La vacunación del rodeo de hembras adultas induce protección inmediata contra la brucelosis ya que los animales obtienen inmunidad 3-4 semanas después de la vacunación, lo cual acelera el proceso de control de la enfermedad.

En los establecimientos infectados, la vacunación de adultos disminuirá la diseminación de la infección dentro del rodeo a medida que los animales reaccionantes infectados se eliminen con destino al sacrificio en matadero/ frigorífico habilitado oficialmente por los servicios veterinarios de DGSG/MGAP. Los animales confirmados como reaccionantes deben ser marcados a fuego con la letra B (brucellosis). El procedimiento de pruebas serológicas en serie permite la remoción de los animales infectados del rodeo y la vacunación ofrece protección a los animales libres de infección.

Otra ventaja importante de la vacunación de adultos es el beneficio derivado de la protección contra el aborto en muy alto porcentaje de las hembras preñadas. Esta protección contra el aborto ofrece tres ventajas importantes: un mayor procreo de terneros, una menor aparición de animales infectados y una importante disminución de las fuentes de infección por *Brucella abortus* virulenta. El resultado será que progresivamente habrá menor número de animales reaccionantes removidos con destino al sacrificio sanitario.

En establecimientos de alto riesgo de infección – libres de infección pero con alta probabilidad de ser expuestos a la brucelosis- la vacunación puede prevenir la introducción de la infección en el rodeo.

### INFORME TÉCNICO DE VACUNACIÓN DE VACUNOS CON CEPA *Brucella abortus* RB51

### COMITÉ TÉCNICO PARA EVALUACIÓN DE LA VACUNA

Unidad Enfermedades Zoonóticas USDA/ARS/NADC 2300 Dayton Rd., PO Box 70 Ames, IA 50010 Revisión de 16 de Agosto de 2000.

Comité de Investigación del ARS .Steven C. Olsen (Presidente, medicina/ inmunología). Norman F. Cheville (patología). Betsy Briker (biología molecular). Allen E. Jensen (bacteriología). Mitchell Palmer (patología). Mark Stevens (inmunología). Asesores Técnicos de Transferencia. Gerhart Schurig, Virginia P.I.. Fred Enright, Louisiana State University. Mike Gilsdorf, APHIS Cattle Disease. Phillip O'Berry, ARS Liaison. Versión en español Raúl Casas Olascoaga, Academia Nacional de Veterinaria, Uruguay

### ÍNDICE

Características de la RB51. Cepa RB51 en Vacunos. Eficacia de la Vacunación

Pruebas de campo en vacunos. La cepa RB51 en el búfalo americano y alce. Infección humana. Comercialización. Referencias

## INFORME TÉCNICO SOBRE VACUNACIÓN DE VACUNOS CON *Brucella abortus* CEPA RB51

### CARACTERÍSTICAS DE LA CEPA RB51

#### Derivación

*Brucella abortus* 2308 en cuya superficie bacteriana falta la cadena O de polisacáridos (residuos de perosamina). La cepa RB51 fue derivada naturalmente por pasajes en serie en medio que contenía rifampicina y por selección de colonias que poseían morfología rugosa.<sup>1</sup>

El Dr. Schurig del Virginia Polytechnic Institute, quien desarrolló la cepa RB51, suministró en 1990 un cultivo de la cepa RB51 al National Animal Disease Center para su estudio ulterior. Este cultivo fue transferido una vez y el nuevo cultivo fue designado como Semilla Maestra (Master Seed) RB51/ARS-1. A partir de esta cepa maestra, se produjeron varios pasajes para ser usados en el estudio con bovinos.

#### Caracterización

El carácter rugoso de cepa RB51 se basa en la morfología, tinción con cristal violeta, aglutinación espontánea en so-

lución salina, y aglutinación en solución de acriflavina.

La falta o muy baja expresión de la cadena O se demuestra por SDS-PAGE y tinción por plata, y por análisis en blot Western con anticuerpos monoclonales de la cadena-O.<sup>1</sup> Los análisis sobre sulfato dodecil sódico- electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), seguidos de tinción por azul Coomassie dan perfiles similares a la *Brucella abortus* cepa 19 y cepa 2308 lo cual sugiere que los componentes proteínicos de la cepa RB51 no han sufrido cambios diferenciales. La cepa RB51 expresa las proteínas mayor y menor de la membrana externa como previamente han sido informados para otras cepas de *Brucella abortus*. La tinción de Gram de las preparaciones de RB51 muestra formas bacilares o coccobacilares las cuales son ligeramente menores que las de las cepa 19 y cepa 45/20. La cepa RB51 es urea positiva, utiliza oxidativamente la glucosa, crece en presencia de eritritol, y no requiere CO<sub>2</sub> o sangre para su crecimiento.<sup>1</sup> La cepa RB51 al igual que la cepa 2308 (pero diferente a la cepa 19) crece en medio que contiene azul tionina (1:500.000) o penicilina (5U/ml).

#### Resistencia antibiótica

La cepa RB51 es sensible a los antibióticos usados en el tratamiento de la brucelosis humana (tetraciclina, oxitetraciclina, estreptomina, y doxiciclina) y a la amikacina, ampicilina, cloramfenicol, carbenicilina, eritromicina, gentamicina, kanamicina, tobramicina, y trimetoprim-sulfametazol. La cepa RB51 es resistente a la rifampicina (esta resistencia la diferencia de otros aislamientos de *Brucella*) y a penicilina, cloxacilina, metilina y oxacilina. La cepa RB51 no transporta el gene de resistencia a la estreptomina el cual se presenta y expresa por ingeniería genética de mutantes de *Brucella* Tn5.

#### Genes bacterianos

El genoma de la cepa RB51 tiene diferencias menores que el genoma de la cepa madre *B. abortus* 2308 cuando se examina por las técnicas corrientes.<sup>2,3</sup> La cepa RB51 contiene un gene funcional *eri* para el metabolismo del eritritol, el cual falta en la Cepa 19. El cultivo de laboratorio pasaje 70a de la cepa RB51 no difirió de



la Semilla Maestra cuando fue examinada por las técnicas genéticas corrientes. La técnica en campo pulsado de gel la electroforesis de restricción de fragmentos genómicos derivados- endonucleasa revela que la cepa RB51 se asemeja estrechamente con otras cepas de *Brucella*.<sup>2</sup>

### Estabilidad en Vacunos

La cepa RB51 es genéticamente estable en vacunos; no revierte a la virulencia o a la forma lisa después del desarrollo en bovinos por lo menos durante 12 semanas.<sup>4</sup> También se ha demostrado que la cepa RB51 es estable *in vitro* después de > 100 pasajes en cultivo celular e *in vivo* luego de pasajes seriados en ratones.<sup>1</sup>

### Viabilidad durante la Liofilización y Almacenamiento

El proceso de liofilización de las suspensiones de cepa RB51 causa aproximadamente una pérdida de 4% de bacterias vivas. Aún después del almacenamiento a temperaturas de -25 ó 4 C por hasta un año, la cepa RB51 liofilizada retiene una excelente viabilidad (>95% y 75%, respectivamente).<sup>5</sup>

### Dosis de la Vacuna

Las dosis subcutáneas de cepa RB51 usadas para la vacunación son: terneras, 10 a 34 mil millones de bacterias vivas; adultos/hembras preñadas, 1.0 mil millones de bacterias vivas. Las dosis comparables de cepa 19 son: terneras de 4 meses a un año, 3 a 10 mil millones; vacunos adultos, 0,3 a 1.0 mil millones de bacterias vivas.<sup>3</sup>

La dosis estándar de cepa 19 era originalmente de 10 mil millones de células vivas/ml ( 50 mil millones/ dosis) en la prueba inicial y no menos de 5 mil millones/ml ( 25 mil millones/dosis) a la fecha de expiración. Posteriormente se estableció una dosis reducida de cepa 19 en 3 a 10 mil millones de células vivas con edad límite para su aplicación de 4 a 12 meses de edad. La dosis reducida está basada en datos sobre estudios con una dosis protectora mínima de 90 millones a 4.5 mil millones de Unidades Formadoras de Colonias ( UFC) para terneras de 3-6 meses de edad, y 100 millones a 90 mil millones para terneras de 4 a 6 meses de edad.<sup>7</sup>

Se estima que 2:100,000 terneras vacunadas retienen la cepa 19 hasta la edad adulta.<sup>7</sup> En 23 vacas adultas examinadas los tejidos en los cuales la cepa 19 fue retenida fueron: útero/placenta 10, leche/ubre 6, y contenido estómago fetal 2 con aislamiento de riñón, cápsula articular, ganglio linfático preescapular.<sup>8</sup>

Los tejidos de los cuales se recuperaron otros dos aislamientos de cepa 19 no fueron especificados.

En vacunos ha sido determinada la bioseguridad de la cepa RB51. Los experimentos fueron hechos en terneros para determinar la bioseguridad de varias dosis ( 1 millón a 60 mil millones de UFC SQ) y en vacas preñadas para determinar su abortogenicidad. (Cuadro 1).

### VACUNACIÓN DE TERNERAS

#### Efecto clínico

La cepa RB51 es segura en todas las edades. No se presenta enfermedad clínica y no hay evidencias de efectos patológicos en tejidos cuando se administraron subcutáneamente dosis elevadas de RB51 a terneros de 3 y 6 meses de edad. La vacuna de cepa RB51 persiste por un período suficiente para desarrollar inmunidad y es luego eliminada de los tejidos del huésped sin riesgos de persistencia hasta la edad adulta.<sup>9</sup>

En la necropsia de terneros vacunados con cepa RB51 no fueron observadas lesiones patológicas. De acuerdo a información de la Colorado Serum Company, la vacuna cepa RB51 induce

aproximadamente 1 reacción adversa por millón de dosis vendidas.

### Persistencia

Experimentos de bioseguridad hechos con terneras Polled Hereford de 10 meses de edad demostraron que la replicación de cepa RB51 en los ganglios linfáticos que drenaban los lugares subcutáneos de vacunación fueron aproximadamente similares que para la cepa 19, luego de una semana de la vacunación pero declinaron más rápidamente. La mayoría de los bovinos eliminó las dosificaciones de 10 mil millones de UFC de la cepa RB51 antes de las 12 semanas postvacunación. (Cuadro 2).

### Lesiones Tisulares

El examen microscópico de terneros infectados con la cepa RB51 demostró que no se presentaron lesiones en el cerebro, tracto genital, y en otras vísceras. Los ganglios linfáticos que drenan los sitios de vacunación no mostraron evidencias de destrucción linfoide. Artritis, una secuela que puede presentarse en la vacunación con cepa 19, no fue observada en terneros vacunados con RB51. Lesiones histológicas no fueron encontradas en cerebro, hígado, bazo, ganglios linfáticos (12), pulmones, corazón, útero, testículos.

### Diseminación de ternero a ternero

La cepa RB51 no se transmite de terneros vacunados a terneros no vacunados. Terneras no vacunadas estabuladas con terneras vacunadas no desarrollaron evidencias bacteriológicas o serológicas de infección con cepa RB51.

**Cuadro 1.** Criterios de Bioseguridad para Vacuna viva de *Brucella*.

1. No se presentan signos clínicos de la enfermedad luego de la vacunación.
2. La bacteria persiste en los ganglios linfáticos por >6 semanas pero <12 semanas.
3. La bacteria no persiste en la circulación sanguínea más allá de 3 días.
4. La bacteria no se presenta en las secreciones nasales, saliva, u orina.
5. Los anticuerpos séricos aparecen a los 14 días después de la infección
6. La inmunosupresión no causa recrudescencia.
7. No hay depleción linfoide en ganglios que drenan el punto de vacunación.
8. No hay cambios tisulares degenerativos o inflamatorios.
9. Las bacterias recuperadas después de 12 semanas de desarrollo en el huésped son genéticamente idénticas a la cepa de la vacuna.

**Cuadro 2.** Número de *Brucella abortus* vivas en ganglio linfático preescapular que drena los sitios de vacunación ( promedio de 6 biopsias ).

	Semanas después de la vacunación					
	1	2	4	6	10	12
RB51	4,355	1,185	82	29	1	0
CEPA 19	3,748	21,896	1,205	43	2	0

### Inmunosupresión

La supresión química de la inmunidad en terneros vacunados no causó recrudescencia de la cepa RB51. La administración de dexametasona en terneros 12 semanas después de la vacunación, no indujo crecimiento de RB51, ni cambios en la respuesta serológica, u otras evidencias de recrudescencia de la cepa de vacuna.<sup>4</sup>

### VACUNACIÓN DE BOVINOS ADULTOS

Una dosis reducida de la cepa RB51 es eficaz en vacas adultas.<sup>10</sup> Las vacas vacunadas con una dosis única de  $3 \times 10^9$  o  $1 \times 10^9$  UFC, o doble vacunación con  $1 \times 10^9$  UFC previo al servicio fueron protegidas contra el aborto o contra el desafío de infección intraconjuntival con  $1 \times 10^7$  UFC de la cepa virulenta 2308 (Cuadro 3).<sup>10</sup>

### Cepa RB51 en vacas preñadas

La cepa RB51 causó 1 aborto en 820 vacas preñadas las cuales fueron vacunadas en condiciones de campo con 1 mil millones de UFC. A fin de examinar el efecto abortígeno de la vacunación usando dosis y rutas de administración inapropiadas, se administraron dosis de 10 mil millones de UFC de RB51 por vía intravenosa a 10 vaquillonas preñadas a los seis meses de gestación.<sup>11</sup> Las vaquillonas fueron sacrificadas y fue efectuada la necropsia 6 semanas después de la inoculación (n=5) y en el parto normal (n=5). La mayoría de las vaquillonas se infectó con la cepa RB51 y desarrolló placentitis, pero solamente una vaquillona parió un ternero prematuro ( Cuadro 4).

*Brucella abortus* cepa RB51 fue cultivada de tejidos de vacas y fetos 8 semanas

**Cuadro 3.** Vaquillonas Hereford (18 meses de edad) fueron vacunadas con *B. abortus* cepa RB51 inmediatamente después del servicio y desafiadas intraconjuntivalmente en la mitad de la gestación con *B. abortus* cepa 2308.

Dosificación	N	Número de Preñadas	Número de abortos	Cepa 2308 recuperada de tejidos	
				Materno	Fetal
$3 \times 10^9$ UFC dosis única	6	4	0/4	0/4	0/4
$1 \times 10^9$ UFC dosis única	7	7	0/7	0/7	0/7
$1 \times 10^9$ UFC doble dosis	6	4	0/4	0/4	0/4
No vacunadas	6	6	4/6	6/6	4/6

**Cuadro 4.** Vacas preñadas (16 de 27 meses de edad) fueron inoculadas intravenosamente con 10 mil millones UFC de *B. abortus* cepa RB51 a los 180 días de preñez.

n=	Tiempo en semanas del examen después del desafío	Número de placentas infectadas	Número con placentitis	Número de abortos o terneros prematuros
5	8 semanas	4/5	4/5	0
5	en el parto ternero prematuro débil	4/5	4/5	1 *

después de la inoculación y en el momento del parto luego de la inoculación a los 180 días de la gestación.<sup>11</sup> Muestras de útero materno, placenta, hígado, bazo, y ganglios linfáticos supramamarios estaban infectados con la cepa RB51 en ambos tiempos de la toma de muestras. (Cuadro 5). De manera similar, muestras de hígado, bazo, pulmón, ganglios linfáticos brónquicos, e hisopos de recto fueron positivos para la cepa RB51 en ambos tiempos de la toma de las muestras. Muestras alantoideas fueron positivas 2/5 a las 8 semanas, pero todas las muestras alantoideas y amnióticas fueron negativas en las muestras recolectadas al momento del parto.

En un segundo estudio se investigó los efectos de la administración subcutánea de 1 mil millones de UFC de la cepa RB51 o  $3 \times 10^8$  de cepa 19 en la mitad de la gestación de hembras bovinas.<sup>12</sup> Las vacas vacunadas con cepa 19 o con cepa RB51 no abortaron ni tuvieron nacimientos prematuros. (Cuadro 6). Los tejidos maternos y fetales recolectados en la necropsia fueron negativos en los culti-

vos para la detección de *Brucella* spp. y no presentaron lesiones histológicas de brucelosis.

#### OTRAS ESPECIES ANIMALES

En la mayoría de las especies evaluadas, la cepa RB51 se mostró atenuada y la eliminación de la bacteria fue más rápida comparada con otras cepas de vacunas de *B. abortus*. Una excepción es el búfalo americano ("bison") en el cual la cepa RB51 persistió un tiempo similar a la cepa 19.<sup>13</sup> En estudios de inocuidad en ratones campestres, cuervos, venados, ardillas terrestres, la cepa RB51 fue eliminada de los tejidos esplénicos y hepáticos del venado, ratón y cuervo a las 12 semanas y no se observaron efectos nocivos de morbilidad o mortalidad. En la ardilla terrestre la administración oral de cepa RB51 no indujo enfermedad clínica o mortalidad, aun cuando la cepa de vacuna fue recuperada del bazo de 4 de 7 ardillas terrestres 12 semanas después de la infección oral.<sup>14</sup>

### EFICACIA DE LA VACUNACIÓN EXPERIMENTAL DE VACUNOS CON CEPA RB 51

#### Efecto de la Vía de Vacunación

En el vacuno la inyección subcutánea es la única vía recomendada para el uso de la vacuna RB51. Según se ha demostrado, las terneras vacunadas subcutáneamente con RB51 quedan protegidas contra la infección y el aborto. La dosis de la cepa virulenta de desafío *B. abortus* 2308 ( $10^7$  in 100ul) fue administrada en el saco conjuntival (50ul/ojo).<sup>9</sup> La vacunación de vacunos con cepa 19 por vía conjuntival o intrapalpebral fue casi tan efectiva como la vacunación subcutánea pero no tan práctica. La vacunación oral con cepa 19 ha tenido éxito; mientras que los estudios de administración de la RB51 por vía oral están siendo efectuados. Estos experimentos de vacunación oral en vaquillonas con cepa 19 han demostrado protección contra el aborto: 0/20 vaquillonas preñadas vacunadas oralmente y luego desafiadas con la cepa

**Cuadro 5.** Cultivos bacterianos de tejidos de vacas y fetos después de la administración intravenosa de 10 mil millones de UFC de *B. abortus* cepa RB51 a los 180 días de la preñez.

Animal	Tejidos	Necropsia	
		8 semanas	Parto/nacimiento (n=5)
Vacas	Placenta	4/5	4/5
	Ganglios mamarios	2/5	0/5
	Leche	0/5	1/5
	Hisopos vaginales	0/4	1/5
Fetos	Pulmones	4/5	2/5
	Contenido del cuajo	2/5	1/4
	Sangre	0/5	2/5

**Cuadro 6.** Vacas preñadas (20 meses de edad) fueron inoculadas subcutáneamente con 1 mil millones de UFC de *B. abortus* cepa RB51 o con  $3 \times 10^8$  de UFC de *B. abortus* cepa 19 a los 180 días de la preñez.

n=	Vacuna	Número de placentas infectadas	Número de placentitis	Número de abortos o terneros prematuros
5	Cepa RB51	0/5	0/5	0
5	Cepa 19	0/5	0/5	0



2308 virulenta en la mitad de la gestación, no sufrieron aborto; mientras que 10/19 vaquillonas preñadas controles abortaron (14 dieron cultivo positivo).<sup>15</sup>

Los sistemas balísticos de aplicación de la vacuna RB51 liofilizada están siendo evaluados en el búfalo americano y en el alce.

### Efecto de la dosis de vacunación

Dosis altas de cepa RB51 dan respuestas inmunes detectables más elevadas que las dosis más bajas. A fin de examinar el efecto de la dosis sobre la protección, grupos de terneras Polled Hereford fueron vacunadas por vía subcutánea a los 7 meses con una dosis alta (32 mil millones de UFC) o con dosis bajas (16 mil millones de UFC) de la vacuna RB51. Las terneras fueron desafiadas con la cepa virulenta 2308 a los 6 meses de preñez y fueron examinadas para detectar evidencias de infección y aborto. Los datos sugieren protección similar de la vacuna

RB51 a las dosis de 16 y 32 mil millones de UFC. (Cuadro 7).<sup>16</sup>

### Efecto de la Edad de Vacunación

A fin de determinar el efecto de la edad de vacunación, se utilizaron hembras Polled Hereford las cuales fueron vacunadas con 10 mil millones de UFC de la vacuna RB51 a las edades de 3, 5, 6, 7, y 10 meses de edad, se cubrieron a los 16-18 meses de edad, y fueron desafiadas con la cepa virulenta de *B. abortus* a los 6 meses de gestación.<sup>9,17,18</sup> Las terneras vacunadas a los 10 meses de edad presentaron los más altos porcentajes de protección. ( Cuadros 8 y 9). Aun cuando la vacunación a los 5, 6, 7 o 10 meses de edad tendió a dar protección equivalente, hubo una tendencia a inducir menor protección en las edades más jóvenes ( 3 meses ). Las hembras que recibieron la vacuna cepa 19 (n=22) estaban protegidas contra la infección en 95% mientras que las hembras no vacunadas

controles (las cuales recibieron solución salina; n=47) tuvieron una alta incidencia de infección y aborto.

### CEPARB51 EN OTRAS ESPECIES

Un estudio de la eficacia de la vacuna RB51 ( 4x10<sup>10</sup> UFC administradas subcutáneams de la vacunación, los carneros fueron desafiados con 3x10<sup>9</sup> UFC de *B. ovis* virulenta y fueron examinados 8 semanas más tarde. Tanto los controles como los vacunados con la RB51 fueron infectados en el 100%; mientras que se infectó el 68% de los carneros vacunados con la vacuna Rev-1 (Cepa Rev-1 de *Brucella melitensis*).

### PRUEBAS EN VACUNOS EN CAMPO

Pruebas en campo llevadas a cabo por APHIS/ USDA (Drs. Mike Gilsdorf, Donald Evans) comenzaron en 1994 en Kansas y involucraron la vacunación de vacas adultas en un rodeo (rebaño) no

**Cuadro 7.** Eficacia de la Vacuna RB51 administrada a dos dosis diferentes.

Terneras Polled Hereford fueron vacunadas subcutáneamente con 16 o 32 mil millones de bacterias vivas, fueron servidas a los 16 - 18 meses de edad, y desafiadas con la cepa virulenta *Brucella abortus* 2308 a los 6 meses de gestación.<sup>16</sup>

Edad de vacunación	Vacuna (dosis)	n=	<i>Brucella</i> Aborto
7 meses	RB51- alta	6	0
7 meses	RB51- baja	6	0
20 meses	RB51- baja	3	0
7 meses	sol. salina	6	2

**Cuadro 8.** Eficacia de la Cepa RB51 usada en cinco edades diferentes de vacunación

Edad de vacunación	Protección contra la infección % protegidas ( infectadas/desafiadas )		
	RB51	CEPA 19	CONTROLES
10 meses de edad	95% (1/20)	100% (0/6)	45% (6/11)
7 meses de edad	83% (4/23)	80% (1/5)	36% (7/11)
5-6 meses de edad	69% (8/26)	100% (0/4)	50% (7/14)
3 meses de edad	61% (7/18)	100% (0/4)	27% (8/11)
Todas las edades	78% (20/87)	95% (1/19)	40% (28/47)

**Cuadro 9.** Protección contra el aborto conferido por la vacuna RB51 y la cepa 19 en diferentes edades de vacunación.

Edad de Vacunación	Protección contra el aborto % protegido ( abortadas/desafiadas)		
	RB51	CEPA 19	CONTROLES
10 meses de edad	100% (0/20)	100% (0/6)	45% (6/11)
7 meses de edad	100% (0/23)	100% (0/6)	64% (4/11)
5-6 meses de edad	92% ( 2/26)	100% (0/4)	64% (5/14)
3 meses de edad	87% (2/15)	100% (0/4)	55% (5/11)
Todas las edades	95% (4/84)	100% (0/19)	58% (20/47)

infectado y en tres rodeos (rebaños) infectados (Cuadro 10). Las vacas recibieron vacuna liofilizada preparada en el National Animal Disease Center a una dosis de 1 mil millones de CFU de *B. abortus* cepa RB51 ( cepa ARS-1).

Los rodeos (rebaños) 1, 2, y 4 estaban cuarentenados en el momento de la vacunación debido a la identificación de bovinos infectados con *B. abortus*. Los rodeos (rebaños) 1 & 2 han sido despoblados. SD= Sin datos.

Como parte del proceso de obtención de la licencia ( permiso, autorización), Colorado Serum Company efectuó pruebas de campo en las cuales fueron administradas dosis de 1 mil millones de UFC de RB51 a más de 1500 bovinos adultos, de ellos más de 800, se confirmó, estaban preñados. Luego del examen bacteriológico, serológico e histológico de las muestras obtenidas después del aborto, la cepa RB 51 fue incriminada como causante de un aborto y se diagnosticaron

otros 6 abortos que no fueron causados por la vacunación con la cepa RB51. El papel potencial de la cepa RB51 en dos abortos adicionales ocurridos en estos estudios se desconoce ya que no fueron obtenidas muestras para el análisis de laboratorio. Los efectos de la dosificación de la cepa RB51 en vacas preñadas es desconocido. Sin embargo, la cepa RB51 fue recuperada de tejidos fetales luego de distocia presentada en una vaquillona la cual fue vacunada con la dosis de ternera ( $1-3.4 \times 10^{10}$  UFC) en la mitad de la gestación.<sup>20</sup>

#### DETECCIÓN DE VACUNOS INFECTADOS EN LABORATORIO Y EN CAMPO

##### Pruebas Serológicas Estándar para Brucelosis

Los sueros de bovinos vacunados con cepa RB51 no contienen anticuerpos que reaccionen en las pruebas diagnósticas

corrientes para brucelosis. En los vacunos, no son inducidos los anticuerpos de la cadena O los cuales reaccionan en las pruebas serológicas que usan lipopolisacáridos como antígenos (pruebas estándar en tubo, prueba de la tarjeta, rivanol, PCFIA)<sup>21</sup> Los vacunos adultos no sufren seroconversión detectable en las pruebas de vigilancia. La vacunación con la cepa RB51 en bovinos adultos que habían recibido la vacunación con cepa 19 cuando eran terneras, no indujo respuestas serológicas en las pruebas convencionales de vigilancia.<sup>22</sup> El fracaso de la cepa RB51 para producir anticuerpos de la cadena O también se ha demostrado en otras especies (caprino, conejo, ratón).<sup>1</sup>

Vacunos vacunados con cepa RB51 e infectados con la cepa virulenta 2308 desarrollan anticuerpos los cuales reaccionan en las pruebas serológicas estándar. Los vacunos vacunados con cepa RB51, luego de desafiados con la cepa virulenta 2308 muestran respuestas po-

**Cuadro 10.** Pruebas de campo con *B. abortus* cepa RB51.

Rodeo ( rebaño)	n	Fecha de vacunación	Estatus	
			No. nacimientos	Cultivos Positivos
1	25	12-3-94	13	2
2	99	12-22-94	>35	SD
3	57	3-20- 95	>18	0/22
4	15	7-27-95	SD	

Los rodeos (rebaños) 1, 2, y 4 estaban cuarentenados en el momento de la vacunación debido a la identificación de bovinos infectados con *B. abortus*. Los rodeos (rebaños) 1 & 2 han sido despoblados. SD= Sin datos.

sitivas en la prueba estándar de tubo, pero a diferencia de las respuestas de los vacunos no vacunados e infectados, los títulos serológicos disminuyen progresivamente.

### Pruebas serológicas para la cepa RB51

Las evidencias serológicas de la vacunación con cepa RB51 se hacen con la prueba del "dot blot" la cual detecta la respuesta de anticuerpos contra las proteínas bacterianas gamma- irradiadas de la RB51.<sup>23</sup> Los títulos de anticuerpos son significativamente más altos en los vacunos a los cuales se ha dado una dosis de 30 mil millones de CFU de la cepa RB51, comparados con los títulos de los vacunos con una dosis de 15 mil millones. Los vacunos vacunados con Cepa RB51 producen anticuerpos contra, por lo menos, la membrana proteica externa (superficiales) 4 o 5 de *B. abortus*. Estas proteínas han sido aisladas para usarlas en el desarrollo de una prueba diagnóstica más específica.<sup>24</sup>

### Prueba Cutánea

La prueba cutánea de sensibilidad específica por medio de inyección intradérmica de brucelina no distingue entre vacunos infectados con cepa 19 y aquellos infectados con una cepa de *B. abortus* virulenta de campo, ya que ambos grupos reaccionan dando pruebas cutáneas positivas. Los vacunos vacunados con RB51 no reaccionan a la inyección intradérmica de brucelina estándar.<sup>24</sup>

### Inmunidad celular mediada

Los vacunos vacunados con RB51 muestran in vitro evidencias de inmunidad mediada por células. Los linfocitos aislados de ganglios linfáticos de vacunos vacunados con RB51 responden de manera similar a aquellos procedentes de vacunos que recibieron cepa 19.<sup>25</sup>

### Identificación Bacteriológica

Los métodos presentes para el cultivo de la cepa RB51 incluyen el plaqueado en placas de agar triptosa conteniendo 5% de suero bovino. Usualmente, el desarrollo se presenta a los 4-5 días de incubación. El subcultivo es seguido por

la verificación de las características consistentes, morfológicas y bioquímicas de la cepa RB51. Se ha desarrollado un medio selectivo que facilita el aislamiento e identificación de la cepa RB51 y permite su diferenciación de las cepas de *B. abortus* experimentales y las cepas de campo.<sup>26</sup>

Un prueba rápida (abortus, melitensis, ovis, suis; "AMOS" PCR TEST), basada en la tecnología de la cadena polimerasa, puede ser usada para la identificación diagnóstica específica de la cepa RB51. La prueba "AMOS" distingue la cepa RB51 de otras cepas virulentas de *B. abortus* aisladas en el campo, en 8 horas, mientras que las técnicas bacteriológicas estándares requieren varios días para diferenciarlas. La prueba "AMOS" no permite diferenciar la cepa RB51 de su cepa madre 2308. El análisis genético ha demostrado una segunda redistribución genética, la cual diferencia la cepa RB51 de la cepa 2308. Esta redistribución es estable y ha sido mantenida en todos los aislamientos de la RB51 probados hasta el presente, y podría ser usado para desarrollar una prueba diferencial.<sup>2</sup>

### CEPARB51 EN EL BÚFALO AMERICANO Y EN EL ALCE

La infección con *B. abortus* del búfalo americano y el alce en el Yellowstone National Park es una fuente potencial de infección del vacuno y de la persistencia de la brucelosis en Estados Unidos. Los estudios en el búfalo americano indican que la cepa RB51 puede ser un efectivo agente inmunizante. Los búfalos americanos vacunados subcutáneamente con RB51, tienen un pico menor de número de bacterias en los tejidos de los ganglios linfáticos, más bajo título de anticuerpos, y eliminan las bacterias más lentamente que los vacunos.<sup>12,27,28</sup> La cepa RB51 se localiza predominantemente en los tejidos de los ganglios linfáticos de los búfalos y no parece causar lesiones histológicas adversas.<sup>28</sup>

En los búfalos americanos la vacunación de terneros con la cepa RB51 no disemina la infección a terneros vírgenes estabulados con ellos o alojados en el mismo ambiente.<sup>27</sup> En los búfalos ha sido de-

mostrada la respuesta celular mediada a antígenos de *B. abortus* iniciándose a las 12 semanas y las respuestas son similares a las que se observan en los vacunos vacunados.<sup>27</sup> Las búfalas vacunadas con RB51 en la edad joven (terneras) quedaron protegidas contra la infección y aborto, cuando fueron desafiadas en la mitad de la gestación con la cepa virulenta 2308.<sup>29</sup>

La vacunación con RB51 en la edad adulta de búfalas preñadas, la cepa RB51 indujo aborto (2/8) y placentitis cuando se aplicó a la dosis de 10<sup>9</sup> UFC, dosificación que ha demostrado ser segura en bovinos.<sup>30</sup> Los datos sugieren que la búfala vacunada en el segundo trimestre de la gestación es probable que aborte.

### INFECCIÓN HUMANA

Han ocurrido infecciones accidentales de humanos con *B. abortus* cepa RB51, si bien, no hay conocimiento de signos clínicos adversos que hayan sido informados al Center for Disease Control en Atlanta, GA. Sin embargo, la patogenicidad de la cepa RB51 para los humanos está aún pendiente de determinación.

### COMERCIALIZACIÓN

No existe patente para la *B. abortus* cepa RB51. Los científicos e instituciones que desarrollaron (Dr. Schurig, Virginia Polytechnic Institute) y probaron (National Animal Disease Center, ARS) la cepa RB51 han publicado sus datos, y esto impide la adquisición y registro de patente.

El potencial del uso de la vacuna RB51 en Estados Unidos ha sido estimado en 10 millones de dosis anuales durante 10 años.

Actualmente la cepa RB51 se reconoce como vacuna oficial en 49 estados con, por lo menos, 20 estados que no autorizan el uso de la vacuna cepa 19. (Alaska no autoriza la vacunación de los vacunos contra la brucelosis).

Se anticipa que APHIS recomendará suspender el uso de la cepa 19, o alternativamente, reducir severamente su uso, una vez que la vacuna comercial de cepa RB51 obtenga aprobación oficial completa.

## Referencias Bibliográficas

1. Schurig, G.G.; Roop R.M.; Bagchi, T.; Boyle, S.; Buhrman, D.; Sriranganathan, N. (1991). Biological properties of RB51: a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.* 28: 171-188.
2. Jensen, A.E.; Cheville, N.F.; Ewalt, D.R.; Payeur, J.B.; Thoen, C.O. (1995). Application of pulsed-field gel electrophoresis for differentiation of vaccine strain RB51 from field isolates of *Brucella abortus* from cattle, bison, and elk. *Am. J. Vet. Res.* 56: 308-312.
3. Bricker, B.J.; Halling, S.M. (1995). Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay: differentiation of *Brucella abortus* vaccine strain RB51. *J. Clin. Microbiol.* 33: 1640-1642.
4. Cheville, N.F.; Jensen, A.E.; Halling, S.M.; Tatum, F.M.; Morfitt, D.C.; Hennager, S.G.; Frerichs W.M.; Schuring G. (1992). Bacterial survival, lymph node changes and immunologic responses of cattle vaccinated with standard and mutant strains of *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.* 53: 1881-1888.
5. Capsel, R.L.; Olsen, S.C.; Cheville, N.F.; Thoen, C.O. Survival of *Brucella abortus* strain RB51 lyophilized and as liquid vaccine under different storage conditions. *Biologicals* (In Press).
6. Deyoe, B.L.; Dorsey, T.A.; Meredith, K.; Garrett L. (1980). Reduced doses of *Brucella abortus* in cattle. *Proc. USAHA Annl. Meet.*, pp 163-164.
7. Jones, L.M.; Berman, D.T. (1976). The role of living vaccines in prophylaxis. *Develop. Biol. Standard* 31: 328-334.
8. Thomas, B.L.; Bracewell, C.D.; Corbel M.J. (1981). Characterization of *Brucella abortus* strain 19 culture isolated from vaccinated cattle. *Vet. Record* 108: 90-93.
9. Cheville, N.F.; Stevens, M.G.; Jensen, A.E.; Tatum, F.M.; Halling, S.M. (1993). Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of *Brucella abortus*. *AM. J. Vet. Res.* 54: 1591-1597.
10. Olsen, S.C. (2000). Responses of adult cattle to vaccination with a reduced dose of *Brucella abortus* strain RB51. *Res. Vet. Sci.* (in Press)
11. Palmer, M.V.; Cheville, N.F.; Jensen, A.E. (1996). Experimental infection of pregnant cattle with the vaccine candidate *Brucella abortus* strain RB 51. Pathologic, bacteriologic and serologic findings. *Vet. Path.* 33: 682-691.
12. Palmer, M.V.; Cheville, N.F.; Olsen, S.C. (1997). Safety and immunogenicity of *Brucella abortus* strain RB51 vaccination in pregnant cattle. *Am. J. Vet. Res.* 58: 472-477.
13. Olsen, S.C.; Cheville, N.F.; Kunkle, R.A.; Palmer, M.V.; Jensen, A.E. (1997). Bacterial survival, lymph node changes, and immunologic responses of bison (*Bison bison*) vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51. *J. Wildlife Dis.* 33: 146-151.
14. Jannuszewski, M.C.; Olsen, S.C.; McLean, R.G.; Clark, L.; Rhyan, J.C. Biosafety of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 in non-target species of birds and rodents. *J. Wildlife Dis.* (In Review).
15. Nicoletti, P.; Milward, F.W. (1983). Protection by oral administration of *Brucella abortus* strain 19 against an oral challenge exposure with a pathogenic strain of *Brucella*. *Am. J. Vet., Res.* 44: 1641-1646.
16. Olsen, S.C.; Bricker, B.; Palmer, M.V.; Jensen, A.E.; Cheville, N.F. (1999). Responses of cattle to two dosages of *Brucella abortus* strain RB51: Serology, clearance and efficacy. *Res. Vet. Sci.* 66: 101-105.
17. Cheville, N.F.; Olsen, S.C.; Jensen, A.E.; Stevens, M.G.; Palmer, M.V. (1996). Efficacy of *Brucella abortus* strain RB51 to protect cattle against brucellosis: Effects of age at vaccination, *Am. J. Vet. Res.* 57: 1604-1607.
18. Olsen, S.C. (2000). Immune responses and efficacy following administration of a commercial *Brucella abortus* strain RB51 vaccine to cattle. *Vet. Therapeutics* (In Press).
19. de Bacques, M.P.J.; Barberan, M.; Marin, C.M.; Blasco, J.M. (1995). The *Brucella abortus* RB51 vaccine not confer protection against *Brucella ovis* in rams. *Vaccine* 13: 301-304.
20. Van Metre, D.C.; Kennedy, G.A.; Olsen, S.C.; Hansen, G.R.; Ewa, D.R. (1999). Brucellosis induced by RB51 vaccine in a pregnant heifer. *J.A.V.M.A.* 215: 1491-1493.
21. MacMillan, A. (199). Conventional serologic tests, pp 153-197. In: Nielsen K, Duncan JR (eds.) *Animal Brucellosis* CRC Press, Boca Raton, FL.
22. Olsen, S.C.; Stevens, M.G.; Cheville, N.F.; Schurig, G. (1997). Experimental use of a dot-blot assay to measure serologic responses of cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51. *J. Vet. Diag. Invest.* 9: 363-367.
23. Olsen, S.C.; Evans, D.; Hennager, S.G.; Cheville, N.F.; Stevens, M.G. (1996). Serologic Responses of Calfhood Vaccinated Cattle to *Brucella abortus* strain RB51. *J. Vet. Diag. Invest.* 8: 451-454.
24. Cheville, N.F.; Jensen, A.E.; Morfitt, D.C.; Stabel, T.J. (1994). Cutaneous delayed hypersensitivity reactions of cattle vaccinated with mutant strains of *Brucella abortus*, using brucellins prepared from various brucellar strains. *Am. J. Vet. Res.* 55: 1261-1266.
25. Stevens, M.G.; Olsen, S.C.; Cheville, N.F. (1994). Comparative analysis of immune responses in cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 or strain RB51. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 44: 223-235.
26. Hornsby, R.L.; Jensen, A.E.; Olsen, S.C.; Thoen, C.O. (2000). Selective media for isolation of *Brucella abortus* strain RB51. *Vet. Microbiol.* 73: 51-60.



- 
27. **Olsen, S.C.; Jensen, A.E.; Palmer, M.V.; Stevens, M.G.** (1998). Evaluation of serologic responses, lymphocyte proliferative responses, and clearance from lymphatic organs after vaccination of bison with *Brucella abortus* strain RB51. *Am. J. Vet. Res.* 59: 410-415.
28. **Roffe, T.J.; Olsen, S.C.; Gidlewski, T.; Jensen, A.E.; Palmer, M.V.; Huber, R.** (1999). Biosafety of parenteral *Brucella abortus* strain RB51 vaccine in bison calves. *J. Wildlife Management.* 63: 950-955.
29. **Olsen, S.C.; Palmer, M.V.** Efficacy of calfhood vaccination with *Brucella abortus* strain RB51 to protect bison against challenge with virulent *B. abortus* strain 2308. *J. Wildlife Dis.* (In preparation).
30. **Palmer, M.V.; Olsen, S.C.; Gilsdorf, M.J.; Philo, L.M.; Clarke, P.R.; Cheville, N.F.** (1996). Abortion and placentitis in pregnant bison (*Bison bison*) induced by the vaccine candidate, *Brucella abortus* strain RB51. *Am. J. Vet. Res.* 57:1604-1607.



## Homenaje al Dr. Carlos Carlevaro

El 17.08.2002, falleció en Montevideo como consecuencia de una lesión de origen cerebral, el Dr. Carlos Carlevaro nacido en Florida el 19.09.1919. En esa -su ciudad- había realizado sus estudios de primaria y secundaria, en esta última con exoneración de exámenes debido a su excelente escolaridad.

En 1939 ingresó a la Facultad de Veterinaria, egresando en 1944 sin haber perdido un solo de los 28 exámenes rendidos.

En 1946, Conaprole le había asignado la responsabilidad de dirigir un trabajo de inseminación para tamberos de la cuenca lechera para el que había adquirido en Estados Unidos un excepcional toro de la raza Holando. En 1947 ingresó a la Dirección de Ganadería, ocupando un cargo de control de ectoparasitosis en los departamentos de Treinta y Tres y Lavalleja. En 1949 es trasladado a Montevideo para ocupar diferentes cargos en frigoríficos de la capital, jubilándose en 1994 con el cargo de Director del Departamento de Contralor de Embarques.

Simultáneamente, había ingresado a la docencia en 1948, jubilándose en 1994, cuando ejercía el cargo de Profesor titular grado cinco de la Cátedra de Obstetricia y Jefe del Instituto de Producción Animal.

Sumamente habilidoso, había construido un cepo de retención para extraer semen a gallos y también electroyaculador muy práctico y económico para ser utilizado tanto en vacunos como carneros.

Probablemente haya sido el primero en el país en practicar inseminación artificial en aves.

El Dr. Carlevaro usufructuó varias becas entre las que son de señalar la ofrecida por la Fundación Rockefeller y Universidad de la República en 1955, para especializarse en Reproducción en Illinois durante 14 meses y en 1963, durante ocho meses en el Instituto Spallanzani de Milán para actualización de conocimientos en reproducción e inseminación artificial, otorgada por Italia y la Facultad de Veterinaria.

Carlevaro, fue socio de la Sociedad de Medicina de Veterinaria y la Asociación Uruguaya de Escritores, habiendo tenido importante y decisiva contribución en la fundación de la Academia Nacional de Veterinaria.

Carlos fue nuestro compañero de estudio en la Facultad, también de viajes tanto a la Exposición Internacional de Palermo, como a las numerosas incursiones que por el interior nos organizara siempre nuestro compañero Oscar Latorre y en esos días de convivencia, confirmó siempre -más allá de su carácter reservado- su cordialidad, su don de gente y el sentido de la amistad, actitudes que mantuvo siempre como profesional y Profesor.

Le sobrevive la Sra. Dora García Baptista con quien se había unido en 1955.

**Dr. Aníbal Durán del Campo**  
Académico de número

## REVISTA DE LA SOCIEDAD DE MEDICINA VETERINARIA DEL URUGUAY

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

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

## INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES DE TRABAJOS PARA PUBLICACIÓN

### Normas generales

Los trabajos se enviarán a la Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay, Consejo Editor de la revista Veterinaria, Cerro Largo 1895, CP11200, Montevideo, con un original y dos copias y en diskette (3.5").

La etiqueta del diskette deberá contener el apellido del primer autor, las primeras palabras del artículo y el nombre del procesador de texto utilizado. El texto será archivado en documento Word y no deberá exceder de 20 páginas en formato carta (21,6 x 27,9 cm), escrito en una sola carilla, con margen de 2,5 cm a cada lado y deberá estar escrito con caracteres de 12 puntos, con interlineado doble. Los cuadros y figuras deben ir al final del manuscrito (cada una en hoja aparte). Las figuras deben estar fuera del manuscrito hechas en Excell o Power Point. Las fotografías o impresiones serán en blanco y negro, en un máximo de 5 que serán adjuntadas al original, con leyenda en hoja aparte y numeradas al dorso indicando el borde superior derecho. Las fotografías o ilustraciones en color podrán ser publicadas pero a costo de los autores, no se aceptarán diapositivas.

Los autores solicitarán por nota aparte y con la firma de todos ellos la publicación del trabajo, designando a uno de los mismos para ser enviada la correspondencia (indicando dirección postal completa, teléfono, fax y correo electrónico), dejándose establecido que el mismo no se ha publicado ni se ha remitido a ninguna otra publicación periódica. Se aceptarán trabajos que hubieran sido publicados como resúmenes o comunicaciones cortas en congresos, simposios o jornadas, debiéndose en este caso indicarse en el pie de la primera página del artículo.

Los trabajos recibidos serán evaluados por el Consejo Editor pudiendo darle los destinos siguientes: aceptarlos, devolverlos a los autores para su adecuación o rechazarlos. El Consejo Editor los clasificará en: 1. Trabajo científico (artículo original, revisión) y 2. Trabajo de divulgación (práctica veterinaria, diagnóstico, tecnológico, conferencia). Los autores tendrán derecho a 3 revistas.

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

### 1. Trabajos científicos

Es una publicación que aporta y amplía el conocimiento o la comprensión de un problema determinado y 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 miembros de un Comité de Arbitros de la revista Veterinaria.

### 2. Trabajos de divulgación

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 Consejo Editor evaluará el trabajo y lo clasificará según su contenido en: prácticas veterinarias, diagnósticos, tecnológicos, conferencias, educación, u otro según corresponda. También podrán ser publicadas Cartas al Editor de intercambio profesional.

### Normas de redacción para Artículos Originales

Contendrán los siguientes elementos:

Título: Será lo más breve posible y conciso, reflejando exactamente lo que el trabajo contiene. Escrito en minúsculas.

Nombre de Autores: apellido, inicial del nombre<sup>1</sup>; otro/s nombres

ejemplo: Vidal, L.<sup>1</sup>; Gómez, J.<sup>2</sup>

dirección:(en pie de página): ejemplo: <sup>1</sup> Departamento de Bovinos, Facultad de Ciencias Veterinarias, Suipacha 698, Buenos Aires, Argentina, tel.: (497)3002511, e-mail: vidal@facvet.com; <sup>2</sup> Facultad de Veterinaria.

Se detallará solamente la dirección postal completa del autor responsable o correspondiente, para los demás autores solamente el nombre de la institución.

### RESUMEN

Dará una idea clara y precisa del contenido, será una versión en miniatura del artículo, conteniendo: objetivos, materiales y métodos, resultados, conclusión. No debe excederse de 200 palabras. Escrito en español en tiempo presente y en un sólo párrafo luego del encabezado del título y los autores.

El resumen con texto en inglés se denominará: Summary.

Palabras clave

El autor propondrá las palabras clave que representen al contenido del texto para una clasificación y búsqueda bibliográfica. Se permitirán hasta 5 (cinco) palabras.

Las mismas palabras en idioma inglés (Key words) serán agregadas para complementar el Summary.

### INTRODUCCIÓN

Los autores deben suministrar antecedentes suficientes sobre el tema para que el lector no deba recurrir a otras publicaciones anteriores y para que comprenda la importancia o trascendencia de la investigación que se comunica. Deben referirse al contexto en general (en el mundo, etc.) y en particular (en el país), eligiendo las informaciones más recientes y más relevantes.

Se deben dar los fundamentos científicos del estudio y definir claramente cuál es el propósito de escribir el artículo, precisando en el último párrafo los objetivos del trabajo. Escrito en tiempo presente.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Los autores deben dar suficientes detalles para que un investigador competente pueda repetir los experimentos y definir el diseño experimental.

Describir claramente los animales utilizados, su número, especie, género, raza, edad.

Describir claramente la marca, modelo y origen (ciudad y país del fabricante) de los equipos utilizados. Los reactivos, drogas o medicamentos deben describirse por su nombre genérico o químico o por marcas comerciales patentadas (que se señalarán al pie de página).

Los métodos y procedimientos deben ser detallados y bibliográficamente referenciados. Deben precisarse con claridad, tiempos, temperaturas, etc. Los métodos de los análisis estadísticos deben señalarse y citarse bibliográficamente.

## RESULTADOS

La descripción de los resultados obtenidos debe presentarse con claridad. Primeramente hacer un "pantallazo general" de los resultados experimentales y luego pueden describirse en cuadros (tablas) o figuras (gráficos, dibujos, fotografías) los datos de los experimentos. No deben presentarse datos repetitivos o demasiado extensos y detallistas.

Deben usarse medidas del sistema métrico decimal dentro de lo posible u otras medidas convencionales. Los análisis estadísticos de datos deben señalar su significación.

Debe redactarse en tiempo pasado

## DISCUSIÓN

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

Se deben dar interpretaciones que sean justificadas por los datos.

Se deben resumir y globalizar las conclusiones parciales que se obtuvieren de diferentes resultados del trabajo. No deben darse conclusiones demasiado generales.

Debe haber una coherencia entre los objetivos, los resultados y las conclusiones, pudiendo sugerirse recomendaciones.

## 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.

## Referencias Bibliográficas

En el texto: Al final de cada cita bibliográfica se colocará: el número correspondiente al autor con punto. Si existieran varias citas en el mismo párrafo se citará de la siguiente manera (ej.): (8, 10, 12-14, 22). Si es necesario mencionar un autor en el texto, se escribirá el apellido del 1er. autor entre paréntesis; si los autores fueran dos se colocarán los apellidos de ambos y entre medio el símbolo &. En todos los casos deberá citarse además el número correspondiente a la referencia bibliográfica.

En el ítem de Referencias bibliográficas: Debe hacerse especial atención al texto de las referencias bibliográficas, no se aceptarán trabajos mal referenciados. Las referencias deben colocarse en orden alfabético de autores, numerando las obras citadas y consultadas en el texto. Deberán citarse de la siguiente manera: Apellido seguido de coma y un espacio (,) y luego la(s) inicial(es) seguida(s) de un punto (.). Ej.: González, R.. Si hubieran varios autores deben separarse entre sí por un punto y 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. o el nombre completo de la revista, seguido por el volumen, el número entre paréntesis, seguido por los números de páginas precedidos por dos puntos, ejemplos: 12:44-48. ó también: 12(8):44-48. Ejemplo: González, R.; López, A. (1989) Paraqueratosis en suinos. Am.J.Vet.Res. 12(8):44-48.

En el caso de la cita de libros, se indicará Autores (Año) Título, n° de edición (salvo la 1ra.), Lugar 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, In: 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.

En la cita de comunicaciones personales: se cita el Nombre (apellido, inicial del nombre) (Año), se hace una llamada y se cita al pie de página con el texto: Comunicación personal. No citar en las referencias bibliográficas.

## Cuadros

Los cuadros deben tener un n° de identificación correlativo que figurará en el texto y contendrán un texto de título en la parte superior. Deben contener información sobre el experimento que lo autodefinen. Las referencias o símbolos de los cuadros se presentarán al pie del mismo en letra cursiva 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 y Gráficos

Las figuras o gráficos deben tener un n° 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 figura o gráfico no es original, citar la fuente (Autor y año) en pie de página.

## Fotos

Las fotografías y especialmente las microfotografías deben contener una escala de referencia. Deben tener un n° 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.

## Normas de redacción para Revisiones

Es un trabajo científico con el objetivo de efectuar una revisión o recapitulación actualizada de los conocimientos presentando una evaluación crítica de la literatura publicada según la perspectiva del autor. Este tipo de trabajo permite una mayor discrecionalidad en la presentación de la información pero debe mantener rigor científico. Deberán describirse los objetivos y el alcance que se pretende lograr. La cita de bibliografía será la misma que la de los artículos originales.