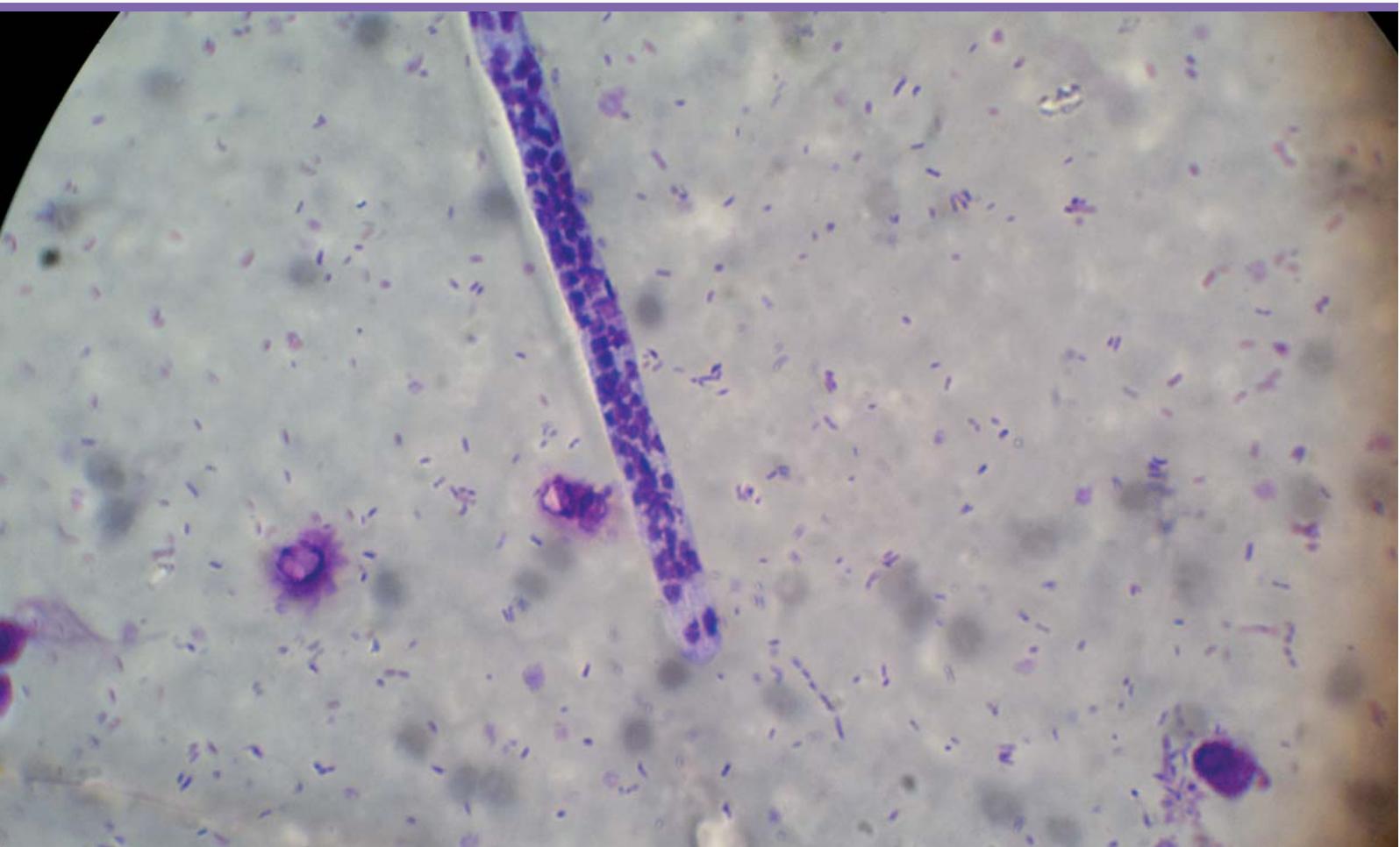


Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias

ISSN 0365514-8 Versión Impresa
ISSN 1514-2590 Versión Electrónica
ISSN 1666295-4 Versión CD-ROM

ANALECTA VETERINARIA



Publicación de la
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
Volumen 37 n° 2 año 2017



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

ANALECTA

VETERINARIA

ANALECTA VETERINARIA VOL. 37 n° 2 2017

Publicación de la
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de La Plata

Autoridades

Decano

Dr. Claudio Barbeito

Vicedecano

Dr. Miguel Petruccelli

Secretaria de Asuntos Académicos

Dra. Vanina Cambiaggi

Secretario de Posgrado

Dr. Luzbel de la Sota

Secretario de Ciencia y Técnica

Dr. Enrique Portiansky

Secretaria de Gestión de Calidad

Dra. Cecilia di Lorenzo

Secretaria de Extensión

Méd. Vet. Elena del Barrio

Secretaria de Asuntos Estudiantiles

Méd. Vet. Verano Gómez

Prosecretario de Relaciones Institucionales

Ms. Sci. Julio Copes

Coordinador Académico de Campos Experimentales

Méd. Vet. Hugo Marcantoni

ANALECTA VETERINARIA Consejo Editorial

Director

Dr. Nestor O. Stanchi
Microbiología

Editor Responsable

Dr. Claudio G. Barbeito
Histología y Embriología

Editor Asociado

Dr. Enrique L. Portiansky
Patología

Coordinador Editorial

Dr. Julio R. Idiart
Patología

Secretaría de Redacción

Dra. Mónica E. Diessler
Histología y Embriología

Méd Vet. María Mercedes Abeyá
Virología

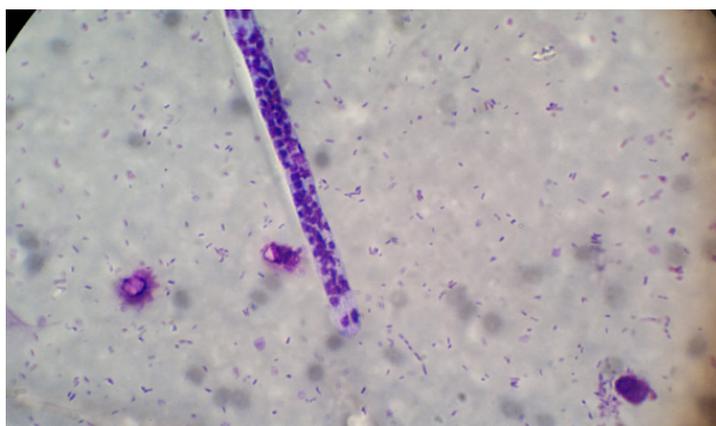


Foto de tapa: Detalle del extremo anterior de la microfilaria de *Dirofilaria* sp. Vezzani D, Moré G, Eiras DF.

ACERCA DE ANALECTA VETERINARIA

Analecta Veterinaria (Analecta vet) es una revista de publicación semestral (cubre los meses de enero/junio y julio/diciembre) y constituye el órgano oficial de comunicación científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Se reciben para su consideración trabajos que versen acerca de cualquiera de las áreas de las Ciencias Veterinarias, generados por profesionales de esta u otras Unidades Académicas, entes nacionales o de la actividad privada, escritos en español o en inglés.

Todos los trabajos publicados en ANALECTA VETERINARIA son sometidos a revisión con modalidad doble ciego por parte de expertos del área de conocimiento que no pertenecen a las instituciones de origen del trabajo recibido.

The Journal ANALECTA VETERINARIA is a biannual publication of the School of Veterinary Sciences of the National University of La Plata, Argentina. It is committed to the diffusion of scientific reports in the field of the Veterinary Sciences, generated both in this and in other institutions.

ISSN 1514-2590 Versión Electrónica
<http://www.fcv.unlp.edu.ar/analecta/analecta.html>
Registro Propiedad Intelectual 77383
Dirección postal: 60 y 118 (B1900AVW)
La Plata, Buenos Aires, ARGENTINA

Comité Científico

Dr. José I. Aguirre

Department of Physiological Sciences, College of Veterinary Medicine, University of Florida, USA

Dra. María Barranteguy

Instituto de Virología, Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVYA), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina

Ph.D. Julián A. Bartolomé

Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa (UNLPam), Argentina

Dr. Carlos Campero

Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria, Argentina

Dr. Rodolfo Cantet

Mejoramiento Genético Animal, Departamento de Producción Animal, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires (UBA), Argentina

Ph.D. Eduardo R. Cobo

Production Animal Health, Veterinary Medicine, University of Calgary, Canada

Dr. Guillermo M. Denegri

Laboratorio de Zoonosis Parasitarias, Instituto de Investigaciones en Producción, Salud y Ambiente (IIPROSAM), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMDP); Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

Dr. Eduardo J. Gimeno

Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

Dra. Nélide V. Gómez

Clinica Médica de Pequeños Animales, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires (UBA), Argentina

Ph.D. Alberto A. Guglielmo

Laboratorio de Parasitología, Departamento de Sanidad Animal, Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina

Dr. Carlos Lanusse

Fisiología y Farmacología Veterinaria, Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA), Argentina

Dr. Antonio Javier Masot Gómez-Landero

Anatomía y Anatomía Patológica Comparada, Departamento de Medicina Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Extremadura, España

Dr. Gastón Moré

Laboratorio de Inmunoparasitología (LAINPA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (UNLP); Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

Dr. Dadín Prando Moore

Patología Veterinaria, Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA); Unidad Integrada Balcarce, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMDP); Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

Me. Eduardo V. Moras

Cátedra de Enfermedades Infecciosas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires (UBA), Argentina

Dr. Hugo H. Ortega

Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral (UNL); Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

Ph.D. Luis M. Ortega Mora

Grupo SALUVET, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, España

Ph.D. Pablo E. Piñeyro

Veterinary Diagnostic & Production Animal Medicine, Veterinary Diagnostic Laboratory, College of Veterinary Medicine, Iowa State University, USA

Dr. Martí Pumarola i Batle

Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Barcelona, España

Dr. Manuel Quezada Orellana

Departamento de Patología y Medicina Preventiva, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción, Chile

Dr. Francisco Reynaldi

Micología Médica e Industrial, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (UNLP); Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

Dr. Franklin Riet-Correa

Plataforma de Salud Animal, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), INIA-La Estanzuela, Uruguay

Dr. Luis E. Samartino

Instituto de Patobiología, Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVYA), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA); Microbiología, Carrera de Veterinaria, Universidad del Salvador (USAL), Argentina

Dra. Analía I. Seoane

Instituto de Genética Veterinaria (IGEvet), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (UNLP); Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

Dra. Irma E. Sommerfelt

Salud Pública, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires (UBA), Argentina

Ph.D. José M. Verdes García

Departamento de Patología, Área Patología y Departamento de Biología Molecular y Celular, Área Biofísica, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay

Equipo técnico

Revisora del idioma inglés: PhD. Magdalena Rambeaud

Diseño: Dr. Nestor O. Stanchi

Diseño multimedial: Lic. Santiago Ciancaglini

ANALECTA

Pronunciación: «a-n&l-'ek-t&

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

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

Costa EF, Portiansky EL, Massone AR, Marino FP, Idiart JR, Gimeno EJ. 1998. Alteraciones en la diferenciación y proliferación celular cutánea en bovinos, inducidas por hipervitaminosis D de origen vegetal. *Analecta Veterinaria* 18(1/2):7-13.

ANALECTA VETERINARIA está indizada en el Índice Latinoamericano de Revistas Científicas

LATINDEX (www.latindex.unam.mx),

Ulrich's International Periodicals Directory

(www.ulrichsweb.com)

Zoological Records

(www.biosis.org.uk/products_services/zrss.html)

BIOSIS (<http://www.biosis.org>)

Infocyt (<http://www.redhucyt.oas.org/infocyt/>)

Catálogo de LATINDEX (Sistema Regional de Información en Línea para Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal), en la Plataforma Open Access de Revistas Científicas Electrónicas Españolas y Latinoamericanas del CSIC (<http://bibliotecas.csic.es>) y en el Directory of Open Access Journals (<http://doaj.org>).

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

El uso de nombres comerciales tiene como único objetivo facilitar la identificación de los productos mencionados y no implica el respaldo directo o indirecto de los Ministerios de la Nación Argentina ni de los países respectivos de donde provengan los trabajos. Tampoco se garantizan ni respaldan los productos promocionados en los avisos de publicidad.

Licencia



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

Acceso Electrónico a ANALECTA VETERINARIA

La revista puede ser recuperada gratuitamente en internet en formato pdf en la dirección electrónica <http://www.fcv.unlp.edu.ar> o en el repositorio institucional SeDiCi UNLP (<http://sedici.unlp.edu.ar>).

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

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

ANALECTA VETERINARIA ha sido editada por la Facultad de Ciencias Veterinarias anteriormente con el nombre de **Revista de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de La Plata**, desde 1905, **Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria**, desde desde 1922, luego como **Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias** desde 1959 y como **Analecta Veterinaria** desde 1969 cumpliendo más de 100 años.

Actualmente se publica sólo en su versión *on line* (ISSN 1514-2590).

Contacto

Para cualquier comunicación oficial dirigirse al Sr. Director de la Revista Analecta Veterinaria a la dirección analecta@fcv.unlp.edu.ar

Evaluadores de trabajos de ANALECTA VETERINARIA

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

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

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

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

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

ANALECTA VETERINARIA Vol 37 n° 1, 2017

Nota Editorial/Editorial note

Proceso de consolidación y jerarquización de la calidad editorial
de ANALECTA VETERINARIA

V

Trabajos de investigación/Research works

Evaluación de la eficacia de algunos fármacos para el tratamiento de la hepatozoonosis canina

Evaluation of the effectiveness of some drugs for the treatment of canine hepatozoonosis

7

Diversidad de haplotipos del complejo principal de histocompatibilidad en equinos de la raza Árabe de la República Argentina

Major histocompatibility complex haplotype diversity in Arab horses from Argentina

14

Determinación de anticuerpos contra patógenos virales y bacterianos seleccionados en la población de cerdos silvestres (*Sus scrofa*) de la Reserva Natural Bahía Samborombón, Argentina

*Determination of antibodies against selected viral and bacterial pathogens in the feral pigs (*Sus scrofa*) population of the Bahía Samborombón Natural Reserve, Argentina*

21

Microscopía virtual: una nueva herramienta tecnológica para la enseñanza de la histología y la patología

Virtual microscopy: a new technological tool for teaching histology and pathology

28

Trabajos de revisión /Reviews

Evaluación del descarte en cerdas: causas, registros reproductivos e inspección en planta de faena

Evaluation of sow removal: culling reasons, reproductive data and slaughterhouse inspection

33

Histoplasmosis en caninos y felinos: signos clínicos, métodos de diagnóstico y tratamiento

Canine and feline histoplasmosis: clinical signs, diagnostic methods and treatment

45

Informes técnicos/Technical reports

Uso de la técnica de micromatrices de tejido en histología veterinaria

Use of tissue microarrays in veterinary histology

59

Seroprevalencia de infección por el virus de leucosis bovina durante 2015 en rodeos de cría de la Zona Deprimida del Río Salado, provincia de Buenos Aires, Argentina

Seroprevalence of bovine leukosis virus infection during 2015 in breeding herds from Zona Deprimida del Río Salado, Province of Buenos Aires, Argentina

65

Instrucciones a los autores

69

ANALECTA VETERINARIA Vol 37 nº 2, 2017

Trabajos de investigación/Research works

Evidencias sobre una nueva especie del género *Dirofilaria* en perros de Neuquén, Argentina

*Evidences on a new species of the genus *Dirofilaria* in dogs from Neuquén, Argentina.*

Vezzani D, Moré G, Eiras DF.

7

Safety and ef.cacy of a combined paste formulation of a botanical extract of the latex of *Croton lechleri* (SB-300, Neonorm foal™) with probiotics for the treatment of watery diarrhea in nursing foals

Determinación de la seguridad y eficacia de una formulación en pasta que combina un extracto botánico del látex de *Croton lechleri* (SB-300, Neonorm foal®) con probióticos para el tratamiento de diarrea acuosa en potrillos no destetados.

McAuliffe SB, Deferrari MG, Ambrosoni C, Tejera A, Berrotarán H, Echaniz B, Cortés JM.

11

DetECCIÓN DE *Staphylococcus pseudintermedius* resistentes a meticilina y a otros antimicrobianos de uso habitual en la clínica en piodermias caninas

*Detection of *Staphylococcus pseudintermedius* resistant to methicillin and to other antimicrobials commonly used in canine pyodermias.*

Giacoboni GI, Vinocur F, Fauret N, Grandinetti J, Manzuc P.

19

Prevalencia de anticuerpos contra virus de influenza equina en equinos deportivos de la República Argentina durante 2015 y 2016

Prevalence of antibodies against equine influenza virus in sport horses from Argentina during 2015 and 2016.

Durante E, Marcos A, Ayerbe M, Chiricosta A, Segato L, Donato ME, Capellino F, D'Alessio F, Piskorz A, Carballo Longo M.

25

Comunicaciones cortas/Short Communications

Efecto antimicrobiano de la combinación de cloxacilina con aceite esencial de *Melaleuca armillaris* frente a *Staphylococcus aureus*

*Antimicrobial effect of combinations of cloxacillin and essential oil of *Melaleuca armillaris* against *Staphylococcus aureus*.*

Buldain D, Buchamer A, Marchetti L, Aliverti F, Borja C, Mestorino N.

33

Trabajos de revisión /Reviews

Carbunco. Prevención de la enfermedad

Anthrax. Prevention of the disease.

Bernagozzi, JA, Barragán JH, Anselmino F, Bernagozzi ME.

40

Cervezas elaboradas artesanalmente: análisis de la normativa técnico-sanitaria vigente.

Handcrafted beer: analysis of applicable sanitary technical regulations.

Bigeon G, Benítez F, Pellicer K, Copes J.

54

Informes técnicos/Technical reports

Morfología de estructuras parasitarias de *Rangelia vitalii* en muestras de perros naturalmente infectados

Morphology of Rangelia vitalii parasitic stages in samples from naturally infected dogs.

Sánchez RO, Moré G, Eiras D.

60

Instrucciones para los autores

66

Evidencias sobre una nueva especie del género *Dirofilaria* en perros de Neuquén, Argentina

Evidences on a new species of the genus *Dirofilaria* in dogs from Neuquén, Argentina

Vezzani D^{1,2*}, Moré G^{2,3}, Eiras DF^{3,4}

Instituto Multidisciplinario sobre Ecosistemas y Desarrollo Sustentable, Facultad de Ciencias Exactas, UNICEN, Tandil; 2. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET); 3. Laboratorio de Inmunoparasitología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional La Plata 4. Laboratorio DIAP, Banfield, provincia de Buenos Aires.

*Correo electrónico del autor: dvezzani@gmail.com

Resumen: La dirofilariasis canina en Argentina se extiende desde la provincia de Buenos Aires hacia el norte. En todos los casos documentados, el agente etiológico es el gusano del corazón del perro, *Dirofilaria immitis*, única especie del género identificada como causal de infecciones naturales autóctonas en el país. En este estudio, se presentan evidencias morfológicas, serológicas y moleculares de la infección de otra especie del género *Dirofilaria* en 8 perros de la ciudad de Neuquén, en el extremo norte de la Patagonia. Las microfilarias observadas tuvieron una media de 370 μm de largo y 7,1 μm de ancho. Las secuencias obtenidas mostraron homologías inferiores al 95 % con otras secuencias de filáridos reportadas en el GenBank.

Palabras clave: filáridos, perros, Patagonia, Argentina, dirofilariasis

Abstract: Canine dirofilariasis in Argentina extends from Buenos Aires province to the North. All documented cases were due to the dog heartworm, *Dirofilaria immitis*, the unique species recorded in natural infected dogs in the country. In this study, we present morphologic, serologic and molecular evidences of the infection with another *Dirofilaria* species in 8 dogs from Neuquén city, in the northern extreme of Patagonia. The observed microfilariae had a mean of 370 μm long and 7.1 μm wide. The sequences obtained showed homologies lower than 95% with other filarid sequences reported in the Genbank.

Key words: filarid, dogs, Patagonia, Argentina, dirofilariasis

Introducción

La dirofilariasis canina es una enfermedad de gran importancia veterinaria a nivel mundial causada por nematodos del género *Dirofilaria* Railliet & Henry, 1911 (Orden Spirurida, Familia Onchocercidae). Los principales agentes etiológicos son *Dirofilaria immitis* Leidy, 1856, en regiones templadas y tropicales de todo el mundo, y *Dirofilaria repens* Railliet & Henry, 1911, en Europa, África y Asia (Simón et al., 2012; Dantes-Torres & Otranto, 2013). Actualmente el género está compuesto por 27 especies válidas y 15 cuestionables (Canestri Trotti et al., 1997; Dantes-Torres & Otranto, 2013). En el continente americano, *D. immitis* es el responsable indiscutido tanto de la dirofilariasis canina como de la dirofilariasis pulmonar humana. Sin embargo, al menos otras 11 especies están bien documentadas en fauna silvestre del continente: *D. freitasi* Machado de Mendonca, 1949, *D. lutrae* Orihel & Beaver, 1974, *D. cancrivori* Eberhard, 1978, *D. acutiuscula* Molin, 1858, *D. macrodemos* Eberhard, 1978, *D. panamensis* Eberhard, 1978, *D. subdermata* Monnig, 1924, *D. tenuis* Chandler, 1942, *D. ursi* Yamaguti, 1941, *D. striata* Molin, 1858, y *D. spectans* Freitas y Lent, 1949 (Canestri Trotti et al., 1997; Vicente et al., 1997).

En Argentina, la dirofilariasis canina por *D. immitis* se extiende en 11 provincias: Salta, Formosa, Chaco, Misiones, Corrientes, Entre Ríos, Santa Fe, Santiago del Estero, Córdoba, Mendoza y Buenos Aires (Vezzani et al., 2006; Vezzani & Eiras, 2016). Si bien los registros de casos señalan a la ciudad de La Plata y sus alrededores como el límite sur de distribución del parásito en Sudamérica, los modelos teóricos basados principalmente en la temperatura sugieren que existen las condiciones climáticas adecuadas para su transmisión en el norte de la Patagonia (Cuervo et al., 2015; Vezzani & Carbajo, 2006). Hasta el presente ninguna otra especie del género ha sido confirmada en nuestro país en infecciones naturales autóctonas. El objetivo de este trabajo es reportar los hallazgos microscópicos y moleculares acerca de una especie del género *Dirofilaria*, distinta a *D. immitis*, en perros de la ciudad de Neuquén.

Materiales y métodos

Se analizaron muestras de sangre pertenecientes a 8 perros microfilarémicos que asistieron a consulta veterinaria durante 2011-2013 en la ciudad de Neuquén. Esta ciudad se encuentra ubicada en 38°57'06"S 68°04'28"O, aproximadamente 500 km al sur del límite conocido de distribución de *D. immitis*. Los pacientes fueron identificados como positivos para microfilarias durante la observación de la interfase del capilar microhematocrito en la rutina de laboratorio. Las muestras fueron recolectadas en anticoagulante

EDTA, conservadas a 4 °C y remitidas al Laboratorio de Inmunoparasitología de la FCV-UNLP para su caracterización.

Se realizaron mediciones morfológicas en microfilarias (10 larvas por muestra) recuperadas del test de Knott modificado, de acuerdo con lo indicado por Soulsby (1987). La sangre remanente se conservó a -20 °C para la extracción de ADN y realización de pruebas moleculares. Además, se recolectaron muestras de sangre sin anticoagulante para la obtención de suero y realización de pruebas serológicas rápidas para la detección de antígeno específico de las hembras adultas de *D. immitis* (FASTest® DIRO, Megacor, Austria).

El ADN de las muestras de sangre entera se extrajo utilizando el kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante, con el agregado de 20 µl de proteinasa K (20mg/ml; Promega, EE.UU) al buffer de lisis nuclear, incubando a 55 °C *overnight*. Cada rutina incluyó un tubo sin muestra, pero conteniendo todas las soluciones del kit, como control de extracción.

Se realizaron dos técnicas de PCR con *targets* diferentes. En la primera se utilizaron los cebadores DIDR-F1 y DIDR-R1 con los que se amplifican fragmentos de las subunidades ribosomales 5.8S-ITS2-28S de diferentes filáridos (Rishniw et al., 2006), denominados de aquí en adelante como Panfilaria. El protocolo de amplificación fue 94 °C durante 4 min y luego 35 ciclos de: 94 °C por 30 s, 60 °C por 30 s y 72 °C por 45 s. Por último, la extensión final se realizó a 72 °C durante 7 min. En la segunda técnica se utilizaron los cebadores COIF y COIR, que amplifican un fragmento del gen de subunidad I de la citocromo-oxidasa mitocondrial (COI). La amplificación en este caso se realizó en las siguientes condiciones: 94 °C durante 4 min y luego 40 ciclos de: 94 °C durante 45 s, 54 °C durante 45 s y 72 °C durante 45 s. La extensión final se realizó a 72 °C durante 7 min (Casiraghi et al., 2001, 2006). Todas las rutinas de PCR se llevaron a cabo con controles positivos (*D. immitis*), control de extracción (como negativo) y una muestra sin ADN (NTC= *no template control*).

Los productos de amplificación fueron revelados en geles de agarosa al 1,5% y fueron observados en el transiluminador de luz azul. La técnica Panfilaria se caracteriza por la obtención de fragmentos de diferente longitud de acuerdo con la especie de filárido hallado (Rishniw et al., 2006). En el protocolo COI se analiza la presencia de una banda de aproximadamente 650 pares de bases (pb) para diferentes filáridos, diferenciables mediante RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) o secuenciación (Casiraghi et al., 2001, 2006).

Los productos de amplificación de ambas técnicas fueron purificados con el *kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, EE.UU) y remitidos para secuenciación al Instituto de Biotecnología de la Unidad de Genómica (Estación Experimental INTA-Castelar). Las secuencias fueron alineadas y analizadas mediante el software GENEIOUS (Versión R9) y comparadas con otras disponibles en el GenBank mediante la herramienta BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) disponible en línea. (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Resultados

Los 8 perros microfilarémicos resultaron negativos para *D. immitis* en los estudios serológicos. En las mediciones de las microfilarias se registró una media de 370 μm de largo (mínimo: 339, máximo: 411) y 7,1 μm de ancho, con el extremo anterior redondeado y el posterior ahusado. En los extendidos de sangre coloreados se observó que las primeras células somáticas se encontraban muy próximas al extremo anterior de las microfilarias (Fig. 1), rasgo de similitud con *D. repens* pero no con *D. immitis*, en las que las primeras células aparecen un poco más atrás.

Todas las muestras fueron positivas para la detección de ADN de filáridos mediante PCR en ambas técnicas utilizadas. Para la PCR Panfilaria se obser-

varon fragmentos de ~500 pb, valor intermedio entre los esperados para *D. immitis* (542 pb) y *D. repens* (484 pb). Se obtuvo un total de 5 secuencias de PCR Panfilaria y 2 de COI. Las secuencias correspondieron a muestras de 5 animales y cada grupo de secuencias de cada gen presentó una homología mayor al 99%. Sin embargo, todas las secuencias mostraron homologías inferiores al 95% con otras secuencias de filáridos reportadas en el GenBank. Las secuencias de la PCR Panfilaria evidenciaron una homología del 91% con secuencias obtenidas de *D. repens* en Túnez (KR676387) y de *D. immitis* en Portugal (LN626260); ambas secuencias corresponden a estudios no publicados. Por otra parte, las secuencias obtenidas de la PCR de COI mostraron un 94% de homología con la secuencia de *Dirofilaria* sp. "hongkongensis" (KX265050), 93% con *D. repens* de un caso humano en República Checa (KR998259) y 91% con *D. immitis* obtenida de mosquitos en España (LC107816). Las secuencias obtenidas para Panfilaria y COI fueron depositadas en el GenBank como *Dirofilaria* sp., con los números de acceso KY085962 y KY085963, respectivamente.

Discusión y conclusiones

La dirofilariasis canina es una enfermedad totalmente desconocida en la Patagonia. La presente comunicación es, sin duda, la primera sobre una infección canina por *Dirofilaria* en la región. También es el primer

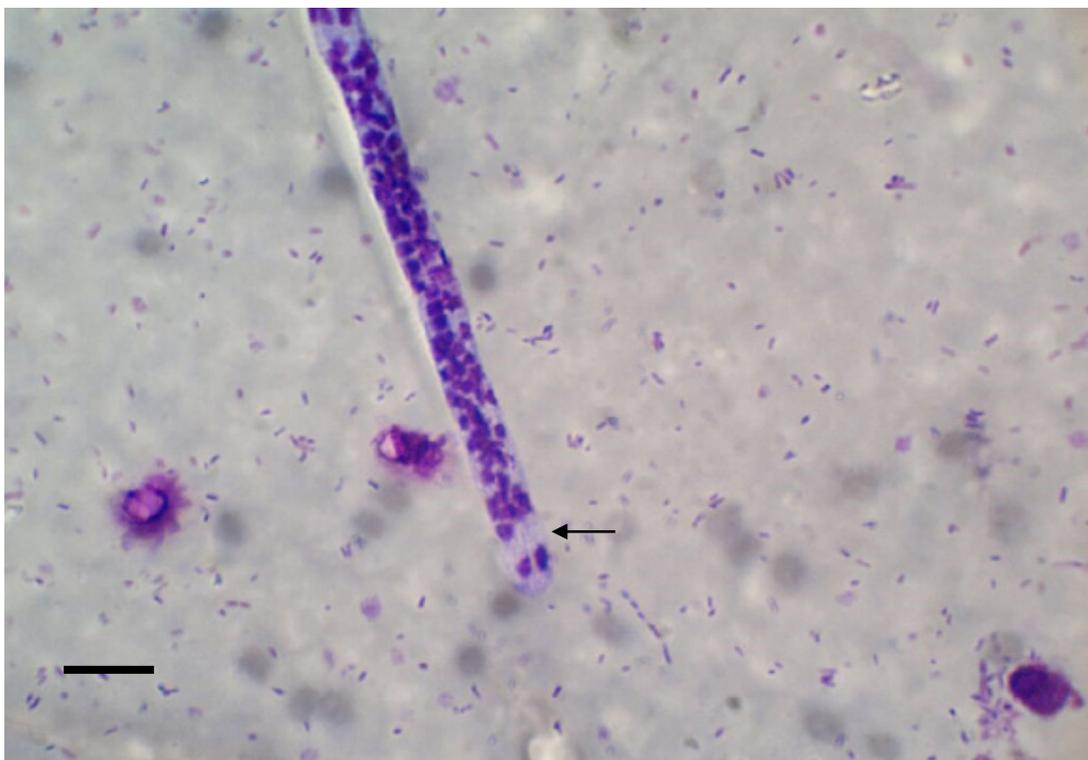


Figura 1. Detalle del extremo anterior de la microfilaria de *Dirofilaria* sp. hallada en perros de Neuquén. Extendido sanguíneo coloreado con May-Grünwald Giemsa (1000x). La flecha indica las primeras células somáticas cercanas al extremo anterior. Barra: 10 μm .

estudio que demuestra, mediante distintas técnicas, la presencia de una especie del género distinta a *D. immitis* en nuestro país. Las mediciones morfológicas de las microfilarias encontradas registraron valores muy lejanos a *D. immitis* (301,7 µm de largo y 6,3 µm de ancho; Magnis et al., 2013). La longitud media de 370 µm observada es muy superior a la de las microfilarias de las especies más comunes descritas en caninos, con la excepción de *Dipetalonema grassi* Noe, 1907, la cual tiene una media de 570 µm (Soulsby, 1987). La homología de las secuencias obtenidas indicaría que las microfilarias halladas se corresponden con una misma especie en todos los casos de Neuquén y que no se corresponderían con *D. immitis* ni con *D. repens*. Los resultados serológicos negativos obtenidos en las 8 muestras microfilarémicas, junto con las secuenciaciones obtenidas, indican claramente que la especie de filárido presente en los perros estudiados no es *D. immitis*. Por otra parte, dentro de la baja homología de secuencias mediante BLAST, detectamos una de las mayores homologías (93 %) con secuencias de *D. repens*, aunque esto no resulta suficiente ya que la homología esperada para identificación de especies debe superar el 98-99 %.

Recientemente, López et al. (2012) reportaron por primera vez una infección canina por *Dirofilaria* en Santiago de Chile. Los autores describen una potencial nueva especie, la cual es cercana en aspectos morfológicos y moleculares, aunque distinta, a *D. repens*. Si bien nuevas especies son sugeridas con cierta frecuencia, considerando el actual número de especies dudosas dentro del género, cualquier sugerencia de una nueva especie que no incluya una descripción genética y morfológica completa podría ser prematura (Dantes-Torres & Otranto, 2013). En este sentido, más estudios son necesarios para avanzar sobre la identificación del filárido que hemos hallado en el extremo norte de nuestra Patagonia, el cual podría, o no, ser el mismo descrito recientemente en Chile.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Andrea Varni del Laboratorio Veterinario LAVAC, San Martín 2275, Ciudad de Neuquén, Argentina, por la provisión de las muestras pertenecientes a los hallazgos descritos en este trabajo. A Belén Craviotto y Gimena Rudchenco por la colaboración técnica.

Conflicto de intereses

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

Bibliografía

- Canestri Trotti G, Pampiglione S, Rivasi F. 1997. The species of the genus *Dirofilaria* Railliet & Henry, 1911. *Parassitologia*. 39(4):369-374.
- Casiraghi M, Anderson T, Bandi C, Bazzocchi C, Genchi C. 2001. A phylogenetic analysis of filarial nematodes: comparison with the phylogeny of *Wolbachia* endosymbionts. *Parasitology*. 122:93-103.
- Casiraghi M, Bazzocchi C, Mortarino M, Ottina E, Genchi C. 2006. A simple molecular method for discriminating common filarial nematodes of dogs (*Canis familiaris*). *Veterinary Parasitology*. 141:368-372. doi:10.1016/j.vetpar.2006.06.006.
- Cuervo PF, Rinaldi L, Cringoli G. 2015. Modeling the extrinsic incubation of *Dirofilaria immitis* in South America based on monthly and continuous climatic data. *Veterinary Parasitology*. 209:70-75. doi:10.1016/j.vetpar.2015.02.010.
- Dantes-Torres F, Otranto D. 2013. *Dirofilaria immitis* in the Americas: a more virulent *Dirofilaria immitis*? *Parasites & Vectors*. 6:288. doi: 10.1186/1756-3305-6-288.
- López J, Valiente-Echeverría F, Carrasco M, Mercado R, Abarca K. 2012. Morphological and molecular identification of canine filariae in a semi-rural district of the metropolitan region in Chile. *Revista Chilena de Infectología*. 29:248-289. doi: 10.4067/S0716-10182012000300006.
- Magnis J, Lorentz S, Guardone L, Grimm F, Magi M, Naucke TJ, Deplazes P. 2013. Morphometric analyses of canine blood microfilariae isolated by the Knott's test enables *Dirofilaria immitis* and *D. repens* species-specific and *Acanthocheilonema* (syn. *Dipetalonema*) genus-specific diagnosis. *Parasites & Vectors*. 6:48. doi: 10.1186/1756-3305-6-48.
- Rishniw M, Barr SC, Simpson KW, Frongillo MF, Franz M, Alpizar JLD. 2006. Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. *Veterinary Parasitology*. 135:305-314. doi:10.1016/j.vetpar.2005.10.013.
- Simón F, Siles-Lucal M, Morchón R, González-Miguel J, Mellado I, Carretón E, Montoya-Alonso JA. 2012. Human and animal dirofilariasis: the emergence of a zoonotic mosaic. *Clinical Microbiology Reviews*. 25:507-543. doi: 10.1128/CMR.00012-12.
- Soulsby E. 1987. *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*. 7ª Ed. México DF, Nueva Interamericana.
- Vezzani D, Carbajo AE. 2006. Spatial and temporal transmission risk of *Dirofilaria immitis* in Argentina. *International Journal for Parasitology*. 26:1463-1472. doi:10.1016/j.ijpara.2006.08.012.
- Vezzani D, Eiras DF, Wisnivesky C. 2006. *Dirofilaria immitis* in Argentina: Historical review and first report of *Dirofilaria immitis* in a natural mosquito population. *Veterinary Parasitology*. 136:259-273. doi:10.1016/j.vetpar.2005.10.026.
- Vezzani D, Eiras F. Actualización sobre dirofilariasis en Argentina y el contexto en América. En: Berón CM, Campos RE, Gleiser RM, Díaz-Nieto LM, Salomón OD, Schweigmann N. 2016. *Investigaciones sobre mosquitos en Argentina*. Mar del Plata, Universidad Nacional de Mar del Plata. pp. 192-200.
- Vicente JJ, Rodrigues HO, Gomes DC, Pinto RM. 1997. *Nematóides do Brasil*. Parte V: nematóides de mamíferos. *Revista Brasileira de Zoologia*. 14(Suppl 1):1-452.

Safety and efficacy of a combined paste formulation of a botanical extract of the latex of *Croton lechleri* (SB-300, Neonorm foal™) with probiotics for the treatment of watery diarrhea in nursing foals

Determinación de la seguridad y eficacia de una formulación en pasta que combina un extracto botánico del látex de *Croton lechleri* (SB-300, Neonorm foal®) con probióticos para el tratamiento de diarrea acuosa en potrillos no destetados

McAuliffe SB^{1*}, Deferrari MG², Ambrosoni C², Tejera A³, Berrotarán H⁴, Echaniz B⁵, Cortés JM⁶

¹Dreamland Farm, Kentucky, USA; ²Independent professional; ³Haras De La Pomme, San Antonio de Areco; ⁴Haras La Quebrada, Pilar; ⁵Haras Carampangue, San Antonio de Areco; ⁶Haras Abolengo, San Isidro.

*Author's e-mail: mcauliffesiobhan@gmail.com

Abstract: Diarrhea is a common disorder in preweaned foals, and there are no antisecretory anti-diarrheals currently available. The objective of this study was to evaluate the safety and efficacy of an enteric-coated paste formulation of a standardized botanical extract of the latex of *Croton lechleri* (SB-300) for the treatment of watery diarrhea in foals. This was a randomized blinded multisite, safety and efficacy pilot study of the formulation in client-owned foals with watery diarrhea. Sixty-one foals under 16 weeks of age with watery diarrhea were randomly divided into two treatment groups and one placebo group, approximately 20 foals each. Each foal received either placebo or investigational product/probiotic combination, four times daily. No significant safety issues were noted but the transient production of hard feces that was noticed in foals that continued therapy beyond clinical improvement. A treatment responder was any foal who developed formed stool (fecal score <3), and maintained formed stool for a minimum of 16 consecutive hours within a 24 h period. Statistically significant differences in treatment response were demonstrated at a number of time points between the investigational product treatment and placebo groups. We conclude that a paste formulation of SB-300, a standardized botanical extract of the latex of *Croton lechleri*, when combined with probiotics, is effective in the treatment of watery diarrhea in foals less than 16 weeks of age and warrants further investigation without the addition of probiotics.

Key words: diarrhea, foal, *Croton lechleri*, SB-300, chloride channels

Resumen: La diarrea es un desorden común en potrillos lactantes, y no se dispone de anti-diarreicos antisecretorios específicos. El objetivo del estudio fue evaluar la seguridad y eficacia de una formulación en pasta con cubierta entérica del extracto botánico estandarizado del látex de *Croton lechleri* (SB-300, producto en investigación), para el tratamiento de diarrea acuosa en potrillos. Fue un estudio piloto, ciego, aleatorizado, realizado en distintos sitios, en potrillos de clientes particulares con diarrea acuosa. Sesenta y un potrillos con diarrea acuosa menores a 16 semanas de edad fueron divididos aleatoriamente en dos grupos de tratamiento y uno de placebo, aproximadamente 20 en cada grupo. Cada potrillo recibió placebo o la combinación del producto en investigación y probiótico cuatro veces al día. No se presentaron problemas de seguridad significativos, pero se observó la producción transitoria de heces duras en los que continuaron la terapia luego de la resolución de la diarrea. La respuesta al tratamiento fue considerada en aquellos potrillos que desarrollaron heces formadas (score fecal <3) y mantuvieron las heces formadas durante un mínimo de 16 h consecutivas dentro de un período de 24 h. Se demostraron diferencias estadísticamente significativas en la respuesta al tratamiento en distintos tiempos entre los grupos que recibieron el producto y los que recibieron placebo. La conclusión fue que la formulación en pasta de (SB-300), un extracto botánico estandarizado del látex de *Croton lechleri*, combinado con probióticos, es efectivo para el tratamiento de diarrea acuosa en potrillos menores de 16 semanas de edad y requiere investigaciones complementarias sin la adición del probiótico.

Palabras clave: diarrea, potrillo, *Croton lechleri*, SB 300, canales de cloro

Introduction

Diarrhea in foals is very common and there are many causative agents (viral, bacterial, protozoa, parasites, drug or dietary associated, toxins) that manifest with clinical signs of watery diarrhea (Atherton *et al.*, 2009a, 2009b; Lester, 2001; Wohlfender *et al.*, 2009). An intestinal insult (virus, bacteria, toxin) results in stimulation of intracellular cyclic adenosine monophosphate (cAMP), cyclic guanosine monophosphate (cGMP), and cytosolic calcium and/or protein kinases, which in turn cause an increase in chloride secretion through activation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) chloride channel located on the apical membrane of enterocytes (Barrett & Keely, 2000) (Figure 1). Other apical channels such as calcium-activated chloride channels (CaCCs) and type-2 chloride channels also produce intestinal chloride secretion. CaCCs appear to play a role in the complex etiology of secretory diarrhea caused by rotavirus (Lorrot & Vasseur, 2007). Activation of the chloride channels and resultant increased secretion of chloride into the intestinal lumen results in osmotic movement of water into the lumen. This increase in intestinal water overwhelms the absorptive capacity of the small and large intestine with resultant diarrhea (Cottreau *et al.*, 2012).

Latex of the *Croton lechleri* tree, (Dragon's blood), which is found in the western Amazonian region

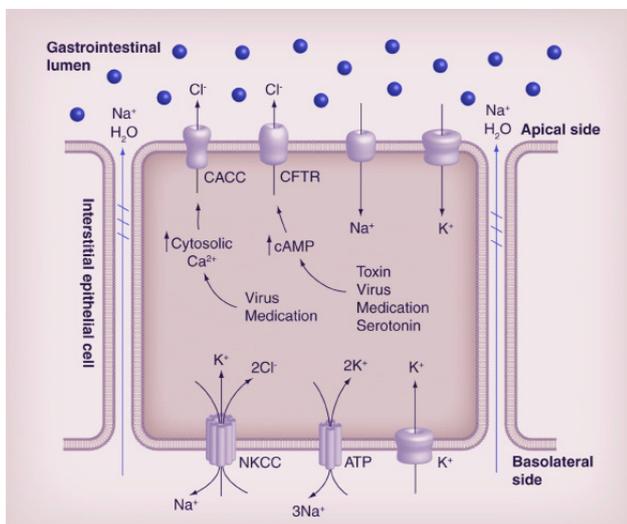


Figure 1. Mechanisms involved in intestinal epithelial cell chloride secretion. SB-300, a botanical extract of *Croton lechleri* (blue circles) binds to the apical surface of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and the calcium-activated chloride channels, blocking secretion of chloride into the intestinal lumen. Ca²⁺: calcium; CACC: calcium-activated chloride channels; cAMP: cyclic adenosine monophosphate; CFTR: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; Cl⁻: chloride; H₂O: water; K⁺: potassium; Na⁺: sodium; NKCC: sodium-potassium-chloride-cotransporter.

of South America (Jones, 2003), has been used by indigenous tribes as a remedy for diarrhea for many years (Mark *et al.*, 2000). Botanical extracts of this latex have been shown *in vitro* to be effective inhibitors of both CFTR and CaCCs channels (Fisher *et al.*, 2004). This mode of action suggests that it may be an aid in reducing the water content of feces during episodes of secretory diarrhea.

Specific treatments for diarrhea in foals are aimed at causative agents and include the administration of antimicrobials; while supportive care may include fluid therapy and anti-inflammatories combined with antidiarrheal products. Current antidiarrheal treatments have a variety of actions including adsorbents, probiotics and toxin binders.

Bismuth subsalicylate has been shown to have some antisecretory effects but the exact mode of action is unknown (DuPont, 1987; Ericsson *et al.*, 1990). Currently there are no products available for foals with specific antisecretory properties to normalize the intestinal secretion of chloride.

The rationale for this study was that if intestinal secretion of chloride in response to an insult can be controlled or normalized, then the feces produced would have a lower water content which would in turn aid in avoiding diarrhea associated dehydration and secondary complications associated with it.

Materials and methods

This was a randomized, blinded, multisite, safety and efficacy pilot study of enteric-coated SB-300 paste in client-owned foals with active watery diarrhea. This study was performed in the province of Buenos Aires, Argentina, during the 2015 breeding season. Five sites were initiated. Site and treatment by site interaction terms were included in the models.

Foals

Following identification of potential participants and the signing of an informed consent form, screening assessments were performed to determine eligibility for enrollment into the study. Inclusion criteria were: male or female foals of any breed between birth and 16 weeks of age with a baseline fecal score of 3 or 4 (Table 1). Foals of foal heat diarrhea age (6-15 days) were only considered for enrollment if they showed signs of complication of the foal heat diarrhea (fever, absence of nursing or other clinical signs such as dehydration). Foals were excluded if they were suffering from nongastrointestinal disease or injury, fractious, moribund, >16 weeks of age, weaned, orphaned, treated with oral antidiarrheals within 7 days of the first dose administration or had a fecal score of <3 or >4.

Following enrollment foals were randomly

Table 1. Fecal score. Foals with a fecal score of 3 or 4 were eligible for enrollment. Foals with a fecal score of 1 or 2 were considered to have insufficient diarrhea for enrollment and those with a grade 5 were excluded due to the possibility of hemorrhagic enterocolitis.

Fecal description	Score
Well-formed feces	1
Soft or very soft, moist (cow patty consistency)	2
Watery, liquid feces with some particulate matter either evident adhered to the tail or perineum or upon the surface of the bedding	3
Severe watery diarrhea with no particulate matter visible or no diarrhea seen but watery staining of the tail, perineum or walls evident.	4
Hemorrhagic diarrhea	5

divided into one of three groups. A randomization schedule was generated using SAS proc plan (SAS for Windows, version 9.3 or higher, Cary, NC). Medical history was obtained and a complete physical examination was performed on all eligible foals. Baseline blood work and fecal analyses were performed. Blood work consisted of white blood cell differential percentages and absolute counts, hematocrit and a serum biochemistry profile (albumin, alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST), albumin/globulin ratio, calcium, chloride, creatinine, direct bilirubin, gamma glutamyltransferase (GGT), globulin, glucose, iron, potassium, sodium, total bilirubin, total protein, triglycerides, urea nitrogen, serum amyloid A and plasma fibrinogen.

Fecal collection for analyses was conducted at baseline only, except for *Salmonella* spp. cultures which were conducted at baseline, 24 and 48 hours (+/- 6) hours post t=0 (time of first treatment administration). Rotavirus antigen test and clostridial antigen/toxin ELISA tests were also conducted. Fecal aerobic cultures for detection of other pathogens were also performed. Additional blood samples were collected and analyzed at the end of the treatment period (T72 h) and at the end of the observation period (T144 h) and at post-treatment observation period (72-144 h). Following enrollment, the foal entered the treatment period (0-72 h), which was followed by a post-treatment observation period (72-144 h). From the onset of the treatment period to the end of the observation period, ongoing fecal scoring (four times daily), clinical assessments including adverse events (four times daily), and concomitant medications were recorded. Clinical assessments were made based on a standardized form with heart rate, respiratory rate, mucous membrane color, capillary in refill time, rectal temperature and body condition score being recorded. Total time on

study for each foal was 6 days. Fecal scoring was conducted jointly with the dosing times (four times a day with a minimum of 4 hours in between assessments) during the treatment period, followed by twice a day thereafter until the end of the observation period.

Treatments

The study design included 3 treatment groups. Treatment groups were divided such that approximately 20 foals each would receive: investigational product/probiotic (IVP/P) four times daily (QID) (Group 1), IVP/P two times daily (BID) and placebo BID (Group 2), or placebo QID (Group 3). Group 2 therefore received alternating doses of IVP/P and placebo that represents half the daily dose of IVP/P received by Group 1. Each foal received a 30 ml syringe of either IVP or placebo QID. There were two test materials: one contained the IVP and a probiotic (DigestivTM), the second was a placebo.

Both test materials were formulated as a paste and packaged in identical 30 ml metered syringes. Both test materials contained the same excipients. The IVP (SB-300) is a proprietary standardized botanical extract of sustainably harvested *Croton lechleri*. All formulation components were considered safe for use in animals.

The following medications were prohibited beginning at baseline through to the end of the observation period: additional probiotics, oral electrolytes (IV fluids were allowed) and other oral antidiarrheal treatments (within 7 days prior to the first dose being administered and while on study).

The weight range for foals enrolled in the study was 37-140 kg, which resulted in a dosing range of 2-18 mg/kg.

Descriptive statistics (number of subjects, mean, standard deviation, standard error of the mean, median, minimum and maximum values) were presented for age (weeks), baseline body weight (kg) and baseline fecal score, in each treatment group.

Safety was assessed by the following parameters: adverse events, plasma chemistry and hematology. Descriptive statistics were presented by treatment group, for each parameter for the screening visit, end of treatment period, end of observation period and for the changes from screening to end of treatment period and end of observation period. Possible differences between treatment groups in the changes from screening were assessed by ANCOVA modeling. The model contained baseline fecal score as a covariate with treatment, time point and treatment by time point as a fixed effect. Residuals from the model were investigated for normality using the Shapiro-Wilk test. If the normality assumption was rejected at an alpha level of 0.05, the degree of departure from normality was

investigated and a rank transformation was applied. Additionally, clinically significant changes from screening were investigated for white blood cell count (change from screening $>12,500$ cells/ μ l), serum amyloid A (change from screening >30 μ g/ml) and percentage of banded neutrophils (change from screening >5 %). The number (%) of foals with clinically significant changes was presented by treatment group. Possible differences between treatment groups were assessed with Fisher's Exact (2-tail) test.

To standardize care and where possible any foal that received antibiotics was placed on ceftiofur (5 mg/kg q8h) and amikacin (22 mg/kg q24h). A treatment responder was defined as a foal that developed formed feces or had no feces (fecal score <3), and maintained formed feces or no feces (i.e. no fecal score of 3, 4 or 5) for a minimum of 16 consecutive hours within a 24 hours period during the 72 hours treatment period. However, due to the difficulty in determining if "no observed feces" actually corresponded to "no feces", only those foals with observable feces that could be scored as <3 were considered to be responders.

All tests of significance were assessed at alpha = 0.05, 2-sided. No adjustments were applied for multiple comparisons. All statistical analyses were conducted using SAS for Windows.

For the treatment responder parameters, the number (%) of successes was presented for each treatment group. Possible differences between treatment groups were assessed using a generalized linear mixed model assuming a binomial distribution and a logit link. The model contained baseline fecal score as a covariate with treatment, time and treatment by time interaction as fixed effects.

Subgroup analyses, including only those foals with a baseline fecal score of 4 were also completed.

Results

At study completion site 1 through 5 had enrolled 22, 6, 21, 6 and 6 foals respectively, resulting in a total of 61 enrolled foals. One foal was the subject of an early withdrawal due to debilitation and worsening clinical condition, with a total of 60 foals completing the study. Data from all foals were used in the analysis of safety. The safety population included all animals that received at least one dose of IVP or placebo. The safety population included 20 animals treated with the IVP QID, 21 animals treated with IVP BID and placebo BID, and 20 animals treated with placebo QID. An efficacy population was defined as a subset of the safety population excluding 6 foals that had ≤ 1 recorded fecal score through the 144 hours of the study. The efficacy population included 19 animals treated with IVP QID,

19 animals treated with IVP BID and placebo BID and 17 animals treated with placebo QID.

An arbitrary scoring system was established with "no observation of feces" being noted as just that. In the 0-72 h time frame, there were a total of 732 possible fecal scores with 496 recorded as "No fecal sample (NFS)". For each treatment group, the following scores were recorded as NFS: IVP/P QID (161 of 240), IVP/P BID/placebo BID (171 of 252), and placebo QID (164 of 240).

Age, body weight and baseline fecal score were similar among treatment groups for both the safety and efficacy populations. The chi-square p-value was not statistically different between the groups for those that received antibiotics, indicating a similar distribution.

Safety parameters

Hematology and serum amyloid A (SAA). The comparison of the number of foals with clinically significant white blood cell count and serum amyloid A values were not found to be statistically different between groups at enrollment or by responder/nonresponder.

Serum biochemistry. No clinically significant differences were found at screening or between treatment/placebo groups at T 72 h or T 144 h.

Adverse events

An adverse event was defined as any change in physical or clinical pathology evaluations from baseline. These were classified as mild, moderate or severe. Adverse events noted included alopecia of the perineal area, fevers and increases/decreases in white cell counts. Most adverse events noted were deemed to be related to the underlying disease/diarrhea rather than having a direct relationship with the investigational product other than the development of transient hard feces, which was noted in a number of foals. No severe events were reported during either the treatment or observation period.

Treatment outcome parameters and analyses

The number of responders in each group and statistical comparisons for the evaluated population are presented in Table 2. The percentage of responder from 0-72 h was greater in the IVP BID group (68 %) than in the placebo group (35 %) ($p=0.03$). The percentage of responders from 0-96 h was also found to be greater in IVP BID group (79 %) when compared to the placebo group (47 %) ($p=0.03$). From 0-120 h, the percentage of responders in the IVP QID group was 84 % versus 53 % in the placebo group, which was found to be significant ($p=0.04$). No significant differences were found between groups for the periods 0-24 h and 0-48 h.

Table 2. Number and percentage of responders (a foal that developed formed feces -fecal score < 3-, and maintained formed feces for a minimum of 16 consecutive hours within a 24 hours period during the 72 hours treatment period), during the treatment and observation periods. Also, statistical comparison of each treatment group to the placebo.

Period	Active QID	Active BID	Placebo QID	Pairwise comparison to placebo Fisher's Exact (2-tail) p-value	
				Active QID	Active BID
	Neo 101	Neo 101	Neo 101	Neo 101	Neo 101
0-24 h	0/19 (0.0 %)	2/19 (10.5 %)	3/17 (17.6 %)	0.96	0.46
0-48 h	2/19 (10.5 %)	6/19 (31.6 %)	3/17 (17.6 %)	0.55	0.21
0-72 h	9/19 (47.4 %)	13/19 (68.4 %)	6/17 (35.3 %)	0.40	0.03
0-96 h	13/19 (68.4 %)	15/19 (78.9 %)	8/17 (47.1 %)	0.20	0.03
0-120 h	16/19 (84.2 %)	14/19 (73.7 %)	9/17 (52.9 %)	0.04	0.10
0-144 h	17/19 (89.5 %)	15/19 (78.9 %)	10/17 (58.8 %)	0.04	0.17

Table 3. Number and percentage of responders of the subset of foals that had a fecal score of 4 upon enrollment, during the treatment and observation periods and shows statistical comparison of each treatment group to the placebo.

Period	Active QID	Active BID	Placebo QID	Pairwise comparison to placebo Fisher's Exact (2-tail) p-value	
				Active QID	Active BID
0-24 h	0/16 (0.0 %)	1/11 (9.1 %)	0/13 (0.0 %)	0.99	0.98
0-48 h	2/16 (12.5 %)	3/12 (25.0 %)	1/13 (7.7 %)	0.78	0.22
0-72 h	8/16 (50.0 %)	9/13 (69.2 %)	4/13 (30.8 %)	0.31	0.05
0-96 h	12/16 (75.0 %)	11/13 (84.6 %)	5/13 (38.5 %)	0.05	0.02
0-120 h	15/16 (93.8 %)	10/13 (76.9 %)	6/13 (46.2 %)	0.02	0.10
0-144 h	15/16 (93.8 %)	11/13 (84.6 %)	7/13 (53.8 %)	0.03	0.10

For the subset of foals with a baseline fecal score of 4, the percentage of responders from 0-96 hours was found to be significantly different ($p = 0.02$) between the IVP BID (85 %) and placebo groups (39 %). For the interval from 0-120 hours, the IVP QID group was found to be significantly different ($p = 0.02$) from the placebo group (94 % versus 46 %, respectively; Table 3). No significant differences were found for the periods 0-24 h, 0-48 h and 0-72 h.

Discussion

This trial design allowed for 72 hours of treatment and a further 72 hours observation period. This was designed to allow extended assessments of foals post-treatment, as the duration of an acute diarrhea episode in foals is commonly 5-6 days. A key component and often, key difficulty in any diarrhea study, is the ability to evaluate fecal production. The diarrhea scoring system used in this trial was derived

from a scoring system that had been used in a previous safety study for the same product carried out in a group of older foals (Divers; personal communication). Extensive literature searches revealed little in terms of scoring fecal production in horses or foals. The most common difficulties encountered and not adequately addressed by this scoring system are the following:

1. No obvious fecal production due to the feces simply not being observed and thereafter mixed with bedding or the fecal production is of such watery consistency that if not directly observed it soaks directly through the bedding,
2. No fecal production associated with ileus in the acute phase of illness, and
3. No fecal production, which frequently occurs in the recovery phase.

While in each of these scenarios we may expect to find some other clinical indicators such as improvement in attitude and appetite that may indicate if the

animal is improving it was felt that many of these indicators are subjective and frequent exceptions were likely.

Given the strict use of the term “NFS” for any period when no fecal production was witnessed, many foals had missing fecal scores, which resulted in 6 foals being excluded from the efficacy analysis due to only having a single fecal score. Therefore, it is possible that these foals responded or reached clinical resolution before such time as was recorded for them. A recommendation for future studies would be the use of cameras with recording systems in the stalls to facilitate detection of defecation.

The product was palatable and easily administered in the paste formulation. There were no significant safety issues related to administration. One foal was withdrawn due to a worsening clinical condition. The foal had marked signs of sepsis and a cardiac arrhythmia was noted at withdrawal that had not been present at enrollment. The foal died 18 hours later and a necropsy indicated septicemia with cultures yielding a *Pseudomonas sp.* Unblinding of the foal’s treatment group was requested at withdrawal and it was revealed that the foal had received placebo. It was noted that a number of foals in the study produced hard feces, which in some cases was noted to have a small amount of surface blood, likely related to mucosal bleeding. In total, 5 foals were noted to have this change within the 144 hours of the study. The production of hard feces in all cases was transient and none of the foals experienced any long-term medical problems related to the production of hard feces. In the opinion of the trial veterinarian, the production of hard feces was more likely to occur in cases where the diarrhea had resolved before the end of the treatment period but use of the product was continued past the resolution of the diarrhea.

Analysis of plasma biochemistry and hematology revealed that foals across the three groups had similar laboratory results on admission indicating a similar level of systemic illness across the groups. Through the regulation of chloride channels, SB-300 prevents hyper-stimulation of electrolyte secretion in response to an intestinal insult. This helps to control fluid balance and prevent dehydration but is not a direct treatment for the cause of the diarrhea. Depending on the etiology of diarrhea, antibiotics may be required and as such where deemed necessary based on clinical and laboratory findings foals were placed on antibiotic therapy.

Another challenge when performing trials evaluated foals with diarrhea is the range of etiologies that may be involved. Diarrhea may be infectious or noninfectious and the animals may show minimal clinical signs other than the diarrhea or may be severely systemically ill. Standardization of the degree of illness

and etiology is impossible. Animals may appear to only be mildly ill if presented soon after the onset of diarrhea and deteriorate after admission or vice versa. All efforts were made to try to enroll foals with a comparative level of illness. To this effect only foals with diarrhea scores of 3 or 4 were enrolled. Foals with lesser scores were likely to be not as ill and foals with fecal scores of 5 frequently carry a poor prognosis which could result in a negative bias. Every effort was made not to enroll foals with ‘foal heat’ diarrhea which is regarded as being a normal physiological event. Foals with foal heat diarrhea are normally presented from 6-15 days but are bright, actively nursing with no changes in physical parameters such as heart rate or body temperature. If a foal of that age group was presented with a diarrhea score of 3 or 4, it had to demonstrate some indication of complication of the foal heat diarrhea such as fever to be eligible for enrollment. Comparison of physical and laboratory parameters between the treatment groups indicated that the animals were similarly ill across all groups.

Standardization *per etiology* is also impossible. Definitive determination of the cause of diarrhea is not possible in many cases (Savage, 2009; Sellon, 2014). In this trial an etiology was determined in 28.4 % of cases (Deferrari *et al.*, 2016). An additional complication is the likely mixed etiology of many cases of foal diarrhea and new research indicating the presence of previously unrecognized viruses as causes of foal diarrhea (Vega *et al.*, 2016).

The argument could be made that administration of antibiotics to some foals and not to others could impact the outcome and while this is indeed true if one treatment group contains a large number of foals that receive antibiotics compared to other groups, the similar distribution between groups in this trial for those that received antibiotics; IVP/P QID 13 of 19, IVP/P BID/placebo BID 13 of 19 and placebo QID 9 of 17, indicates that the likely impact of antibiotics on the overall comparative analysis was minimal. Similarly, the argument could be made that younger foals may have a tendency towards more severe illness than older foals. When the responders were divided by age group (<1 month and >1 month), there was little numerical difference between the responders by age group but there was a numerical difference between treated and placebo for foals <1 month of age. The placebo group of foals >1 month of age only consisted of 2 foals and no inferences could be drawn (Table 4).

Probiotics are live organisms that, when administered at adequate concentrations, provide a beneficial effect beyond that of their nutritional value. They are used widely in the treatment of diarrhea in humans, small animals and equines. To standardize their use across this study, probiotics were included

Table 4. Number and percentage of responders (a foal that developed formed feces -fecal score <3-, and maintained formed feces for a minimum of 16 consecutive hours within a 24 hours period during the 72 hours treatment period), during the treatment and observation periods with foals <1month of age on the left and foals >1month of age on the right.

Foals less than 1 month (age)			
Period	Active QID Neo 101	Active BID Neo 101	Placebo Neo 101
0-24 h	0/9 (0.0 %)	0/10 (0.0 %)	2/15 (13 %)
0-48 h	0/9 (0.0 %)	3/10 (30 %)	3/15 (20 %)
0-72 h	3/9 (33.3 %)	7/10 (70 %)	6/15 (40 %)
0-96 h	6/9 (66.7 %)	8/10 (80 %)	8/15 (53 %)
0-120 h	7/9 (77.8 %)	7/10 (70 %)	9/15 (60 %)
0-144 h	8/9 (88.9 %)	7/10 (70 %)	9/15 (60 %)

with the investigational product in the dosage syringe. The positive or negative effect of the probiotics on the outcome of this trial is debatable and unknown. At this point in time the only conclusion that can be drawn was that the combination of the investigational product with probiotics appears to be effective in the treatment of foal diarrhea.

In conclusion, the administration of a paste formulation of SB-300 was well tolerated with minimal adverse events and showed numerical and statistically significant improvement in the resolution of diarrhea in nonweaned foals less than 4 months of age. It is recommended that a larger trial be performed to further evaluate the benefits of the product without additional probiotic.

Acknowledgements

The authors would like to thank the farms and owners who participated in the study in addition to the sub-investigators involved. Jaguar Animal Health Inc, 201 Mission St, Suite 2375, San Francisco, CA 94105 was the sponsor for this trial.

Conflict of interest

Siobhan McAuliffe provides consultation services to Jaguar Animal Health Inc. None of the other authors have any conflicts of interest to declare.

References

- Atherton RP, McKenzie HC, Furr MO. 2009. Acute colitis: pathophysiology and noninfectious causes. *Comparative Continuing Education Equine Practice*. 4:366-74.
- Atherton RP, McKenzie HC, Furr MO, Amezcua M, Friendship R, Dewey C, Lucas M, De Lange CFM. 2009. Acute colitis: infectious causes. *Comparative Continuing Education Equine Practice*. 4:375-80.
- Barrett KE, Keely SJ. 2000. Chloride secretion by the intestinal epithelium: molecular basis and regulatory aspects. *Annual Review Physiology*. 62:535-72. doi: 10.1146/annurev.physiol.62.1.535.

Cottreau J, Tucker A, Crutchley R, Garey KW. 2012. Crofelemer for the treatment of secretory diarrhea. *Expert Review Gastroenterology Hepatology*. 6(1):17-23. doi: 10.1586/egh.11.87.

Deferrari MG, McAuliffe SB, Burdet M, Palma C, Tallarico M, Mattei D, Retamar G, Bustos C. 2016. Diagnóstico etiológico de diarreas en potrillos en Buenos Aires. *La especie equina, Revista de la AAVE*. N° 54.

Dupont HL. 1987. Bismuth subsalicylate in the treatment and prevention of diarrheal disease. *Drug Intelligence and Clinical Pharmacy*. 21(9):687-93.

Ericsson CD, Tannenbaum C, Charles TT. 1990. Antisecretory and antiinflammatory properties of bismuth subsalicylate. *Reviews of Infectious Diseases*. 12(Suppl.1), S16-S20.

Fisher H, Machen T, Widdicombe J, et al. 2004. A novel extract SB-300 from the stem bark latex of *Croton lechleri* inhibits CFTR-mediated chloride secretion in human colonic epithelial cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 94:351-7. doi: 10.1016/j.jep.2004.04.005.

Jones K. 2003. Review of Sangre de Drago (*Croton lechleri*) – A south American tree sap in the treatment of diarrhea, inflammation, insect bites, viral infections and wounds: traditional uses to clinical research. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 9(6):877-96. doi: 10.1089/107555303771952235.

Lester GD. 2001. Infectious diarrhea in foals. *Proceedings 47th Annual Meeting American Association Equine Practitioners, San Diego, CA, USA*. 47:468-71.

Lorrot M, Vasseur M. 2007. How do the rotavirus NSP4 and bacterial enterotoxins lead differently to diarrhea? *Virology Journal*. 4:31. doi: 10.1186/1743-422X-4-31.

Savage CJ. 2009. Diagnosing and managing colitis (colityphilitis) in horses and enterocolitis in foals. *Proceedings of the 11th International Congress of the World Equine Veterinary Association*. Guaruyá, SP, Brasil. 24:27.

Sellon DC. 2014. Diarrhoea in foals and weanlings. *Proceedings of the British Equine Veterinary Association*. Birmingham, United Kingdom.

Vega CG, Conceição-Neto N, Miño S, Zeller M, Heylen E, Parreño V, Barrandeguy M, Matthijnssens J. 2016. Novel viruses determined using fecal virome analysis in the feces of foals with diarrhea. *Journal of Equine Veterinary Science*. 39, Suppl, S23-S24.

McAuliffe SB et al.

Wohlfender FD, Barrelet FE, Doherr MG, Straub R, Meier HP. 2009. Diseases in neonatal foals. Part 1: the 30 day incidence of disease and the effect of prophylactic antimicrobial drug treatment during the first 3 days post-partum., *Equine Veterinary Journal*. 41(2)179-85.

Detección de *Staphylococcus pseudintermedius* resistentes a meticilina y a otros antimicrobianos de uso habitual en la clínica en piodermias caninas

Detection of *Staphylococcus pseudintermedius* resistant to methicillin and to other antimicrobials commonly used in canine pyodermias

Giacoboni GI^{1*}, Vinocur F², Fauret N², Grandinetti J³, Manzuc P⁴

¹Departamento de Microbiología, ²Cátedra de Microbiología, Departamento de Microbiología, ³Cátedra de Patología General Veterinaria, Departamento de Ciencias Preclínicas, ⁴Hospital Escuela, Departamento de Clínica. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata

*Correo electrónico del autor: giacoboni@fcv.unlp.edu.ar

Resumen: Se estudiaron 96 muestras provenientes de caninos que presentaban diferentes formas clínicas de piodermia. El objetivo fue detectar, mediante pruebas fenotípicas, la presencia de *Staphylococcus pseudintermedius* y, mediante antibiograma, la resistencia antimicrobiana a la meticilina y a otros antimicrobianos de uso común en la práctica clínica, ambos métodos utilizados en el laboratorio de diagnóstico veterinario. *S. pseudintermedius* se identificó en 91 animales (94,8 %) y la resistencia a la meticilina se detectó en 31 cepas (34 %). De ellas, 21 (93,5 %) expresaron multiresistencia a 4, 5 y 6 antimicrobianos. El perfil de resistencia predominante fue OXA-ERY-CLIN-TMS-CIP-CMP. Entre los otros antibióticos probados, los que presentaron mayor porcentaje de resistencia fueron: trimetoprima sulfametoxazol 61/67 %, eritromicina 59/64,4 %, clindamicina 55/60 % y ciprofloxacina 47/52 (%). Todas las cepas fueron sensibles a vancomicina, nitrofurantoína y rifampicina. La prueba D (conocida como D-test) se utilizó para evaluar la resistencia inducible a la clindamicina. Se concluye que la identificación fenotípica de *S. pseudintermedius*, así como el antibiograma, son herramientas importantes para colaborar en la utilización responsable de los antimicrobianos en medicina veterinaria.

Palabras clave: identificación fenotípica, *Staphylococcus pseudintermedius*, antibiograma, meticilino-resistencia, piodermia canina

Abstract: Ninety-six samples from dogs with different clinical forms of pyoderma were studied, with the objective of detecting the presence of *Staphylococcus pseudintermedius* by phenotypic tests and the antimicrobial resistance to methicillin and other antimicrobials commonly used in clinical practice. *S. pseudintermedius* was identified in 91 animals (94.8 %) and methicillin resistance was detected in 31 strains (34 %). Of these, 21 (93.5 %) expressed multiresistance to 4, 5 and 6 antimicrobials. The predominant resistance profile was OXA-ERY-CLIN-TMS-CIP-CMP. Among other antibiotics tested, the ones with the highest percentage of resistance were: trimethoprim-sulfamethoxazole (67%), erythromycin (64.4 %), clindamycin (60 %) and ciprofloxacin (52 %). All strains were sensitive to vancomycin, nitrofurantoin and rifampicin. The D-test was performed to evaluate inducible resistance to clindamycin. It is concluded that the phenotypic identification of *S. pseudintermedius* as well as the antibiogram are important tools to contribute to the responsible use of antimicrobials in veterinary medicine.

Key words: phenotypical identification, *Staphylococcus pseudintermedius*, antibiogram, methicillin resistance, canine pyoderma

Introducción

La piodermia canina es una entidad a la que habitualmente se enfrenta el médico veterinario en la práctica clínica. Las opciones del tratamiento varían, según la profundidad y localización de la lesión, desde la aplicación de antisépticos y antimicrobianos locales hasta el uso de antibióticos sistémicos.

La clasificación del agente etiológico más frecuentemente involucrado cambió luego de la revisión de la clasificación de los estafilococos coagulasa positivos. Así, la descripción de la nueva especie «*Staphylococcus pseudintermedius* Devriese et al., 2005» completó la agrupación con varios estafilococos estrechamente relacionados en el grupo llamado *Staphylococcus intermedius* (GSI), que hoy involucra a *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* y *S. delphini* grupo A y B. Como consecuencia de la revisión de esta clasificación, se asume que la mayoría de los estafilococos aislados de caninos e identificados como *S. intermedius* son *S. pseudintermedius*. Sin embargo, la determinación de especie mediante pruebas bioquímicas presenta limitaciones, ya que existen escasas pruebas bioquímicas/metabólicas que los diferencien (Sasaki et al., 2007).

Esta bacteria forma parte de la microbiota normal del perro; constituye, en la boca 57 % de la microbiota, en el periné 52 % y en ingles 23 %. Es un patógeno oportunista y no causa enfermedad, a menos que la inmunocompetencia del hospedador se encuentre disminuida o que la barrera cutánea se altere por factores como dermatitis atópica, procedimientos médicos, quirúrgicos o factores ambientales (Bannoehr & Guardabassi, 2012).

Desde la descripción de *S. pseudintermedius* se conoce su sensibilidad a los antibióticos betalactámicos, pero a partir de 2006 surgió la resistencia a la meticilina (*S. pseudintermedius* resistente a la meticilina, SPRM). Se trata de una situación similar a la de *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) por la presencia del gen *mec A* (Weese & van Duijkeren, 2010), a pesar de que en *S. pseudintermedius* se describen actualmente otros genes *mec* (Chanchaithong et al., 2016).

La prueba de sensibilidad a los antimicrobianos por difusión (antibiograma), utilizada comúnmente en los laboratorios de diagnóstico es, en la práctica, la que puede ayudar al veterinario clínico a seleccionar el antibiótico adecuado para instaurar un tratamiento criterioso y con mayor probabilidad de éxito. El antibiograma se realiza según pautas y recomendaciones de instituciones internacionales, tales como el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) y el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Este último es el que se toma como referencia en nuestro país para la interpretación de las pruebas de sensibilidad.

La detección de resistencia a meticilina y a otros antibióticos betalactámicos mediada por el gen *mec A* en *S. pseudintermedius* ha sido motivo de controversia a través del tiempo.

En 2009, los grupos de investigadores encabezados por Schissler y por Bemis evaluaron la utilidad de los puntos de corte del CLSI para detectar resistencia a meticilina en aislamientos de *S. pseudintermedius* de caninos. Demostraron que el disco de cefoxitina usado para predecir resistencia a meticilina en *S. aureus* y estafilococos coagulasa negativos no es útil para *S. pseudintermedius*, pero sí lo es el disco de oxacilina. Las normas Vet01-S28, de 2013 del CLSI, incluyeron puntos de corte para oxacilina a *S. pseudintermedius*, dado que es el adecuado para detectar la meticilinoresistencia en esta especie bacteriana.

El CLSI tiene puntos de corte establecidos para *S. aureus* aislados de humanos con el disco de cefoxitina 30 µg (S ≥ 22 mm/ R ≤ 21 mm). En 2013, este instituto eliminó de las tablas de estafilococos a la oxacilina, dado que la cefoxitina es mejor marcador de resistencia a meticilina mediada por el gen *mec A*. En 2016 incorporó puntos de corte de oxacilina para *S. pseudintermedius* (S ≥ 18 mm/ R ≤ 17 mm) y consignó que ni el disco de cefoxitina ni la concentración inhibitoria mínima (CIM) de cefoxitina son apropiados para detectar resistencia a meticilina mediada por el gen *mec A* en esta especie (CLSI, 2016).

Para el laboratorio de diagnóstico bacteriológico, la evolución en la clasificación de los estafilococos, así como las normas para la interpretación de su comportamiento frente a los antimicrobianos *in vitro* son motivos de actualización y desafío, pues la correcta identificación de la especie de estafilococo es indispensable para predecir la resistencia antimicrobiana.

A pesar de que los avances tecnológicos para identificar *S. pseudintermedius*, como las técnicas moleculares (Bannoehr et al., 2009) y de espectrometría de masa (Descristóphoris et al., 2011), permiten una identificación certera, la mayoría de los laboratorios de diagnóstico veterinario utilizan la identificación fenotípica.

Este trabajo recopila la identificación de *S. pseudintermedius* aislados de perros con diagnóstico clínico de piodermia en el transcurso de 10 meses, así como la resistencia que presentaron a la meticilina y a otros antimicrobianos de prescripción habitual, por medio de la utilización de pruebas fenotípicas y de antibiograma, respectivamente. Se pretende alertar a los médicos veterinarios clínicos sobre la importancia que tienen el laboratorio de diagnóstico veterinario en la identificación del microorganismo y las pruebas de sensibilidad antimicrobiana como herramientas de suma utilidad para la elección y prescripción correcta del fármaco, así como sobre su uso prudente

para prevenir o evitar la extensión de la resistencia antimicrobiana.

Materiales y métodos

Se obtuvieron y enviaron al laboratorio muestras de 96 caninos de entre 6 meses y 14 años de edad, con diagnóstico clínico de piodermia. Se registraron: edad, raza, sexo, datos de enfermedades de base, tipo de piodermia según su localización y evolución, antimicrobianos utilizados en tratamientos previos a la toma de muestras. Se procesaron 96 hisopados de piel. Las muestras se tomaron de tres lesiones diferentes por hisopo, en el período comprendido entre febrero y diciembre de 2016, de caninos provenientes de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Gran Buenos Aires y La Plata, República Argentina.

En el laboratorio, se sembraron en caldo salado (NaCl al 6,5 %) para su preenriquecimiento selectivo a 37 °C durante 24 h y, posteriormente, en agar manitol salado. Las colonias sospechosas fueron repicadas en agar tripticasa soya para obtener un cultivo puro. La identificación de especies se realizó mediante las siguientes pruebas bioquímicas: coagulasa, Voges Proskauer, fermentación de trehalosa, manitol y maltosa, hidrólisis de la arginina y l-pirrolidonilarginilamida.

La sensibilidad a los antimicrobianos se determinó mediante el método de difusión en agar según normas M2-A 11 del CLSI. Se utilizaron discos de oxacilina 1 µg (OXA), eritromicina 15 µg (ERY), clindamicina 2 µg (CLIN), ciprofloxacina 5 µg (CIP), nitrofurantoína 30 µg (NIT), rifampicina 5 µg (RIF), cloranfenicol 30 µg (CMP), minociclina 30 µg (MIN) trimetoprima-sulfametoxazol 25 µg (TMS) y vancomicina 5 µg (VAN) (Laboratorio Britania S. A, CABA, Argentina). Los resultados del método de difusión con oxacilina, eritromicina, clindamicina, cloranfenicol y trimetoprima sulfametoxazol se interpretaron según las normas CLSI (2013) para aislamientos de animales Vet01-S28, mientras que, con el resto de los antimicrobianos, los resultados se interpretaron según las normas CLSI M100-S26 (2016) para aislamientos de humanos, por no disponer de puntos de corte para aislamientos de animales. Se evaluó el fenotipo de resistencia a macrólidos utilizando la prueba D, según lo describen Steward *et al.* (2005) para *S. aureus*. La prueba D se realiza colocando los discos de eritromicina y clindamicina separados por una distancia de 15 mm entre sí, de borde a borde. El desarrollo en forma de letra D en la zona circular de inhibición alrededor del disco de clindamicina indica la presencia de MLSB inducible.

Resultados

S. pseudintermedius se aisló e identificó en n=91 (94,8 %) de los animales mediante identifica-

ción fenotípica. Los antimicrobianos que presentaron mayores registros de resistencia fueron TMS n=61 (67 %), seguidos por ERY n=59 (64,8 %) y CLIN n=55 (60,4 %). Hubo 15 aislamientos (16 %) que mostraron sensibilidad a todas las drogas probadas (Tabla 1).

La resistencia a la metilicina, detectada utilizando el disco de oxacilina según la recomendación del CLSI, se presentó en 31 cepas (34 %). De ellas, 21 (93,5 %) expresaron multiresistencia a 4, 5 y 6 antimicrobianos. El perfil de resistencia predominante fue ERY-CLIN-TMS-CIP, seguido del perfil OXA-ERY-CLIN-TMS-CIP-CMP (Tabla 2).

Tabla 1. Resistencia a los antimicrobianos probados en 91 cepas de *S. pseudintermedius* aisladas de caninos con piodermia.

Antimicrobiano	Cantidad de aislamientos resistentes	(%)
Oxacilina	31	(34 %)
Eritromicina	59	(65 %)
Clindamicina	55	(60 %)
Ciprofloxacina	47	(52 %)
Trimetoprima-sulfametoxazol	61	(67 %)
Cloranfenicol	15	(16 %)
Minociclina	1	(1 %)
Rifampicina	0	(0 %)
Nitrofurantoína	0	(0 %)
Vancomicina	0	(0 %)

Tabla 2. Fenotipo de resistencia.

Resistencia	Fenotipo de resistencia	N° de cepas
7ATB ^a	OXA ^b -ERY ^c -CLIN ^d -TMS ^e -CIP ^f -CMP ^g -RIF ^h	3
6 ATB	OXA-ERY-CLIN-TMS-CIP-CMP	8
6 ATB	OXA-ERY-CLIN-TMS-MINO ⁱ -CMP	1
5 ATB	ERY-CLIN-TMS-CIP-CMP	1
5 ATB	OXA-ERY-CLIN-TMS-CIP	9
4 ATB	ERY-CLIN-TMS-CIP	15
4 ATB	OXA-ERY-CLIN-TMS	4
4 ATB	OXA-ERY-CLIN-CMP	1
4 ATB	OXA-ERY-CLIN-CIP	3
3 ATB	ERY-CLIN-TMS	8
3 ATB	ERY-TMS-CIP	1
3 ATB	ERY-CLIN-CIP	1
2 ATB	TMS-CIP	3
2 ATB	ERY-CLIN	1
2 ATB	CIP-CMP	1
1 ATB	TMS	8
1 ATB	ERY	3
1 ATB	CIP	3
1 ATB	OXA	2
Ningún ATB		15

^aantimicrobiano, ^boxacilina, ^ceritromicina, ^dclindamicina, ^etrimetoprima/sulfametoxazol, ^fciprofloxacina, ^gcloranfenicol, ^hrifampicina, ⁱminociclina

La resistencia a macrólidos en estafilococos puede deberse al mecanismo de eflujo o a la modificación del sitio blanco macrólido-lincosamida-estreptogramina B (MLSB). La resistencia MLSB puede ser constitutiva o inducible tras la exposición a un macrólido.

De los 59 aislamientos resistentes a ERY, 4 (6,8 %) presentaron sensibilidad a CLIN y prueba D negativas, correspondiente al fenotipo M de eflujo. Los 55 aislamientos restantes presentaron resistencia a ERY y CLI correspondiente al fenotipo MLSB constitutivo.

Hubo solo un aislamiento resistente a minociclina (1 %). Todos los aislamientos fueron sensibles a VAN, RIF y a NIT.

Discusión y conclusiones

La colonización con *S. pseudintermedius* en perros es común, ya que la bacteria reside en su piel y mucosas. Se informó su aislamiento hasta en un 90 % de los animales portadores sanos (Griffeth *et al.*, 2008). La piodermia asociada con este patógeno oportunista es una infección común de los caninos que frecuentemente requiere de tratamientos prolongados. Sin embargo, el tratamiento se ha visto dificultado por el aumento de la resistencia a los antimicrobianos (Bannoehr & Guardabassi, 2012). La infección surge, generalmente, cuando las barreras cutáneo-mucosas son alteradas, ya sea por lesiones ocasionadas por procedimientos quirúrgicos o medicamentosos, por dermatitis parasitarias, dermatitis atópicas o enfermedades metabólicas (Bannoehr & Guardabassi, 2012). En cuanto a las formas de presentación de las dermatitis, las formas superficial y generalizada fueron las más frecuentes, coincidiendo con la bibliografía (Bloom *et al.*, 2014).

La infección causada por SPRM es un desafío emergente por la aparición de cepas multirresistentes a betalactámicos, macrólidos, lincosamidas, aminoglucósidos sulfonamidas y cloranfenicol y las limitadas opciones terapéuticas que presentan algunos casos. Ante este problema, surgieron investigaciones como la de Waleed Younis *et al.* (2017) para hallar compuestos con otros sitios de acción como, por ejemplo, compuestos de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima, que aún están en evaluación.

Se registró un 34 % de resistencia a la metilicina con el disco de oxacilina e interpretándolo con los puntos de corte de CLSI para aislamientos de *S. pseudintermedius* en animales (Vet01-S28 CLSI, 2013), resistencia que generalmente está determinada por la presencia del gen *mec A* (Weese & van Duijkeren, 2010). Algunos investigadores discrepan en la interpretación de esos datos, argumentando que el

rol del gen *mec A* con el informe extendido de resistencia a los compuestos betalactámicos se estableció sobre la base clínica y microbiológica de *S. aureus* en humanos, y que fue trasladado a *S. pseudintermedius* en medicina veterinaria sin estudios específicos en animales. Mientras se aguardan estas investigaciones, se recomienda informar los aislamientos que presentan resistencia a la oxacilina como resistentes a los antibióticos betalactámicos que se utilizan en medicina veterinaria, con una evaluación clínica del caso antes de cambiar el tratamiento si, por ejemplo, los animales están siendo tratados con amoxicilina-clavulánico o cefalexina (Guardabassi *et al.*, 2017).

La observación de altas resistencias a TMS, CIP y ERY se registraron en otro estudio similar de piodermias caninas en la Universidad de Santa María, Brasil, pero con valores más bajos que los nuestros (TMS 29,9 %, ERY 17,7 %, CIP 18,8 %). En el mismo estudio detectaron 0,6 % de resistencia a la vancomicina, resistencia que no se encontró entre los 91 aislamientos de este trabajo (da Silva *et al.*, 2014).

La resistencia a macrólidos en estafilococos puede deberse al mecanismo de eflujo o a la modificación del sitio blanco macrólido-lincosamida-estreptogramina B (MLSB). La resistencia MLSB puede ser constitutiva o inducible tras la exposición a un macrólido. Cuando se observa resistencia a la eritromicina y la clindamicina tiene halo de sensibilidad pero presenta achatamiento, la prueba D es positiva y significa que hay resistencia inducible. Según CLSI, los aislamientos que presenten prueba D positiva, a pesar de presentar halo de sensibilidad a clindamicina, se deben informar resistentes, ya que podrían desarrollar resistencia intra-tratamiento y llevar al fracaso terapéutico.

En nuestro trabajo no encontramos resistencia inducible a clindamicina (MLSB inducible), como tampoco la informaron Faires *et al.* (2009) en un estudio de SPRM en perros y gatos, ni Vigo *et al.* (2015) en un estudio retrospectivo de *S. pseudintermedius* de diferentes casos clínicos en caninos. Gold & Lawhon (2013), aunque hallaron solamente 1,32 % de resistencia inducible (8/608), enfatizaron la importancia de la prueba D, debido a que la alternativa recomendable ante una falla terapéutica con amoxicilina-clavulánico y cefalosporinas de primera generación es la clindamicina, debido a su eficacia, seguridad y buena distribución en piel. Sin embargo, los valores de resistencia para clindamicina hallados (60%) fueron altos y similares a los encontrados por Moodley *et al.* (2014) en la revisión que realizaron entre 1980-2013 con un rango de porcentajes entre 60-80.

Las interpretaciones de los resultados de los antibiogramas podrían ser objetadas en los casos en los que no están establecidos los puntos de corte para

dicho antimicrobiano en medicina veterinaria. Tal es el caso de la minociclina y la doxiciclina que fueron evaluadas por Hnot *et al.* (2015). Estos autores observaron que muchas cepas portadoras de genes *tetM*, que confieren resistencia a tetraciclina por metilación ribosomal, eran sensibles a ambos antibióticos si se interpretaban con los puntos de corte para aislamientos de humanos, es decir que estos puntos de corte no son apropiados para animales.

La definición y la clasificación de las especies en bacteriología han ido cambiando y la taxonomía tiende a diversificarse debido a la proliferación de técnicas moleculares que se registran día a día y forman parte de bases de datos actualizadas.

En esta especie bacteriana se describieron dos cassettes cromosómicos (SCCmec) nuevos que portan *mec A*: SCCmec II-III y SCCmec VII. Este último es un nuevo elemento propio de *S. pseudintermedius* que no se encuentra en *S. aureus* (Descloux *et al.*, 2008). Se completó la secuenciación de los 3 tipos clonales dominantes de *S. pseudintermedius* meticilinoresistentes (ST 84, ST 71 y ST 68), todos con el gen *mec A* (Riley *et al.*, 2016).

A pesar de estos avances, en la práctica clínica y en los laboratorios veterinarios se siguen utilizando, tanto para la identificación bacteriana como para determinar la sensibilidad a los antimicrobianos, pruebas bioquímicas convencionales y antibiograma por difusión.

En el caso de la resistencia a la meticilina mediada por el gen *mec A*, la prueba de oro para confirmarla es la PCR, pero las normas CLSI 2013 ya establecieron luego de las apreciaciones realizadas por Schissler *et al.* (2009) y Bemis *et al.* (2009) que el disco de oxacilina puede ser, como para el caso de *S. aureus* el disco de cefoxitina, el predictor de dicha resistencia. Las pruebas que evalúan características macroscópicas, reacciones bioquímicas y metabólicas así como el antibiograma por difusión son las que pueden ofrecerse a los médicos veterinarios para la resolución de los casos de dermatitis por *S. pseudintermedius*, más aún cuando aparecen cepas multirresistentes. Sin embargo, son las que pueden ofrecerse a los médicos veterinarios para la resolución de los casos de dermatitis por *S. pseudintermedius*, más aun cuando aparecen cepas multirresistentes.

Este estudio de laboratorio permitió conocer la prevalencia de *S. pseudintermedius*, a partir de muestras de piel, en pacientes caninos con piodermias en un período de 10 meses en el año 2016. El estudio del comportamiento de la bacteria frente a los diferentes antimicrobianos utilizados corrientemente en la práctica clínica fue de valor para que el médico veterinario tomara decisiones para la elección del tratamiento.

Estas acciones colaboran con el uso prudente de los antimicrobianos en medicina veterinaria, tal como lo propone la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), para preservar la eficacia de estos valiosos medicamentos, considerados un bien público mundial, en los animales, el hombre y el medio ambiente.

Conflicto de intereses

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

Bibliografía

- Bannoehr J, Franco A, Iurescia M, Battisti A, Fitzgerald JR. 2009. Molecular diagnostic identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of Clinical Microbiology*. 47:469-71. doi: 10.1128/JCM.01915-08.
- Bannoehr J, Guardabassi L. 2012. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. *Veterinary Dermatology*. 23(4):253-66, e51-2. doi: 10.1111/j.1365-3164.2012.01046.x.
- Bemis DA, Jones RD, Frank LA, Kania SA. 2009. Evaluation of susceptibility test breakpoints used to predict *mec A*-mediated resistance in *Staphylococcus* isolated from dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 21:53-84. doi.org/10.1177/104063870902100108.
- Bloom P. 2014. Canine superficial bacterial folliculitis: current understanding of this etiology, diagnosis and treatment. *Veterinary Journal*. 199:217-22. doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.11.014.
- Chanchaithong P, Prapasarakul N, Perreten V, Schwendener S. 2016. Characterization of a novel composite *Staphylococcal* cassette chromosome *mec* in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from Thailand. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 60(2):1153-7. doi: 10.1128/AAC.02268-15.
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). 2012. M2-A11: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test: Approved Standard- Eleventh Edition. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, Pensilvania, EE.UU.
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). 2013. Approved Standard Supplement Vet01-S2. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria isolated from Animals. Second Informational Supplement. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, Pensilvania, EE.UU.
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). 2016. M100S 26th Edition: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, Pensilvania, EE.UU..
- da Silva AP, Schmith C, de Vargas A, Maboni, G, Rampelotto C, Schwab M, Escobar T, do Amaral A. 2014. Susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus spp.* isolados de caes com pioderma superficial. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. 34(4):365-361. doi.org/10.1590/S0100-736X2014000400010.

- Descristóphoris P, Fasola A, Benagli C, Tonolla M, Petrini O. 2011. Identification of *Staphylococcus intermedius* group by MALDI-TOF MS. *Systematic Apply Microbiology*. 34:45-51. doi: 10.1016/j.syapm.2010.11.004.
- Descloux S, Rossano A, Perredten V. 2008. Characterization of new staphylococcal cassette chromosome mec (SCC-mec) and topoisomerases genes in fluoroquinolone- and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of Clinical Microbiology*. 46(5):1818-23. doi: 10.1128/JCM.02255-07.
- Devriese LA, Vancanneyt M, Baele M. 2005. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55:1569-73. <http://hdl.handle.net/1854/LU-328337>.
- Faires MC, Aucoin D, Weese JS. 2009. Inducible clindamycin-resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from dogs and cats. *Veterinary Microbiology*. 139:419-20.13. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.06.016.
- Gold RM, Lawon SD. 2013. Incidence of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* from dogs. *Journal of Clinical Microbiology* 51(12):4196-9. doi: 10.1128/JCM.02251-13.
- Griffeth GC, Morris DO, Abraham JL, Shoper FS, Rankin SC. 2008. Screening for skin carriage of methicillin resistant coagulase positive and *Staphylococcus schleiferi* in dogs with healthy and inflamed skin. *Veterinary Dermatology*. 19(3):142-9. doi: 10.1111/j.1365-3164.2008.00663.x
- Guardabassi L, Damborg P, Stamm I, Kopp PA, Broens EM, Toutain PL. 2017. Diagnostic microbiology in veterinary dermatology: present and future. *Veterinary Dermatology*. 46–e30. doi: 10.1111/vde.12414
- Hnot M, Cole LK, Lorch G, Papich M, Rajala Schultz PJ, Daniels JB. 2015. Evaluation of canine minocycline and doxycycline susceptibility break points for methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from dogs. *Veterinary Dermatology*. 26:334-e71. doi: 10.1111/vde.12227.
- Moodley A, Damborg P, Saxmose Nielsen, S. 2014. Antimicrobial resistance in methicillin susceptible and methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* of canine origin: Literature review from 1980 to 2013. *Veterinary Microbiology*. 171:337-41 doi: 10.1016/j.vetmic.2014.02.008.
- OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal). Código sanitario para los animales terrestres. Título 6. Capítulo 9. [ONLINE]. Disponible en: <http://www.oie.int/es/normasinternacionales/codigo-terrestre/acceso-en-linea/>. [Consultado: 09/06/2017].
- Riley MC, Perretton V, Bemis DA, Kania S. 2016. Complete genome sequences of three important methicillin resistant clinical isolated of *Staphylococcus pseudintermedius*. *Genome announcements* 4 (5): e01194-16. doi: 10.1128/genomeA.01194-16
- Sasaki T, Kikuchi K, Tanaka Y, Takahashi N, Kamata S, Hiramatsu K. 2007. Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 45(9):2770-8. doi: 10.1128/JCM.00360-07
- Schissler JR, Hiller A, Daniels JB, Cole LK, Gebreyes WA. 2009. Evaluation of Clinical Laboratory Standards Institute interpretative criteria for methicillin resistance *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 21:684-8.
- Steward CD, Raney PM, Morrell AK, Williams PP, McDougal LK, Jevitt L, McGowan JE Jr, Tenover FC. 2005. Testing for induction of clindamycin resistance in erythromycin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 43:1716:21-7. doi: 10.1128/JCM.43.4.1716-1721.2005
- Vigo G, Giacoboni G, Galletti P, Pasterán F, Corso A. 2015. Resistencia antimicrobiana y epidemiología molecular de cepas de *Staphylococcus pseudintermedius* aislados de muestras clínicas de caninos. *Revista Argentina de Microbiología*. 47(3):206-11.
- Weese JS, van Duijkeren E. 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*. 140:418-29. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.01.039.
- Younis W, Mohammad H, Hostetler M, López-Pérez D, Steussy C, Lipton M, Stauffcher C, Sullan S, Abd Al-Azeen MW, Hussein AA, Seteen N. 2017. Class II HMG-CoA reductase inhibitors targeting methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of Advanced Veterinary Research* 7(1):1-7.

Prevalencia de anticuerpos contra virus de influenza equina en equinos deportivos de la República Argentina durante 2015 y 2016

Prevalence of antibodies against equine influenza virus in sport horses from Argentina during 2015 and 2016

Durante E¹, Marcos A^{2*}, Ayerbe M³, Chiricosta A¹, Segato L¹, Donato ME², Capellino F², D'Alessio F², Piskorz A³, Carballo Longo M³

¹Programa de Enfermedades de los Equinos, Dirección de Programación Sanitaria, SENASA; ²Dirección de Epidemiología y Análisis de Riesgo, SENASA; ³Dirección de Laboratorio Animal, SENASA.
*Correo electrónico del autor: amarcos@senasa.gob.ar

Resumen: Mediante un muestreo en dos etapas se analizó la población de equinos de deporte o recreación de toda la República Argentina que presenta una frecuencia regular (o alta) de movimientos y para los cuales la vacunación contra influenza equina es obligatoria. Mediante la técnica de inhibición de la hemaglutinación se evaluó la presencia de anticuerpos contra dos cepas del virus de la influenza equina: A/eq/2 La Plata 93 y A/eq/Argentina/E2345-1/2012. Los títulos obtenidos permitieron clasificar a los equinos en protegidos, parcialmente protegidos y no protegidos. El 57 % y el 59 % de los equinos fueron considerados como no protegidos contra la cepa La Plata 93 y Argentina 2012, respectivamente. El 34 % fue considerado como parcialmente protegido contra la cepa La Plata 93 y el 33 % contra la cepa Argentina 2012. Finalmente, el 9 % y el 8 % de los animales fueron considerados protegidos contra la cepa La Plata 93 y Argentina 2012, respectivamente. Se constató que los animales de mayor edad, con mayor cantidad de dosis de vacunas aplicadas y con la fecha de última vacunación más cercana a la fecha del muestreo, presentaron concentraciones mayores de anticuerpos. Menos del 10 % de los equinos tuvo títulos protectores y un alto porcentaje títulos inferiores a lo requerido para evitar la enfermedad, lo cual implica que existe en Argentina una gran cantidad de equinos que pueden diseminar la enfermedad sin presentar sintomatología.

Palabras claves: influenza equina, vacunación, Argentina

Abstract: The population of sport equines of Argentina frequently transported was analyzed through a two-stage sampling. In this population vaccination against equine influenza is mandatory. Antibodies against two strains of equine influenza virus (A/eq/2La Plata 93 and A/eq/Argentina/E2345-1/2012) were evaluated through the hemagglutination inhibition technique. Based on the titer obtained, horses were classified as protected, partially protected and not protected. Fifty-seven per cent and 59 % of the horses were not protected against La Plata 93 and Argentina 2012 strains, respectively. Thirty-four per cent of the horses were partially protected against La Plata 93 and Argentina 2012 strains, respectively. Finally, 9 % and 8 % of the animals were protected against La Plata 93 and Argentina 2012 strains, respectively. Older animals with more vaccinations and with the last vaccination applied closer to the date of sampling had higher antibody levels. Less than 10 % of the horses had protective titer and a high percentage had insufficient titer to avoid the disease, suggesting that in Argentina a large number of horses can spread the disease without showing clinical signs.

Key words: equine influenza, vaccination, Argentina

Introducción

La influenza equina (IE) es una enfermedad respiratoria viral sumamente contagiosa. En los caballos el agente etiológico es el virus de influenza A, subtipos A equi 1 (H7N7) y equi 2 (H3N8). Los virus H7N7 se consideran extintos. Los virus H3N8 han evolucionado en dos linajes, linaje Americano y linaje Europeo. A su vez el linaje Americano evolucionó en tres sublinajes: Kentucky, Florida y Sudamericano. El linaje predominante es Florida, que se dividió en dos clados antigénicamente diferentes, Clado 1 y Clado 2 (Cullinane & Newton, 2013). El sublinaje Sudamericano también se encuentra dividido en Clado 1 y Clado 2 (Olguin Perglione *et al.*, 2016b).

Los brotes de IE suelen estar asociados a la concentración de los caballos en eventos ecuestres, donde adquieren la enfermedad. Luego la diseminan cuando son trasladados una vez terminado el evento ecuestre (van Maanen & Cullinane, 2002). La medida profiláctica más importante es la aplicación de vacunas (Newton *et al.*, 2000a).

En países endémicos las pérdidas económicas debidas a la enfermedad pueden minimizarse mediante la vacunación específica de caballos con traslados frecuentes (Gildea *et al.*, 2010; Olguin Perglione *et al.*, 2016a;).

La enfermedad puede manifestarse con fiebre, tos seca y áspera seguida de secreción nasal inicialmente serosa, que luego pasa a ser mucopurulenta. En animales vacunados, con inmunidad parcial, se observa que alguno de estos signos puede estar ausentes (Newton *et al.*, 2006). Sin embargo, estos equinos pueden seguir excretando el virus y servir de fuente de infección para otros animales (Cullinane & Newton, 2013).

En la República Argentina, en marzo de 1993, se produjo un brote de IE en los hipódromos de Palermo y de San Isidro, donde enfermaron aproximadamente el 40 % de los equinos en entrenamiento. En octubre de 1994, otro episodio de intensidad menor afectó a los animales de dos años de edad. A fines de mayo de 1995, se notificó otro brote en el hipódromo de San Isidro, con la particularidad de haber afectado en forma variable a los equinos, lo que se atribuyó a los diferentes estados inmunitarios dentro de una población. En el periodo comprendido entre 2011 y 2016, en el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) se recibieron 19 notificaciones de sospechas de influenza equina, con 12 eventos confirmados de la enfermedad y 238 equinos afectados. El último brote confirmado de IE en la Argentina se produjo en 2012, afectó principalmente a los hipódromos de la provincia de Buenos Aires (Azul, La Plata y San Isidro) y de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (Palermo) (Olguin Perglione *et*

al., 2016a) y fue producido por un virus de influenza equina A subtipo A equi 2 (H3N8). Este mismo tipo de virus fue aislado, durante 2015, durante los brotes de influenza equina y casos individuales notificados en China, Francia, Alemania, Irlanda, Malasia, Suecia, Reino Unido y Estados Unidos (OIE, 2016).

En el período del estudio la aplicación de vacuna contra el virus de IE de manera previa a los movimientos de equinos era obligatoria, con excepción de aquellos movilizados con destino a faena. Las vacunas nacionales disponibles en el mercado contenían la cepa A/eq/La Plata/93 y las vacunas importadas contenían la cepa A/eq/Kentucky/1/97.

Dado que se desconoce la situación inmunológica real de la población de equinos de Argentina, el objetivo de este estudio fue estimar la prevalencia de anticuerpos contra IE en una subpoblación específica, como los equinos utilizados para deporte y recreación, y la magnitud de su respuesta humoral.

Materiales y métodos

Información poblacional y marco de muestreo

La población que se analizó fue la conformada por equinos de deporte o recreación de toda la República Argentina los que, de acuerdo a las actividades para las que son utilizados, presentan una frecuencia regular (o alta) de movimientos. En esta población la vacunación es obligatoria de forma previa a los movimientos (Resolución Ex SAGPyA N°617/2005).

Sobre la base de los registros del Sistema Integrado de Gestión de Sanidad Animal (SIGSA) del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), la población en estudio incluyó 1252 establecimientos y 92545 equinos.

Además, se realizó una encuesta para recabar los siguientes datos: edad de los equinos analizados, cantidad de vacunas aplicadas en dichos animales y fecha de aplicación de las vacunas.

Diseño de muestreo

Se realizó un muestreo probabilístico en dos etapas. La primera etapa consistió en la selección aleatoria de establecimientos proporcionalmente a su tamaño (cantidad de equinos por establecimiento) y, la segunda etapa, en la selección aleatoria simple de equinos dentro de cada establecimiento.

Los valores de los parámetros y supuestos propuestos se consignan a continuación.

- Prevalencia esperada: 60 % de animales con anticuerpos contra el virus de IE.

- Tasa de homogeneidad (roh): dado que no se dispone de información previa se elige un nivel desconocido.

- Cantidad de muestras que analizar por establecimiento: 15. Surge sobre la base de aspectos biológicos, epidemiológicos, operativos y de recursos disponibles.

- Intervalo de confianza del 95 %, estándar para este tipo de estudios.

- Error relativo: se fija como valor aceptable de error relativo un 10 %.

De acuerdo con los parámetros y supuestos propuestos, el diseño de muestreo resultó en los valores consignados a continuación.

-Cantidad de animales a sangrar por establecimiento: 15 equinos.

-Establecimientos para analizar: 129.

-Cantidad de muestras totales: 1935.

La toma de muestras estuvo a cargo de los veterinarios locales del SENASA.

Pruebas diagnósticas

Se realizó el diagnóstico mediante la técnica de inhibición de la hemaglutinación (IHA) para dos cepas del virus de la IE subtipo 2 (H3N8): A/eq/La Plata/93 (linaje Americano, sublinaje Sudamericano, Clado 1) que fue aislada en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Plata en 1993, en adelante denominada LP93, y A/eq/Argentina/E2345-1/2012 (Linaje Americano, Sublinaje Florida, Clado 1) que fue aislada en el INTA Castelar en 2012 (Olguin Perglione *et al.*, 2016a), en adelante denominada Argentina 2012. Este diagnóstico se realizó en el Laboratorio Animal del SENASA sobre la base del protocolo descrito por el Centro de Productos Biológicos Veterinarios del Departamento de Agricultura de Estados Unidos y según el manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres de la OIE.

La cepa LP93 fue seleccionada para su análisis, dado que hasta 2014, fecha en la que los laboratorios comenzaron a actualizar las cepas de sus vacunas de IE, estaba contenida en ellas. La cepa Argentina 2012 fue seleccionada para su análisis por haber sido una de las cepas que en 2012 produjo un extenso brote de influenza equina en América del Sur.

Clasificación de los animales

Los animales se clasificaron considerando las siguientes categorías de protección sobre la base de los títulos de anticuerpos obtenidos:

- Protegidos (nivel de protección de infección y clínica): títulos 1/80 y superiores.

- Parcialmente protegidos (nivel de protección clínica): títulos entre 1/20 y 1/40.

- No protegidos (susceptibles): título menor a 1/20 o negativos.

Estas categorías se establecieron sobre la base de los títulos de anticuerpos, asumiendo una correlación entre cierto umbral de concentración de anticuerpos y su capacidad protectora.

Análisis estadístico

Los resultados de la encuesta fueron analizados a fin de evaluar posibles asociaciones entre la edad de los animales, la cantidad de vacunas aplicadas y la fecha de última vacunación con el título de anticuerpos. Los grupos se compararon en relación con la edad y la cantidad de vacunas recibidas a través del test no paramétrico de comparaciones de a pares Kruskal-Wallis. Para comparar diferencias en los grupos con respecto a la fecha de la última vacunación se utilizó la prueba de Chi-cuadrado.

Resultados

Se muestrearon 120 establecimientos y 1677 equinos, obteniendo el siguiente porcentaje de cumplimiento del muestreo (Tabla 1).

Tabla 1. Cumplimiento de muestreo.

	Establecimientos	Equinos
Diseño	129	1935
Muestreados	120	1677
Cumplimiento (%)	93	87

La prevalencia estimada para calcular la cantidad de establecimientos que muestrear fue del 60 %. Los resultados obtenidos arrojaron una prevalencia del 43 % para la cepa LP93 (Tabla 2), que es la que presentó mayor cantidad de equinos con protección (protegidos y parcialmente protegidos).

Tabla 2. Prevalencia e intervalo de confianza para cepa LP93.

Prevalencia	IC 95 % inf	IC 95 % sup	Tasa de homogeneidad
43,23 %	37,23 %	49,24 %	0,42

En la tabla 3 se detallan los resultados por cepa y categoría de protección.

A su vez, se observó que el 95 % de los equinos muestreados presentaban exactamente los mismos títulos de anticuerpos para ambas cepas (Tabla 4).

En las figuras 1 y 2 se observa una cantidad superior de establecimientos con mayor proporción de animales sin protección, así como también que ambas cepas evaluadas presentan prácticamente la misma distribución de sus resultados.

Tabla 3. Datos por cepa y categoría de protección

Categoría de protección	Cepa LP93		Cepa Argentina 2012	
	Cantidad de equinos	%	Cantidad de equinos	%
No protegidos	952	57	990	59
Parcialmente protegidos	566	34	554	33
Protegidos	159	9	133	8
Total general	1677	100	1677	100

Tabla 4. Detalle de resultados agrupados para ambas cepas.

Protección a las dos cepas	Cantidad de equinos	%
No protegidos	951	57
Parcialmente protegidos	519	31
Protegidos	124	7
Total con el mismo título	1594	95
Total analizados	1677	100

Con respecto a las encuestas, solo 37 establecimientos (31 % de los muestreados) respondieron, por lo cual se pudieron analizar los datos correspondientes a 502 animales (30 % de los muestreados).

El promedio de edad de los equinos analizados fue de 6 años, con un rango entre 1 y 25 años.

A través del test de comparaciones de a pares Kruskal-Wallis se compararon los grupos y se observó que no hubo diferencias significativas de edad entre los equinos protegidos (P) y los parcialmente protegidos (PP), pero sí de estos con respecto al grupo de los no protegidos (NP) (Tablas 5, 6, 7 y 8).

Tabla 5. Análisis estadístico de edad y categoría de protección para cepa LP93.

Ranking de medias	Tamaño de muestra
NP	212,5
PP	285,8
P	316,1
Total	502

Estadístico Kruskal-Wallis: 41,7068. $p = 0,0000$

Figura 1: Categoría de protección desagregada por establecimiento y animal muestreado, cepa LP93.

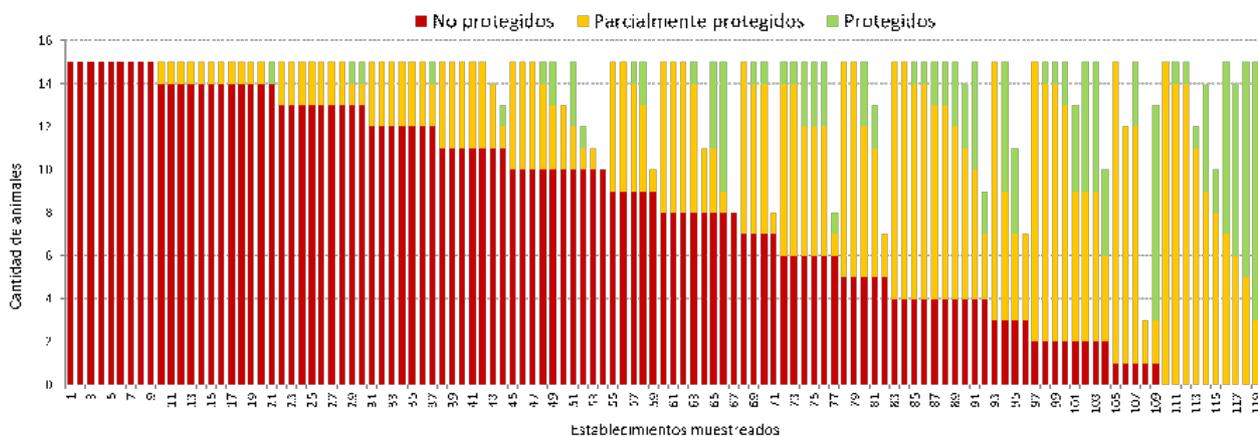


Figura 2: Categoría de protección desagregada por establecimiento y animal muestreado, cepa Argentina 2012.

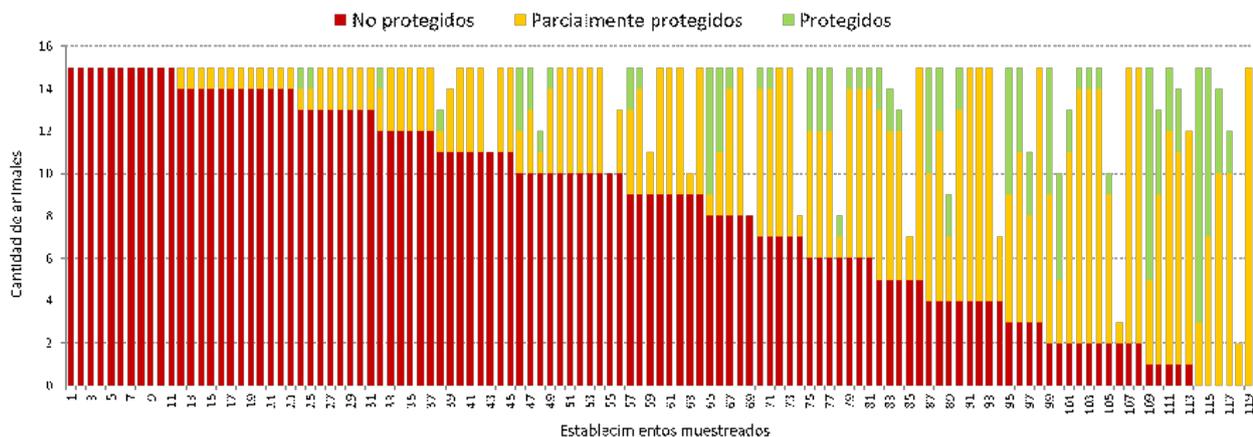


Tabla 6. Test de comparación de pares Kruskal-Wallis para edad y categoría de protección para cepa LP93.

Media	Grupos homogéneos	
PP	316,11	A
P	285,79	A
NP	212,52	B

Valor alfa: 0,05

Valor crítico de z: 2,394

Tabla 7. Análisis estadístico de edad y categoría de protección para cepa Argentina 2012.

	Ranking de medias	Tamaño de muestra
NP	212,5	261
PP	285,8	178
P	316,1	63
Total	351,5	502

Estadístico Kruskal-Wallis: 41,7068.

p= 0,0000

Tabla 8. Test de comparación de pares Kruskal-Wallis para edad y categoría de protección para cepa Argentina 2012.

	Media	Grupos homogéneos
PP	316,11	A
P	285,79	A
NP	212,52	B

Valor alfa: 0,05

Valor crítico de z: 2,394

En la figura 3 se muestra que los animales del grupo NP fueron animales de menor edad (mediana: 4 años) que aquellos que pertenecieron a los grupos PP (mediana: 6,5 años) y P (mediana: 7 años). Estos resultados corresponden a la cepa LP93.

Muy similares resultados se obtuvieron cuando se analizaron los datos por edad entre los grupos NP (mediana: 4 años), PP (mediana: 7 años) y P (mediana: 7 años) respecto a la cepa Argentina 2012 (Figura 4).

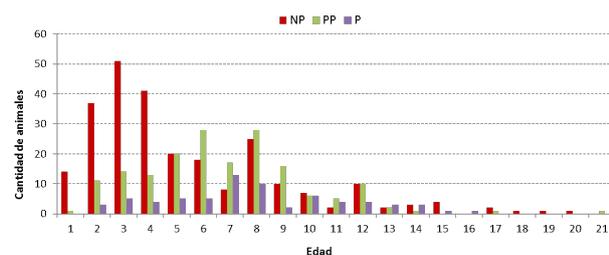


Figura 3. Cantidad de animales distribuidos por edad y categoría de protección sobre la base de las encuestas realizadas. Cepa LP93.

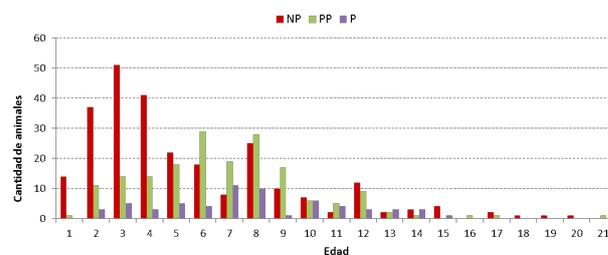


Figura 4: Cantidad de animales distribuidos por edad y categoría de protección sobre la base de las encuestas realizadas. Cepa Argentina 2012.

El mismo análisis se repitió para detectar diferencias significativas entre los tres grupos mencionados y la cantidad de vacunas contra IE aplicadas. Para las dos cepas se detectaron diferencias significativas entre la media del grupo de equinos NP respecto a la media de los grupos P y PP (Tablas 9, 10, 11 y 12).

Tabla 9. Análisis estadístico de cantidad de vacunas aplicadas y categoría de protección para cepa LP93.

	Ranking de medias	Tamaño de muestra
NP	182,7	242
PP	290,9	165
P	290,6	62
Total	235	469

Estadístico Kruskal-Wallis: 75,9551.

p= 0,0000

Tabla 10. Test de comparación de pares Kruskal-Wallis para cantidad de vacunas aplicadas y categoría de protección para cepa LP93.

Media	Grupos homogéneos	
PP	290,86	A
P	290,57	A
NP	182,68	B

Valor alfa: 0,05

Valor crítico de z: 2,394

Tabla 11. Análisis estadístico de cantidad de vacunas aplicadas y categoría de protección para cepa Argentina 2012.

	Ranking de medias	Tamaño de muestra
NP	183,6	246
PP	290,9	169
P	294,2	54
Total	235	469

Estadístico Kruskal-Wallis: 75,8686.

p=0,0000

Tabla 12. Test de comparación de pares Kruskal-Wallis para cantidad de vacunas aplicadas y categoría de protección para cepa Argentina 2012.

	Media	Grupos homogéneos
PP	294,19	A
P	290,91	A
NP	183,60	B

Valor alfa: 0,05

Valor crítico de z: 2,394

En las figuras 5 y 6 se observa que en el grupo NP (LP 93 mediana: 1,5 vacunas; Argentina 2012 mediana: 2 vacunas) se administraron menor cantidad de vacunas que en los grupos PP (LP 93 mediana: 4 vacunas; Argentina 2012 mediana: 4 vacunas) y P (LP 93 mediana: 4 vacunas; Argentina 2012 mediana: 4 vacunas).

Se evaluó también el momento de la última vacunación con respecto al estado inmunitario de los equinos. Dividiendo a la población entre aquellos que según la encuesta recibieron la última vacuna antes del 2015 o directamente no fueron vacunados (grupo A) y los que fueron vacunados por última vez en 2015 (grupo B), se compararon ambos grupos mediante un test de Chi-cuadrado, detectándose diferencias significativas entre ambos grupos ($p < 0,05$). En el grupo A el muestreo detectó mayor cantidad de equinos NP que lo esperado y menos equinos P y PP de lo esperado (Tabla 13). En el grupo B se produjo lo opuesto, detectando el muestreo mayor cantidad de equinos P y PP que lo esperado y menor cantidad de equinos NP de lo esperado (Tabla 14).

Discusión y conclusiones

En un trabajo realizado en la región centro norte de la provincia de Santa Fe en 1999 se estudió la presencia de anticuerpos en una población de equinos de cría extensiva que no se encontraba vacunada contra influenza equina (Pinotti *et al.*,

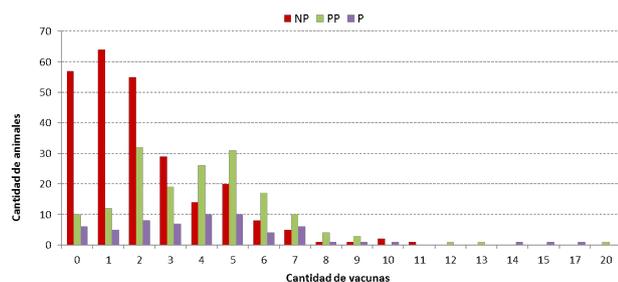


Figura 5. Cantidad de animales distribuidos por cantidad de vacunas aplicadas y categoría de protección sobre la base de las encuestas. Cera LP93.

Tabla 13. Cantidad de animales distribuidos por última fecha de vacunación y categoría de protección sobre la base de las encuestas. Cera LP93.

Vacuación	PP + P	NP	Total parcial	Total general
Grupo A	10 %	25 %	35 %	100 %
Grupo B	39 %	26 %	65 %	

Tabla 14. Cantidad de animales distribuidos por última fecha de vacunación y categoría de protección en base a las encuestas. Cera Argentina 2012.

Vacuación	PP + P	NP	Total parcial	Total general
Grupo A	9 %	25 %	34 %	100 %
Grupo B	39 %	27 %	66 %	

2002). El 23,74 % de los equinos fueron positivos. Esto indica que la circulación del virus de IE en una población cerrada puede generar anticuerpos en un porcentaje un poco menor que los observados en el presente estudio.

Si bien se usaron distintos niveles de corte, los resultados de este estudio pueden compararse con los realizados por Carossino *et al.* (2014). La diferencia en la base de dilución entre ambos estudios se debe al tratamiento previo para la eliminación de posibles inhibidores inespecíficos de la hemaglutinación. En la mencionada investigación, el porcentaje de equinos protegidos y parcialmente protegidos en el hipódromo de Palermo fue de 97 % y 74 % en 2012 y 2013, respectivamente, mientras que para el hipódromo de San Isidro, los porcentajes fueron del 88,5 % y 89 % para los respectivos años. Estos valores resultan significativamente mayores a los obtenidos en nuestro trabajo. Esto puede deberse a la población analizada, ya que Carossino *et al.* (2014) estudiaron dos de los mayores hipódromos de Argentina, mientras que el muestreo presentado en esta publicación tuvo como población en estudio más de 1000 establecimientos en todo el país que poseían equinos de deporte o recreación.

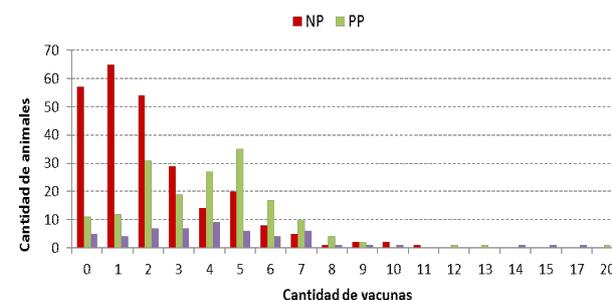


Figura 6. Cantidad de animales distribuidos por cantidad de vacunas aplicadas y categoría de protección sobre la base de las encuestas. Cera Argentina 2012.

Dos de las variables analizadas en la encuesta, cantidad de vacunas recibidas y fecha de la última vacunación, fueron identificadas como factores de riesgo asociados al nivel de títulos de anticuerpos contra IE en potrillos de raza Sangre Pura de Carrera (Newton *et al.*, 2000b). En el modelo de regresión citado la asociación resulta positiva para cantidad de vacunas aplicadas previamente y negativa para fecha de última vacunación. Este modelo está en línea con los resultados de nuestro análisis estadístico, en el que los equinos NP tenían un promedio de vacunas aplicadas significativamente menor que los equinos P y PP. Lo mismo ocurre respecto a la fecha de última vacunación en que el porcentaje de P y PP fue menor (10 %) en el grupo de equinos que habían recibido la última vacuna antes del 2015 o directamente no habían sido vacunados, que en el grupo vacunado por última vez en 2015 (P y PP: 39 %).

Los resultados de la encuesta muestran que los animales protegidos y parcialmente protegidos son de mayor edad que los no protegidos. Esto podría explicarse por la mayor cantidad de vacunas recibidas a lo largo del tiempo. Se espera que estos equinos sean más resistentes a la infección. Sin embargo, está indicado en la bibliografía, que cuanto mayor es la cantidad de vacunas inactivadas aplicadas, se desarrollan más anticuerpos de reacción cruzada, que no mejorarían la calidad de la respuesta inmune (Newton *et al.*, 2006). Por lo tanto, el mayor nivel de protección detectado en animales de mayor edad no sería garantía de una mejor protección inmunitaria.

Con este estudio se identificó que los equinos “protegidos”, es decir, con nivel de protección suficiente para evitar la infección, representan el porcentaje más bajo, siendo del 9 % para la cepa LP93 y del 8 % para la cepa Argentina 2012. Esto indica que existe un bajo porcentaje de animales con niveles de inmunidad adecuados frente a esta enfermedad, ya sea de origen vacunal o por infección natural. Este valor asciende al sumar el grupo de los equinos “parcialmente protegidos”; sin embargo, el porcentaje continúa siendo más bajo que en los equinos que resultaron “no protegidos”.

El 95 % de los equinos muestreados presentaban los mismos niveles de anticuerpos para ambas cepas. Esto podría indicar que la vacuna brinda protección contra la cepa Argentina 2012. Sin embargo, vemos que los equinos no vacunados, vacunados con pocas dosis o vacunados por última vez antes del 2015, también tuvieron anticuerpos contra ambos antígenos analizados. Por lo tanto, no se puede definir si los anticuerpos son producto de la vacuna o de una infección con la cepa Argentina 2012. Es importante considerar que la cepa vacunal (LP 93) y la cepa de campo (Argentina 2012) se encuentran estrechamente relacionadas y comparten epitopes. Además, en 2014

la OIE emitió una recomendación de actualización de cepas vacunales de IE, por lo cual los equinos vacunados en 2015 podrían haber sido inmunizados con vacunas que contuviesen la cepa A/Eq/2/Argentina/E2345-1/2012. Esta actualización se realizó sobre la base de las Conclusiones y Recomendaciones emitidas por el Comité de expertos de la OIE en Influenza Equina en marzo de 2013 (OIE, 2013).

Se observó que los animales de mayor edad, con mayor cantidad de dosis de vacunas aplicadas y con la fecha de última vacunación más cercana a la fecha del muestreo, presentaron niveles de anticuerpos más altos, pero también existe mayor probabilidad de que hayan estado expuestos al virus de influenza equina a campo.

Sin embargo, menos del 10 % de los equinos tuvieron títulos protectores. Por lo tanto, el 90 % restante o no tuvo inmunidad (aproximadamente el 60 %) o tuvo una protección parcial (aproximadamente el 30 %). Esto último conlleva el riesgo de que los animales puedan diseminar la enfermedad sin presentar sintomatología.

Los resultados obtenidos no permiten concluir si el bajo porcentaje de animales con protección es debido a la vacuna misma, a la aplicación o al incumplimiento del cronograma de vacunación. Tampoco es posible diferenciar si la protección en aquellos que presentan inmunidad se debe a la vacunación o a la presencia de anticuerpos debido a una reacción por infección. Para poder realizar un diagnóstico de infección reciente, además de los signos clínicos, se deben obtener muestras pareadas con catorce días de intervalo entre ambas para constatar si hay conversión serológica (aumento en cuatro o más diluciones en el título); esto permitiría diferenciar si los anticuerpos son vacunales o debidos a una infección. Lo que queda claro es que hay un elevado porcentaje de animales que son “vírgenes” inmunológicamente a esta enfermedad y que son susceptibles ante a un posible ingreso del agente.

A partir de los resultados obtenidos, y con el objeto de disminuir la posibilidad de nuevos brotes de la enfermedad, se actualizaron las medidas de control obligatorias en Argentina. Se estableció que todo equino que permanezca o se movilice hacia un remate feria, exposición, establecimiento identificado como hipódromo, club hípico, stud, caballeriza, centro tradicionalista y/o a distintas actividades ecuestres que concentren equinos para trote, pato, polo, salto, doma, jineteada, prueba completa y endurance debe estar vacunado contra influenza equina, y dicha vacunación debe encontrarse vigente. La vigencia de la vacuna contra influenza equina es de tres, seis o más meses, según el tipo de vacuna utilizada, conforme al plazo que el SENASA otorgue en la aprobación de las

distintas marcas y series, que estará determinado por la duración efectiva de la inmunidad demostrada en cada caso (Resolución SENASA N°521/2016).

A futuro, sería adecuado diseñar un estudio que permita evaluar la efectividad de la vacunación y su cumplimiento, ya que los datos de vacunación se obtuvieron mediante encuestas en el momento de tomar las muestras.

Agradecimientos

Muy especialmente a los veterinarios y paratécnicos de las diferentes regiones del SENASA, ya que con su aporte y esfuerzo se logró el cumplimiento del presente trabajo.

Conflicto de intereses

No existe conflicto de intereses.

Bibliografía

Carossino M, Olguin Perglione C, Miguens Soubie A, Vissani A, Becerra L, Duffy SJ, Campodónico R, Arcuri C, Costa A, Zambruno T, Elgue F, Gómez MS, Zaba O, Barrandeguy ME. 2014. Estimación de los niveles de protección contra influenza equina en caballos en entrenamiento y competencia. *La Especie Equina*. 46:36-43.

Cullinane A, Newton JR. 2013. Equine influenza—A global perspective. *Veterinary Microbiology*. 167:205-14. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.03.029.

Gildea S, Arkins S, Cullinane A. 2010. A comparative antibody study of the potential susceptibility of Thoroughbred and non-Thoroughbred horse populations in Ireland to equine influenza virus. *Influenza and Other Respiratory Viruses*. 4(6):363-72. doi: 10.1111/j.1750-2659.2010.00163.x.

Newton JR, Townsend HGG, Wood JLN, Sinclair R, Hannant D, Mumford JA. 2000. Immunity to equine influenza: relationship of vaccine induced antibody in young Thoroughbred race horses to protection against field infection with influenza A/equine-2viruses (H3N8). *Equine Veterinary Journal*. 32(1):65-74 doi: 10.2746/042516400777612116.

Newton JR, Lakhani KH, Wood JLN, Baker DJ. 2000. Risk factors for equine influenza serum antibody titres in young Thoroughbred racehorses given an inactivated vaccine. *Preventive Veterinary Medicine*. 46:129-41. doi: 10.1016/S0167-5877(00)00144-6.

Newton JR, Daly JM, Spenser L, Mumford JA. 2006. Description of the outbreak of equine influenza (H3N8) in the United Kingdom in 2003, during which recently vaccinated horses in Newmarket developed respiratory disease. *Veterinary Record*. 158:185-92. doi: 10.1136/vr.158.6.185.

OIE. OIE Expert surveillance panel on equine influenza vaccine composition. 2013. <http://www.oie.int/doc/ged/D12875.PDF>.

OIE. OIE Expert surveillance panel on equine influenza vaccine composition. 2016. <http://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/informaciones-especificas-y-recomendaciones/gripe-equina/>.

Olguin Perglione C, Gildea S, Rimondi A, Miño S, Vissani A, Carossino M, Cullinane A, Barrandeguy M. 2016. Epidemiological and virological findings during multiple outbreaks of equine influenza in South America in 2012. *Influenza and Other Respiratory Viruses*. 10(1):37-46. doi: 10.1111/irv.12349.

Olguin Perglione C, Golemba MD, Torres C, Barrandeguy M. 2016. Molecular epidemiology and spatio-temporal dynamics of the H3N8 equine influenza virus in South America. *Pathogens*. 5:61-74. doi: 10.3390/pathogens5040061.

Pinotti, M, Occhi, H, Lucca, E, Blainq, L, Luy, D, Gollan, A. 2002. Prevalencia de anticuerpos contra influenza equina en la región centro-norte de la provincia de Santa Fe, Argentina, durante los años 1997-99. *Revista FAVE - Ciencias Veterinarias* 1(2):26-31.

Resolución Ex SAGPyA N°617/2005. Página web de Información Legislativa y Documental del Ministerio de Justicia y Derechos Humanos. <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/105000-09999/108872/norma.htm>.

Resolución SENASA N°521/2016. Página web de Información Legislativa y Documental del Ministerio de Justicia y Derechos Humanos. <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/265000-69999/265486/norma.htm>.

van Maanen C, Cullinane A. 2002. Equine influenza virus infections: an update. *Veterinary Quarterly*. 24(2):79-94. doi: 10.1080/01652176.2002.9695127.

Efecto antimicrobiano de la combinación de cloxacilina con aceite esencial de *Melaleuca armillaris* frente a *Staphylococcus aureus*

Antimicrobial effect of combinations of cloxacillin and essential oil of *Melaleuca armillaris* against *Staphylococcus aureus*

Buldain D^{1,2*}, Buchamer A¹, Marchetti L¹, Aliverti F¹, Borja C¹, Mestorino N¹

¹Laboratorio de Estudios Farmacológicos y Toxicológicos (LEFyT)

²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET). Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP)

*Correo electrónico del autor: dbuldain@fcv.unlp.edu.ar

Resumen: La problemática actual de la resistencia bacteriana, promovida básicamente por el abuso en la utilización de antibióticos, lleva a la necesidad de encontrar alternativas terapéuticas más eficaces para enfrentar las infecciones bacterianas. Los aceites esenciales representan una gran herramienta para enfrentar esta crisis. Nuestro objetivo fue evaluar la interacción farmacodinámica establecida al combinar aceite esencial de *Melaleuca armillaris* con cloxacilina en busca de un efecto sinérgico que maximice la actividad del antibiótico frente a *Staphylococcus aureus*. Cepas de referencia y salvajes de dicha especie fueron enfrentadas al extracto vegetal y al antimicrobiano en forma individual y combinada mediante microdilución en caldo, modificando las condiciones del pH para emular el ambiente subcelular. Se determinó la interacción mediante la técnica de tablero de damas o *checkerboard*, se calculó el índice de concentración fraccionaria inhibitoria y, finalmente, se estableció el índice de actividad antibacteriana de la combinación. Nuestros resultados demuestran una clara actividad antimicrobiana del aceite esencial, que permite reducir las concentraciones mínimas inhibitorias del antibiótico betalactámico para el *S. aureus*. Esta interacción se ve favorecida por la acidificación del medio, lo que permite que menores concentraciones de cloxacilina logren un efecto bactericida, cercano a la erradicación virtual, en presencia de pequeñas cantidades de aceite esencial. Estos hallazgos resultan prometedores para enfrentar infecciones estafilocócicas de difícil resolución.

Palabras clave: *Melaleuca armillaris*, cloxacilina, *Staphylococcus aureus*, resistencia, sinergismo

Abstract: The current problem of bacterial resistance, largely promoted by indiscriminate use of antibiotics, leads to find more effective therapeutic alternatives to combat bacterial infections. Essential oils are a potential tool to deal with this issue. Our objective was to evaluate the pharmacodynamic interaction of *Melaleuca armillaris* essential oil and cloxacillin in search of a synergistic effect that maximizes the activity of the antibiotic against *Staphylococcus aureus*. Reference and wild strains of *S. aureus* were confronted to the essential oil and the antibiotic individually and in combination by microdilution in broth, modifying the pH conditions to emulate the subcellular environment. The interaction was determined by the *checkerboard* technique, the index of inhibitory fractional concentration was calculated and the index of antibacterial activity of the combination was finally established. Our results demonstrate a clear antimicrobial activity of the essential oil, which allows reducing the minimum inhibitory concentrations of cloxacillin for *S. aureus*. This interaction is favored by medium acidification, where lower concentrations of cloxacillin achieved a bactericidal effect, close to virtual eradication, in the presence of small amounts of essential oil. These findings are promising for dealing with staphylococcal infections with a difficult resolution.

Key words: *Melaleuca armillaris*, cloxacillin, *Staphylococcus aureus*, resistance, synergism

Introducción

Los antibióticos constituyen una parte fundamental del tratamiento de las enfermedades infecciosas. El desarrollo de mecanismos evolutivos, por parte de los microorganismos para evadir la acción antibiótica, genera riesgos en la terapia y en la salud, tanto animal como humana. A pesar de que durante años de investigación se han logrado encontrar y desarrollar nuevos fármacos antimicrobianos, se observan aún, y cada vez con mayor frecuencia, situaciones en las que aparecen infecciones difíciles de tratar, ocasionadas por patógenos que se han convertido en resistentes al tratamiento, lo cual se ha incrementado de forma alarmante durante los últimos años (OMS, 2015). Una alternativa para combatir la resistencia bacteriana la representan los extractos vegetales, donde se pueden aprovechar los metabolitos secundarios que las plantas utilizan en su defensa contra microorganismos. Sus compuestos con acción antimicrobiana se encuentran mayoritariamente presentes en los aceites esenciales (AE), que pueden presentarse en uno o más órganos, dependiendo de la especie vegetal. Estos resultan ser el producto final del metabolismo secundario de plantas aromáticas y se conforman fundamentalmente de terpenos con actividad y composición variada de entre 20-60 compuestos (Vega-Portocarrero & López-Malo, 2009).

Se ha observado que los compuestos que conforman la mezcla de un AE presentan efectos sinérgicos potenciándose entre sí. A pesar de que muchos de estos componentes no pueden producir efectos inhibidores significativos cuando son utilizados solos, si se usan en combinación con fármacos convencionales, el efecto logrado supera la actividad individual y produce mejoras en la acción antimicrobiana (Gibbons et al., 2003).

Melaleuca armillaris es una de las plantas del género *Melaleuca* sp. más ampliamente cultivadas, cuyo AE, aún poco estudiado, debido a la presencia de 1,8-cineol entre sus principales componentes, se transforma en una alternativa terapéutica con prometedoras acciones farmacológicas (Chabir et al., 2011). Se encontró actividad inhibitoria, *in vitro*, frente a especies bacterianas como *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Amri et al., 2012).

S. aureus es un patógeno de importancia en salud animal y humana. La convivencia con animales portadores de estos microorganismos puede generar infecciones ocasionadas por cepas que han incrementado su resistencia a diversos antibióticos. Las infecciones e intoxicaciones alimentarias continúan representando graves problemas en salud pública. A lo dicho debemos agregar la capacidad de supervivencia a nivel intracelular que presenta el *S. aureus*. El

tratamiento antibacteriano frente a microorganismos capaces de mantenerse y prosperar en el medio intracelular nos enfrenta a un reto de grandes proporciones, ya que las bacterias en este estado son especialmente refractarias a los mecanismos inmunes. La pobre acción intracelular de los antimicrobianos posibilita la supervivencia de los microorganismos y predispone el camino para la selección de cepas resistentes. Estas consideraciones nos incitan a desarrollar el conocimiento con miras hacia el control de infecciones intracelulares, para lo cual los AE podrían tener importancia por su lipofilia y capacidad de permeabilizar las membranas celulares.

La cloxacilina (CLOX) es un antimicrobiano del grupo de los betalactámicos con buena actividad sobre *S. aureus* y de amplio uso en medicina veterinaria. Estos compuestos mantienen su actividad a pH 5 (Barcia-Macay et al., 2006), lo cual es importante por la capacidad de este patógeno de permanecer dentro de los fagolisosomas, donde el pH es cercano a 5,5. El pH ácido ocasiona un cambio conformacional en la proteína diana de acción (PBP2a), aumentando la afinidad de su centro catalítico por el betalactámico (Mensa et al., 2013).

Existe evidencia documentada que el AE de *M. armillaris* en forma pura tiene actividad antibacteriana *in vitro* frente a múltiples microorganismos (Amri et al., 2012). Esto permite suponer que si se combina con un fármaco antimicrobiano en sistemas sinérgicos, podrían optimizarse los resultados, incluso frente a microorganismos resistentes a los tratamientos convencionales. Hasta el momento, no hemos encontrado referencias que indiquen el uso del AE de *M. armillaris* como potenciador de antibióticos utilizados en el tratamiento de infecciones microbianas, particularmente contra cepas de *S. aureus*. Por ello en este trabajo nos propusimos estudiar la posible existencia de un efecto sinérgico entre el AE de *M. armillaris* y la CLOX frente a *S. aureus*.

Materiales y métodos

Obtención del aceite esencial de *M. armillaris*

Se recolectaron hojas y ramas herbáceas de plantas de *M. armillaris* en la localidad de Coronel Brandsen, provincia de Buenos Aires, durante el mes de julio. Las mismas se sometieron a destilación por arrastre de vapor de agua, en un equipo especialmente preparado (Figura 1). Para la extracción de AE se utilizaron 26,12 kg de hojas y ramas herbáceas. El proceso duró 4,5 h. El AE obtenido se secó con sulfato de sodio anhidro y se guardó en frascos de vidrio color ámbar en heladera a 4 °C. Se obtuvieron muestras del espécimen vegetal utilizado, que se depositaron en el Herbario LPAG de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP (Holmgren et al., 1990).

Figura 1. Destilador de aceites esenciales por arrastre de vapor.



Staphylococcus aureus

El estudio se llevó a cabo usando 3 cepas salvajes de *S. aureus*. La cepa de referencia *S. aureus* ATCC 29213 se utilizó como control de calidad. Las cepas salvajes fueron obtenidas a partir de aislamientos realizados en vacas Holstein portadoras de mastitis subclínica. Estas fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas de rutina, tinción de Gram, pruebas de coagulasa y catalasa, desarrollo de β -hemólisis, fermentación de glucosa y crecimiento en medio salino (7,5 %).

Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de CLOX y del AE de *M. armillaris* mediante microdilución en caldo

Para determinar la CIM de CLOX se utilizaron placas de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos con caldo Mueller Hinton (MH) a pH 7,4, pH 6,5 y pH 5. El rango de concentraciones evaluado fue de 256 a 0,007 $\mu\text{g/ml}$. Se siguieron las pautas establecidas por la CLSI (2009) en su documento M31-A3.

Para la determinación de la CIM del AE se preparó el caldo MH agregando Tween® 80 al 0,5 % para mejorar la disolución de la esencia a los 3 pH mencionados para CLOX. Se probaron concentraciones desde 50 $\mu\text{l/ml}$ hasta 0,1 $\mu\text{l/ml}$.

En ambos casos, cada pocillo fue inoculado con una concentración bacteriana final de 5×10^5 UFC/ml. Se incubó a 37 °C en estufa durante 18-24 h y se estableció como CIM la primera concentración en la que no se observó la formación de botón de crecimiento ni turbidez. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado y en todos los casos se utilizaron controles positivos y negativos con caldo MH conteniendo Tween® 80 al 0,5 %.

Determinación de la CIM de la combinación CLOX/AE de *M. armillaris*

Se evaluaron combinaciones del antibiótico y del extracto vegetal (en placas de microtitulación de 96 pocillos, con caldo MH con Tween® 80 al 0,5 % a pH 7,4, 6,5 y 5) frente a los aislados de *S. aureus* y a la cepa de referencia, mediante la técnica de tablero de damas o checkerboard (Grzybowska *et al.*, 2004). El inóculo bacteriano utilizado fue de 5×10^5 UFC/ml por pocillo. Se realizó la incubación a 37 °C durante 18-24 h. Se determinó el índice de concentración fraccionaria inhibitoria (ICF) según la siguiente ecuación:

$$[(A) / (CIM)a] + [(B) / (CIM)b] = ICF$$

Donde (A) es la CIM de CLOX en combinación con el AE; (B) es la CIM del AE en la mezcla con CLOX; (CIM)a es la CIM del antimicrobiano solo y (CIM)b es la CIM del AE solo. Se consideró sinergismo (S) si $ICF \leq 0,5$; sinergismo parcial o bajo (SP) si $0,5 < ICF < 1$; indiferencia o adición (I) si $1 \leq ICF < 2$ y antagonismo (A) cuando $ICF \geq 2$.

Evaluación del índice de actividad antibacteriana de la combinación AE/CLOX

A partir de aquellas combinaciones que arrojaran los menores valores de ICF, tomadas como valor CIM de la mezcla, se evaluó el índice de actividad antibacteriana (*E*). El índice *E* se cuantificó como la diferencia entre los valores \log_{10} del número de bacterias viables (UFC/ml) al inicio (n_{t_0}) y al final del ensayo ($n_{t_{24}}$), según la siguiente ecuación: $E = n_{t_{24}} - n_{t_0}$. Para ello se prepararon 6 tubos con 1 ml de volumen final conteniendo la mezcla AE/CLOX (control sin antimicrobianos, 0,5, 1, 2, 4 y 8 veces la CIM de la mezcla), para luego incubar a 37 °C y obtener muestras a las 0, 2, 4, 8, 12 y 24 h, para construir curvas de muerte bacteriana mediante recuento de bacterias en placa.

Para evaluar *E*, se aplicaron tres puntos de corte teóricos (Sidhu *et al.*, 2011): a) efecto bacteriostático: $E = 0$; no hay cambios en el valor de n_{t_0} ; b) efecto bactericida: $E = -3$; hay reducción de $\geq 3 \log_{10}$ de n_{t_0} y c) efecto de erradicación virtual de bacterias: $E = -4$; hay reducción de $\geq 4 \log_{10}$ (99,99 %) respecto del \log de n_{t_0} .

Los resultados obtenidos fueron graficados utilizando el programa GraphPad Prism 6 a fin de obtener curvas *E* vs. \log_{10} (concentración de CLOX). Los ensayos fueron realizados por triplicado y las cepas salvajes fueron agrupadas obteniéndose una $n=3$.

Resultados

Las cepas utilizadas en este estudio fueron aquellas identificadas como la especie *S. aureus* luego de caracterizarlas bioquímicamente, dando como

resultados cepas Gram +, coagulasa +, catalasa +, β-hemolíticas, fermentadoras de glucosa y con crecimiento en medio salino (7,5 %).

La CIM de la CLOX obtenida para *S. aureus* ATCC 29213 a pH 7,4 fue de 0,125 µg/ml, lo cual es acorde a las recomendaciones de la CLSI (2009). Las 3 cepas salvajes (denominadas como SA13, SA96 y SA139) presentaron una CIM de 0,5 µg/ml a pH 7,4. En todos los casos se observó un descenso de esta concentración al acidificar el medio de cultivo (Tabla 1).

En cuanto al AE de *M. armillaris*, para *S. aureus* ATCC 29213, la CIM fue de 25 µl/ml, mientras que para las 3 cepas salvajes fue de 12,5 µl/ml. Estos valores

disminuyeron ligeramente con la acidez del medio de cultivo (Tabla 2).

En la tabla 3 se presentan los resultados obtenidos al combinar la CLOX con el AE a los 3 valores de pH mencionados y los menores valores de ICF hallados.

Con la evaluación del índice de actividad antibacteriana se pudo comparar la incidencia del AE en la actividad de la CLOX, además del efecto causado por la variación del pH. Esto se observa en las tablas 4, 5, 6 y en las figuras 2 y 3.

Aquí se observa cómo, al acidificar el medio, se potencia la actividad antimicrobiana de la CLOX

Tabla 1. Valores de concentración inhibitoria mínima de cloxacilina obtenidos para las 4 cepas a pH 7,4, 6,5 y 5.

Cepa	CIM pH 7,4	CIM pH 6,5	CIM pH 5
ATCC 29213	0,125 µg/ml	0,062 µg/ml	0,031µg/ml
SA 13	0,5 µg/ml	0,125 µg/ml	0,031µg/ml
SA 96	0,5 µg/ml	0,125 µg/ml	0,031µg/ml
SA 139	0,5 µg/ml	0,125 µg/ml	0,031µg/ml

CIM: concentración inhibitoria mínima

Tabla 2. Valores de concentración inhibitoria mínima del aceite esencial de *M. armillaris* obtenidos para las 4 cepas a pH 7,4; 6,5 y 5.

Cepa	CIM pH 7,4	CIM pH 6,5	CIM pH 5
ATCC 29213	25,0 µl/ml	25,0 µl/ml	12,50 µl/ml
SA 13	12,5 µl/ml	12,5 µl/ml	6,25 µl/ml
SA 96	12,5 µl/ml	12,5 µl/ml	6,25 µl/ml
SA 139	12,5 µl/ml	12,5 µl/ml	6,25 µl/ml

CIM: concentración inhibitoria mínima

Tabla 3. Índices de concentración fraccionaria obtenidos para la combinación aceite esencial/cloxacilina en diferentes condiciones de pH vs. concentraciones inhibitorias mínimas individuales.

Cepa	pH 7,4				pH 6,5				pH 5			
	CIM AE µl/ml	CIM CLOX µg/ml	CIM AE/CLOX (µl/ml)/(µg/ml)	ΣICF	CIM AE µl/ml	CIM CLOX µg/ml	CIM AE/CLOX (µl/ml)/(µg/ml)	ΣICF	CIM AE µl/ml	CIM CLOX µg/ml	CIM AE/CLOX (µl/ml)/(µg/ml)	ΣICF
ATCC 29213	25	0,125	25/0,03	0,75	25	0,062	0,62/0,007	0,36	12,5	0,031	3,1/0,0035	0,36
13	12,5	0,5	6,25/0,125	0,62	12,5	0,125	12,5/0,015	1,12	6,25	0,031	3,1/0,0035	0,61
139	12,5	0,5	6,25/0,125	0,62	12,5	0,125	12,5/0,015	1,12	6,25	0,031	3,1/0,0035	0,61
96	12,5	0,5	6,25/0,125	0,62	12,5	0,125	12,5/0,015	1,12	6,25	0,031	3,1/0,0035	0,61

ICF: índices de concentración fraccionaria; AE/CLOX: aceite esencial/cloxacilina; CIM: concentración inhibitoria mínima

Tabla 4. Índices de actividad bacteriana (E) con su desvío estándar (DE) para la CLOX sola y en combinación con AE (AE/CLOX) a diferentes concentraciones (CIM) para *S. aureus* ATCC 29213 (n=3) y para *S. aureus* salvajes (n=3), a pH 7,4.

CIM	<i>S. aureus</i> ATCC 29213 pH 7,4				<i>S. aureus</i> salvajes pH 7,4			
	CLOX (µg/ml)	E ± DE	CLOX/AE (µg/ml)/(µl/ml)	E ± DE	CLOX (µg/ml)	E ± DE	CLOX/AE (µg/ml)/(µl/ml)	E ± DE
0,5	0,062	6,50 ± 0,04	0,015/12,5	1,07 ± 0,06	0,25	6,69 ± 0,71	0,062/3,13	0,15 ± 0,07
1	0,125	1,34 ± 0,15	0,031/25	-1,25 ± 0,09	0,5	0,13 ± 0,30	0,125/6,25	-1,94 ± 0,10
2	0,25	-1,10 ± 0,12	0,062/50	-3,83 ± 0,06	1	-2,82 ± 0,08	0,25/12,5	-3,66 ± 0,13
4	0,5	-3,05 ± 0,08	0,125/100	-3,77 ± 0,09	2	-3,12 ± 0,21	0,5/25	-3,78 ± 0,14
8	1	-3,46 ± 0,14	0,25/200	-3,76 ± 0,08	4	-3,31 ± 0,39	1/50	-3,77 ± 0,15

E: índice de actividad bacteriana; DE: desvío estándar; CLOX: cloxacilina, AE: aceite esencial; CIM: concentración inhibitoria mínima

frente a *S. aureus* (tanto para la cepa de referencia como para las cepas salvajes). Al descender el pH se requieren menores concentraciones de antibiótico para obtener un valor E menor a -3 , indicando un efecto bactericida. En las figuras 2 y 3 se puede ver cómo la presencia del AE favorece el accionar de la CLOX, ya que se alcanzan valores de E menores con concentraciones más bajas del antibiótico en comparación con los resultados obtenidos para CLOX sola. En la cepa

de referencia ATCC 29213 se logra alcanzar un efecto bactericida muy cercano a la erradicación virtual, dado que los valores de E son cercanos a -4 . Esto se observa con concentraciones de 2, 4 y 8 veces la CIM de CLOX en la mezcla, a los 3 pH evaluados (Figura 2).

En los aislamientos salvajes, el comportamiento fue similar al observado para la cepa de referencia (Figura 3).

Tabla 5. Índices de actividad bacteriana (E) con su desvío estándar (DE) para la CLOX sola y en combinación con AE (AE/CLOX) a diferentes concentraciones (CIM) para *S. aureus* ATCC 29213 ($n=3$) y para *S. aureus* salvajes ($n=3$) a pH 6,5.

CIM	<i>S. aureus</i> ATCC 29213 pH 6,5				<i>S. aureus</i> salvajes pH 6,5			
	CLOX		CLOX + AE		CLOX		CLOX + AE	
	CLOX ($\mu\text{g/ml}$)	$E \pm \text{DE}$	CLOX/AE ($\mu\text{g/ml}$)/($\mu\text{l/ml}$)	$E \pm \text{DE}$	CLOX ($\mu\text{g/ml}$)	$E \pm \text{DE}$	CLOX/AE ($\mu\text{g/ml}$)/($\mu\text{l/ml}$)	$E \pm \text{DE}$
0,5	0,031	$1,96 \pm 0,12$	0,015/12,5	$1,04 \pm 0,04$	0,062	$2,67 \pm 0,39$	0,007/6,25	$0,21 \pm 0,14$
1	0,062	$0,34 \pm 0,15$	0,031/25	$-2,94 \pm 0,05$	0,125	$0,43 \pm 0,05$	0,015/12,5	$-2,25 \pm 0,28$
2	0,125	$-2,80 \pm 0,12$	0,062/50	$-3,95 \pm 0,09$	0,25	$-2,84 \pm 0,16$	0,031/25	$-2,97 \pm 0,09$
4	0,25	$-3,41 \pm 0,04$	0,125/100	$-3,90 \pm 0,10$	0,5	$-3,13 \pm 0,23$	0,062/50	$-3,11 \pm 0,06$
8	0,5	$-3,77 \pm 0,05$	0,25/200	$-3,89 \pm 0,07$	1	$-3,22 \pm 0,03$	0,125/100	$-3,35 \pm 0,24$

Tabla 6. Índices de actividad bacteriana (E) con su desvío estándar (DE) para la CLOX sola y en combinación con AE (AE/CLOX) a diferentes concentraciones (CIM) para *S. aureus* ATCC 29213 ($n=3$) y para *S. aureus* salvajes ($n=3$), a pH 5.

CIM	<i>S. aureus</i> ATCC 29213 pH 5				<i>S. aureus</i> salvajes pH 5			
	CLOX		CLOX + AE		CLOX		CLOX + AE	
	CLOX ($\mu\text{g/ml}$)	$E \pm \text{DE}$	CLOX/AE ($\mu\text{g/ml}$)/($\mu\text{l/ml}$)	$E \pm \text{DE}$	CLOX ($\mu\text{g/ml}$)	$E \pm \text{DE}$	CLOX/AE ($\mu\text{g/ml}$)/($\mu\text{l/ml}$)	$E \pm \text{DE}$
0,5	0,015	$4,02 \pm 0,05$	0,0016/6,25	$-0,59 \pm 0,07$	0,015	$3,13 \pm 0,54$	0,0015/3,1	$-1,30 \pm 0,31$
1	0,031	$1,35 \pm 0,07$	0,0035/12,5	$-2,09 \pm 0,05$	0,031	$0,92 \pm 0,03$	0,0035/6,25	$-1,96 \pm 0,12$
2	0,062	$-2,79 \pm 0,04$	0,007/25	$-3,90 \pm 0,07$	0,062	$-2,90 \pm 0,03$	0,007/12,5	$-2,89 \pm 0,05$
4	0,125	$-3,13 \pm 0,16$	0,015/50	$-3,84 \pm 0,08$	0,125	$-3,01 \pm 0,13$	0,015/25	$-3,44 \pm 0,23$
8	0,25	$-3,37 \pm 0,12$	0,031/100	$-3,81 \pm 0,05$	0,25	$-3,43 \pm 0,44$	0,031/50	$-3,49 \pm 0,17$

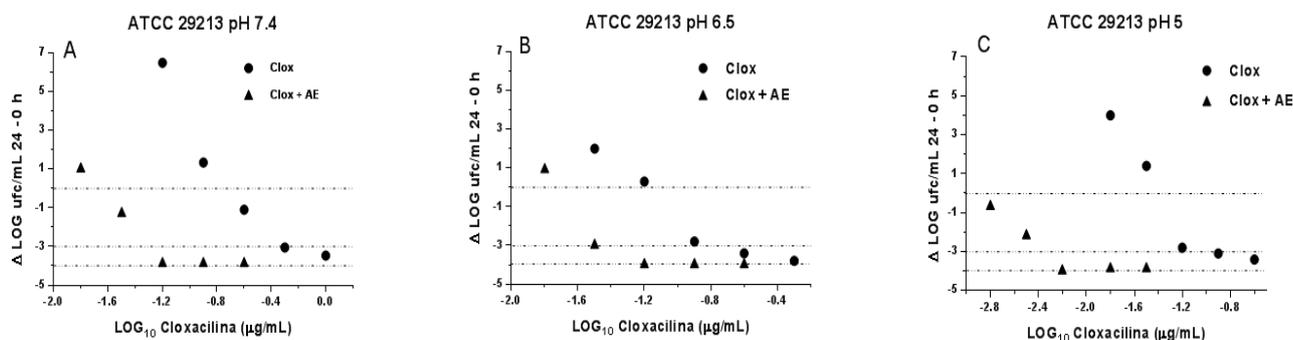


Figura 2. Representación gráfica del efecto antibacteriano (E : $\Delta \log \text{UFC/ml } 24 - 0 \text{ h}$) de cloxacilina frente a *S. aureus* ATCC 29213 ($n=3$) a pH 7,4 (a), 6,5 (b) y 5 (c) en presencia y ausencia de aceite esencial de *M. armillaris*.

Discusión y conclusiones

Los AEs son mezclas complejas cuyas propiedades antimicrobianas han sido ampliamente estudiadas para muchas especies vegetales y resultan ser un gran recurso para combinar con antibióticos que han disminuido su efectividad frente a microorganismos (Yap et al., 2014).

El AE de *M. armillaris* utilizado solo en este estudio presentó actividad inhibitoria frente a *S. aureus*. Su CIM frente a *S. aureus* ATCC 29213 fue de 25 µl/ml a pH 7,4 y disminuyó a la mitad a pH 5. Esta disminución, en un factor de dos, también se observó para los aislamientos salvajes. Dichos resultados marcan una importante actividad antibacteriana, la cual también fue determinada por Amri et al. (2012).

La capacidad de los AEs de potenciar el efecto de antibióticos frente a especies bacterianas es un concepto nuevo. El AE de *Pelargonium graveolens* logró reducir la dosis mínima eficaz de norfloxacin frente a *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli* y *S. aureus* (Rosato et al., 2007). Rodrigues et al. (2009) informaron que el AE de hojas de *Croton zehntneri* es capaz de potenciar la actividad de gentamicina en un 42,8 % frente a *P. aeruginosa* a través del contacto gaseoso, lo que sugiere que el aceite posee un potencial para ser utilizado como coadyuvante en la terapia antimicrobiana. En nuestros resultados se observa un efecto antimicrobiano claro para la combinación AE/CLOX, ya que se obtuvieron valores de ICF que marcan la presencia de sinergismo entre ellos al enfrentarlos con cepas de *S. aureus*, logrando disminuir notoriamente la concentración del antibiótico en presencia del AE. Este efecto se mantuvo al disminuir el pH del medio de 7,4 a 5, permitiendo bajar aún más la cantidad de CLOX necesaria para lograr la inhibición del microorganismo.

La actividad conjunta del AE de *M. armillaris* y la CLOX, utilizados en nuestro trabajo, se evidenció también en el efecto bactericida, establecido por el índice *E*. El descenso del inóculo bacteriano inicial -log₁₀ (UFC/ml)- en un factor de 3 en 24 horas, marca actividad bactericida; esto se observó tanto para la CLOX sola como para la mezcla. Sin embargo, la

concentración del antimicrobiano en presencia del AE fue claramente menor y el *E* obtenido fue más cercano al efecto de erradicación virtual (*E*=-4) que la concentración necesaria cuando se aplica el antibiótico betalactámico solo. En un estudio realizado por Nascimento et al. (2007) se evaluó el AE de *Eremanthus erythropappus* en combinación con ampicilina (antibiótico betalactámico) frente a *S. aureus*, logrando obtener un efecto sinérgico bactericida tras una incubación de 24 horas.

Al combinar el AE de *M. armillaris* con CLOX se logró disminuir la concentración del antibiótico necesaria para inhibir al *S. aureus*, incluso modificando el pH del medio, lo cual es importante para el tratamiento de infecciones intracelulares por la acidez del fagolisosoma (donde se logra internalizar el *S. aureus*) respecto del medio extracelular. Esto se refleja también en la actividad bactericida logrando un efecto cercano a la erradicación virtual. Se obtuvieron resultados prometedores frente al tratamiento de infecciones estafilocócicas. Este hallazgo se transforma en una valiosa alternativa para el tratamiento de infecciones estafilocócicas persistentes.

Agradecimientos

Los autores agradecen al CONICET por la financiación parcial mediante la beca de doctorado 2016-2021. Este trabajo es parcialmente financiado por el LEFyT y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (ANP-CyT) (PICT 2015-831).

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Bibliografía

Amri I, Mancini E, De Martino L, Marandino A, Lamia H, Mohsen H, Bassem J, Scognamiglio M, Reverchon E, De Feo V. 2012. Chemical composition and biological activities of the essential oils from three *Melaleuca* species grown in Tunisia. International Journal of Molecular Science. 13:16580-91. doi: 10.3390/ijms131216580.

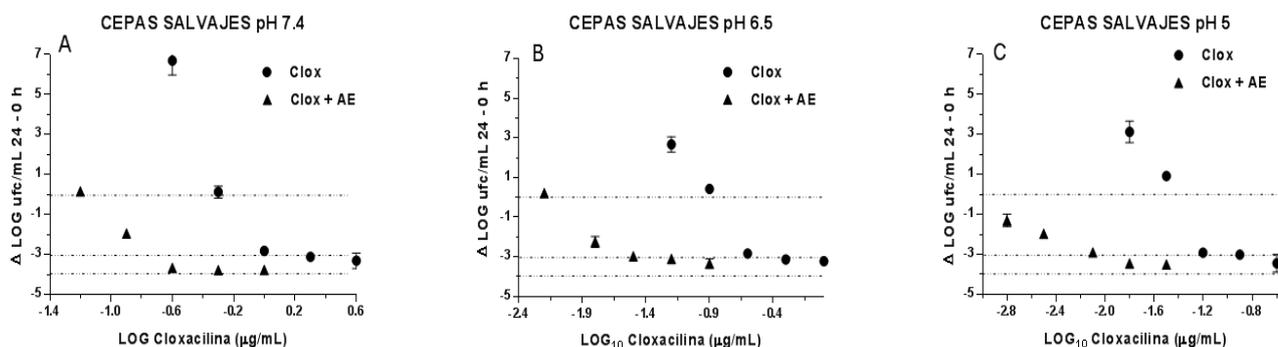


Figura 3. Representación gráfica del efecto antibacteriano (*E*: Δ log UFC/ml 24 – 0 h) de cloxacilina frente a cepas de *S. aureus* salvajes (n=3) a pH 7,4 (a), 6,5 (b) y 5 (c) en presencia y ausencia de AE de *M. armillaris*.

Barcia-Macay M, Seral C, Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM, Van Bambeke F. 2006. Pharmacodynamic evaluation of the intracellular activities of antibiotics against *Staphylococcus aureus* in a model of THP-1 macrophages. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 50:841-51. doi: 10.1128/AAC.02609-12.

Chabir N, Romdhane M, Valentin A, Moukarzel B, Marzoug HN, Brahim NB, Mars M, Bouajila J. 2011. Chemical study and antimalarial, antioxidant, and anticancer activities of *Melaleuca armillaris* (Sol Ex Gateau) Sm essential oil. *Journal of Medicinal Food*. 14:1383-8. doi: 10.1089/jmf.2010.0168.

Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). 2009. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria isolated from Animals; Nineteenth Informational Supplement. Clinical Laboratory Standard Institute. Wayne, Pennsylvania, EE.UU.

Gibbons S, Oluwatuyi M, Veitch NC, Gray AI. 2003. Bacterial resistance modifying agents from *Lycopus europaeus*. *Photochemistry*. 62(1):83-7. doi: 10.1016/S0031-9422(02)00446-6.

Grzybowska W, Banaszczyk-Ru M, Wójcik A, Tyski S. 2004. Comparison of checkerboard and time-kill methods for the analysis of two antibiotics combined. *Medycyna Doswiadczalna Mikrobiologia*, 56(4):391-403.

Holmgren PK, Holmgren NH, Barnett LC. 1990. Index Herbariorum. The herbaria of the world. 8^oEd. New York Botanical Gardens, Bronx, New York, EE.UU.

Mensa J, Soriano A, Llinares P, Barberán J, Montejo M, Salavert M, Alvarez Rocha L, Maseda E, Moreno A, Pasquau J, Gómez J, Parra J, Candel J, Azanza JR, García JE, Marco F, Soy D, Grau S, Arias J, Fortun J, de Alarcón CA, Picazo J. 2013. Guía de tratamiento antimicrobiano de la infección por *Staphylococcus aureus*. *Revista Española de Quimioterapia*. 26(1):1-84.

Nascimento AM, Brandão MG, Oliveira GB, Fortes IC, Chartone-Souza E. 2007. Synergistic bactericidal activity of *Eremanthus erythropappus* oil or beta-bisabolene with ampicillin against *Staphylococcus aureus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 92(1):95-100. doi: 10.1007/s10482-006-9139-x.

Rodrigues FF, Costa JG, Coutinho HD. Synergy effects of the antibiotics gentamicin and the essential oil of *Croton zehntneri*. 2009. *Phytomedicine*. 16(11):1052-5. doi: 10.12691/ajmr-4-1-2.

Rosato A, Vitali C, De Laurentis N, Armenise D, Antonietta Milillo M. 2007. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with norfloxacin. *Phytomedicine*. 14(11):727-32. doi: 10.1016/j.phymed.2007.01.005.

Sidhu P, Landoni M, Aliabadi F, Lees P. 2011. PK-PD integration and modeling of marbofloxacin in sheep. *Research in Veterinary Science*. 88:134-41. doi:10.1016/j.rvsc.2009.05.013.

OMS. Resistencia a los antimicrobianos. Nota descriptiva N°194. Abril de 2015. [ONLINE] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>. [Consultado: 16/06/2016].

Vega-Portocarrero E, López-Malo A. 2009. Agentes antimicrobianos presentes en especies y hierbas. *Temas selectos de ingeniería en alimentos*. 3(1):85-95.

Yap Polly Soo, Yiap Beow Chin, Ping Hu Cai, Lim Swee Hua. 2014. Essential oils. A new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. *The Open Microbiology Journal*. 8:6-14. doi: 10.2174/1874285801408010006.

Carbunco. Prevención de la enfermedad

Anthrax. Prevention of the disease

Bernagozzi, JA¹, Barragán JH¹, Anselmino F¹, Bernagozzi ME²

¹Cátedra de Inmunología II. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata

²Profesional independiente

Correo electrónico del autor: jorgeberna22@gmail.com

Resumen: Este trabajo revisa las alternativas para la prevención del carbunco, desde la vacuna desarrollada por Pasteur hasta las actuales. Así, se describen diferentes tipos de vacunas (basadas en el antígeno protector, en esporos inactivados, en plásmidos, entre otras) y los efectos que estas producen.

Palabras clave: *Bacillus anthracis*, factores de patogenicidad, toxinas, inmunopatogenia, vacunas

Abstract: This work reviews the alternatives used for prevention of carbunco, from the vaccine developed by Pasteur up to current ones. Thus, different types of vaccines (based on protective antigen, inactivated spores, or plasmids) and their effects are described.

Key words: *Bacillus anthracis*, pathogenic factors, toxins, immunopathogenicity, vaccines

Introducción

El carbunco, carbunco bacteridiano, carbón, grano malo o *ántrax* es una enfermedad conocida desde la antigüedad. Fue mencionada por Hipócrates, quien describió ciertas lesiones cutáneas y le dió el nombre de anthrax, debido a su aspecto (del griego: carbón). Casimir Davaines, médico francés, en 1850, describió por primera vez el agente etiológico al observarlo en la sangre de carneros infectados (Geison, 1995; Kauffman, 2005; Schaible, 2005; Tournier *et al.*, 2009). En 1876, Robert Koch lo aisló en estado puro y lo clasificó, denominándolo *Bacillus anthracis* (Carter, 1985; Davis *et al.*, 1996; Geison, 1995). Koch, además, entre 1880 y 1881 registró, por primera vez, el uso exitoso de una vacuna a base celular, la que permitió luchar con éxito contra las epizootias producidas por el *Bacillus anthracis*.

Prevención de la enfermedad: vacunas

Pasteur, Koch y otros microbiólogos contemporáneos habían observado que cultivos envejecidos o muertos por calor de diversas bacterias, cuando eran inoculados a animales susceptibles, lejos de producir la enfermedad, protegían a éstos de la posterior descarga de las formas patógenas de las mismas (Tizard, 2009). Pasteur aplicó con *B. anthracis* la misma técnica que utilizaba en la elaboración de otras vacunas bacterianas, sometiendo el bacilo a temperaturas más elevadas de cultivo y obteniendo una cepa modificada que utilizó como vacuna. Erroneamente supuso que la patogenicidad de la misma se había reducido o atenuado. Las vacunas comerciales para prevenir el carbunco datan de 1881 y se basaron en las pruebas realizadas por Pasteur en Pouilly le-Fort con esta cepa "atenuada" por calentamiento (Davis *et al.*, 1996; Geison, 1995).

La primera dosis aplicada a los animales consistía en cultivos de *B. anthracis* atenuados mediante incubación a 42-43°C, durante 15-20 días. Esta cepa es conocida como Pasteur I, patógena para ratones y cobayos. La segunda dosis, 2 semanas después, contenía cultivos incubados a 42-43°C durante solamente 10-12 días, por lo tanto, menos atenuados. Esta cepa es la denominada Pasteur II, con un grado mayor de patogenicidad que la anterior. Pasteur creyó en ese entonces haber atenuado la patogenicidad de la bacteria. Pero en realidad este mantenimiento de la cepa a temperaturas más elevadas, denominadas "disgenésicas", ocasiona la pérdida de, al menos, diez plásmidos responsables de la producción de antígeno protector (AP), factor edematoso (FE) y factor letal (FL) (Blaustein *et al.*, 1989; Sterne, 1937).

A la luz de los conocimientos actuales podemos afirmar que no se trataba de una verdadera atenuación, sino que, bajo esas condiciones de crecimiento,

algunos microorganismos perdían el plásmido con capacidad de producir la toxina, quedando como remanente una baja cantidad de bacilos que lo conservaban y mantenían su capacidad toxigénica intacta. Estos bacilos con aptitud para producir toxinas habrían sido los potenciales inductores de la inmunidad.

Después de las investigaciones de Pouilly le-Fort, la vacuna de Pasteur adquirió una excelente reputación que determinó que su uso se extendiera ampliamente por Europa y Sudamérica por alrededor de 50 años. Si bien la vacuna propuesta por Pasteur fue una revolución para su época y una solución al problema del carbunco, con el devenir de los años y la masificación de su uso, fueron apareciendo diversos inconvenientes que podemos resumir de esta manera:

a) Dificultad en obtener el nivel de atenuación apropiado para la sensibilidad de cada una de las especies animales a las que se destina.

b) Deterioro y/o modificación del poder patógeno de las cepas por cultivos sucesivos, debido a la alteración lógica de la relación bacterias productoras de toxina vs. no productoras.

c) Esporulación muy pobre en los medios de cultivo líquidos conocidos en la época de Pasteur.

Sin embargo, todas las vacunas elaboradas con esporos atenuados de ese entonces deben considerarse como ligeras modificaciones del método original propuesto por Pasteur.

Una de las primeras modificaciones fue propuesta por Zenkowski en el año 1887, quien recomendó el uso de glicerina para suspender las vacunas esporuladas, con un triple objetivo: inhibir el desarrollo de contaminantes, aumentar la longevidad de los esporos y actuar como adyuvante de la inmunidad. La estandarización y la prueba de eficacia de estas vacunas eran complejas. La prueba de potencia debía realizarse en ovejas, ya que las cepas Pasteur mataban a los cobayos. A los efectos de atenuar o disminuir los efectos deletéreos que producía la vacuna, se recurrió a la aplicación simultánea de vacuna y suero hiperinmune. Esta alternativa, si bien fue utilizada durante bastante tiempo (también utilizada en la vacunación para prevenir la peste porcina clásica), presenta una serie de inconvenientes, que van desde lo económico, ante la necesidad de utilizar suero hiperinmune, hasta la gran dificultad para encontrar el correcto equilibrio y generar una respuesta inmune efectiva sin reacciones adversas. Un exceso de suero disminuye la respuesta inmune pero una escasa cantidad puede provocar reacciones indeseables. Este método fue propuesto por Sorberhein en 1913, quien adicionó suero a la segunda aplicación, es decir, a la cepa menos atenuada.

Durante las décadas de 1920 y 1930, la vacuna

original sufrió importantes modificaciones. Durante la primera de las décadas mencionadas, a la vacuna original de Pasteur se le adicionó un 50-60 % de glicerina.

En esta década también se realizaron pruebas con la aplicación de una dosis única de vacuna suspendida en glicerina de una cepa lo suficientemente atenuada que no era patógena para conejos, pero mantenía la patogenicidad para cobayos. Todas las vacunas elaboradas con la cepa Pasteur resultaron muy difíciles de estandarizar.

Entre los años 1929 y 1937 se realizaron distintas investigaciones con diferentes tipos de vacunas, adicionándose entre un 4 y un 10 % de saponina para atenuar la virulencia de la cepa. La saponina es un detergente que provoca una inflamación muy intensa, limitando la diseminación de los esporos, haciendo la vacuna más segura y favoreciendo la inducción de la inmunidad. Sin embargo, es capaz de producir fuertes reacciones inflamatorias y de hipersensibilidad, cuando la pureza de la saponina no es la adecuada.

El método original fue propuesto por Mazuchi en 1931, quien adicionó a la vacuna original entre 2 y 5 % de saponina.

Una de las vacunas más conocidas fue la Carbazoo®, producida por el Instituto Seroterápico Milanés y luego en Estados Unidos por el laboratorio Lederle.

Presumiblemente, se trataba de una vacuna elaborada con una cepa de alta patogenicidad, a la cual se le agregaba saponina en algunos casos hasta en una concentración del 10 %, de acuerdo con el criterio de diversos investigadores de la época, entre ellos Sterne, que consideraban que de esta manera se disminuía la patogenicidad de la cepa. Sin embargo, esta concentración de saponina resultaba sumamente tóxica. Esta vacuna tenía la particularidad que debía ser inocua e inofensiva para conejos y cobayos. Posteriormente, Sterne disminuyó la concentración de saponina entre el 0,1 y el 0,5 % para reducir las reacciones indeseables.

Max Sterne, nacido en Italia, en 1905, logró desarrollar una vacuna a partir de una cepa de carbunco patógena en el año 1937 (Sterne, 1937).

La cepa patógena aislada fue cultivada durante 24 horas en un medio que contenía 50 % de suero equino y en una atmósfera con un 30 % de anhídrido carbónico. Obtuvo una cepa rugosa acapsulada y acapsulógena, es decir sin cápsula y sin capacidad de producirla como consecuencia de haber perdido el plásmido responsable de la formación de la misma. Esta nueva cepa fue denominada 34 F2 y la vacuna elaborada a partir de la misma tuvo una amplia difusión en el campo veterinario (Elliot et al., 2000; Shlyakho & Rubinstein, 1994).

La cepa Sterne ha perdido el plásmido pXO2 responsable de la formación de la cápsula, pero mantiene el pXO1, responsable de la formación de toxina, siendo esta falta de capacidad de la producción de cápsula la única diferencia con la cepa patógena o de campo. Esto determina que la cepa Sterne pueda ser fácilmente endocitada por los neutrófilos (debemos recordar que la cápsula es un componente con propiedades antifagocitarias), aunque mantiene intacta la capacidad de producir toxina en forma similar a la cepa patógena.

En 1944, Sterne comunicó el empleo de su vacuna en gran escala en Sudáfrica. A partir de entonces, el uso de la vacuna avirulenta de Sterne se ha extendido por todo el mundo y en muchos países, como en Argentina, es la única vacuna aprobada por el ente nacional de regulación, SENASA, para su uso en medicina veterinaria.

El éxito obtenido por esta vacuna determinó que se pensara en utilizarla en medicina humana. Dada la capacidad de producción de toxinas que posee la cepa, la vacuna fue calificada como muy agresiva y peligrosa para ser empleada en la especie humana. Sin embargo, y a pesar de ello, fue autorizada y utilizada en numerosas ocasiones en la Unión Soviética, mientras que la mayoría de los países la consideraron inaceptable (Ivins, 1998; Milne et al., 1995; Petosa et al., 1997; Turnbull, 1991).

En 1940, en la Unión Soviética se introdujo una vacuna similar a la Sterne, denominada ST1. Esta cepa, al igual que la Sterne, se considera peligrosa para la especie humana por su capacidad de producir toxinas y por su alta reactogenicidad, además de producir una protección parcial contra el ántrax cutáneo.

La necesidad de desarrollar vacunas efectivas, seguras y no reactogénicas para la especie humana se transformó en una imperiosa necesidad durante los tiempos de la guerra fría ante el peligro cierto del uso del *B. anthracis* como arma biológica (Scorpio et al., 2006).

Durante la década de 1950, se desarrolló una vacuna sin purificar, acelular, a partir de sobrenadante de cultivo, conteniendo el AP, con el objetivo de formar anticuerpos contra este factor y así impedir la penetración en la célula de los otros factores que componen la toxina, el FE y/o el FL. Esta vacuna, de relativa eficacia, aparentemente fue desarrollada casi simultáneamente en el Reino Unido y en los Estados Unidos.

Esta primera generación de vacunas licenciadas en Estados Unidos fue utilizada para inmunizar granjeros, investigadores y personas con alto riesgo de contraer la enfermedad. A pesar de su uso, la eficacia y seguridad de esas vacunas fue cuestionada permanentemente.

Esta necesidad de conseguir vacunas eficientes y seguras para la prevención de la enfermedad, sobre todo con el objetivo de neutralizar el ántrax contraído por vía inhalatoria, determinó el licenciamiento de vacunas más purificadas, adsorbidas y elaboradas a partir de cepas genéticamente modificadas con incapacidad de producir FE y FL. Las vacunas desarrolladas mediante técnicas de ingeniería genética serán fundamentales para lograr estos objetivos.

Los primeros trabajos sobre la utilización de *B. anthracis* como arma biológica datan de la Primera Guerra Mundial, cuando fue utilizado para matar caballos. Durante la Segunda Guerra Mundial, el ejército japonés desarrolló la primera arma biológica a base de esporos. En la etapa de la posguerra, más precisamente durante la denominada guerra fría, muchos países como Estados Unidos, Gran Bretaña, Canadá e Irak no escatimaron esfuerzos en desarrollar y perfeccionar este tipo de armamento debido a ciertas particularidades del espora, como son su fácil producción, diseminación y supervivencia que le dan cierta supremacía sobre otros agentes etiológicos como el virus de la viruela humana (*small pox*) y el virus del Ebola.

La investigación sobre producción de nuevos inmunógenos, que había entrado prácticamente en un período de estancamiento luego del desarrollo de vacunas más seguras, resurgió con vertiginosidad inusitada después de los ataques a las Torres Gemelas el 11 de setiembre de 2001 y de la amenaza de uso de los esporos de ántrax diseminados a través de cañerías de aire acondicionado en edificios y aviones y la contaminación de encomiendas o cartas. Los esporos de *Bacillus anthracis* inhalados producen una elevada mortalidad, ya que cuando aparecen los signos clínicos, que se confunden primariamente con una gripe, prácticamente es demasiado tarde para instaurar un tratamiento eficaz.

Vacunas basadas en el antígeno protector

La vacuna para uso humano denominada AVA (*Anthrax Vaccine Adsorbed*) está basada en el AP adsorbido en hidróxido de aluminio y es utilizada en los Estados Unidos desde hace muchísimos años, siendo más conocida, a partir del año 2002, con el nombre comercial de BioThrax.

Las primeras vacunas de uso humano datan de la década de 1950 en el Reino Unido y desde la década de 1960 en Estados Unidos. Fueron probadas y demostraron su efectividad en la prevención de la infección en muchos modelos animales, incluidos primates no humanos (Hotchkiss *et al.*, 2005).

La vacuna consiste en material sobrenadante de *B. anthracis* cepa V770-NP1-R. Esta cepa tiene como

característica mantener el plásmido pXO1+ productor de toxina y haber perdido el plásmido pXO2- responsable de la presencia de la cápsula, cultivada en forma microaerófila en medios definidos, es decir, medios con una constitución química perfectamente conocida. El sobrenadante del cultivo es filtrado y adsorbido con hidróxido de aluminio. El plan corriente de vacunación consiste en seis dosis inyectadas por vía subcutánea en un término de 18 meses y una revacunación anual (Benson *et al.*, 1998; Brossier *et al.*, 2000; Duesbery *et al.*, 1998; Ivins *et al.*, 1990; Ivins, 1998; Milne *et al.*, 1995; Petosa *et al.*, 1997; Turnbull *et al.*, 1990; Turnbull, 1991).

Los Estados Unidos disponen, desde 1970, de la denominada AVA, producida por la Bioport Corporation, compuesta, fundamentalmente y como ya hemos consignado, por el AP adsorbido en hidróxido de aluminio, conteniendo, como máximo, 0,83 mg por dosis, adicionado 0,0025 a 0,004 % de cloruro de benzetonio y 0,01 a 0,0037 % de formaldehído, como conservantes. Algunos lotes contienen como impureza algo de FL y menor cantidad de FE. Estimula la inmunidad humoral pero no la celular y se deben administrar 6 dosis a las semanas 0, 2 y 4, y a los 6, 12 y 18 meses (Brachman *et al.*, 1962; Fellows *et al.*, 2001; Friedlander *et al.*, 1999; Ivins *et al.*, 1992; Ivins *et al.*, 1994; Ivins *et al.*, 1998; Mahlandt *et al.*, 1966; Pittman *et al.*, 2001).

En el Reino Unido se utiliza una vacuna similar, pero proveniente de sobrenadante de la cepa Sterne 34F2. Esta vacuna contiene trazas de FE y FL y es para muchos autores, entre ellos Jones y colaboradores (1996), superior a la norteamericana.

Si bien estas vacunas carecen prácticamente de efectos adversos, y están optimizados, estandarizados y protocolizados los pasos de manufacturación para eliminar los otros componentes de la toxina, existe cierta variabilidad en los procesos, quedando latente la posibilidad de producir reacciones adversas. Esto provocó el desarrollo de una nueva generación de vacunas compuesta por APr (AP recombinante) purificado de una cepa atoxigénica y aesporogénica de *B. anthracis*. Esta vacuna fue probada experimentalmente en monos *Macacus Rhesus*, observándose que fue capaz de prevenir la infección por *B. anthracis* inoculados por vía aerógena por medio de aerosoles (Jones *et al.*, 1996; Turnbull, 1991).

Las vacunas a base de cepas con esporas recombinantes parecen ser más eficaces que las obtenidas por formas vegetativas clásicas (Ivins *et al.*, 1986). Cohen y colaboradores en el año 2000 produjeron vacunas con APr. Esta vacuna fue probada en cobayos a los que se les aplicaba una sola dosis de 5×10^7 esporas de la cepa MASC10 con capacidad de expresar, al menos, 100 μg por ml de APr, demostrando

do protección frente al desafío con cepas patógenas. Esta vacuna, previo análisis de seguridad y eficacia, y luego de obtener autorización de uso por el Instituto de Medicina de la Academia Nacional de Ciencias, EEUU, fue aplicada a las tropas estadounidenses que se desplazaron a la Península Arábiga (Cohen et al., 2000). Algunos informes internacionales atribuyeron a esta vacuna el denominado "síndrome del Golfo". Este síndrome se caracteriza por síntomas inespecíficos y variables como cansancio, dolores musculares y de las articulaciones, jaquecas, pérdida de la memoria y estrés postraumático. Su causa es desconocida y no es mortal, pero puede estar asociada con angustia e incapacidad excesiva, quizás de origen psiquiátrico (Schumm et al., 2002).

Además del desarrollo de estas vacunas de nueva generación, más seguras e inmunogénicas, se están estudiando vías alternativas de inoculación con el objetivo de aumentar la rapidez y eficacia de la respuesta inmune. La vía de inoculación de AVA es la subcutánea. Sin embargo, se están desarrollando experiencias utilizando la vía intramuscular que parece generar menos reacciones indeseables y mayor protección. Esto quizás esté determinado por el daño que el aluminio ocasiona en la fibra muscular, originando la producción de DAMPs (patrones moleculares asociados a daño) capaces de estimular el inflammasoma, sensor citosólico con capacidad para reconocer patrones comunes de los microorganismos, detectar su presencia, es decir la infección, y luego liberar mediadores que favorecen el desarrollo de la respuesta inmune. Tanto la vacuna AVA como la APr han demostrado ser muy eficaces en la producción de IgM e IgG anti AP. Sin embargo, a efectos de lograr una mejor y más completa protección, es importante desarrollar vacunas que se apliquen por la vía de las mucosas con el objetivo de generar inmunoglobulina A secretoria (IgAs).

Vacunas aplicadas por la vía de las mucosas

Teniendo en cuenta las tres vías probables de infección con *Bacillus anthracis*, la vía inhalatoria es, sin duda, la que mayor mortalidad produce, ya que prácticamente carece de sintomatología post infección y, por lo general, cuando esta aparece, es demasiado tarde e incluso suele confundirse con cuadros gripales que retrasan la intervención profesional y el tratamiento específico.

La inmunidad humoral circulante cumple un importante rol en la prevención de la enfermedad, pero no de la infección. Prevenir la infección es crucial en la afección respiratoria.

En este sentido, es de vital importancia el desarrollo de IgAs en las mucosas del organismo.

Con este objetivo, se están desarrollando vacunas para generar inmunidad en las mucosas mediante vacunación oral utilizando como vectores *Salmonella* (*S. typhimurium*, *S. entérica* serovar Typhi) o *Lactobacillus* genéticamente modificados con capacidad de expresar AP (Coulson et al., 1994; Zegers et al., 1999).

También se encuentran en vía de desarrollo vacunas inoculadas mediante instilación nasal, a base de APr asociado a microesferas que se colocan en la nariz o adsorbidas a liposomas para aumentar la inmunogenicidad. Una variante interesante es la utilización de una vacuna oral elaborada a partir de esporos atenuados de cepas de *B. anthracis* que expresan APr. Se ha desarrollado una vacuna a partir de la cepa Sterne pXO1-, pXO2- transformada, con capacidad de expresar el plásmido de APr (pero no toxinas ni cápsula) e inducir la producción de IgG e IgAs.

Otra vacuna interesante en vía de desarrollo es la que se elabora a partir de lisados de *Lactobacillus casei* con posibilidad de expresar AP, aplicada por vía enteral y con alta capacidad de respuesta específica.

Trabajos experimentales han demostrado la eficacia de vacunas en cuyo diseño se utilizan adyuvantes como toxina colérica y fosfatidilcolina de soja y otras a base de AP micro encapsulado en esferas de 100 kDa de poli L- lactato. También ha resultado exitosa la utilización de una vacuna a base de esporos de la cepa Δ Sterne pXO1-, pXO2-, con posibilidad de expresar AP e inducir una respuesta anti AP mediada por IgG e IgAs cuando se la aplica por vía oral a cobayos, siendo capaz de proteger animales vacunados cuando se desafían con 20 DL₅₀ de *B. anthracis*. Las ventajas de estas vacunas orales reside en la facilidad de aplicación de las mismas, teniendo en cuenta el plan básico de inmunización que consta, como mínimo, de 6 aplicaciones (Aloni-Gristein et al., 2005; Flick-Smith et al., 2002; Mikszta et al., 2005; Sloat et al., 2005).

Vacunas de doble protección

Se han elaborado vacunas complementando al APr con antígenos capsulares y con antígenos propios de la superficie del bacilo, como el Bc1A. La idea conceptual es la de tratar de inhibir el desarrollo de formas vegetativas, favoreciendo la fagocitosis por los anticuerpos anti-antígenos capsulares, y evitar la posterior formación de toxinas.

Por otra parte, el AP, además de ser secretado por la forma vegetativa de la bacteria, se encuentra en pequeñas cantidades en la superficie de los esporos sin germinar y, por lo tanto, los anticuerpos anti AP pueden unirse a los mismos. Esto disminuye la germinación y favorece la captación por parte de los macrófagos para su destrucción, de acuerdo con lo

observado *in vitro* cuando se los enfrenta a cultivos de macrófagos. Si bien es una alternativa válida, otros autores postulan que la presencia de pequeñas cantidades de anticuerpos circulantes puede facilitar, por efecto opsónico, la endocitosis rápida de esporos y así favorecer el desarrollo de la enfermedad, si la tasa de anticuerpos circulantes presentes no permite la neutralización de la toxina a generar.

Considerando la mayor protección ante la descarga de formas patógenas, se obtuvieron resultados satisfactorios inmunizando ratones con vacunas a base de AP, adicionadas con antígenos capsulares y esporos inactivados con formol. Esta vacuna a esporos inactivados es conocida como FIS (*formol inactivate spore*) (Hahn *et al.*, 2006; Rhie *et al.*, 2003).

Vacunas de esporos inactivados

En el año 2000, Cohen y colaboradores demostraron que los anticuerpos generados contra los esporos contribuyen a la inmunidad. El trabajo se realizó en cobayos a los que se les inocularon esporos inactivados en suspensión. El AP ligado al espora en pequeña concentración genera los Ac específicos y facilita la endocitosis y destrucción de los mismos. Es necesario destacar que, para generar respuesta inmune, esta vacuna debe contener una alta carga de esporos dado la escasa concentración del AP en la superficie de los mismos. Otra condición necesaria es que la misma esté adyuvada.

Sin embargo, Brossier y colaboradores, en el año 2002, hicieron lo mismo en conejos, encontrando protección parcial y observando que mejoraba la eficacia de la vacuna cuando se adicionaba AP a los FIS (Brossier *et al.*, 2002; Cohen *et al.*, 2000; Glomski *et al.*, 2005; Steichen *et al.*, 2003).

Vacunas sobre la base de cápsulas

La obtención de una vacuna con capacidad de neutralizar la propiedad antifagocítica de la cápsula es una alternativa sumamente interesante, ya que permitiría, ni bien el espora germina, la opsonización, endocitosis y destrucción antes de que la forma vegetativa dé lugar a la producción de las toxinas.

Uno de los problemas a resolver es que la cápsula posee poca capacidad inmunogénica, haciéndose necesario copular o asociar la misma a una proteína que le proporcione capacidad de impacto sobre el sistema inmunológico. Su poca capacidad inmunogénica se debe a su estructura química y a la carga negativa que posee, lo que determina que se comporte, prácticamente, como un antígeno T-independiente (Chabot *et al.*, 2004; Maurer *et al.*, 1965; Schneerson *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004).

Vacunas de plásmidos

La inoculación del plásmido codificador del AP al ratón induce la producción de IgG con títulos no muy elevados, pero éstos aumentan rápidamente con la aplicación de un *booster* o refuerzo a base de AP. Existe una vacuna de diseño elaborada por el USAMRIID (Instituto de Investigaciones Médicas sobre Enfermedades Infecciosas del Ejército de Estados Unidos) que protege al cobayo de la inhalación de esporas (Little *et al.*, 1986).

Otros tipos de vacunas ensayadas

Pasteur, Chamberland y Roux, en 1883, ensayaron, al menos, tres tipos de vacunas con bacilos muertos con escaso éxito.

En 1956, Schlingman y colaboradores obtuvieron una vacuna a partir de filtrado estéril del sobrenadante rico en AP, purificado y concentrado, con escasa presencia de PE y FL. Varios grupos de investigadores (Puzzis & Wright, 1954; Darlows *et al.*, 1956; Ivins *et al.*, 1995; Ivins *et al.*, 1998; Firedlander *et al.*, 1999), encontraron que estas vacunas protegían al mono rhesus de la inhalación de esporas. Cuando esta vacuna se inoculó al mono *Macacus Rhesus* por vía intramuscular se comprobó la formación de IgG e IgM, y cuando fue aplicada por vía nasal la presencia de IgAs.

Beznosov y colaboradores, en 1997, extrajeron una proteína de 92kD de la forma vegetativa de la cepa de *B. anthracis* STI-1 atenuada, utilizando lauril-sarcosilato sódico al 3% y a 4°C, y purificada mediante cromatografía de absorción en hidroxiapatita y adicionada con adyuvante de Freund. Fue probada con éxito en ratones (Beznosov *et al.*, 1997).

Todas estas vacunas necesitan estar adyuvadas para aumentar su capacidad de impacto, utilizándose, entre otros, hidróxido de aluminio, monofosforil lípido A, *Bordetella pertussis* y *Corynebacterium ovis*, lo que aumenta las reacciones vacunales.

Se ha ensayado para animales el adyuvante denominado Detox, compuesto por las paredes de *Mycobacterium phlei* o de *Mycobacterium bovis*, ricas en muramildipéptido (MDP) más 10% de monofosforil lípido A (MPL) y 2% de escualeno.

El triple mix o Tri Mix es un adyuvante que utiliza como base el Detox más dimicolato de trealosa y emulsión de MPL unido a escualeno-lecitina-tween 80. Brusière y colaboradores, en 1995, utilizaron este tipo de adyuvante y demostraron que la aplicación de esta vacuna puede causar uveítis y artritis.

Estos adyuvantes no están autorizados para ser usados en vacunas para seres humanos, y si bien no figuran en los protocolos de composición de las vacunas empleadas en los soldados, en varios cientos

de afectados por el síndrome de la Guerra del Golfo se encontraron anticuerpos antiescualeno, haciendo pensar en su uso secreto (Nass, 1998).

Cuando se desarrollan vacunas, el desafío primario es conseguir una buena inmunogenicidad y una baja reactogenicidad. Además, deben ser seguras e incapaces de revertir la patogenicidad (si se trata de cepas atenuadas) y de no provocar reacciones adversas graves.

El desafío actual para los investigadores es desarrollar vacunas que, además de las propiedades citadas, sean capaces de brindar protección ante cepas cuya patogenicidad sea modificada intencionalmente para ser utilizadas en la guerra biológica, con el agravante, además, de que estas cepas pueden poseer resistencia a los antibióticos.

El desarrollo de nuevas vacunas de diseño fue posible a partir del conocimiento de la estructura proteómica de *B. anthracis*. Identificar las proteínas que el bacilo expresa específicamente o preferentemente durante la infección, o aquellas que contribuyan a la virulencia, será seguramente de vital importancia en el desarrollo de nuevas vacunas.

En este aspecto, debemos resaltar los esfuerzos en desarrollar vacunas con nuevos antígenos, utilizando como base subunidades multivalentes. El inconveniente que presentan este tipo de vacunas, como todas las de subunidades, es que precisamente, por tratarse de fracciones antigénicas del bacilo, se pierde capacidad de impacto sobre el sistema inmune y requieren adyuvantes muy importantes para el reconocimiento escalonado a través de los PRRs.

Sin embargo, cuando se compara la eficacia de la protección conferida por una vacuna a base de esporas vivas como la cepa Sterne con la conferida por vacunas de subunidades, nos encontramos que, en general, es mayor la protección brindada por la esporovacuna, a pesar de que la de subunidades genera una buena respuesta anti AP. En 1986, Little y Knudson encontraron que la vacuna Sterne confirió una protección del 80 % frente a la descarga de 1000 esporos, mientras que la de subunidades brindó solamente una protección del 50 % en las mismas condiciones. Casi con seguridad podemos afirmar que esta diferencia en la eficacia a favor de la cepa Sterne se debe a la formación de cantidades relativas de FE y FL que, aunque indeseables desde el punto de vista de la reactogenicidad, colaboran grandemente en los fenómenos de protección a campo (Ivins et al., 1998).

Cuando se compara la respuesta de distintas vacunas se debe tener muy en cuenta el sistema de evaluación utilizado. Cuando se realizan evaluaciones solamente *in vitro*, como por ejemplo cuantificación de anticuerpos, se dejan de lado otros factores que hacen a la patogenicidad *in vivo* y los resultados pueden ser

disímiles y quizás una vacuna que *in vitro* denota una excelente producción de anticuerpos específicos no nos brinde, *in vivo*, una protección adecuada.

En la actualidad, a través de la ingeniería genética, se ha logrado insertar dentro de especies del género *Bacillus*, particularmente *B. subtilis*, que no posee la capacidad natural de producir toxinas, el gen capaz de codificar y hacer expresar AP (Ivins et al., 1986). Se han elaborado vacunas a partir de este AP y se logró producir protección en el cobayo.

La protección inducida por vacunas elaboradas a partir de AP producido por *B. amyloliquefaciens* fue mucho más eficiente que la obtenida a partir de *B. subtilis*.

Se ha obtenido AP atóxico utilizable como vacuna a partir de *Lactobacillus casei* y también a partir de *B. subtilis* lisogenizado por el fago phi 105.

El USAMRIID obtuvo una vacuna a base de una mutante de la cepa Sterne, cuya supervivencia depende de ciertos cuerpos aromáticos. Estos cuerpos aromáticos necesarios para la supervivencia del bacilo no se encuentran presentes en los tejidos humanos. Por lo tanto, cuando es utilizada como vacuna, esta cepa tiene la particularidad de reproducirse, aunque en forma limitada, y no tiene capacidad de difundir e invadir el organismo.

Las vacunas desarrolladas a partir de cepas con mutaciones que afectan la distribución de las mismas en el hospedador pueden resultar muy peligrosas, ya que se ha determinado que son muy inestables y pueden revertir a la forma patógena. No obstante, las nuevas técnicas de secuenciación y mutagénesis pueden hacer más eficiente y segura la producción de estas vacunas.

El desarrollo de nuevas vacunas exige el cumplimiento de estrictos protocolos que garanticen la eficacia y la falta de reactogenicidad.

Condiciones requeridas para los ensayos de vacunas

Cuando se realizan estudios en los que se compara la eficiencia de dos o más vacunas, los mismos deben realizarse en sistemas biológicos fiables que produzcan resultados similares (Belton et al., 1956; Brachman et al., 1945; Pittman et al., 2002).

En general, las vacunas de uso en medicina humana son probadas, en cuanto a su seguridad, con distintos modelos en primates no humanos. Generalmente, el ratón y el cobayo son especies difíciles de proteger cuando se descargan cepas totalmente virulentas de *B. anthracis*. El tipo de ratón utilizado es crucial en las pruebas, ya que la susceptibilidad varía grandemente según las líneas genéticas. Un estudio comparó diez líneas celulares encontrando variantes

sustanciales en la DL_{50} y en el tiempo necesario para producir la enfermedad, variando éste desde 3 a 6,5 días.

También se encuentran importantes diferencias con relación a la DL_{50} cuando se desafían con cepas atenuadas. Por ejemplo, algunas cepas de ratones como la A/J son sensibles a una DL_{50} de $1,1 \times 10^3$ esporos de la cepa Sterne, mientras otras cepas, como la C58/J, son resistentes a una descarga de esta misma cepa con más de 10^7 esporos. Las mismas diferencias se encontraron con respecto a la DL_{50} de esporos y cuando se utilizó la descarga de toxinas. Por ejemplo, la cepa de rata denominada Fisher 344 es muy sensible a FL y es, por ende, la más comúnmente usada. De la misma manera que ciertas cepas de ratas muestran una sensibilidad extrema a las toxinas, paradójicamente resultan muy difíciles de infectar, mientras que otros animales, como los cobayos, son muy resistentes a las toxinas y pueden morir cuando se las infecta con una escasa cantidad de esporos. La razón de esta discrepancia no está muy bien estudiada, pero parece ser que la diferencia radica en la capacidad del esporo para germinar en el hospedador, en la capacidad de expresión de los receptores de AP, en la respuesta inmune y en la sensibilidad a las toxinas.

Uno de los métodos más comúnmente utilizados *in vitro* para evaluación de vacunas es el método de ELISA, fundamentalmente para medir anticuerpos antitóxicos o anticápsula.

También se utilizan métodos de seroneutralización, sobre todo anti-FL, mediante los cuales los macrófagos murinos son protegidos *in vitro* con antisuero anti FL purificado. Este método de seroneutralización es tomado como *gold estándar* para evaluar respuestas a vacunas anti AP, aunque algunos estudios posteriores demostraron que estos títulos no guardan correlación exacta con la protección *in vivo*.

La medición de la inmunidad mediada por células no se utiliza, probablemente porque *B. anthracis* es un patógeno de vida extracelular y cuya patogenicidad está ligada fundamentalmente a la acción tóxica.

Probablemente, la evaluación de las nuevas vacunas requerirá de la combinación de pruebas más complejas que incluyan respuesta de anticuerpos, neutralización de toxinas, muerte de bacterias e inmunidad celular.

Vacuna Sterne: generación de respuesta inmune

La vacuna de uso veterinario contra carbunco bacteriano cepa Sterne es la única vacuna aprobada por el SENASA para utilización en la República Argentina.

Es una vacuna a base de esporos, clasificada

técnicamente como esporovacuna, que contiene, como mínimo, 10.000.000 de esporos por mililitro, suspendidas en partes iguales de solución salina bufferada y glicerina, adicionada de saponina como coadyuvante de la inmunidad.

Como es sabido, la característica esencial de la cepa Sterne, es de ser acapsulada y acapsulógena, pero mantiene la capacidad de producir los tres factores componentes de su única toxina: el AP, FE y el FL.

Prácticamente, la única diferencia entre la cepa Sterne y el *B. anthracis* patógeno, comúnmente denominado cepa de campo, es la falta de cápsula, ya que la capacidad de producir toxinas es desde el punto de vista cuali-cuantitativo, prácticamente la misma.

La enfermedad a campo se produce cuando los esporos de *B. anthracis* ingresan al organismo, encuentran las condiciones ideales de germinación y pasan a la forma vegetativa capsulada. La cápsula tiene como función principal impedir la fagocitosis y así escapar a los mecanismos de destrucción por los PMN para poder continuar su desarrollo y elaborar, finalmente, la toxina responsable de la muerte del animal.

Cuando se inocula la vacuna Sterne la saponina presente en la formulación produce un fenómeno inflamatorio severo en el sitio de inoculación. Como en todo proceso inflamatorio la tensión parcial de oxígeno es menor que en los tejidos normales. Esta microaerofilia favorece el pasaje de la forma esporulada de resistencia a la forma vegetativa carente de cápsula y así es susceptible de ser fagocitada y eliminada por los PMN. De esta manera, el organismo va eliminando la misma pero una pequeña cantidad de bacilos que escapa a los mecanismos fagocíticos va liberando limitadas cantidades de toxinas con capacidad de estimular el sistema inmune, lo que determinará la generación de una respuesta antitóxica que protegerá de la enfermedad.

Los anticuerpos antitóxicos son los principales responsables de la protección, teniendo en cuenta que estamos ante una septicemia, siendo las toxinas liberadas la principal causa de muerte. Hasta el momento, no se ha puesto énfasis sobre la inmunidad mediada por células, pero es indudable que la misma debe tener injerencia en algún proceso intermedio y, como mencionan recientes trabajos, en procesos colaborativos en la prevención y/o desarrollo de la enfermedad (Ingram et al., 2013).

Si bien esta secuencia de acontecimientos es comprensible y lógica, creemos que es demasiado superficial y que no contempla algunas particularidades que tiene esta bacteria cuando es analizada a la luz de los conocimientos actuales.

Cuando estudiamos el fenómeno con más pro-

fundidad, surgen algunas dudas y nos permitimos presuponer que la realidad es algo diferente a la expuesta.

El primer interrogante que cabe preguntarse es la siguiente:

Si la cepa vacunal tiene la capacidad de producir la misma cantidad de toxina que la cepa patógena y la generada por ésta provoca supresión de la respuesta inmune innata, afectando PMN, CD, LB y macrófagos, es dable suponer que la misma toxina producida por la cepa vacunal debería provocar un efecto similar sobre las células del sistema inmune.

Es más, cuando se realizan pruebas de seguridad sobre la vacuna terminada y estandarizada en cobayos se observa que el peso que, según la técnica, debe ser de 550 a 600 g, es determinante para la supervivencia de los animales. Si utilizamos cobayos de menor peso, por ejemplo, de 250 g, es probable que ninguno de ellos sobreviva.

Por otra parte, cuando la vacuna, por error en la estandarización, supera las 15.000.000 de esporas por ml, se hace necesario realizar pruebas complementarias en ovejas para demostrar la seguridad. También existen referencias de que algunos terneros de 3 a 4 meses que por error fueron vacunados con el doble de la dosis (84 ml), han muerto como consecuencia de la vacunación.

Esto es indicativo de que es una vacuna con una significativa capacidad tóxica potencial.

Todo esto nos llevó a profundizar la investigación sobre los reales mecanismos inmunitarios que despliega la vacuna. No hemos encontrado en la bibliografía información precisa que permita dilucidar la cuestión.

Según nuestro punto de vista, el mecanismo inmune estaría mediado por una serie de sucesos:

1.- Se ha demostrado que no todas las CD o macrófagos son sensibles a la toxina. Algunas de estas células se ven afectadas por ella, mientras que otras del mismo individuo son resistentes. Es más, dentro de la misma especie, existen razas que son resistentes a la enfermedad, precisamente por no verse afectadas estas células.

2.- Diversos autores, a través de comunicaciones personales, nos han referido que aparentemente el primer factor que el bacilo secreta es el AP y, posteriormente, los otros dos. Esta aseveración nos permite postular que este AP puede ser captado por las CD en una etapa temprana, para ser procesado, presentado y transportado al linfonódulo para iniciar la respuesta inmune. Debemos recordar que las CD a partir de su origen en la médula ósea, tienen alta capacidad fagocítica con muy baja o nula expresión de moléculas de coestimulo, como CD80/86 y CMH, moléculas que se adquieren a través de su proceso madurativo. A partir

del momento en que toman contacto con un antígeno, tal como el AP, migran hacia el linfonódulo y dan origen a los procesos de inducción de la respuesta inmune, para que las células plasmáticas elaboren los primeros anticuerpos antitóxicos.

3.- Tampoco debemos olvidar que en la generación de la respuesta inmune interviene una gran cantidad de CD, macrófagos y linfocitos B y que algunos de ellos pueden ser resistentes a la acción tóxica e inducir respuesta, mientras que otros sucumben a la toxina.

4.- El AP presente en el esporo, a pesar de hallarse en una pequeña cantidad, puede, al ser ingerido por el macrófago, iniciar una respuesta inmune temprana específica.

De acuerdo con nuestro criterio, sería relevante la hipótesis de que el factor AP es liberado prontamente y, en primer término, lo que permitiría el procesamiento, la presentación y el transporte al linfonódulo de los epitopes específicos, iniciando la respuesta inmune contra éste.

Estas CD ya no se verían afectadas por la producción de los otros factores, FE y FL.

Cuando el proceso infeccioso avanza y estos factores son liberados con posterioridad al AP, las poblaciones de CD y macrófagos responsables de la inducción de la respuesta inmune sensibles a la toxina se verán afectadas y no podrán ejercer su función específica.

Las poblaciones celulares no sensibles a la toxina no se verían afectadas por las mismas y desarrollarían sus funciones propias, originando la inmunidad antitóxica. A medida que se van liberando pequeñas cantidades de Ac específicos, estos se unen al AP libre formando inmunocomplejos, los que son opsónicamente endocitados. Esto favorece la formación y liberación de nuevos Ac antitóxicos.

El trabajo recientemente publicado por Ingram *et al.* (2013) demuestra la importancia que poseen los receptores específicos de unión de la toxina a la célula, no sólo en la enfermedad, sino en la respuesta inmune a vacunas. Estos autores demostraron que la exposición previa a pequeñas cantidades de toxina modula negativamente la expresión de los receptores (ANTXR) y, por consiguiente, la captación del AP, lo que provoca la iniciación del proceso tóxico cuando se unen los FE o FL.

Trabajos publicados con anterioridad analizando tres tipos de poblaciones humanas: naturalmente infectados, vacunados y no expuestos, demostraron una notable variación de expresión de los receptores específicos en sus leucocitos (Maldonado-Arocho *et al.*, 2006; Warfel *et al.*, 2005). Analizando los porcentajes de ANTXR1 presente en los monocitos de donantes voluntarios de sangre, encontraron grandes

diferencias en la expresión de los receptores específicos, por lo que clasificaron a estas poblaciones en grupos denominados de “baja” o “alta” capacidad de expresión. Estos resultados establecen notables diferencias de sensibilidad hacia la toxina en líneas de células linfoblásticas humanas, como resultado, en parte, de los niveles de expresión de ANTXR2 (Martchenko *et al.*, 2012).

Trabajando con padres e hijos, descubrieron, además, que la variedad de expresión está ligada a procesos genéticos. Estos hallazgos confirman, de manera contundente, la presencia de células sensibles y otras refractarias a la toxina, detallando, además, el fundamento de su comportamiento. Estos resultados permitieron a los autores postular la existencia de una estrecha correlación entre la susceptibilidad a los efectos de la toxina en modelos animales *in vivo* e *in vitro* y la elevada expresión de receptores ANTXR1 (Martchenko *et al.*, 2012; Salles *et al.*, 2006; Young *et al.*, 2007). Los individuos con alta capacidad de expresión de receptores poseen una elevada susceptibilidad a la infección, como así también al desarrollo de una enfermedad mucho más severa (Doganay *et al.*, 2010; Warfel *et al.*, 2005).

Estos estudios fueron realizados con pacientes que habían padecido ántrax cutáneo y recibido tratamiento antibiótico. Curiosamente, los individuos recuperados presentaban baja capacidad de expresión de los receptores. Esta reducción de la expresión de receptores podría estar relacionada con la elevada persistencia de toxina en los individuos infectados.

Está demostrado que el FL produce activación del inflammasoma de las células afectadas determinando la activación del sistema de las caspasas y liberación de citoquinas proinflamatorias, originando la muerte rápida de los macrófagos por piroptosis (Muehlbauer *et al.*, 2007; Popov *et al.*, 2002; Terra *et al.*, 2010). Por lo tanto, es posible que mediante este mecanismo puedan haberse eliminado muchas de las células que expresan ANTXR1 en la población de individuos que han estado expuestos previamente y por largo tiempo a la toxina, sobreviviendo aquellas células con baja expresión de receptores. Se ha sugerido que esta activación inducida por la LT del Nlrp1b (inflammasoma) y la posterior y consecuente muerte de los macrófagos puede ser una respuesta inmune innata de protección, en oposición a mecanismos de virulencia utilizados por *B. anthracis* (Terra *et al.*, 2010).

Las personas vacunadas reciben una exposición primaria intensa al AP, componente principal de la vacuna. Las concentraciones de FE y FL son muy bajas y puede afirmarse que estos dos factores son “contaminantes” indeseados pero presentes en el inmunógeno, a pesar de los procesos de purificación de esta vacuna. Consecuentemente, estos individuos

están expuestos a una cantidad muy inferior de toxinas que los infectados.

También quedó demostrado que el marco inflamatorio del proceso, vacunal o infeccioso, juega un rol muy importante en la expresión de receptores. Sin ninguna duda, el correspondiente a la infección natural es diferente al provocado por la vacunación.

Los monocitos de los individuos no expuestos previamente tienen una gran capacidad de fijar AP más allá de si se encuentran clasificados en los grupos con “baja” o “alta” capacidad de expresión de receptores. Esto, sin ninguna duda, está asociado a la co-expresión de ANTXR2 y/o beta1 integrinas en los monocitos. Si bien no fue posible en el estudio evaluar cantidades de AP ligados a las células, quedó claramente demostrado que una reducción de los niveles de presencia de ANTXR1 provoca una reducción considerable de macrófagos que han adherido AP.

El receptor ANTXR2 ha demostrado tener una mayor afinidad para ligar AP que el ANTXR1 (Scobie *et al.*, 2003). Sin embargo, existen sustanciales diferencias en relación con el pH del sitio donde se produce la adherencia. Así, los receptores ANTXR2 prefieren un pH ácido de 5 a 6, mientras que los ANTXR1 lo hacen a pH más fisiológico, entre 6 y 8 (Fu *et al.*, 2010).

Analizada en conjunto, queda claro que la reducción del porcentaje de monocitos que expresan ANTXR1 podría tener un papel fundamental en la respuesta del huésped a las toxinas de ántrax.

También ha quedado demostrada la importancia, casi desconocida hasta el momento, de la producción de IFN- γ por parte de las células T específicas anti AP provocando una disminución de la expresión en los monocitos de los receptores ANTXR1. Por otra parte, modelos murinos han sugerido que el IFN- γ originado como respuesta de las células T CD4 es protector frente a las esporas de ántrax (Muehlbauer *et al.*, 2007).

Los resultados y conclusiones presentadas parecen tener implicancias relevantes en lo que hace a la eficacia de la vacuna. Sin embargo, se hacen necesarios posteriores estudios acerca de la correlación de los niveles de unión de AP, la expresión de los ANTXRs, las respuestas de células T y los títulos de anticuerpos.

Dado el papel desempeñado por ANTXRs en la susceptibilidad a la toxina del ántrax, (Salles *et al.*, 2006; Young *et al.*, 2005) la relación inversa entre el porcentaje de monocitos que expresan ANTXR1 y la magnitud de las respuestas de células T, cualquier desarrollo de vacuna o adyuvante que sea capaz de regular negativamente la expresión de los ANTXR podría resultar beneficioso para la efectividad de la misma.

Se requieren futuras investigaciones que permitan desentrañar el mecanismo íntimo de inducción de la inmunidad, la función específica de linfocitos T, la producción de INF- γ y la protección de los individuos.

Carbunco en Argentina

Las primeras citas referentes a la aparición de carbunco en la República Argentina podemos encontrarlas en las actas del Cabildo de Buenos Aires entre los años 1590 y 1609.

El Dr. Francisco Javier Muñiz (1795-1871) médico y científico argentino, describió un caso humano de la enfermedad en el año 1847.

En 1859, Luis Pasteur, conocedor de la problemática que representaba el carbunco en la República Argentina, envió numerosas dosis de la vacuna por él elaborada para la prevención de la enfermedad.

Con posterioridad, José Hernández en su publicación del año 1882 mencionó el carbunco como “el grano, enfermedad conocida desde tiempos muy antiguos” e indica la necesidad de no desollar animales muertos de manera inesperada.

En 1886 se registró fehacientemente la vacunación con vacuna Pasteur en una estancia de Gualeguay, Entre Ríos.

El Dr. Bidali fue uno de los pioneros e impulsores de la elaboración de la vacuna en el país, pues habiendo trabajado con Pasteur comprendió la necesidad imperiosa de prevenir la enfermedad que para ese entonces provocaba grandes mortandades de bovinos, como asimismo la transmisión del carbunco a las personas involucradas en tareas rurales.

En la República Argentina fueron utilizadas en forma rutinaria durante muchísimos años las vacunas Pasteur, denominadas Pasteur I y Pasteur II. También fue utilizada una cepa denominada Chaco, probablemente de patogenicidad intermedia entre las Pasteur I y II, de difícil caracterización, la denominada Delphy 5 y la cepa Sterne.

Mediante la Resolución 705/81, SENASA estableció las normas de elaboración, control y uso de la cepa Sterne. La Ley N° 6703/1961 y la Resolución 115/2014 establecieron la obligatoriedad de la vacunación en la provincia de Buenos Aires. La provincia de Santa Fe, mediante la Resolución N° 1007/14 vigente, estableció el “Plan de Vacunación obligatorio” contra carbunco bacteridiano.

Por otra parte, las autoridades de Salud Pública Nacional acordaron recomendar a la Comisión Provincial de Sanidad Animal (COPROSA) la implementación de un plan superador de lucha contra el carbunco que incluya la vacunación obligatoria en conjunto con la fiebre aftosa. También se establece la figura de “Veterinario Corresponsable Sanitario”.

El Ministerio de Agroindustria de la Provincia de Buenos Aires, mediante la Resolución 115/2014, estableció una serie de medidas que pueden consultarse en la página de la institución: <http://www.maa.gba.gov.ar/2010/SubPED/Ganaderia/carbunclo.php>.

Desde el año 2002 a la fecha, el Dr. Ramón Nosedá y el Laboratorio Azul emiten informes y alertas de casos de carbunco rural en la Provincia de Buenos Aires, habiéndose creado el “Área de evaluación de carbunco rural en la provincia de Buenos Aires” constituida por 30 partidos de la misma.

El Dr. Nosedá, en su informe anual correspondiente al año 2015, presentó los resultados de la evaluación en tres áreas de vacunación anticarbuncosa simultánea con aftosa:

a) Área de Alerta y Respuesta (partido de Azul, provincia de Buenos Aires). En 2014 se vacunó el 85 % de la población blanco, mientras que en 2015 se vacunó el 68 %, es decir, 17 puntos porcentuales menos de bovinos vacunados.

b) Provincia de Buenos Aires. Según datos no oficiales, en la campaña de 2014 se vacunó el 83 % de la población blanco estimada, mientras que, en 2015, solamente se vacunó el 63 %, es decir, 20 puntos porcentuales menos.

c) Provincia de Santa Fe. Durante 2014 se vacunó el 73 % de su población blanco expuesta mientras que, en 2015, se logró vacunar el 86 %, es decir, 13 puntos porcentuales más que el año anterior.

Conclusiones

B. anthracis es un patógeno con características muy particulares, responsable de provocar una grave enfermedad septicémica en diversas especies animales y en el hombre. Por otra parte, constituye un arma biológica utilizada desde la Primera Guerra Mundial, cobrando inusitada importancia en los ataques bioterroristas con posterioridad a la caída de las Torres Gemelas en el año 2001.

Desde los trabajos de Pasteur en el siglo XIX se han desarrollado vacunas elaboradas a partir de distintas variantes de la cepa de campo patógena hasta las noveles vacunas desarrolladas mediante ingeniería genética. Todas apuntan a un denominador común: vacunas muy eficaces, seguras y carentes de reacciones adversas. Sin embargo, nuevos desafíos asoman en el horizonte. La posibilidad de que se utilicen en bioterrorismo cepas genéticamente modificadas y/o resistentes a antibióticos, hace necesario el desarrollo de vacunas que generen una respuesta inmune cuali-cuantitativamente superior, con capacidad de neutralizar esas posibles mutaciones genéticas del bacilo. Además, deberían ser capaces de inducir IgAs a efectos de prevenir la infección, sobre todo

para proteger contra la presentación respiratoria de la enfermedad, forma elegida preferentemente para los ataques biológicos.

Las vacunas destinadas a la especie humana han sido el objetivo principal del desarrollo tecnológico, conociéndose perfectamente el mecanismo de acción y de protección generado por la vacuna.

En medicina veterinaria, prácticamente, no se ha avanzado mucho desde la aparición de la vacuna a cepa Sterne. Esta vacuna, si bien en líneas generales es considerada como segura e inmunogénica, conlleva un riesgo potencial que es la generación de todos los componentes de la toxina, con acción deletérea sobre el sistema inmune.

Creímos oportuno indagar sobre los mecanismos inmunogénicos intrínsecos de la misma. No hemos encontrado muchas explicaciones que vayan más allá de la tradicional académica. Como resultado de estas pesquisas y de comunicaciones personales con autores de relevancia y reconocidos en la materia, nos permitimos, a modo de presunción, elaborar la teoría desarrollada *up supra*.

Creemos que resultaría de interés generar, a partir de la presente revisión bibliográfica, un foro de discusión que contribuya al conocimiento sobre el real mecanismo inmunogénico de las distintas vacunas disponibles.

Bibliografía

- Aloni-Gristein R, Gat O, Altboum Z, Velan B, Cohen S, Shafferman A. 2005. Oral spore vaccine based on live attenuated nontoxigenic *Bacillus anthracis* expressing recombinant mutant protective antigen. *Infection and Immunity*. 73:4043-53. doi: 10.1128/IAI.73.7.4043-4053.2005.
- Belton FC, Darlow HM, Henderson DW. 1956. The use of anthrax antigen to immunise man and monkey. *Lancet*. 271(6941):476-9.
- Benson EL, Huynh PD, Finkelstein A, Collier RJ. 1998. Identification of residues protective antigen channel. *Biochemistry*. 37:3941-8. doi: 10.1021/bi972657b.
- Beznosov MV, Petrov GA, Sorkin I, Filippova OL, Rogov SN. 1997. The isolation of the surface antigen from vegetative cells of *Bacillus anthracis* STI-1 and study of its protective properties. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii, i Immunobiologii*. 1:9-13.
- Blaustein RO, Koehjer TM, Collier RJ, Finkelstein A. 1989. Anthrax toxin: channel-forming activity of protective antigen in planar phospholipoid bilayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86:2209-13.
- Brachman PS, Gold H, Plotkin SA, Fekety RF, Werrin M, Ingraham NR. 1945. Field evaluation of human anthrax vaccine. *American Journal of Public Health Nations*. 52(4):632-45.
- Brachman PS, Gold H, Plotkin SA, Fekety FR, Werrin M, Ingraham NR. 1962. Field evaluation of a human anthrax vaccine. *American Journal of Public Health*. 19:3241-7.
- Brossier F, Weber Levy M, Mock M, Sirard JC. 2000. Role of toxin functional domains in anthrax pathogenesis. *Infection and Immunity*. 68:178-186.
- Brossier F, Levy M, Mock M. 2002. Anthrax spores make an essential contribution to vaccine efficacy. *Infection and Immunity*. 70:661-4.
- Bussièrè JL, Mc Cormick GC, Green JD. 1995. Preclinical safety assesment considerations. *Pharmaceutical Biotechnology*. 6:61.
- Carter KC. 1985. Koch's postulates in relation to the work of Jacob Henle and Edwin Klebs. *Medical History*. 29:353-74.
- Chabot D J, Scorpio A, Tobery SA, Little SF, Norris SL, Friedlander AM. 2004. Anthrax capsule vaccine protects against experimental infection. *Vaccine*. 23:43-7. doi: 10.1016/j.vaccine.2004.05.029.
- Cohen S, Mendelson I, Altboum Z, Kobiler D, Elanany E, Bino T, Leitner M, Inbar I, Rosemberg H, Gozes H, Gozes Y, Barak R, Fisher M, Kronman C, Velan B, Shafferman A. 2000. Attenuated nontoxigenic and noncapsulated recombinant *Bacillus anthracis* spore vaccines protects against anthrax. *Infection and Immunity*. 68:4549-58. doi: 10.1128/IAI.68.8.4549-4558.2000.
- Coulson NM, Fulop M, Titball RW. 1994. *Bacillus anthracis* protective antigen, expressed in *Salmonella typhimurium* SL 3261, affords protection against anthrax spore challenge. *Vaccine*. 12:1395-401.
- Davis B, Dulbecco R, Herman N, Eisen H, Ginsberg H, 1996. *Tratado de microbiología*. 4a Ed. Barcelona. Salvat Editores.
- Darlow HM, Belton FC, Henderson DN. 1956. The use anthrax antigen to immunize man and monkey. *Lancet*. 271:476-9.
- Doganay M, Metan G, Alp E. 2010. A review of cutaneous anthrax and its outcome. *Journal of Infection and Public Health* 3:98-105. doi: 10.1016/j.jiph.2010.07.004.
- Duesbery NS, Webb CP, Leppla SH, Gordon VM, Klimpel KR, Copeland TD, Ahn NG, Oskarsson MK, Fukasawa K, Paul KD, Vande Woude GF. 1998. Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. *Science*. 280:734-7.
- Elliot JL, Mogridge J, Collier RJ. 2000. A quantitative study of the interaction of *Bacillus anthracis* edema factor and lethal factor with activated protective antigen. *Biochemistry*. 39:6706-13. doi: 10.1021/bi000310u.
- Fellows PF, Linscott MK, Ivins BE, Pitt ML, Rossi CA, Gibbs PH, Friedlander AM. 2001. Efficacy of a human anthrax vaccine in guinea pigs, rabbits, and rhesus macaques against challenge by *Bacillus anthracis* isolates of diverse geographical origin. *Vaccine*. 19:3241-7.
- Flick-Smith HC, Eyles JE, Hebdon R, Waters EL, Beedham RJ, Stagg TJ, Miller J, Alpar HO, Baillie LW, Williamson ED. 2002. Mucosal or parenteral administration of microsphere-associated *Bacillus anthracis* protective antigen protects against anthrax infection in mice. *Infection and Immunity*. 70:2022-8. doi: 10.1128/IAI.70.4.2022-2028.2002.
- Friedlander AM, Pittman PR, Parker GW. 1999. Anthrax vaccine: evidence for safety and efficacy against inhalational anthrax. *Journal of the American Medical Association*. 282:2104-6.
- Fu S, Tong X, Cai Ch, Zhao Y, Wu Y, Li Y, Xu J, Zhang XC, Xu L, Chen W, Rao Z. 2010. The structure of tumor endothelial

- marker 8 (TEM8) extracellular domain and implications for its receptor function for recognizing anthrax toxin. *PLoS ONE* 5, e11203. doi: 10.1371/journal.pone.0011203.
- Geison GL. The private science of Louis Pasteur. 1995. Princeton, Princeton University Press.
- Glomski IJ, Kepler SJ, Corre JP, Mock M, Goossens PL. 2005. Spores confer protective cellular immunity against capsulated *Bacillus anthracis*. ACT. Conference 2005. Santa Fe, EE.UU.
- Hahn UK, Boehm R, Beyer W. 2006. DNA vaccination against anthrax in mice-combination of anti-spore and anti-toxin components. *Vaccine*. 24:4595-7. doi: 10.1016/j.vaccine.2005.08.031.
- Hotchkiss KA, Basile CM, Spring SC, Bonuccelli G, Lisanti MP, Terman BI. 2005. TEM 8 expression stimulates endothelial cell adhesion and migration by regulating cell-matrix interactions on collagen. *Experimental Cell Research*. 305:133-44. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.12.025.
- Ingram RJ, Harris A, Ascough S, Metan G, Doganay M, Ballie L, Williamson ED, Dyson H, Robinson JH, Sriskandan S, Altmann DM. 2013. Exposure to anthrax toxin alters human leucocyte expression of anthrax toxin receptor 1. *Clinical and Experimental Immunology*. 173:84-91. doi: 10.1111/cei.12090.
- Ivins BE, Ezzell JW Jr, Jemski J, Hedlund K, Ristrop JD, Leppla SH. 1986. Immunization studies with attenuated strains of *Bacillus anthracis*. *Infection and Immunity*. 52:454-8.
- Ivins BE, Welkos SL. 1986. Cloning and expression of the *Bacillus anthracis* protective antigen gene in *Bacillus subtilis*. *Infection and Immunity*. 54:537-42.
- Ivin BE, Welkos SL, Knudson GB, Little SF. 1990. Immunization against anthrax with aromatic complex dependent (Aro-) mutants of *Bacillus anthracis* and with recombinant strain of *Bacillus subtilis* that produce anthrax protective antigen. *Infection and Immunity* 58:303-8.
- Ivins BE, Welkos SL, Little SF, Knudson GB. 1990. Cloned protective activity and progress in development of improved anthrax vaccines. *Salisbury Medical Bulletin*, 68 (suppl), 86.
- Ivins BE, Fellows PF, Nelson GO. 1994. Efficacy of standard human anthrax vaccine against *Bacillus anthracis* spore challenge in guinea pigs. *Vaccine*. 12, 872.
- Ivins BE, Fellows PF, Pitt L, Estrep J, Farchaus J, Friedlander A, Gibbs P. 1995. Experimental anthrax vaccines: efficacy of adjuvants combined with protective antigen against an aerosol *Bacillus anthracis* spore challenge in guinea pigs. *Vaccine*. 13(18):1779-84.
- Ivins BE. 1998. Anthrax vaccines. How stable is the potency? The ASMth ifc General Meeting. Atlanta, EE. UU. May 18.
- Ivins BE, Pitt ML, Fellows PF, Farchaus JW, Benner GE, Waag DM, Little SF, Anderson, GW Jr, Gibbs PH, Friedlander AM. 1998. Comparative efficacy of experimental anthrax vaccine candidates against inhalation anthrax in rhesus macaques. *Vaccine*. 16:1141-8.
- Jones MN, Beedham RJ, Turnbull PC, Fitzgeorge RB, Manchee RJ. 1996. Antibiotic prophylaxis for inhalations anthrax. *Salisbury Medical Bulletin* 87, (suppl) 127.
- Kauffman SH, Schaible UE. 2005. 100th anniversary of Robert Koch's Nobel Prize for the discovery of the tubercle bacillus. *Trends in Microbiology*. 13(10), 469-75. doi: 10.1016/j.tim.2005.08.003.
- Little SF, Knudson GB. 1986. Comparative efficacy of *Bacillus anthracis* live spore vaccine and protective antigen vaccine against anthrax in the guinea pig. *Infection and Immunity*. 52:509-12.
- Mahlandt BG, Klein F, Lincoln RE, Haines BW, Jones WI Jr, Friedman RH. 1966. Immunologic studies of anthrax. IV. Evaluation of the immunogenicity of three components of anthrax toxin. *Journal of Immunology*. 96:727-33.
- Maldonado-Arocho FJ, Fulcher JA, Lee B, Bradley KA. 2006. Anthrax oedema toxin induces anthrax toxin receptor expression in monocyte-derived cells. *Molecular Microbiology*. 61:324-37. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05232.x.
- Martchenko M, Candille SI, Tang H, Cohen SN. 2012. Human genetic variation altering anthrax toxin sensitivity. *Proceedings National Academic Sciences USA*, 109:2972-7.
- Maurer PH. 1965. Antigenicity of polypeptides (poly alpha amino acids) XIII. Immunological studies with synthetic polymers containing only D- or D- and L- α -amino acids. *Journal of Experimental Medicine*. 121:339-49.
- Miksza JA, Sullivan VJ, Dean C, Waterston AM, Alarcon JB, Dekker JP 3rd, Brittingham JM, Huang J, Hwang CR, Ferriter M, Jiang G, Mar K, Saikh K U, Stiles BG, Roy CJ, Ulrich RG, Harvey NG. 2005. Protective immunization against inhalational anthrax: a comparison of minimally invasive delivery platforms. *Journal of Infectious Diseases*. 191:278-88.
- Milne JC, Blanke S R, Hanna PC, Collier RJ. 1995. Protective antigen- binding domain of anthrax lethal factor mediates translocation of a heterologous protein fused to its amino-or-carboxy-terminus. *Molecular Microbiology*. 15:661-6.
- Muehlbauer SM, Evering TH, Bonuccelli G, Squires RC, Ashton AW, Porcelli SA. 2007. Anthrax lethal toxin kills macrophages in a strain-specific manner by apoptosis or caspase-1-mediated necrosis. *Cell Cycle*. 6:758-66. doi: 10.4161/cc.6.6.3991.
- Nass M. 1998. Anthrax vaccine safety and efficacy: response to Army Surgeon General Ronald Blanck's posting.
- Petosa C, Collier RJ, Klimpel KR, Leppla SH, Liddington RC. 1997. Crystal structure of the anthrax protective antigen. *Nature*. 385:833-8.
- Pittman PR, Gibbs PH, Cannon TL, Friedlander AM. 2001. Anthrax vaccine: short term safety experience in humans. *Vaccine*. 20:972-8. doi: 10.1016/S0264-410X(01)00387-5.
- Pittman PR, Kim-Ahn G, Pifat DY, Coon K, Gibbs P, Little S, Pace-Templeton J, Myers R, Parker GW, Friedlander AM. 2002. Anthrax vaccine: immunogenicity and safety of a dose-reduction, route-change comparison study in humans. *Vaccine*. 20(9-10):1412-20. doi:10.1016/S0264-410X(01)00462-5.
- Popov SG, Villasmil R, Bernardi J, Grene E, Cardwell J, Wu A, Alibek D, Bailey C, Alibek K. 2002. Lethal toxin of *Bacillus anthracis* causes apoptosis of macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 293:349-55.
- Puziss M, Wright GG. 1954. Studies on immunity in anthrax. IV. Factors influencing elaboration of the protective antigen of *Bacillus anthracis* in chemically defined media. *Journal of Bacteriology* 68(4):474-82.
- Rhie GE, Roehrl MH, Mourez M, Collier RJ, Mekalanos JJ, Wang JY. 2003. A dually active anthrax vaccine that confers protection against both bacilli and toxins. *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America. 100:10925-30.
- Salles II, Voth DE, Ward SC, Averette KM, Tweten RK, Bradley KA, Ballard JD. 2006. Cytotoxic activity of *Bacillus anthracis* protective antigen observed in a macrophage cell line overexpressing ANTXR1. *Cellular Microbiology*. 8:1272-81.
- Scobie, H. M. and Young, J. A. T. 2005. Interactions between anthrax toxin receptors and protective antigen. *Current Opinion in Microbiology*. 8:106-12.
- Schneerson R, Kubler-Kielb J, Liu TY, Day ZD, Leppla SH, Yergey A, Backlund P, Shiloach J, Majadry F, Robbins JB. 2003. Poly (gamma-D-glutamic acid) protein conjugates induce IgG antibodies in mice to the capsule of *Bacillus anthracis*; a potential addition to the anthrax vaccine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100:8945-50.
- Schumm WR, Webb FJ, Jurich AP, Bollman SR. 2002. Comments on the Institute of Medicine's 2002 report on the safety of anthrax vaccine. *Psychological Reports*. 91:187-91.
- Scobie HM, Young JA. 2005. Interactions between anthrax toxin receptors and protective antigen. *Current Opinion in Microbiology*. 8:106-12. doi: 10.1016/j.mib.2004.12.005.
- Scobie HM, Rainey GJA, Bradley KA, Young JA. 2003. Human capillary morphogenesis protein 2 functions as an anthrax toxin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100:5170-4.
- Scorpio A, Blank TE, Day WA, Chabot D J. 2006. Anthrax vaccines: Pasteur to the present. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 63:2237-48. doi: 10.1007/s00018-006-6312-3
- Shlyakhov EN, Rubinstein E. 1994. Human live anthrax vaccine in the former USSR. *Vaccine*. 12(8):727-30.
- Sloat BR, Cui Z. 2005. Strong mucosal and systemic immunities induced by nasal immunization with anthrax protective antigen protein incorporated in liposome-protamine-DNA particles. *Pharmaceutical Research*. 23:262-9.
- Steichen C, Chen P, Kearney JF, Turnbough CL Jr. 2003. Identification of the immunodominant protein and other proteins of the *Bacillus anthracis* exosporium. *Journal of Bacteriology*. 185:1903-10.
- Sterne M. 1937. Avirulent antrax vaccine. *Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal Industry*. 7:41-3.
- Terra JK, Cote CK, France B, Jenkins AL, Bozue JA, Welkos SL. 2010. Cutting edge: resistance to *Bacillus anthracis* infection mediated by a lethal toxin sensitive allele of Nalp1b/Nlrp1b. *Journal of Immunology* 184:17-20. doi: 10.4049/jimmunol.0903114.
- Tizard IR. 2009. *Inmunología Veterinaria*. 8va Ed. Elsevier. España.
- Tournier JN, Ulrich RG, Quesnel-Hellman A, Mohamad-zadeh M, Stiles BG. 2009. Anthrax, toxin and vaccines: a 125-year journey targeting *Bacillus anthracis*. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 7 (2):219-36. doi: 10.1586/14787210.7.2.219.
- Turnbull PC, Quin CP, Hewson P, Stockbridge M, Melling J. 1990. Protection conferred by microbially supplement UK and purified PA vaccine *Salisbury Medical Bulletin*. 68 (suppl), 89.
- Turnbull PC. 1991. Anthrax vaccine: past, present and future. *Vaccine*. 9(8):533-9.
- Wang TT, Fellows PF, Leighton TJ, Lucas AH. 2004. Induction of opsonic antibodies to the gamma-D-glutamic acid capsule of *Bacillus anthracis* by immunization with a synthetic peptide-carrier protein conjugate. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 40:231-7. doi: 10.1016/S0928-8244(03)00366-3.
- [Warfel JM, Steele AD, D'Agnillo F. 2005. Anthrax lethal toxin induces endothelial barrier dysfunction. *American Journal of Pathology*. 166:1871-81. doi: 10.1016/S0002-9440(10)62496-0.
- Young JJ, Bromberg-White JL, Zylstra C, Church JT, Boguslawski E, Resau JH, Williams BO, Duesbery NS. 2007. LRP5 and LRP6 are not required for protective antigen-mediated internalization or lethality of anthrax lethal toxin. *PLOS Pathogens* 3:27. doi: 10.1371/journal.ppat.0030027.
- Zegers ND, Kluter E, van Der Stap H, van Dura E, van Dalen P, Shaw M, Baillie L. 1999. Expression of the protective antigen of *Bacillus anthracis* by *Lactobacillus casei*: towards the development of an oral vaccine against anthrax. *Journal of Applied Microbiology*. 87:309-14.

Cervezas elaboradas artesanalmente: análisis de la normativa técnico-sanitaria vigente

Handcrafted beer: analysis of applicable sanitary technical regulations

Bigeon G*, Benítez F, Pellicer K, Copes J

Cátedra de Tecnología y Sanidad de los Alimentos, Departamento de Epizootiología y Salud Pública.
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

*Correo electrónico del autor: gbigeon@fcv.unlp.edu.ar

Resumen: La cerveza es tan antigua como nuestra civilización. Actualmente, ha surgido una gran variedad de cervezas en América del Sur, alguna con características verdaderamente atípicas o diferentes con respecto al concepto clásico, principalmente elaboradas por el sector “microcervecero” y/o “artesanal”. Este trabajo consistió en la búsqueda, recopilación y análisis de la normativa técnico-sanitaria vigente para este tipo de productos en la región. Argentina cuenta con una norma vertical dentro del Código Alimentario Argentino para cervezas «elaboradas artesanalmente», debiendo cumplir también con las normas horizontales para cerveza establecidas por el MERCOSUR. En la actualidad, este es el único país en el bloque regional que cuenta con legislación específica para estos productos. Brasil y Bolivia cuentan con anteproyectos de normas para definir el producto y los establecimientos, mientras que el resto de los estados parte no poseen normativa vertical. Colombia posee un registro de este tipo de productos incluyendo en el rótulo el término “artesanal”. Chile, Ecuador y Perú no cuentan actualmente con ninguna reglamentación que haga referencia a las cervezas elaboradas de forma artesanal. Se concluye que sería conveniente armonizar criterios o establecer parámetros técnicos específicos para las cervezas elaboradas de forma artesanal en la región, indistintamente de cual sea su jurisdicción, sin que esto implique el incumplimiento de la norma general para cerveza. Esta propuesta tiene como objeto resguardar la Salud Pública, garantizar una leal competencia entre los elaboradores y proporcionar información adecuada a los consumidores mediante la correcta rotulación.

Palabras clave: cerveza, elaboración artesanal, normativa técnica, América del Sur

Abstract: Beer is as old as our civilization. Nowadays, a wide range of beers has emerged in South America, some of them with truly atypical or diverse characteristics compared to the classic concept, manufactured mainly by the “micro brewery” and/or “craft brewery” sector. This work consisted in the search, compilation and analysis of the technical-sanitary norms applicable to this type of products in the region. Argentina has vertical regulations within the Argentine Food Code for “craft beers”, which still requires compliance with horizontal regulations for beers established by MERCOSUR. Currently, this is the only country within the regional bloc that has specific legislation for these products. Brazil and Bolivia have regulatory projects to define the product and facilities, while the rest of the member states do not have vertical regulations. Although Colombia has a registry for this type of products, it includes the term “crafts” on its label. Chile, Ecuador and Peru do not currently have any regulations regarding craft beers. In conclusion, it would be wise to harmonize the criteria or establish specific technical standards for craft beers in the region, regardless of their scope, without this implying the breach of the general rule for beers. The aim of this proposal consist to ensure the protection of public health, fair competition among brewers and provide adequate information to consumers at the time of purchase through accurate labeling.

Key words: beer, craft beers, technical regulations, South America

Introducción

La cerveza, bebida alcohólica elaborada a partir de agua, cereal, lúpulo y levadura, es tan antigua como nuestra civilización. Se cree que su origen está unido a los primeros asentamientos humanos junto al desarrollo de la agricultura y al alejamiento del modo de vida nómada (FIFCO). Se considera que los sumerios fueron los primeros en fermentar granos como la cebada. Fue en el desierto de Sumeria (Mesopotamia asiática), hace unos 6.000 años, donde se halló el registro sobre unas tablas de arcilla con las primeras menciones de la cerveza, llamada *sikaru* (Alcazar, 2001).

Esta bebida ha ido modificándose a lo largo del tiempo, beneficiándose con los progresos científicos y técnicos, logrando, de esta forma, un avance y mejora tecnológica, como por ejemplo, la automatización de sus procesos (Carrillo, 2009; FIAB, 2009). Algunos de ellos son: la reducción de la oxidación antes y durante la maceración, la disminución en el contenido de sustancias volátiles que afectan la calidad del producto, la restricción del consumo de energía en la elaboración del mosto (para mermar el costo de producción y mejorar la calidad del producto) y la implementación de medidas para contribuir a la gestión de los residuos cerveceros de elaboración (Carrillo, 2009).

Se estima que la difusión del consumo de cerveza en Latinoamérica está relacionada con la migración de habitantes extranjeros y su influencia (Cerpa & Melo, 2011). En 2015, ocho países de la región concentraban la mayor parte de la producción de cerveza (291 millones de hectolitros), liderados por Brasil, México seguidos por otros tres países con una cantidad similar: Venezuela, Colombia y Argentina (Petevél, 2016).

El consumo de cerveza en Argentina es de 44,7L per cápita por año. Esta cifra es la más alta entre todas las bebidas alcohólicas que se consumen (Abliin, 2014), ocupando el puesto 72 del *ranking* mundial. El *ranking* está encabezado por la República Checa (147L), Alemania (111L) y Austria (109L). Con respecto a las ventas, Argentina comercializa 17 millones de hectolitros de cerveza por año, lo que permite considerarlo como uno de los países con mayor potencial de crecimiento (La Capital, 2016).

En la actualidad, han surgido una gran variedad de cervezas en la región, alguna de ellas con características verdaderamente atípicas o diferentes respecto del concepto clásico, principalmente elaboradas por el sector “microcervecero” y/o “artesanal” (Bascur Palacios, 2013). El volumen de producción, la tecnología implementada, las materias primas utilizadas, la receta del maestro cervecero y, principalmente, las diferencias en el proceso de elaboración, favorecen el surgimiento de una gran multiplicidad de estilos (Martínez Muñoz, 2015).

En cuanto a los productos, se puede resaltar que son relativamente nuevos, variados, y sus características difieren en volumen, materias primas, composición, color, elaboración o producción, forma de gasificación, entre otras. Esto hace que sea difícil unificar criterios y establecer pautas de índole técnico.

Con respecto a los establecimientos elaboradores de “cervezas artesanales”, encuadrarlos y definirlos dentro de un reglamento es un trabajo arduo y engorroso, en el que idealmente quedarían plasmadas las cuestiones operativas, técnicas y edilicias que estos deben cumplir. Los requerimientos deberían ser contemplados siempre y cuando cumplan con los requisitos de seguridad e higiene mínimos establecidos para garantizar la inocuidad del producto. Por lo tanto, establecer las características de las “cervecías artesanales” y consignar las diferencias con las industriales no es tarea sencilla, como por ejemplo, en la definición de la cantidad de litros producidos por el establecimiento, es decir, las escalas de producción.

El consumo de esta bebida se ha ido incrementando debido a cambios sociales y de estilo de vida. El consumidor busca calidad y diferentes variedades de cervezas, lo que ha provocado un aumento de pubs y bares que promueven su consumo y en lo que lo social juega un rol fundamental (Martínez Muñoz, 2015).

En nuestro país se observa que las “cervecías artesanales” han proliferado (20 % anual) (Abliin, 2014) y, junto con la venta de hamburguesas, son los negocios de moda que registran un crecimiento exponencial de ventas (La Nación, 2017), con un crecimiento en variedades y productos que hasta hace poco no existían ni se elaboraban (Abliin, 2014).

En Argentina, las cervezas cuentan con un marco legal y técnico a cumplir dentro del Código Alimentario Argentino (CAA) en el que se ha incorporado en su articulado el reglamento técnico MERCOSUR para este tipo de productos. Recientemente, se ha establecido legislación relativa a las cervezas “elaboradas artesanalmente”, la que nace de la necesidad de contar con las herramientas legales para legitimarlas.

El objetivo del presente trabajo consistió en la búsqueda y recopilación de la normativa técnico-sanitaria en América del Sur, vigente al 1 de junio de 2017, en relación con las cervezas elaboradas bajo metodología “artesanal” y su comparación con la situación técnico-legal de la cerveza.

Normas analizadas

Se llevó a cabo un análisis de la normativa sanitaria para las cervezas, con hincapié en las elaboradas artesanalmente. Los elementos para la realización del análisis comprendieron las normas encontradas y

vigentes a la fecha de corte: 1 de junio de 2017; también se consignaron dos anteproyectos de ley (Brasil y Bolivia), no vigentes en la actualidad.

Resolución GMC N°14/01, Reglamento técnico del MERCOSUR para productos de cervecías.

Código Alimentario Argentino (CAA), Capítulo XIII, artículos 1080, 1081, 1082, y 1083.

Resolución conjunta SPReY y SV N°5-E/ 2017 que dictamina la incorporación al CAA del artículo N° 1082 bis.

Decreto 6871/09, Brasil Diário Oficial da União - Seção 1 - 5/6/2009, Página 20 (Publicação Original). Disponible en: <http://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/2009/decreto-6871-4-junho-2009-588673-norma-pe-html>.

Proyecto de Ley N°5191/13, regulación de cervezas artesanales. Brasil. Disponible en: <http://www.cerevisiaie.com.br/guia-regulamentacao-erveja-artesanal>.

Norma Boliviana NB 382/2001, productos de cervecía, IBNORCA. Bolivia. Disponible en: <http://www.ibnorca.org/images/archivos/IBNORCACATALOGODENORMAS2016Noviembre.pdf>.

Anteproyecto de norma boliviana, relacionada a las cervezas artesanales APNB 323001(16) Disponible en: <http://www.ibnorca.org/images/archivos/consulta-sept15/Septiembre2016/APNB323001.pdf>.

Ley N° 18455, con su Decreto Supremo reglamentario N°78 del 1986, última modificación: Diario Oficial n°39.290 del 17 de febrero de 2009. Chile.

Decreto N° 1686 del año 2012, Colombia. Diario Oficial No. 48.517 del 9 de agosto de 2012.

Norma Técnica Colombiana NTC 3854. Bebidas alcohólica, Cerveza. 1996-03-02.

Norma Técnica Obligatoria N° 2262, Ecuador. El Consejo Directivo del INEN aprobó este proyecto de norma en sesión el 2 de agosto de 2002.

Norma Técnica Peruana 213.014:2016, Perú. El Peruano. Publicación Oficial - Diario Oficial, 14 de abril de 2016.

Decreto Supremo 20-90-ICTIIND, Perú. El Peruano, 21 de junio de 1990.

Situación en diversos países de la región

Argentina, Brasil, Paraguay, Uruguay y Venezuela integran el bloque regional llamado MERCOSUR. Este cuenta con la resolución GMC N°14/01, reglamento técnico MERCOSUR de productos de cervecía. En este documento, se fija la identidad y calidad de los productos de cervecía para el consumo humano, sin mencionar a las cervezas elaboradas en forma artesanal.

En **Argentina**, recientemente, se sancionó una norma para las “cervezas elaboradas artesanalmente”, con fecha de publicación 3 de febrero de 2017 en el Boletín Oficial y entrada en vigencia al día siguiente. La Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos y la Secretaría de Agregado de Valor, en resolución conjunta N° 5-E/ 2017, resolvieron en el: “ARTÍCULO 1° — Incorpórese al Código Alimentario Argentino el artículo 1082 bis, el que quedará redactado de la siguiente manera: “Podrá incluirse la leyenda ‘Elaboración Artesanal’ en el rótulo de aquella cerveza que cumpla con las siguientes exigencias: a) Que no utilice en su producción aditivos alimentarios; b) Que se encuentre adicionada únicamente con ingredientes naturales; c) Que la elaboración sea de manera manual o semiautomática; y d) Que en el caso que se le agregue jugos o extractos de frutas, éstos sean previamente pasteurizados”. Además, se destaca que “a la cerveza que se comercialice con la leyenda “Elaboración Artesanal” no se le aplicará el parámetro de turbidez establecido en el artículo 1082 inciso b). Se permitirá el uso del gas autorizado en el artículo 1067”. Cabe remarcar que esta reglamentación establece cuáles son las condiciones necesarias que debe cumplir el producto para poder llevar impreso en su etiqueta la frase “elaboración artesanal”, generando la posibilidad de que las empresas rotulen legítimamente sus bebidas al incorporar la leyenda en su rótulo.

En **Brasil**, en 2013 se propuso un anteproyecto de ley N° 5191/13 (Cerevisiae, 2016), con el exclusivo objetivo de regular la producción de cerveza artesanal. La idea del proyecto es definir a la “cerveza artesanal” e instaurar las características de los establecimientos que producirían este tipo de producto, para ofrecer simplificaciones en el proceso de registro e inspección. Sin embargo, este proyecto se encuentra actualmente postergado, debatiéndose en las diversas comisiones, antes de ser sometida a votación (Rodrigues et al., 2014).

La norma 382 del año 2001 de **Bolivia** hace referencia a los productos de cervecía: definiciones, clasificación y requisitos. En relación a las “cervezas artesanales”, este país cuenta con un anteproyecto de Norma IBNORCA, APNB 323001. La propuesta de este documento es establecer las definiciones, clasificación y los requisitos que deben cumplir las cervezas llamadas artesanales para su elaboración y/o comercialización en el territorio nacional boliviano. En la actualidad, este proyecto está a la espera de ser aprobado.

Chile cuenta con la Ley N° 18455, que fija las normas sobre producción, elaboración y comercialización de alcoholes etílicos, bebidas alcohólicas y vinagres. Esta fue reglamentada por el Decreto Supremo N° 78 de 1986, estableciendo las normas técnicas

dispuestas para la elaboración de cerveza industrial y otras bebidas alcohólicas y vinagres. A partir del 2013, por la creciente actividad en el país para cervezas de elaboración artesanal, el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) tiene dentro de sus funciones fiscalizar la Ley de Alcoholes 18.455 en cuanto a su producción y comercialización y, en el marco de ello, el servicio entrega una acreditación para que los establecimientos elaboradores puedan funcionar. Por lo tanto, estos deben inscribir el producto y realizar análisis al mismo para comprobar graduación alcohólica y los ingredientes que se están utilizando (Martínez, 2013).

Colombia cuenta con el decreto N° 1686 del año 2012 (Valencia *et al.*, 2015) en el que se hallan los requisitos sanitarios que se deben cumplir para la fabricación, elaboración, hidratación, envase, almacenamiento, distribución, transporte, comercialización, expendio, exportación e importación de bebidas alcohólicas destinadas para consumo humano. Por otro lado, el decreto N° 3192 de 1983, reglamenta parcialmente el Título V de la Ley 9 de 1979, en lo que refiere a fábricas de alcohol y bebidas alcohólicas, elaboración, hidratación, envase, distribución, exportación, importación y venta de estos productos y establece mecanismos de control en el territorio nacional. También posee una Norma Técnica, NTC 3854, Bebidas Alcohólicas, cerveza. Hay antecedentes de que el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos – INVIMA, ha concedido registros sanitarios a “cerveza artesanal” rubia tipo *belgian blond*, quedando establecido el término cerveza artesanal en el rótulo. En la resolución N° 2014005947 del 6 de marzo de 2014, por la cual se concede el Registro Sanitario, se consigna que el producto debe cumplir con el decreto N° 1686 del año 2012. Si bien en la etiqueta es posible expresar la denominación “cerveza artesanal”, en dicho decreto no existen referencias ni definición del término “artesanal”.

Ecuador posee la Norma Técnica (INEN) N° 2262, “Bebidas Alcohólicas. Cerveza. Requisitos”. En ella se establecen los requisitos que debe cumplir la cerveza para ser apta para el consumo humano. En el texto se definen los criterios físicos, químicos y microbiológicos. Los elaboradores de este tipo de bebidas artesanales se enfrentan, en el momento de la inscripción del producto, con una dificultad técnica y sanitaria específica: según la normativa, la cerveza debe ser pasteurizada, y la “cerveza artesanal” en Ecuador no lo es, sino que atraviesa otro proceso de procesamiento (e. *comexplus*, 2014). Por lo expuesto, no se garantiza el resguardo de la salud pública. Este es uno de los puntos importantes de conflicto a la hora de establecer la normativa técnica para las cervezas elaboradas artesanalmente, pues los muchos y variados procesos tecnológicos hacen a las características de las distintas cervezas. Debido a esto, las

autoridades del INEN reconocen la necesidad de una ampliación de la normativa N° 2262 o inclusive una norma propia para las cervezas artesanales.

Perú posee varias normas técnicas (NTP) referidas a la cerveza. Cabe destacar que estas son voluntarias y están aprobadas a través de la Dirección de Normalización del Instituto Nacional de Calidad (INACAL). Mencionaremos la NTP 213.014:2016 Cerveza. Requisitos. 3ª Edición que reemplaza a la NTP 213.014:2014. Este país cuenta con otras normas NTP, por ejemplo, la que tiene la finalidad de determinar la densidad relativa en cervezas. Por otro lado, el Decreto Supremo 20-90-ICTIIND establece la información que deberá llevar inscrita en el empaque, envase o etiqueta toda bebida alcohólica que sea puesta en venta. No se ha encontrado ninguna norma que haga referencia a las cervezas elaboradas artesanalmente en este país.

Sobre la bibliografía consultada, se remarca la reciente y escasa normativa para las cervezas “elaboradas artesanalmente” en la región; de hecho, cabe destacar la ausencia de legislación referida o definición establecida en el CODEX Alimentarius sobre este tipo de bebidas elaboradas en forma artesanal. No ocurre lo mismo con los productos de la cervecería en general o industriales, siendo estas normas utilizadas como marco legal y técnico en la actualidad. Esta situación trae como consecuencia la limitación a los productores para ampliar su rango de comercialización y resulta un obstáculo a la hora de solicitar permisos o habilitaciones y acceder a créditos.

Desde el punto de vista sanitario, es de suma importancia contar con requisitos bien definidos según el tipo de producción, en este caso “artesanal”, así como los procedimientos de acuerdo con la normativa aplicable en materia de otorgamiento de permisos sanitarios de funcionamiento, autorizaciones sanitarias y de certificados de habilitación de establecimientos elaboradores.

Discusión y conclusiones

Dado el aumento en la producción y el consumo de cervezas artesanales basado en el cambio de hábitos sociales, Argentina cuenta con una norma vertical dentro de su CAA para cervezas “elaboradas artesanalmente” y no debe incumplir con las normas horizontales para cerveza establecidas por MERCOSUR e incorporadas en su código.

En el resto de los países la situación difiere, ya que predomina la escasa e incipiente normativa para cervezas elaboradas artesanalmente, a diferencia de la legislación para cervezas.

De lo expuesto, se concluye que sería prudente unificar criterios implementando una norma específica

para cervezas elaboradas de forma artesanal en la región, sin dejar de cumplir con la norma general para cerveza. Esto garantizaría el resguardo de la Salud Pública y una leal competencia entre los elaboradores y, además, proporcionaría una adecuada información al consumidor en el momento de la compra mediante una correcta rotulación.

Bibliografía

Ablin A. 2014. Área de Sectores Alimentarios. Dirección de Agroalimentos. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca Informe Sectorial N° 3. El Mercado de la Cerveza. Alimentos Argentinos. [ONLINE]. Disponible en: http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/bebidas/In-formes/Cerveza_03_2014_04Abr.pdf [Consultado 06/2017].

Alcazar Rueda A. 2001. Aplicaciones del análisis multivariante a la diferenciación de tipos de cerveza. Universidad de Sevilla. Facultad de Química. Departamento de Química Analítica. España. Pág 2. [ONLINE] Disponible en: http://fondosdigitales.us.es/media/thesis/1596/I_T-823-introduccion.pdf [Consultado 08/2017].

APNB 323001. Anteproyecto de norma boliviana, relacionada a las cervezas artesanales.. [ONLINE]. Disponible en: <http://www.ibnorca.org/images/archivos/consultasept15/Septiembre2016/APNB323001.pdf> [Consultado 05/2017].

Bascur Palacios GG. 2013. Plan de negocio de una cervecería artesanal en la región metropolitana. Memoria para optar al título de ingeniero civil industrial en Internet. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. Departamento de Ingeniería Industrial. [ONLINE]. Disponible en: http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/113903/cfbascur_gp.pdf?Sequence=1 [Consultado 06/2017].

Carrillo RU. 2009. Avances en la tecnología de elaboración de cervezas. Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia. Congreso Nacional de biotecnología y bioingeniería. VII simposio Internacional de producción de alcoholes y levaduras. Pág. 1. Acapulco, México. [ONLINE]. Disponible en: http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/acapulco09/TRABAJOS/simposios/simposio_levaduras_bebidas/RAUL_CARRILLO.pdf [Consultado 06/2017].

Cerevisiae. 2016. Guía de reglamentación de la cerveza artesanal. Brasil. [ONLINE]. Disponible en: cerevisiae.com.br/guia-regulamentacao-cerveja-artesanal [Consultado 05/2017].

Cerpa J, Melo O. 2011. Determinantes del precio en cervezas: aplicación del modelo de precios hedónicos. Economía Agraria. Volumen 15 – 2011. [ONLINE]. Disponible en: <http://www.aeachile.cl/docs/r15/6744%20-%204.pdf> [Consultado 05/2017].

FIFCO. Cervezas y mucho más. Cervecería Costa Rica. [ONLINE]. Disponible en: http://www.florida.co.cr/files/documents/177_es_p_cervezaymuchoms.pdf [Consultado 06/2017].

Código alimentario argentino (Ley N° 18284/69), artículos 1080, 1081, 1082, y 1083. Capítulo XIII. Bebidas fermentadas. CAA. [ONLINE]. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo_XIII.pdf [Consultado 06/2017].

Decreto N° 6871/09, Brasil. Diário Oficial da União - Seção

1 - 5/6/2009, Página 20 (Publicação Original). [ONLINE]. Disponible en: <http://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/2009/decreto-6871-4-junho-2009-588673-norma-pe.html> [Consultado 06/2017].

Decreto N° 1686 del año 2012, Colombia. Diario Oficial No. 48.517 de 9 de agosto de 2012. [ONLINE]. Disponible en: https://redjurista.fcm.org.co/fcm/docs/decreto_1686_2012.htm [Consultado 05/2017].

Decreto Supremo 20-90-ICTIIND, Perú. El Peruano, 21 de junio de 1990.

e. comexplus online. 2014. Normativa amarga la cerveza "artesanal". Publicación 1/10/14. [ONLINE]. Disponible en: <http://e-comex-plus.com/noticias/normativas-'amargan'-la-cerveza-artesanal> [Consultado 06/2017].

FIAB, Fondo social europeo, INEM y Fundación tripartita. 2009. Documento de síntesis. Estudio sectorial de industrias de elaboración de bebidas. Página 22. [ONLINE]. Disponible en: http://www.fiab.es/archivos/documentoAutor/documento-autor_20090313104129.pdf [Consultado 05/2017].

La Capital. 2016. Un estudio revela cuántos litros de cerveza consumen los argentinos en promedio durante un año. Información general. [ONLINE]. Disponible en: <http://www.lacapital.com.ar/informacion-gral/un-estudio-revela-cuantos-litros-cerveza-consumen-los-argentinos-promedio-un-ano-n1196368.html> [Consultado 05/2017].

La Nación. 2017. El lado oscuro de las cervecías artesanales. Diario online. Sección Economía. [ONLINE]. Disponible en: <http://repositorio.udl.cat/bitstream/handle/10459.1/48689/amartinezm.pdf?Sequence=1&isallowed=y> [Consultado 06/2017].

Ley N° 18455. Fija normas sobre producción, elaboración y comercialización de alcoholes etílicos, bebidas alcohólicas y vinagres. Última modificación: Diario oficial n°39.290 de 17 de febrero de 2009. Chile. [ONLINE]. Disponible en: http://www.gie.uchile.cl/pdf/GIE_legislacion/Ley_18455.pdf [Consultado 04/2017].

Martínez C. 2013. SAG llama a regularizar producciones de cerveza artesanal en La Araucanía. Biobiochile. cl. [ONLINE]. Disponible en: <http://www.biobiochile.cl/noticias/2013/06/16/sag-llama-a-regularizar-producciones-de-cerveza-artesanal-en-la-araucania.shtml> [Consultado 06/2017].

Martínez Muñoz A. 2015. Análisis comparativo de compuestos bioactivos en cerveza artesanal y cerveza industrial. Universidad de Lleida, Facultad de Medicina grado en nutrición humana y dietética, España. Pág. 12-13. [ONLINE]. Disponible en: <http://repositorio.udl.cat/bitstream/handle/10459.1/48689/amartinezm.pdf?sequence=1&isallowed=y> [Consultado 05/2017].

NB 382/2001. Norma Boliviana, productos de cervecería, IBNORCA. Bolivia. 2001. [ONLINE]. Disponible en: <http://www.ibnorca.org/images/archivos/IBNORCACATALO-GODENORMAS2016Noviembre.pdf> [Consultada 05/2017].

Norma Técnica Obligatoria N° 2262, Bebidas alcohólicas. Cerveza. Requisitos. Ecuador. Aprobada en sesión de 2002-02-08. [ONLINE]. Disponible en: <https://odaninkasiquito.files.wordpress.com/2015/08/inen-2-262-cerveza.pdf> [Consultado 06/2017].

Norma Técnica Peruana 213.014:2016. Bebidas alcohólicas: cerveza. El Peruano. Publicación Oficial - Diario Oficial, 14 de abril de 2016. Perú. [ONLINE]. Disponible en: <http://busquedas.elperuano.com.pe/normaslegales/aprueban-normas->

[tecnicas-peruanas-sobre-bebidas-alcoholicas-resolucion-n-078-2012cnb-indecopi-838103-2/](#) [Consultado 06/2017].

NTC 3854. 1996. Norma Técnica Colombiana, Bebidas Alcohólicas, Cerveza. [ONLINE]. Disponible en: <https://tienda.icontec.org/wpcontent/uploads/pdfs/NTC3854.pdf> [Consultado 05/2017].

Petevel P. 2016. El top ocho de los mayores productores de cerveza en Latinoamérica. Mercado técnica publicidad medios. [ONLINE]. Disponible en: <https://www.merca20.com/top-8-los-productores-cerveza-latinoamerica/> [Consultado 05/2017]

Resolución conjunta N°5-E/ 2017 del SPReI y SAV. Argentina. [ONLINE]. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo_XIII.pdf [Consultado 06/2017].

Resolución N° 14/01 del GMC, Reglamento técnico del MERCOSUR para productos de cervecías. 2001. [ONLINE]. Disponible en: http://www.puntofocal.gov.ar/doc/r_gmc_14-01.pdf [Consultado 06/2017].

Resolución No. 2014005947. INVIMA. Por la cual se concede un Registro Sanitario. 6 de marzo de 2014. Colombia. [ONLINE]. Disponible en: http://web.sivicos.gov.co/registros/pdf/1168123_2014005947.pdf [Consultado 06/2017].

Rodriguez CCP, Moretti BDA, Saron A. 2014. Evaluation of biogas coming from the anaerobic treatment of the wastewater of craft brewery production of Pilsen and Weiss beer. XXXIV Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Monterrey, México. [ONLINE]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/295400618_Evaluation_of_biogas_coming_from_the_anaerobic_treatment_of_the_wastewater_of_craft_brewery_production_of_pilsen_and_weiss_beer [Consultado 06/2017].

Valencia JS, Castro AP, Ramírez MF. 2015. Proyecto de viabilidad y factibilidad para la creación de una empresa productora y comercializadora de cerveza artesanal. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología industrial. Colombia. Pág. 26. [ONLINE]. Disponible en: <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/5885/65811S479.pdf?sequence=1> [Consultado 05/2017].

Morfología de estructuras parasitarias de *Rangelia vitalii* en muestras de perros naturalmente infectados

Morphology of *Rangelia vitalii* parasitic stages in samples from naturally infected dogs

Sánchez RO^{1*}, Moré G^{2,3}, Eiras D^{3,4}

¹Laboratorio Mesopotámico de Diagnóstico Veterinario, Concordia, Entre Ríos; ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET); ³Laboratorio de Inmunoparasitología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata; ⁴Laboratorio DIAP (Diagnóstico en Animales Pequeños), Banfield, Buenos Aires, Argentina.

Correo electrónico del autor: ricardosanchez74@gmail.com

Resumen: La rangeliosis es una hemoparasitosis causada por *Rangelia vitalii* y transmitida por la garrapata *Amblyomma aureolatum*, que afecta a perros y otros cánidos silvestres. La enfermedad ha sido diagnosticada en Brasil desde principios del siglo XX, en Uruguay y, recientemente, en Argentina. El parásito es un protozoo intracelular Apicomplexa que está emparentado filogenéticamente con *Babesia* spp., aunque presenta diferencias en su ciclo parasitario. Se han observado formas parasitarias dentro de eritrocitos, monocitos, neutrófilos y en el endotelio capilar de diversos órganos, como así también libres en plasma. El presente trabajo describe la morfología de cuatro formas parasitarias (o estadios), observadas en sangre de caninos naturalmente infectados por *Rangelia vitalii* en Argentina.

Palabras clave: *Rangelia vitalii*, morfología, diagnóstico

Abstract: Rangeliosis is a tick-borne disease affecting domestic and wild canids caused by *Rangelia vitalii* and transmitted by the tick *Amblyomma aureolatum*. The disease has been diagnosed in southern Brazil since early XX century, in Uruguay, and, recently, in Argentina. The parasite is an intracellular Apicomplexan protozoon phylogenetically close to *Babesia* spp. However, it shows differences in the life cycle. Parasitic stages have been observed in monocytes, erythrocytes and neutrophils, and in endothelial cells from several organs, as well as free in plasma. The present study describes the morphology of four different parasitic stages observed in blood samples from naturally infected dogs in Argentina.

Key words: *Rangelia vitalii*, morphology, diagnosis

Introducción

La rangeliosis canina es una hemoparasitosis transmitida por garrapatas que afecta a los cánidos y es provocada por un protozoo del phylum Apicomplexa y del orden Piroplasmida denominado *Rangelia vitalii*. La enfermedad fue diagnosticada en Brasil como causada por un piroplasma, *Piroplasma vitalii*, a principios del siglo XX (Pestana, 1910). Inicialmente se clasificó al agente como perteneciente al género Babesia, pero actualmente se encuentra clasificado en un género diferente, con diferencias morfológicas, biológicas y moleculares que lo separan de los piroplasmas pertenecientes a los géneros *Babesia* y *Theileria*. En género fue denominado *Rangelia* como fuera propuesto en 1914 (Carini & Maciel, 1914; Soares et al., 2011). Los signos clínicos más frecuentes pueden incluir anorexia, apatía, anemia, ictericia, hemoglobinuria, hemorragias subcutáneas, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenomegalia, diarrea con o sin sangre y sangrado espontáneo de orejas, nariz y otras partes del cuerpo (Da Silva et al., 2011, 2012; Figuera et al., 2010; França et al., 2010; Lorreti & Barros, 2005; Soares, 2014).

Hasta hace poco tiempo se creía que la garrapata marrón del perro (*Rhipicephalus sanguineus*) estaba implicada en la transmisión de la enfermedad. Sin embargo, estudios recientes han permitido descartarla y demostrar que *Amblyomma aureolatum* es el principal vector capaz de transmitir la enfermedad, de manera transovárica y transestadial (Soares, 2014).

El principal método de diagnóstico es la observación de estadios del protozoo en muestras de sangre, médula ósea o tejidos de los cánidos infectados. Se reporta frecuentemente la presencia de estadios extraeritrocitarios libres en el plasma o dentro de células sanguíneas (eritrocitos, neutrófilos y monocitos) y células endoteliales de diversos órganos, particularidad que justifica en gran medida la separación taxonómica de este piroplasma de aquellos pertenecientes al género Babesia (Lorreti & Barros 2005, Soares et al., 2011).

Luego de la inoculación experimental del parásito en caninos, a partir del quinto día post infección (DPI) pueden comenzar a observarse eritrocitos infectados en sangre capilar. La cantidad de eritrocitos infectados alcanza su pico alrededor de los 9-11 DPI. Entre los 17 y los 21 DPI, los parásitos se observan mayormente dentro de leucocitos; hacia los 30 DPI ya no suelen detectarse en sangre periférica (Da Silva et al., 2011). Durante la infección natural, los eritrocitos infectados son detectables en sangre periférica después de las 2 semanas posinfección, en coincidencia con la trombocitopenia (Soares, 2014).

Esta enfermedad es endémica en el sur y suroeste de Brasil, afectando a cánidos domésticos y sil-

vestres y ha sido también diagnosticada en el norte de Uruguay (Fredo et al., 2015; Sarasúa & Donati, 1976; Soares et al., 2015). La dispersión de la enfermedad puede atribuirse a la infección en cánidos silvestres, ya que la garrapata transmisora se encuentra asociada a ambientes periurbanos o rurales, aunque se considera posible la colonización de ambientes urbanos (Lorreti & Barros, 2005; Soares, 2014).

En nuestro país, la enfermedad ha sido diagnosticada en las provincias de Misiones y Entre Ríos (Eiras et al., 2014; Sánchez et al., 2014). Existen registros de *A. aureolatum* en las provincias de Chaco, Misiones, Entre Ríos (Guglielmone et al., 2002) y, recientemente, en Buenos Aires y Santa Fe (Colombo et al., 2016), por lo que la distribución de la rangeliosis canina podría ser mayor a la actualmente informada.

El objetivo de este trabajo fue describir morfológicamente las formas parasitarias halladas en sangre de perros naturalmente infectados con *R. vitalii*, en la provincia de Entre Ríos.

Descripción metodológica

Las muestras de sangre incluidas en el estudio correspondieron a 17 perros de la provincia de Entre Ríos con manifestaciones clínicas compatibles con rangeliosis y con diagnóstico confirmado en el Laboratorio Mesopotámico de Diagnóstico Veterinario en Concordia, Entre Ríos. La confirmación etiológica (*R. vitalii*) se realizó mediante estudios microscópicos (confirmación parasitológica) de todas las muestras y en 3 casos se realizó PCR anidada RFLP y PCR anidada y secuenciación como se describió anteriormente (Eiras et al., 2014). Los extendidos de sangre periférica y/o capilar (punción del pabellón auricular) fueron coloreados con Tinción 15 (Biopur®) o May Grünwald-Giemsa. Los frotis en los que se observaron merozoítos de piroplasmas dentro de leucocitos circulantes fueron considerados positivos para *R. vitalii*, desde el punto de vista parasitológico. Las mediciones fueron realizadas a 1000 aumentos bajo aceite de inmersión, mediante microscopio dotado de regla micrométrica.

Se observaron merozoítos de *R. vitalii* con diferentes formas, extra e intracelulares. Estas se clasificaron en cuatro grupos: merozoítos libres tipo 1 y tipo 2, merozoítos intraleucocitarios y merozoítos intraeritrocitarios. Las medidas halladas para las diferentes estructuras se resumen en la Tabla 1.

Merozoítos libres tipo 1: estas formas fueron observadas principalmente en muestras de sangre capilar y se presentaron en forma solitaria o en grupos. Poseían generalmente forma piriforme, aunque se observaron algunos redondos, ovales e, incluso, irregulares. Presentaron citoplasma levemente basófilo,

Tabla 1. Medidas de las diferentes formas parasitarias observadas en frotis sanguíneos de perros infectados naturalmente con *Rangelia vitalii*.

	merozoítos libres tipo 1		merozoítos libres tipo 2		merozoítos intraleucocitarios		merozoítos intraeritrocitarios	
	largo (µm)	ancho (µm)	largo (µm)	ancho (µm)	largo (µm)	ancho (µm)	largo (µm)	ancho (µm)
Promedio	3,6	2,6	4,0	2,8	2,4	1,8	3,6	2,3
Moda	4,0	3,0	3,5	3,0	3,0	2,0	3,0	2,0
DesvEst	0,55	0,42	0,67	0,42	0,52	0,32	0,79	0,39
Rango	2,5 - 5	2 - 3,5	3 - 5,5	2,5 - 4	1,5 - 3	1,5 - 2,5	2,5 - 6	1,5 - 3
n	57	57	26	26	33	33	22	22

una estructura redonda u ovalada más basófila que el citoplasma de 0,5 a 1 µm de diámetro, generalmente situada en el extremo más delgado y un núcleo redondeado u oval de color magenta o basófilo de 1 a 2 µm de diámetro que abarcaba, frecuentemente, la mitad o todo el ancho del parásito. Las formas irregulares muchas veces presentaron estructuras internas basófilas dobles (Figuras 1 y 2).

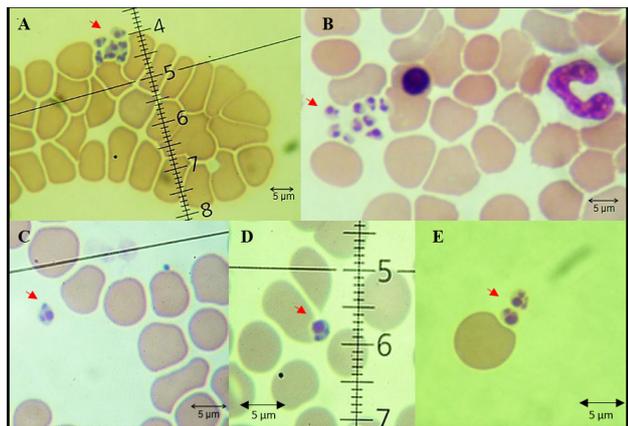


Figura 1 A-E. Merozoítos libres tipo 1 de *R. vitalii* (flechas rojas) en frotis de sangre de caninos.

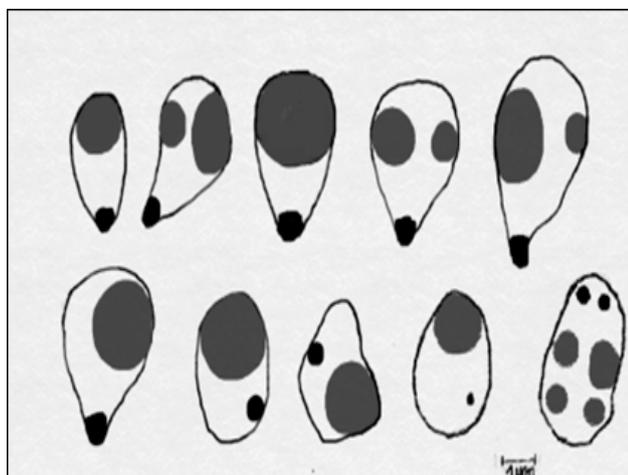


Figura 2: Esquema de los merozoítos libres tipo 1.

Merozoítos libres tipo 2: estas estructuras, también extracelulares, presentaron formas globosas, ahusadas o amorfas, con un núcleo redondo u oval de 0,5 a 1 µm de diámetro y citoplasma levemente basófilo. Estas formas midieron, en promedio, 4 µm de largo por 2,8 µm de ancho. Se observaron solas o agrupadas e incluso, en ocasiones, rodeadas por una fina membrana formando una vesícula que englobaba a varias formas parasitarias (Figuras 3 y 4).

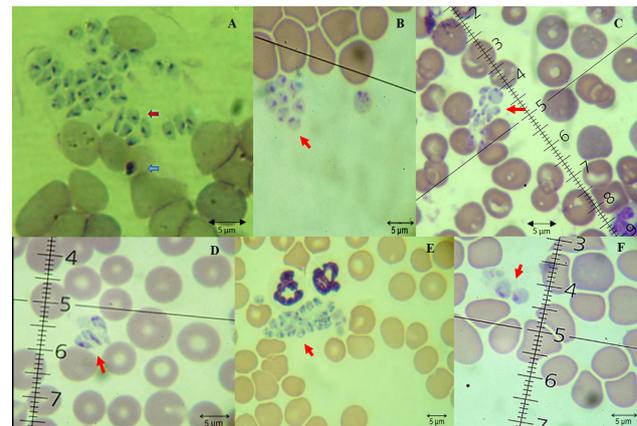


Figura 3 A-F. Merozoítos de *R. vitalii* libres en plasma: merozoítos libres tipo 1 (flecha azul) y merozoítos libres tipo 2 (flechas rojas).

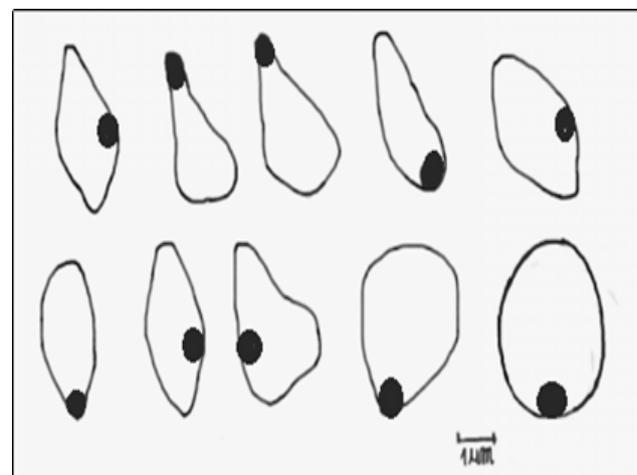


Figura 4. Esquema de los merozoítos libres tipo 2.

Merozoítos intraleucocitarios: se observaron dentro de monocitos y neutrófilos, eran piriformes a ovalados, de 2,4 μm de largo por 1,8 μm de ancho en promedio, con un núcleo basófilo redondeado de 0,5 a 1 μm , ubicado en el extremo apical, y un citoplasma generalmente acidófilo. Dentro de los monocitos se observaron una o más vacuolas con varios parásitos en su interior, o formas libres en el citosol, mientras que en los neutrófilos solo se observaron formas libres.

Merozoítos intraeritrocitarios: los merozoítos observados dentro de glóbulos rojos presentaron forma piriforme, redondeada, hasta amorfa. Los merozoítos presentaron citoplasma levemente basófilo, con un promedio de 3,6 μm de largo por 2,3 μm de ancho y un pequeño núcleo basófilo de 0,5 a 1 μm de diámetro. No se observaron más de 2 merozoítos por eritrocito (Figuras 7 y 8).

Discusión y conclusiones

La rangeliosis canina es una enfermedad que en la actualidad se ha diagnosticado desde el sur de Brasil hasta Uruguay y el noreste argentino. Si bien se ha podido reproducir la infección en forma experimental, no se ha estudiado en profundidad la morfología de los diferentes estadios del ciclo biológico en infecciones naturales. Este protozoo realiza una etapa de merogonia dentro de células como monocitos, neutrófilos y células endoteliales, como sucede en otros hemoparásitos (*Plasmodium* spp., *Theileria* spp., *Cytauxzoon* spp. etc.). Sin embargo, los estudios filogenéticos han demostrado una estrecha relación entre *R. vitalii* y los piroplasmas intraeritrocitarios del género *Babesia* (Eiras *et al.*, 2014; Soares, 2011; Soares *et al.*, 2014). De acuerdo con el gen estudiado y el método utilizado para el análisis filogenético, *R. vitalii* se ubicó dentro del clado de *Babesia* spp. o en su base. Se postula que *R. vitalii* constituye un taxón diferente dentro de las especies de piroplasmas que afectan a caninos, aunque se necesitan más estudios para definir el posicionamiento filogenético de este parásito (Franca *et al.*, 2014).

Existen datos morfométricos de *R. vitalii* que fueron aportados por Da Silva *et al.*, (2011), quienes realizaron mediciones de 3 estadios parasitarios. Sin embargo, ellos no mencionan diferencias entre los parásitos observados intra o extracelularmente ni aportan detalles morfológicos. Las medidas promedio de parásitos extracelulares hallados en plasma por estos autores fueron de $3,94 \pm 0,67 \mu\text{m}$ de largo por $2,23 \pm 0,42 \mu\text{m}$ de ancho. El tamaño del núcleo fue de $0,97 \pm 0,17 \mu\text{m}$ de largo por $0,84 \pm 0,11 \mu\text{m}$ de ancho. Estos datos coinciden parcialmente con los del presente estudio, ya que en nuestros hallazgos los merozoítos

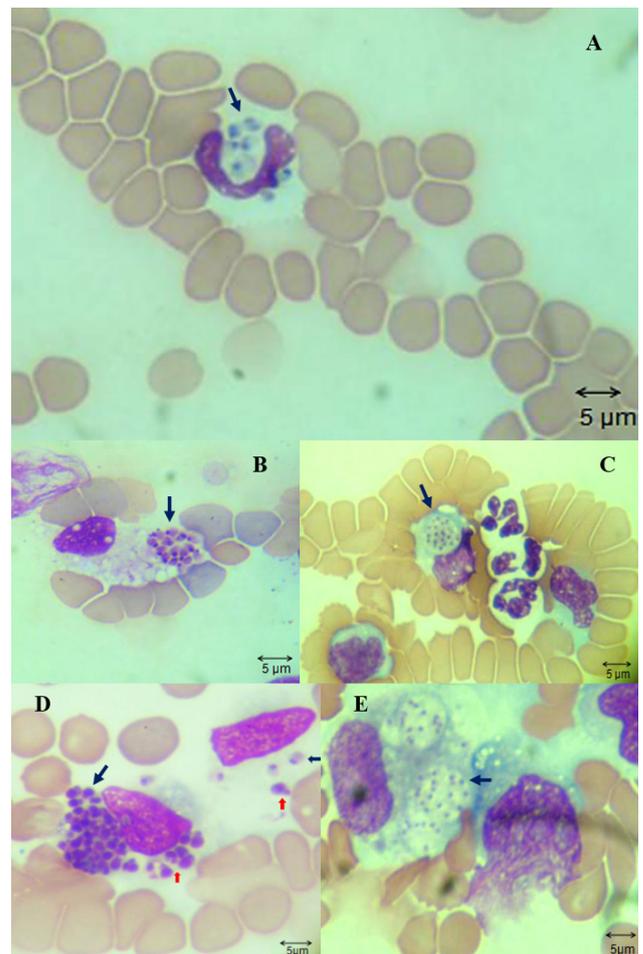


Figura 5 A-E. Merozoítos intraleucocitarios en neutrófilo (A) y en monocito (B-E) indicados con flechas azules. También se observan merozoítos libres tipo 1 (flechas rojas) (D).

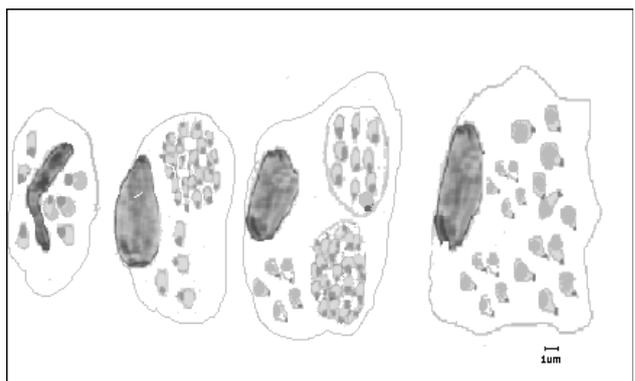


Figura 6. Esquema de los merozoítos intraleucocitarios.

fueron algo más anchos. Los merozoítos libres tipo 1 presentaron como característica una estructura basófila en la parte más angosta y la presencia de otra u otras estructuras basófilas o magenta de mayor tamaño que podrían representar al núcleo en etapas de división. Loretti & Barros (2005) realizaron estudios de formas parasitarias encontradas dentro de células endoteliales mediante microscopía electrónica. Ellos describieron organismos redondos u ovalados con

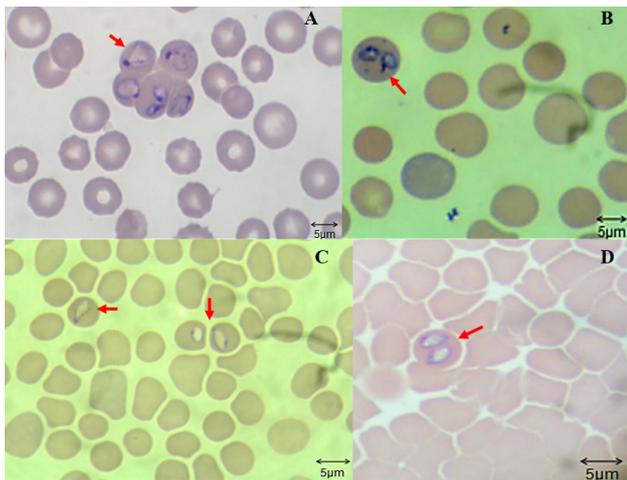


Figura 7 A-D. Merozoítos intraeritrocitarios de *R. vitalii* (flechas rojas).

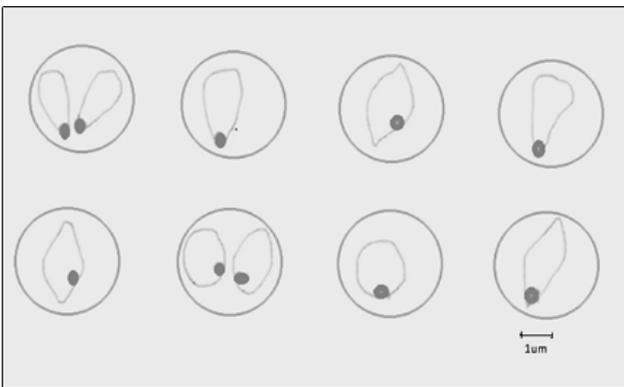


Figura 8. Esquema de los merozoítos intraeritrocitarios.

núcleo excéntrico electrodensito, rodeados por una membrana parasitófora trilaminar y un complejo apical sin conoide. Además, observaron inclusiones cristalinas de forma variable en el citosol de los organismos situados en el endotelio de los capilares intersticiales del riñón. Lamentablemente, no existen estudios de microscopía electrónica realizados sobre otras formas parasitarias identificadas, ya sea dentro de leucocitos, eritrocitos o las halladas libres en plasma.

La longitud de los parásitos (dentro de los eritrocitos) medidos en este trabajo es similar a la observada por Da Silva *et al.* (2011), quienes observaron, en promedio, $3,34 \pm 0,54 \mu\text{m}$ de largo por $2,09 \pm 0,34 \mu\text{m}$ de ancho. En promedio, el núcleo midió $1,07 \pm 0,20 \mu\text{m}$ de largo por $0,87 \pm 0,15 \mu\text{m}$ de ancho.

Las medidas de las formas parasitarias observadas dentro de los leucocitos por Da Silva *et al.* (2011) fueron de $2,97 \pm 0,68 \mu\text{m}$ de longitud por $1,94 \pm 0,26 \mu\text{m}$ de ancho. El promedio de longitud de los núcleos fue $1,17 \pm 0,34 \mu\text{m}$ de largo por $0,85 \pm 0,23 \mu\text{m}$ de ancho. En este trabajo, el promedio hallado fue levemente menor, $2,4 \pm 0,54 \mu\text{m}$ de largo por $1,8 \pm 0,34 \mu\text{m}$ de ancho. Estas formas parasitarias parecieran ser similares a las descritas en estudios histopato-

lógicos dentro de células endoteliales (Figuera *et al.*, 2010; Loretti & Barros, 2005). En ocasiones, también fueron observadas estructuras parasitarias similares a los merozoítos tipo 1, aunque de no más de $3 \mu\text{m}$ de longitud.

Soares *et al.* (2011) realizaron mediciones en parásitos hallados en 5 eritrocitos y 2 leucocitos, observando formas parasitarias de formas ovales a redondeadas con un núcleo excéntrico y citoplasma levemente basófilo. Si bien es común encontrar células infectadas con un solo parásito, hallaron de 6 a 33 merozoítos en cada leucocito. Las medidas halladas por estos autores fueron $2,67 \pm 0,40 \mu\text{m}$ de largo por $1,94 \pm 0,22 \mu\text{m}$ de ancho. Los núcleos midieron, en promedio, $1,06 \pm 0,17 \mu\text{m}$ de largo por $0,89 \pm 0,15 \mu\text{m}$ de ancho.

En este trabajo se observaron diferencias morfológicas y morfométricas entre los parásitos hallados en leucocitos y en eritrocitos. En monocitos fue frecuente encontrar vacuolas conteniendo varios parásitos agrupados, de manera similar a los descritos previamente en células endoteliales, aunque también se hallaron libres en el citosol. En neutrófilos, solo se observaron merozoítos libres en el citosol. Estos hallazgos podrían implicar alguna diferencia en cuanto al estadio del parásito. Podría considerarse que los merozoítos tipo 1 corresponden a etapas en activa división, dada la frecuencia en la que se encuentran estructuras compatibles con división nuclear. Sin embargo, todavía falta conocer completamente el ciclo parasitario en infecciones naturales para poder aceptar estas hipótesis. Para algunos autores, la presencia de formas libres en plasma sería el resultado de la fragilidad de las células durante el manejo de la muestra, ya que los piroplasmas son considerados parásitos intracelulares y estarían más relacionados con un artefacto que con una verdadera etapa parasitaria (Loretti & Barros, 2005).

Morfológicamente, los merozoítos tipo 1 de *R. vitalii* podrían ser confundidos con amastigotes de *Leishmania* spp., que poseen un tamaño similar con forma oval o redondeada. Más aún, la zona geográfica de distribución de rangeliosis en nuestro país coincide con la zona endémica de leishmaniosis canina. Sin embargo, es muy infrecuente el hallazgo de amastigotes en las células sanguíneas y, además, en ellos se destaca la presencia de cinetoplasto.

Este trabajo aporta datos morfológicos y morfométricos de utilidad en el diagnóstico parasitológico de rangeliosis canina.

Conflicto de intereses

Todos los autores declaran que no existe conflicto de intereses, incluyendo entre estos últimos las

relaciones financieras, personales o de otro tipo con otras personas u organizaciones que pudieran influir de manera inapropiada en el trabajo.

Bibliografía

- Carini A, Maciel J. 1914. Sobre a molestia dos caes, chamada Nambi-Uvú, e o seu parasita (*Rangelia vitalii*). *Annaes Paulistas de Medicina e Cirurgia* 3:65-71.
- Colombo VC, Pereira J, Nava S, Beldomenico PM. 2016. *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae): nuevos registros en las provincias de Buenos Aires y Santa Fe, Argentina. *Revista FAVE – Sección Ciencias Veterinarias*. 15:1-4. doi: 10.14409/favecv.v15i1/2.5914.
- Da Silva AS, Franca RT, Costa MM, Paim CB, Paim FC, Dornelles GL, Soares JF, Labruna MB, Mazzanti CM, Monteiro SG, Lopes ST. 2011. Experimental infection with *Rangelia vitalii* in dogs: acute phase, parasitemia, biological cycle, clinical-pathological aspects and treatment. *Experimental Parasitology*. 128:347-52. doi: 10.1016/j.exppara.2011.04.010.
- Da Silva AS, Martins DB, Soares JF, Franca RT. 2012. Canine rangelirosis: the need for differential diagnosis. *Parasitology Research*. 112:1329-32. doi:10.1007/s00436-012-3160-y.
- Eiras DF, Craviotto MB, Baneth G, Moré G. 2014. First report of *Rangelia vitalii* infection (canine rangelirosis) in Argentina. *Parasitology International*. 63:729-34. doi: 10.1016/j.parint.2014.06.003.
- Figuera RA, Souza TM, Kommers GD, Irigoyen LF, Barros CSL. 2010. Patogênese e achados clínicos, hematológicos e anatomopatológicos da infecção por *Rangelia vitalii* em 35 cães (1985-2009). *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. 30:974-87. doi:10.1590/S0100-736X2010001100012.
- Franca RT, Da Silva AS, Paim FC, Costa MM, Soares JF, Mazzanti CM, Lopes STA. 2010. *Rangelia vitalii* in dogs in southern Brazil. *Comparative Clinical Pathology*. 19:383-87. doi:10.1007/s00580-010-1041-2.
- Franca RT, Da Silva AS, Loretti AP, Mazzanti CM, Lopes STA. 2014. Canine rangelirosis due to *Rangelia vitalii*: From first report in Brazil in 1910 to current day – A review. *Ticks and tick-borne diseases*. 5:466-74. doi 10.1016/j.ttbdis.2014.04.005
- Fredo G, Bianchi M, De Andrade C, De Souza S, Leite-Filho R, Bandinelli M, Amorim DB, Driemeier D, Sonne L. 2015. Natural infection of wild canids (*Cerdocyon thous* and *Lycalopex gymnocercus*) with the intraendothelial piroplasm *Rangelia vitalii* in Southern Brazil. *Journal of Wildlife Diseases*. 51:880-4. doi: 10.7589/2014-12-283.
- Guglielmone AA, Mangold AJ, Boero CA, Azcue RA. 2002. Nuevo registro de *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) (*Amblyomma striatum* Koch, 1884) en Entre Ríos, Argentina. *Revista FAVE - Ciencias Veterinarias*. 1(2):33-5.
- Loretti AP, Barros SS. 2005. Hemorrhagic disease in dogs infected with an unclassified intraendothelial piroplasm in southern Brazil. *Veterinary Parasitology*. 134:193-213. doi:10.1016/j.vetpar.2005.07.011.
- Pestana BR. 1910. O Nambyuvú. *Rev Méd São Paulo* 22:423-6.
- Sanchez RO, Moré G, Eiras DF. 2014. Piroplasmosis canina por *Rangelia vitalii* (Protozoa, Piroplasmida) en la ciudad de Concordia, Entre Ríos. XX Reunión Científico Técnica de la AAVLD. Tucumán, Argentina.
- Sarasúa LM, Donati NR. 1976. Constatación de babesiosis canina en el Dpto. de Artigas (Uruguay). *Veterinaria (Montevideo)* 62:137-9.
- Soares JF, Giroto A, Brandão PE, França, RT, Da Silva AS, Lopes STA, Labruna M. 2011. Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. *Veterinary Parasitology*. 180(3-4):203-8. doi:10.1016/j.vetpar.2011.03.024.
- Soares JF. 2014. História natural da rangelirose. Tesis de doctorado en Ciencias Veterinarias, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. doi: 10.11606/T.10.2014.tde-19092014-092438.
- Soares JF, Carvalho L, Maya L, Dutra F, Venzal JM, Labruna MB. Molecular detection of *Rangelia vitalii* in domestic dogs from Uruguay. *Veterinary Parasitology*. 2015; 210(1-2):98-101. doi:10.1016/j.vetpar.2015.03.013.

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

Política editorial y generalidades

Las opiniones expresadas por los autores que contribuyen con ANALECTA VETERINARIA no reflejan, necesariamente, las opiniones de este medio. Analecta Veterinaria autoriza la reproducción de sus artículos con fines académicos, con la única condición de la mención de la fuente cuando corresponda. El uso de nombres comerciales destinados a la identificación de productos en el contexto de los artículos presentados no implica respaldo directo o indirecto ni promoción de dichos productos por parte de la revista.

El Comité Editorial de ANALECTA VETERINARIA tiene en consideración el tratamiento ético de los animales de experimentación y se reserva el derecho de no publicar trabajos que no cumplan esta premisa. Los autores deberán poder certificar la aprobación de su proyecto de investigación por parte del comité de ética de su unidad académica, o consignar según qué normas nacionales o internacionales realizaron sus trabajos.

Todos los autores ceden a Analecta Veterinaria los derechos de autor de manera no exclusiva, se hacen responsables de los datos y el contenido, dejan constancia de que han participado activamente en el proceso de la investigación y/o la confección del trabajo, declaran un eventual conflicto de intereses, mencionan los soportes financieros y explicitan la aprobación por los comités institucionales y autoridades regulatorias que correspondan a cada caso.

No se asume responsabilidad editorial por la exactitud de las referencias. Es responsabilidad exclusiva de los autores asegurarse el permiso para citar datos no publicados. Eventualmente, los editores podrán requerir a los autores información probatoria.

Idiomas. Analecta Veterinaria acepta artículos en español o en inglés para su publicación. Los resúmenes de los artículos se publicarán en español y en inglés.

Originalidad

La información contenida en el trabajo no deberá ser enviada a más de una revista o medio de comunicación al mismo tiempo y debe ser original. El envío de un artículo publicado en otro sitio por otro autor (plagio) o por el mismo autor (publicación duplicada) se considera falta ética grave que invalida su publicación en ANALECTA VETERINARIA.

Tipos de trabajos para publicación

Se aceptan envíos de: trabajos de investigación, trabajos de investigación en educación, comunicaciones cortas, descripciones de casos, informes técnicos, trabajos de revisión y (solamente por parte de organizadores) resúmenes de presentaciones en reuniones científicas (ver definiciones y características de cada tipo de trabajo en las "Instrucciones para la preparación del trabajo").

Los editores decidirán la prioridad de publicación de cada trabajo y la proporción de cada tipo, privilegiando aquellos de investigación. Otro tipo de contenidos, como por ejemplo resúmenes de comunicaciones en reuniones científicas, serán editados como parte de un suplemento. Los organizadores de las mencionadas reuniones deberán ponerse en contacto con los editores escribiendo a: analecta@fcv.unlp.edu.ar

Con respecto a la definición de la autoría, las responsabilidades de los editores y las causas que obran como posible conflicto de intereses, Analecta Veterinaria adhiera a lo propuesto por el International Committee of Medical Journal Editors (<http://www.icmje.org>).

En relación con otros aspectos, como el formato y el estilo de preparación del original, Analecta Veterinaria establece un conjunto de normas que se detallan en "Instrucciones para la preparación del trabajo".

Todas las dudas que se susciten podrán ser consultadas por correo electrónico a

analecta@fcv.unlp.edu.ar

Instrucciones para la preparación del trabajo

Definición. El original para publicación del trabajo comprende: 1- un documento principal, y 2- otros archivos.

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

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

Características generales

El idioma del trabajo puede ser el español o el inglés. Los trabajos escritos en inglés deberán seguir la gramática propia del inglés británico. Se aceptan otras variantes del idioma inglés, siempre que se respeten de manera uniforme en todo el trabajo. Las unidades de medida se expresarán según el Sistema Internacional de Medidas (documento disponible para su descarga). Las abreviaturas deberán ser aclaradas la primera vez que el término se mencione, pero no será necesaria su utilización si el término se menciona menos de cinco veces. Si el trabajo requiere el uso de numerosas abreviaturas (más de diez) deberá generarse una lista que se incluirá luego de los resúmenes. Ciertas siglas, acrónimos y abreviaturas (ATP, ADN, ELISA, OMS, PBS, Dr., n.º., entre otras) no requieren aclaración.

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

1- Documento principal

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

El documento se configurará en papel A4, con márgenes de 3 cm como mínimo por lado y 1,5 de interlineado. El texto deberá alinearse en los márgenes izquierdo y derecho (texto justificado). Se utilizará el tipo de fuente Times New

Roman de 12 puntos. Las páginas deberán estar numeradas, utilizando números arábigos en su ángulo inferior derecho. Asimismo, las líneas deberán estar numeradas a lo largo de todo el documento de manera consecutiva, comenzando en la primera página o página de presentación. El uso de guiones automáticos de separación de palabras en sílabas estará permitido exclusivamente para los resúmenes de congresos (publicados por sus organizadores).

1.2. Otras características comunes a todo tipo de trabajos

1.2.1. Primera página o página de presentación: contendrá el título del trabajo en dos idiomas, los autores y su respectiva filiación/lugar de trabajo, la dirección electrónica de todos los autores, los datos completos del autor de contacto y el título abreviado. Los autores deberán consignar, en lo posible, direcciones de correo oficial (institucional).

De ser necesario, la página de presentación podrá sobrepasar una página de extensión.

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

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

1.2.1 Primera página: página de presentación

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

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

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

El autor de contacto será identificado con un asterisco.

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

-Datos personales.

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

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

Ejemplo de primera página

Título completo en el idioma del trabajo

Título en el segundo idioma (inglés/español)

Autor AA1, Autor BB1, 2, Autor CC3, Autor DD4*.

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

Título abreviado

Datos del autor de contacto (*)

Nombre completo

Dirección postal laboral

Dirección electrónica laboral

Teléfono

Correo electrónico de los autores

Autor AA: aa@mail.com

Autor BB: bb@mail.com

Autor CC: cc@mail.com

Autor DD: dd@mail.com

1.2.2. Páginas segunda y tercera

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

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

-Palabras clave. Son palabras o expresiones adicionales que facilitan la recuperación del documento a partir de bases de datos bibliográficos. Para una mayor utilidad en la búsqueda dentro de los sistemas de indización, se sugiere la utilización de términos no incluidos ni en el título ni en el resumen. Se aceptarán entre 3 y 5.

1.2.3. Páginas sucesivas

a- Texto

Organizado en secciones, según el tipo de trabajo. Estas estarán encabezadas por subtítulos en mayúsculas/minúsculas (tipo oración), sin punto final. El texto contendrá las entradas para todas las tablas, figuras, referencias bibliográficas y material complementario. A continuación del texto se enunciarán los agradecimientos, la declaración de conflicto de intereses y la lista de referencias bibliográficas (bajo el subtítulo Bibliografía).

b- Agradecimientos

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

c- Declaración de conflicto de intereses

Existe un conflicto entre intereses cuando el juicio profesional con respecto a un interés primario (el bienestar del paciente, la validez de la investigación) puede ser influenciado por un interés secundario (como el beneficio económico).

Bajo este título se podrá: a-consignar las relaciones financieras o personales con organizaciones o personas que pueden influenciar o sesgar los resultados del trabajo o,

b-declarar que no existe conflicto de intereses

Ejemplo:

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

d- Bibliografía

Esta revista utiliza el formato de referencias basado en el estilo Harvard, del tipo "autor-año" en el texto y por orden alfabético en la lista de referencias.

Cantidad y disponibilidad. Se establece un máximo de 30 referencias para los trabajos de investigación, incluidos los de investigación en educación, y 15 para las comunicaciones cortas, descripciones de casos e informes técnicos. Para las revisiones se establece un mínimo de 40 referencias.

Todos los artículos u otras fuentes utilizadas como referencias deberán ser accesibles en línea o mediante buscadores bibliográficos. En caso contrario, podrá ser requerido el envío del documento a pedido de los evaluadores o del Consejo Editorial. Las fuentes basadas en comunicaciones presentadas en reuniones científicas, comunicaciones personales y tesis deberán reducirse al mínimo y solamente se justificará su incorporación en caso de que no se registre una fuente publicada en otro medio.

Formato de las citas en el texto. Se consignará, entre paréntesis, en color de fuente azul (incluidos los paréntesis): el apellido del primer autor (seguido de la expresión *et al.*, si se trata de más de dos autores) y el año de publicación, separado por una coma, según el ejemplo. Si el artículo tiene solamente dos autores, se consignarán ambos, separados por el signo &. Si la construcción así lo requiriese podrá ubicarse la cita a mitad de la oración.

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

... similares a los músculos maseteros del ciervo axis (Mateo & Sánchez, 2016).

Los autores también podrían haber elegido expresar: "Según Deeg *et al.*, (2002), puede persistir el infiltrado de linfocitos.

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

... en las células apoptóticas se produce la externalización de la fosfatidilserina de la membrana (Fadok *et al.*, 1992; Savill, 1993,1997; Willie, 1997).

Si se incluyeran dos o más referencias del mismo primer autor y del mismo año, se identificarán con letras:

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

Las referencias a comunicaciones personales se indicarán entre paréntesis del siguiente modo:(comunicación personal, autor, año), pudiendo omitirse el autor si está consignado en el texto.

Formato de las citas en la Bibliografía (lista de referencias, luego de los agradecimientos y de la declaración de conflicto de intereses).

El orden será alfabético y cada cita deberá incluir a todos los autores.

Artículos en publicaciones periódicas. Se citará la nómina completa de autores y sus iniciales, separados por comas. Luego se consignará el año entre puntos. A continuación, el título del trabajo con mayúsculas y minúsculas (tipo oración), sin comillas ni negritas. A continuación, el título completo de la revista seguido de un punto. Luego, el volumen, número de la revista (entre paréntesis) y páginas, en ese orden, sin espacios luego de los signos de puntuación, según el formato que se muestra a continuación:

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

Mateo AG, Sánchez HL. 2016. Descripción anatómica de los músculos masticadores de un ciervo axis (*Axis axis*). *Analecta Veterinaria*. 36(1):25-9.

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

En el caso de estar disponible, se incorporará al final de la referencia el *Digital Object Identifier* (DOI) como se muestra a continuación:

Rensetti D, Marin M, Quintana S, Morán P, Verna A, Odeón A, Pérez S. 2016. Involvement of toll-like receptors 3 and 7/8 in the neuropathogenesis of bovine herpesvirus types 1 and 5. *Research in Veterinary Science*. 107:1-7. doi:10.1016/j.rvsc.2016.04.009.

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

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

Capítulos de libro. La cita constará de: autor/es del capítulo y título del capítulo. En: autor/es del libro. Año de publicación. Título del libro, edición (si no es la primera). Ciudad de publicación, nombre de la editorial y páginas inicial y final del capítulo.

García V, Ochoa L, Quiroga MF, Pasquinelli V. Aspectos celulares y moleculares de la respuesta inmune frente a las micobacterias. En: Rabinovich GA. 2004. Inmunopatología molecular: nuevas fronteras de la medicina. Un nexo entre la investigación biomédica y la práctica clínica. Buenos Aires, MédicaPanamericana, pp. 217-27.

Lewin B. Chapter 4: Clusters and repeats. En: Lewin B. 2003. Genes VIII. Upper Saddle River, Pearson Education Inc., pp. 85-133.

Resúmenes en reuniones científicas: se utilizará un formato similar al de los artículos en revistas, consignando, luego del título del trabajo, el nombre de la reunión. Luego, ciudad, país y página.

Pardini L, Bacigalupe D, Moré G, Rambeaud M, Basso W, Perfumo CJ, Hermann DC, Schares G, Venturini MC. 2011. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* strains in slaughtered pigs from Argentina. The 23rd International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. Buenos Aires, Argentina, p. 336.

Tesis de maestría o doctorado y trabajos finales de especialización: Se indicará el autor y el año. Luego, el título de la tesis/trabajo. A continuación, el indicador "Tesis de" o "Trabajo de" seguido de la carrera e institución que otorga el título:

Huber B. 2012. Estudio farmacocinético de tilosina en abejas melíferas. Variables con impacto en el nivel de residuos en miel. Tesis de Maestría en Tecnología e Higiene de los Alimentos, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

Muriel M. 2016. Determinación de la cinética del daño en el ADN de leucocitos de sangre periférica en equinos sometidos a esfuerzo físico de alta intensidad. Tesis de Doctorado en Ciencias Veterinarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

Libros electrónicos de acceso libre en internet: Autor/es. Año de publicación. Título como figura en el buscador correspondiente [libro electrónico/e-book]. DOI (si estuviera disponible). Lugar de publicación (si se conoce), editor. Disponible en: (URL) [fecha de acceso].

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. 2012. Rang y Dale Farmacología. Séptima Edición [libro electrónico]. Amsterdam, Elsevier. Disponible en:

<https://goo.gl/NFleWT> [Consultado 01/06/2017].

Frank SA. 2002. Immunology and Evolution of Infectious Disease [e-book]. Princeton, Princeton University Press. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2394/> [Consultado 01/06/2017].

Página web / Website: Autor/es. Año de publicación. Título de la página. [ONLINE] Disponible en: (URL). [Consultado (fecha de acceso)].

Herman B, Centonze Frohlich VE, Lakowicz JR, Murphy DB, Spring KR, Davidson MW. 2012. Olympus Microscopy Resource Center | Introduction to fluorescence microscopy. [ONLINE] Disponible en: <http://www.olympus-micro.com/primer/techniques/fluorescence/fluorointrohome.html> [Consultado 30/05/2017].

SENASA. 2015. Bovinos EEB Encefalopatía Espongiforme Bovina. [ONLINE] Disponible en: <http://www.senasa.gob.ar/tags/bovinos-eeb-encefalopatia-espongiforme-bovina>. [Consultado 30/05/2017].

En caso de dudas acerca de cómo citar otro tipo de material (estándares internacionales, leyes, publicaciones parciales en libros electrónicos de reuniones científicas, patentes, informes de organizaciones, etc.), comunicarse con la revista.

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

1.3 Tipos de trabajos

En ANALECTA VETERINARIA se publican trabajos en 8 secciones, que corresponden a:

-Editoriales: son notas de presentación del número o del volumen que publica el Director en ocasiones particulares.

-Trabajos de investigación: son informes completos de investigaciones originales o de meta-análisis. Constan de las siguientes secciones: Introducción, Materiales y métodos, Resultados y Discusión y conclusiones.

-Trabajos de investigación en enseñanza: se trata de trabajos que resulten en un aporte para la enseñanza de las Ciencias Veterinarias (trabajos de investigación propiamente dicha, intervenciones, etc.), que sean superadores de la mera presentación de resultados cuantitativos e incluyan el correspondiente análisis. Constan de los siguientes apartados: Introducción (en el que deberán consignarse el motivo de interés, el estado actual de la cuestión, los fundamentos teóricos en que se enmarca y los objetivos y podrán incluirse hipótesis de trabajo), Métodos, Resultados (presentación y análisis), Discusión y conclusiones y Proyección de la investigación.

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

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

una breve Introducción (en la que se explica el interés del tema o el motivo de la revisión), Subtítulos (los que resulten apropiados al tema en cuestión) y Discusión y conclusiones.

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

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

-Resúmenes de presentaciones en reuniones científicas: el envío estará a cargo de los organizadores de reuniones científicas ocurridas en el ámbito de la Universidad Nacional de La Plata, previo acuerdo con el Consejo Editorial de la revista. Dichos resúmenes se publicarán en un Suplemento.

Formato de resúmenes de presentaciones en reuniones científicas: se invita a los organizadores de tales reuniones a ponerse en contacto por correo electrónico (analecta@fcv.unlp.edu.ar) para conocer los aspectos formales requeridos.

2. Otros archivos

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

Tablas. Las tablas se diseñarán usando la función correspondiente del procesador de texto o de las planillas de cálculo. Deben ser de estructura sencilla, sin sombreados y sin divisiones entre las filas o las columnas. Todo el texto que contengan las tablas (incluidos los títulos) debe ser accesible para la corrección.

Material complementario

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

Envío del trabajo, proceso de revisión y comunicación con los autores

ANALECTA VETERINARIA recibe trabajos para su publicación durante todo el año.

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

El envío se realizará en línea y se acompañará por una breve nota de presentación en la caja "Comentarios para el/la editor/a". Es un requisito que los autores provean, en los casilleros correspondientes, direcciones de correo electrónico institucional. Los autores en ejercicio independiente o privado de la profesión consignarán una dirección activa de correo electrónico. En la nota de presentación es bienvenida la inclusión de nombres de evaluadores potenciales, que en ningún caso podrán haber sido coautores de ningún autor, al menos en los últimos cinco años, ni miembros actuales de la misma institución que ellos. Estos datos son recibidos en calidad de sugerencia y no generan ningún compromiso para el Consejo Editorial.

Todos los autores recibirán un mensaje de confirmación de la recepción correcta de todos los archivos en el que constará un número de referencia para futuras consultas.

Revisión. El Consejo Editorial evaluará primero la pertinencia de la recepción del trabajo, según se adecue o no a las áreas del conocimiento que alcanza la revista. En caso de corresponder, el consejo verificará que se cumplan las siguientes premisas:

- calidad de contenido para ser remitido a los evaluadores,
- corrección gramatical del idioma del trabajo y
- adecuación a las normas editoriales (incluida la bibliografía).

Los trabajos que no cumplan con las normas editoriales serán devueltos a los autores para ser reordenados de acuerdo con ellas y su fecha de recepción será la del nuevo envío.

Se encuentra disponible para su descarga una lista de comprobación que podrá ser utilizada por los autores para

revisar el cumplimiento de algunas cuestiones formales del trabajo antes de su envío.

Todos los artículos serán sometidos a una revisión por pares con modalidad doble ciego: tanto los nombres de los autores como los de los evaluadores se conservarán en el anonimato. El Consejo Editorial seleccionará para esa función a, por lo menos, dos evaluadores externos con conocimiento de la especialidad e informará a los autores acerca de los resultados de la evaluación y los pasos a seguir en consecuencia.

Los autores deberán responder los comentarios y sugerencias de los revisores, punto por punto, en un documento aparte, titulado: "Respuestas al Consejo Editorial", que pueda leerse e interpretarse de manera independiente de la nueva versión del trabajo. Los trabajos que sean reenviados más de una vez, o después de cuatro meses desde la decisión inicial, serán considerados como un nuevo envío.

El Consejo Editorial, teniendo en consideración lo informado por los evaluadores, decidirá e informará si el trabajo ha sido: aceptado sin modificaciones, aceptado con modificaciones menores, aceptado con modificaciones mayores o rechazado.

Los autores de trabajos aceptados recibirán una última prueba en formato [.pdf], o prueba de galera y dispondrán de 4 (cuatro) días hábiles para enviar modificaciones. En caso de no enviarlas en el plazo establecido, la prueba se considerará aprobada por todos los autores.

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

Correo postal:
Sr. Director
Revista ANALECTA VETERINARIA
CC 296 (B1900AVW) La Plata
ARGENTINA