

VETERINARIA



Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay

Año LXXIII - Volumen 49 - Nº 189 - Enero - Marzo de 2013
ISSN 0376-4362 - Indizada en: VET-CD/BEASTCD, Latindex

CONTENIDO:

SOBRE LA REVISTA **1**

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS:

Efecto del tamaño del rodeo sobre la eficacia de un programa de sincronización de celos en base a prostaglandinas e inseminación artificial a celo detectado en vaquillonas Holando

Algorta I, Barbosa J, Sacco G, Cavestany D. **4**

Caracterización de la microbiota bacteriana ruminal de un bovino a pastoreo mediante técnicas clásicas e independientes del cultivo

Fraga M, Perelmuter K, Valencia M J, Cajaville C, Zunino P..... **39**

ARTÍCULOS TÉCNICOS:

Antecedentes de la tuberculosis bovina en Uruguay

Raúl Casas Olascoaga **12**

Leucoencefalomalacia en equinos en el litoral oeste de Uruguay

Rivero R; Collazo S; Ugarte E; Nan F; Mazzolini Y; Matto C. **26**

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES **46**

SOBRE LA REVISTA:

Veterinaria (Montevideo) es la revista oficial de la Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay (SMVU) que tiene el objetivo de publicar artículos en idioma español sobre temas científicos, técnicos y otras comunicaciones de interés a las Ciencias Veterinarias. Es una publicación trimestral (versión electrónica – página web de la SMVU). El volumen completo de cada año (cuatro números) se imprime a fin de año y es distribuido gratuitamente a los socios de la SMVU. La versión electrónica de los números publicados se mantiene en la página oficial de la SMVU (<http://www.smvu.com.uy/revista.php>), la que permite la consulta gratuita de los ejemplares de los últimos años. Los contenidos y opiniones incluidos en los artículos son responsabilidad exclusiva de los autores. Se autoriza la reproducción parcial o total de lo editado mencionando la fuente.

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

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

REDACTOR RESPONSABLE:

Dr. Carlos Morón (Presidente SMVU).

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

SECCIÓN CIENTÍFICA:

Editor Jefe:

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

Consejo Editorial:

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

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

Dr. Guillermo Couto (MV, dipl. ACVIM), Ohio State University, EE.UU

Dr. Luzbel de la Sota (PhD), Facultad de Veterinaria, Universidad de La Plata, Argentina

Dr. Andrés Gil (PhD), Facultad de Veterinaria (UdelaR), Uruguay

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

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

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

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

Dr. José Luis Repetto (PhD), Facultad de Veterinaria (UdelaR), Uruguay
Dr. Franklin Riet (PhD), CSTR, UFCG, Patos PB, Brasil
Dr. Rodolfo Rivero (MSc), DILAVE “Miguel C. Rubino”, MGAP, Uruguay
Dr. Heriberto Rodríguez-Martínez (PhD), CBR, Linköping University, Suecia
Dr. Jorge Tórtora, FES Cuautitlán UNAM, México
Ing. Agr. Jorge Urioste (PhD), Facultad de Agronomía (UdelaR), Uruguay
Dra. Carolina Viñoles (PhD), INIA, Uruguay
Dr. Pablo Zunino (PhD) IIBCE, Uruguay

Secretario:

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

SECCIÓN TÉCNICA:

Editor:

Dra. María A. Solari, DILAVE “Miguel C. Rubino” - MGAP

Consejo Editorial

“Profesor Walter García Vidal”:

Dr. Luis Barros (PhD), Facultad de Veterinaria (UdelaR)
Dr. Uruguaysito Benavides, Facultad de Veterinaria (UdelaR)
Dr. Ulises Cuore, DILAVE “Miguel C. Rubino” - MGAP
Dra. Valeria Gayo (MSc), DILAVE “Miguel C. Rubino” - MGAP

CONTACTO:

Email:

Website: www.revistasmvu.com.uy

Publicación trimestral (versión electrónica)

El volumen completo (números 189 - 192) será impreso a fin de año y será distribuido a los socios de la SMVU.

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

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

Por convenio de la SMVU y Facultad de Veterinaria (16 - 12 - 1988), el Dpto. de Documentación y

Biblioteca de la Facultad de Veterinaria, se realiza el canje internacional por otras publicaciones científicas.

Efecto del tamaño del rodeo sobre la eficacia de un programa de sincronización de celos en base a prostaglandinas e inseminación artificial a celo detectado en vaquillonas Holando



Effect of herd size on the effectiveness of an estrus synchronization program based on prostaglandins and artificial insemination after a detected heat in Holstein heifers

Algorta I¹, Barbosa J¹, Sacco G²,
Cavestany D^{1*}

Recibido: 00/Mes/2013
Aprobado: 00/Mes/2013

RESUMEN

Se evaluó el efecto del tamaño del rodeo en la respuesta a un protocolo de sincronización de celos e inseminación artificial (IA) con prostaglandinas. Se utilizaron 821 vaquillonas de 2 y 3 años de edad, de raza Holando, distribuidas en dos rodeos uno con 621 vaquillonas (rodeo 1) y el otro con 180 vaquillonas (rodeo 2). El protocolo utilizado fue: Día 0: detección de celo e IA durante 6 días; Día 7: examen ginecológico y aplicación de prostaglandina F_{2α} (PG) a las hembras que no fueron inseminadas y tenían cuerpo lúteo (CL), seguida de detección de celo e IA; Día 18: 11 días después del primer tratamiento, segunda aplicación de PG a las vaquillonas no inseminadas, también con IA posterior. En general, el porcentaje de detección de celos (PDC) fue 88,2%, el porcentaje de concepción (PC) 66,5%, el porcentaje de preñez (PP) 59,0%. El PDC durante los 6 días de detección de celos fue 60,1% y luego de la primera administración de PG de 88,0% (P<0,08); luego de la segunda PG fue 36,6% (P<0,0001). El PC fue 65,9%, 68,1% y 61,3% respectivamente

SUMMARY

The effect of herd size on the response to a protocol of estrous synchronization and artificial insemination (AI) with prostaglandins was evaluated with 821 Holstein heifers 2-3 years old, distributed in two herds, one with 621 heifers (herd 1) and the other with 180 heifers (herd 2). The protocol used was: 0 day: heat detection and AI for 6 days; Day 7: gynecological examination and administration of prostaglandin F_{2α} (PG) to females that were not inseminated and had a corpus luteum (CL), followed by heat detection and AI; Day 18: 11 days after the first treatment, second PG administration to heifers not inseminated with subsequent AI. Overall, heat detection rate (HDR) was 88.2%, conception rate (CR) 66.5%, pregnancy rate (PR) 59.0%. HDR during the 6 days of heat detection was 60.1% and after the first administration of PG 88.0% (P<0.08); after the second PG 36.6% (P<0.0001). Herd size affected negatively HDR (86.4% in herd 1 vs. 94.4% in herd 2), but not CR or PR.

¹: DV, PhD, Departamento de Reproducción, Facultad de Veterinaria, UdelaR, Montevideo, Uruguay

²: DCV, ejercicio liberal * : Autor para correspondencia: daniel.cavestany@gmail.com

($P > 0,1$). El PP luego del celo natural fue 36,3%, luego de la primera PG de 59,0% y luego de la segunda 25,8% ($P < 0,0001$). El tamaño del rodeo influyó negativamente en el PDC (86,4% en el rodeo 1 vs. 94,4% en el rodeo 2) pero no en el PC ni en el PP. Los parámetros que presentaron una correlación significativa con el peso corporal fueron la cavidad del VI, SIV, PLVI, Ao y AI. A su vez la cavidad del VD en sístole y diástole, así como DPES no tuvieron correlación con el peso vivo de los animales.

KEYWORDS:

Holstein heifers, prostaglandins, estrus synchronization, heat detection

una práctica muy común en el país, existen muy pocos reportes sobre los resultados obtenidos. El objetivo del trabajo es evaluar el efecto del tamaño del rodeo sobre la eficacia de un programa de sincronización de celos en base a PG e IA a celo detectado.

PALABRAS CLAVE:

Vaquillonas Holando, sincronización de celos, prostaglandinas, detección de celo

INTRODUCCIÓN

La IA se utiliza en un alto porcentaje en rodeos de vaquillonas, siendo la detección de celos el mayor problema para lograr una buena eficiencia reproductiva (Foote, 1975; Larson y Ball, 1992) y la sincronización de celos es una herramienta común en programas de IA (Macmillan, 2010). Cuando se sincronizan celos con prostaglandinas (PG) se obtienen similares resultados de preñez que con celo natural (Stevenson y col., 2008). Si se utiliza solamente una PG al inicio del protocolo, no todos los animales responderán (Lauderdale, 2009) y los que responden los hacen en un lapso de tiempo de 6 días (Macmillan y Henderson, 1984). Esta variabilidad en el tiempo de inicio del celo luego de la inyección con PG se debe fundamentalmente al momento en el ciclo estral en que se encuentra el animal (Berardinelli y Adair, 1989; Watts y Fuquay, 1985). Los protocolos de IA con PG resultan en porcentajes de detección de celos superiores al 60% en cinco días, con tasas de concepción superiores al 70% (Rusiñol y Cavestany, 2011).

A pesar que la utilización de PG en vaquillonas es

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y metodología

El trabajo se realizó en dos predios comerciales de la misma empresa del departamento de Florida, Uruguay, que cuenta con un total de 3.636 Ha, con una dotación de 0,7 UG/Ha, manejados de manera similar. En el mes de mayo de 2009 se seleccionaron 821 vaquillonas de raza Holando, 641 en el predio 1 y 180 en el predio 2 que se consideraron aptas para la IA por superar los 320 kg de peso corporal y un estado corporal superior a 2,5 (Escala de 1 al 5). El protocolo de IA utilizado fue detección de celo durante 7 días, de mañana y de tarde por una hora cada vez e IA a los animales en celo según la regla AM/PM; los animales inseminados eran llevados a un potrero de descanso; el día 7 el veterinario responsable de la empresa realizó un examen ginecológico a los animales que no se inseminaron en ese período y a las hembras con CL se les administró, de forma intramuscular, 2 mL de un análogo de prostaglandina F2 α (PG) (800 μ g de delprostenate, Glandinex, Universal Lab, Montevideo, Uruguay). Se continuó con la detección de celo y la IA de manera similar y a los 11 días de la primera inyección de PG (Día 18 del inicio del protocolo) los animales se reagruparon en el mismo potrero y se administró una segunda dosis de PG a los animales que no presentaron celo durante ese período, esta vez sin examen ginecológico. Para la

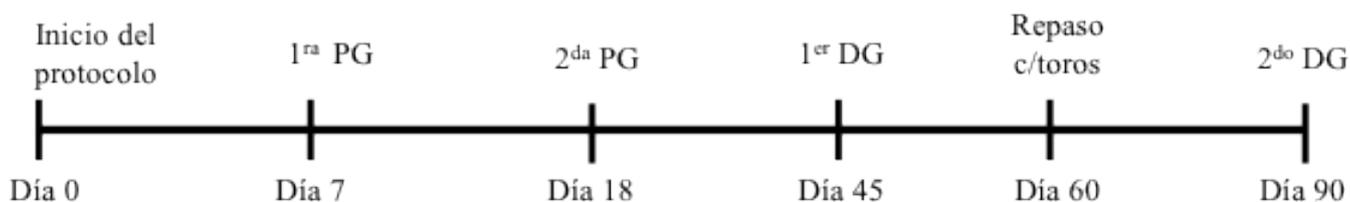


Figura 1. Esquema del protocolo de inseminación y del manejo reproductivo

IA se utilizó semen congelado importado de calidad certificada de cuatro toros el cual se distribuyó de forma uniforme y aleatoria en ambos predios. Cada predio fue manejado de manera independiente, cada uno con su propio personal y un inseminador experimentado en cada predio. La duración total de programa de IA fue 24 días, luego de lo cual se realizó un repaso con cuatro toros durante un mes (dos en cada predio) (Figura 1). El diagnóstico de gestación se realizó mediante ultrasonografía con transductor de 5 MHz (Aloka 500, Aloka, Tokio, Japón) en dos momentos, el primero a los 27 días de la segunda PG y el segundo a los 30 días de finalizado el repaso con toros para así poder determinar las preñeces por la IA y por monta natural.

Definición de parámetros de eficiencia reproductiva utilizados

Porcentaje de detección de celos (PDC):

Animales detectados en celo en 7 días dividido por total de animales ofrecidos y multiplicado por cien.

Porcentaje de concepción (PC):

Animales preñados dividido animales servidos y multiplicado por cien.

Porcentaje de preñez (PP):

Animales preñados dividido animales ofrecidos en 7 días y multiplicado por cien, o PDC x PC.

Porcentaje de preñez final (PPF):

Animales preñados dividido animales ofrecidos al final del período y multiplicado por cien.

Análisis estadístico

La distribución de celos se analizó por análisis de frecuencias y prueba de χ^2 (Proc Freq, SAS). Los parámetros de eficiencia reproductiva se analizaron por regresión logística (Proc Logistic, SAS), con rodeo como efecto principal, incluyendo predio e inseminador en el modelo. Este último factor no registró significancia estadística, por lo cual se eliminó del análisis final. Se definió el 5% como nivel de significancia.

RESULTADOS

Resultados generales en los dos rodeos

El porcentaje de detección de celo fue de 88,2%, el porcentaje de concepción fue de 66,5 %, el porcentaje de preñez fue de 59,0% y el porcentaje de preñez final obtenido con la IA más el repaso con toros fue del 90,6%. En el cuadro I se presenta el porcentaje de detección de celos (PDC), el porcentaje de concepción (PC) y el porcentaje de preñez (PP) en animales inseminadas luego de un celo natural (primeros 7 días) y luego del primer y segundo tratamiento con PG. El PDC de las vaquillonas inseminadas luego de un celo natural fue 60,1% y luego de la primera administración de PG de 88,0% ($P < 0,08$). El porcentaje de detección de celos luego de la segunda PG fue 36,6%, sensiblemente inferior

Cuadro I. Porcentaje de detección de celos (PDC), porcentaje de concepción (PC) y porcentaje de preñez (PP) de acuerdo al número de tratamientos con prostaglandina (PG)

PG ¹	PDC				PC				PP		
	n	%	OR ²	IC ³	%	OR ²	IC ³	%	OR ²	IC ³	
0	311	60,1 ^a	2,62	1,62 – 4,23	65,9 ^d	1,22	0,76 – 1,97	36,3 ^e	1,64	0,98 – 1,97	
1	417	88,0 ^b	12,73	7,61 – 21,32	68,1 ^d	1,35	0,85 – 1,97	59,0 ^f	4,14	2,49 – 6,85	
2	93	36,6 ^c	1,0	Referente	61,3 ^d	1,0	Referente	25,8 ^g	1,0	Referente	

¹: Tratamiento con PG: 0 = celo natural (días 0 a 7 del servicio); 1 = 1 PG; 2 = segunda PG

²: Odds Ratio, ³: Intervalo de confianza 95%,

^{a, b}: P<0,08; ^{b, c}: P<0,0001; ^d: P>0,01; ^{e, g}: P>0,1; ^{f, g}: P<0,0001

a los anteriores (P<0,0001). El PC fue en todos los casos superior al 60%, sin diferencias estadísticas entre grupos (P>0,1). El PP fue estadísticamente superior luego de la administración de la primera dosis de PG (P<0,0001), tanto en relación al grupo inseminado luego de celo espontáneo, como al grupo que recibió una segunda dosis de PG.

Respuesta al tratamiento por rodeo

No hubo diferencias significativas en cuanto a la proporción de animales que no recibieron PG y los que recibieron una y dos PG entre los dos rodeos (P>0,1). Se encontró un efecto del rodeo en la eficiencia de detección de celos tal como se muestra en la figura 2, donde se puede apreciar que en el rodeo con mayor número de animales ofrecidos la eficien-

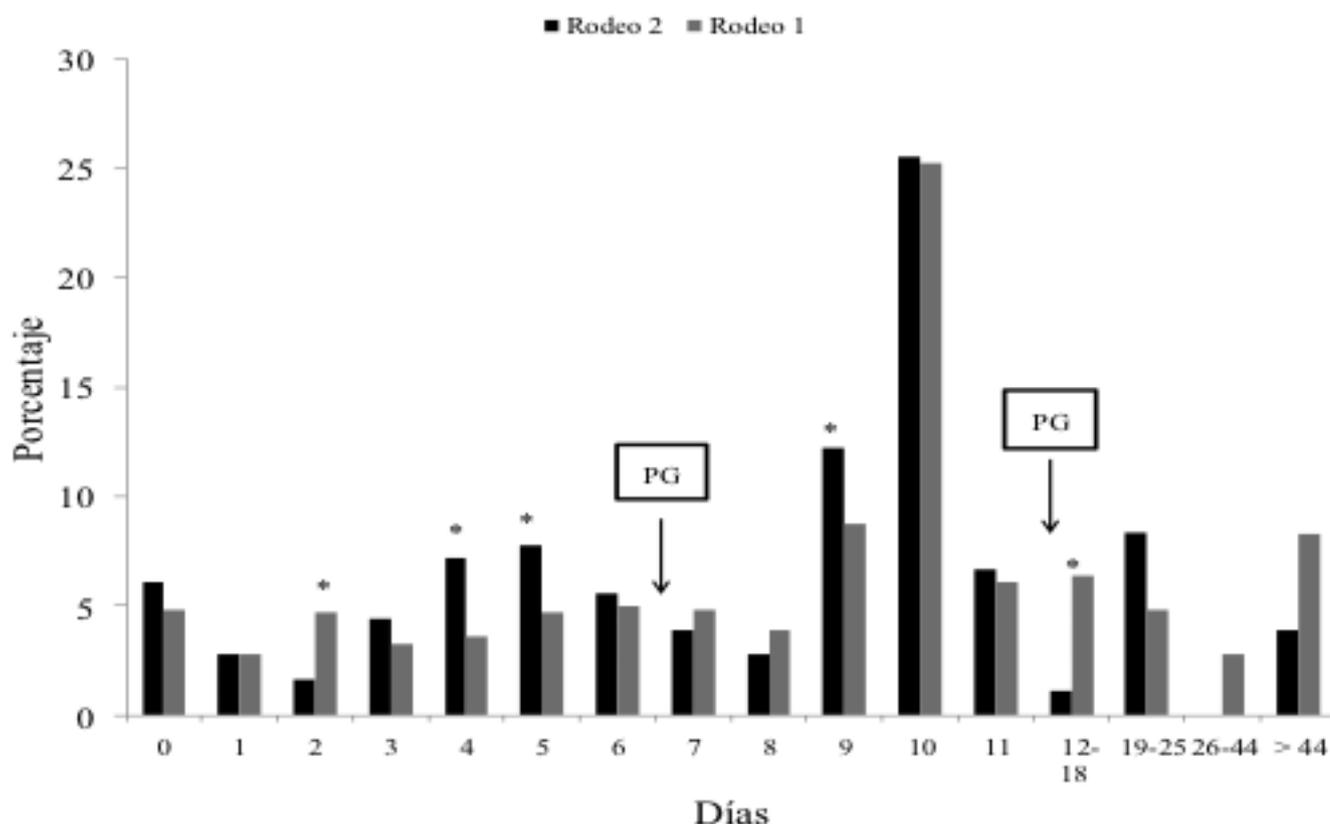


Figura 2. Distribución diaria de celos detectados en cada rodeo observado. Los asteriscos marcan diferencias entre rodeos en cada día (P<0,05).

cia de detección de celos en los primeros 6 días fue inferior al rodeo con menor número de animales. La respuesta a la administración de PG varió solamente a las 48 horas de administrada la hormona, detectándose un mayor número de vaquillonas en celo en el rodeo con menos animales sincronizados. La respuesta al segundo tratamiento con PG fue inversa al día siguiente al mismo, con más animales en celo en el rodeo 1.

Al analizar la eficiencia reproductiva por rodeo, se aprecian diferencias entre ellos, siendo el porcentaje de detección de celos en el rodeo con menor número de animales ofrecidos (rodeo 2) de 94,4% y en el rodeo 1 de 86,4% ($P < 0,05$). La concepción al primer servicio tendió a ser superior en el rodeo 1 que en el 2 ($P = 0,0557$); de la combinación de estos dos índices, surge que el PP fue igual en ambos rodeos ($P = 0,5934$) (Cuadro II).

El porcentaje de preñez final fue de 93,3% en el rodeo 1 y de 89,9% en el rodeo 2, no difiriendo estadísticamente ($P > 0,1$).

De los animales que repitieron el celo durante la IA, el 77,5% lo hizo a un intervalo normal de 17 a 24 días, un 8,7% a un intervalo menor a 17 días y un 13,9% tuvo ciclos largos de más de 24 días.

DISCUSIÓN

Seleccionar los parámetros adecuados para evaluar la respuesta a un determinado protocolo significa considerar las variables que logren dicho objetivo y escoger aquellas más adecuadas para cada situación. Ferguson y Galligan (1993) consideran que el mejor parámetro a utilizar en un programa de inseminación artificial es el porcentaje de preñez, que mide el total de preñeces logradas por unidad de tiempo y combina la eficiencia de la detección de celos (PDC) con la fertilidad (PC). Estos autores recomiendan calcular estos índices cada 21 días, la duración aceptada de un ciclo estral, lo que permite que, cuando no se interviene en la duración del ciclo estral, todos los animales involucrados tengan oportunidad de mostrar un celo espontáneo. En este trabajo este intervalo se calculó en 7 días, ya que fue el lapso en que se realizaron las intervenciones. Esto permitió una evaluación más precisa de lo ocurrido en los períodos de tiempo analizados, es decir la ocurrencia de celos espontáneos durante los primeros seis días de trabajo y luego del primer y segundo tratamiento con PG.

La detección de celos por seis días al comienzo de

Cuadro I. Porcentaje de detección de celos (PDC), porcentaje de concepción (PC) y porcentaje de preñez (PP) de acuerdo al número de tratamientos con prostaglandina (PG)

Rodeo	n	PDC			PC			PP		
		%	OR ¹	IC ²	%	OR ¹	IC ²	%	OR ¹	IC ²
1	641	86,4 ^a	2,67	1,36 – 5,25	68,2 ^c	0,72	0,51 – 1,01	59,4 ^d	0,91	0,65 – 1,28
2	180	94,4 ^b	1,0	Referente	60,6 ^c	1,0	Referente	57,2 ^d	1,0	Referente

¹: Odds Ratio, ²: Intervalo de confianza 95%, a, b: $P = 0,0045$; c: $P = 0,0562$; d: $P = 0,5934$

un trabajo de IA permite inseminar a celo natural a animales que están en el diestro tardío a la vez que permite que aquellas hembras en metaestro o diestro temprano al inicio del trabajo se encuentren en una etapa del ciclo estral receptivo a la PG al momento de la administración de ésta (Lauderdale, 2009). Esta combinación dio buenos resultados, logrando inseminarse casi el 90% de las vaquillonas en un corto período de tiempo. La ventaja del ahorro de dosis de PG contra los costos de un programa más prolongado, es un aspecto que debe considerarse en cada situación en particular. La inyección de PG a los animales antes del día 5 o 6 del ciclo estral es inefectiva o tiene poca respuesta (Gigli et al., 2006; Tanabe y Hann, 1984). También es inefectiva en el diestro tardío a partir del día 17 dado que ya ha comenzado la luteolisis de forma natural.

Los resultados globales de este trabajo fueron similares a los reportados por de Nava (2004), de Nava y col. (2008) y Rusiñol y Cavestany (2011) en Uruguay, así como en otros países (Schilling y col., 1982; Tanabe y Hann, 1984; Chebel y col., 2007). El porcentaje de detección de celos diario en los primeros días fue el esperado en un rodeo en el que los animales están ciclando (Smalley, 1981) y fue similar a los reportados por Rusiñol y Cavestany (2011). Luego de la primer administración de PG la distribución de los celos fue similar a la encontrada por Gonzalez y col. (1985) y Wahome y col. (1985) según los cuales los animales respondieron a la PG entre 23% a 30% a las 48 h, 45,6% a 47% lo hizo a las 72 h y entre 14,3% y 15,4% a las 96 h pos tratamiento; por otra parte, el “pico” de celos ocurrió un poco antes de lo reportado por Donaldson (1977) y de Nava y col. (2008) quienes encontraron que la mayor respuesta a la PG se obtuvo entre el cuarto y sexto día post PG. Kastelic et al. (1990) y Kastelic y Ginther (1991), utilizando ultrasonografía, determinaron que el intervalo entre el tratamiento con PG y la expresión del celo y la ovulación depende del estado de desarrollo del

folículo dominante al momento del tratamiento. Si la PG es aplicada cuando el folículo dominante se encuentra en la última etapa de crecimiento o en la fase estática temprana, la ovulación ocurrirá dentro de los 3 a 4 días (4,2 media) posteriores. En cambio, cuando el folículo dominante se encuentra en la fase estática media o tardía, la ovulación ocurrirá por parte del folículo dominante de la siguiente onda folicular 5 a 7 días (6,3) posteriores. Esto es debido a que el folículo en etapa estática media y tardía ya no es más viable por lo que el aumento del intervalo se debe a que el folículo dominante de la nueva onda debe crecer hasta el tamaño preovulatorio. Por todo esto se explica la variabilidad en los intervalos entre la inyección de PG y la ovulación, por lo que es necesario realizar una correcta detección de celo para obtener altos porcentaje de preñez en los programas de IA sincronizados con PG (Bó et al., 2002; Kastelic y Ginther, 1991).

El mayor porcentaje de detección de celos en las vaquillonas que recibieron una PG sobre las que no recibieron ninguna PG concuerda con otros reportes y se debe a una mayor facilidad de detectar celo en una población sincronizada (Stevenson y col., 2008). También puede deberse a que el incremento de animales en celo al mismo tiempo debido a la sincronización, aumenta la intensidad de la manifestación del celo y por ende la posibilidad de detectarlo (Cavestany y col., 2008; Floyd y col., 2009). En los animales que recibieron una segunda dosis de PG se registró una marcada disminución del porcentaje de detección de celos. Es importante notar que, previo a esta administración, no se realizó un examen ginecológico de las vaquillonas por lo que no se puede descartar que un número de estos animales no presentaran cuerpo lúteo. Tampoco se puede descartar que estos animales presentaran celos más cortos o menos manifiestos, dificultando su detección, problema que ha sido reportado en vacas

(Plunkett y col., 1984).

El porcentaje de concepción de los animales detectados en celo de forma natural y los sincronizados con PG no fue significativamente diferente, sugiriendo que la fertilidad del celo natural y del celo sincronizado con PG es similar (Butler y Balcarce, 1989; Stevenson y Pursley, 1994; Stevenson y col., 2008). El porcentaje de preñez, calculado como fue oportunamente definido, fue superior en los animales que recibieron un tratamiento con PG debido fundamentalmente a un mayor número de vaquillonas detectadas e inseminadas, como ya fuera reportado (Rusiñol y Cavestany, 2011).

El tamaño del rodeo afectó significativamente los resultados reproductivos. Es así que en el rodeo en que se ofrecieron más animales, el porcentaje de detección de celos fue significativamente menor. Esto ha sido demostrado en vacas (Cavestany y Galina, 2001) pero no hemos encontrado antecedentes en vaquillonas.

CONCLUSIONES

El tamaño del rodeo afectó significativamente la eficiencia de la sincronización. La combinación de detección de celos durante 6 días con la administración de PG permitió la inseminación de casi el 90% de los animales en un relativamente corto período. Una segunda administración de PG a animales no detectados en celo de forma natural o luego de una primera administración de PG debe ser considerada cuidadosamente, considerando el bajo número de animales que pueden responder y los costos de prolongar un trabajo por más de 2 semanas.

BIBLIOGRAFÍA

- Berardinelli JG, Adair R. (1989). Effect of prostaglandin F2 alpha dosage and stage of estrous cycle on the estrous response and corpus luteum function in beef heifers. *Theriogenology* 32:301-314.
- Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tribulo R, Tribulo H, Mapletoft RJ. (2002). The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer program in cattle. *Theriogenology*; 57:53-72.
- Butler H, Balcarce A. (1989). Evaluación de la distribución temporal y fertilidad de los celos en vaquillonas Hereford con una dosis reducida de delprostenate. *Cabia* 15:40-44.
- Cavestany D, Galina CS. (2001). Factors affecting the reproductive efficiency of artificial insemination programmes in a seasonal breeding pasture based dairy system with the aid of milk progesterone. *Reprod Dom Anim* 36:85-90.
- Cavestany D, Fernandez M, Perez M, Tort G, Sanchez A, Sienna R. Oestrus behaviour in heifers and lactating dairy cows under a pasture-based production system. *Vet. Quarterly* 2008; 30(Suppl. 1):10-36.
- Chebel RC, Braga FA, Dalton JC. (2007). Factors affecting reproductive performance of dairy heifers. *Anim Reprod Sci* 101:208-224.
- de Nava G. (2004). Resultados en programas de inseminación artificial de vacunos implementados durante la temporada 2003-2004 en estancias ganaderas comerciales del Uruguay. XXXII Jornadas uruguayas de buiatría. Paysandú. Uruguay. pp 61-66.
- de Nava G, Arrospide A, Delgado E, de Paula R, Cavestany D. 2008. Efecto de la administración parenteral de vitaminas y minerales sobre la fertilidad de vaquillonas de carne inseminadas artificialmente. *Veterinaria (Uruguay)* 43:9-14.
- Donaldson LE. (1977). Synchronisation of oestrus in beef cattle artificial breeding programs using prostaglandin F2alpha. *Aust Vet J* 53:72-77.
- Ferguson SD, Galligan DT. (1993). Reproductive programs in dairy herds. *Proc. Central Veterinary*

- Conference, Kansas, USA, p. 161-178.
11. Floyd L, Lents C, White F, Wettemann R. (2009). Efecto de número de vacas en estrus y confinamiento en el comportamiento de vacas de carne. *J Anim Sci*. 87:1998-2004.
 12. Foote RH. (1975). Estrus detection and estrus detection aids. *J Dairy Sci*; 58, 248-256.
 13. Gigli I, Russo A, Agüero A. (2006). Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino, y camélidos sudamericanos. *Rev Inv Vet* 8:1:22.
 14. Gonzalez LV, Fuquay JW, Bearden HJ. (1985). Insemination management for a one-injection prostaglandin F(2)alpha synchronization regimen. I. One daily insemination period versus use of the a.m./p.m. rule. *Theriogenology* 24:495-500.
 15. Kastelic JP, Ginther OJ. (1991). Factors affecting the origin of the ovulatory follicle in heifers with induced luteolysis. *Anim Reprod Sci* 26:13-24
 16. Kastelic JP, Knopf L, Ginther OJ. (1990). Effect of day of prostaglandin F2 α treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers. *Anim Reprod Sci* 23:169-180.
 17. Larson LL, Ball PJH. (1992). Regulation of estrus cycles in dairy cattle: a review. *Theriogenology* 38:255-267.
 18. Lauderdale JW. (2009). ASAS centennial paper: Contributions in the Journal of Animal Science to the development of protocols for breeding management of cattle through synchronization of estrus and ovulation. *J Anim Sci*. 87:801-812.
 19. Macmillan KL. (2010). Recent advances in the synchronization of estrus and ovulation in dairy cows. *J Reprod Dev* 56 Suppl:S42-47.
 20. Macmillan KL, Henderson HV. (1984). Analyses of the variation in the interval from an injection of prostaglandin F2 α to estrus as a method of studying patterns of follicle development during diestrus in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 6:245-254.
 21. Plunkett SS, Stevenson JS, Call EP. (1984). Prostaglandin F2 alpha for lactating dairy cows with a palpable corpus luteum but unobserved estrus. *J Dairy Sci*. 67:380-387.
 22. Rusiñol C, Cavestany D. (2011). Comparación de tres métodos de sincronización de celos y ovulaciones con y sin inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) en vaquillonas para carne. *Veterinaria (Uruguay)* 47:25-30.
 23. Schilling E, Jochle W, Smidt D. (1982). Estrous cycle synchronization in dairy heifers with the prostaglandin analog alfaprostol (II). *Theriogenology* 18:413-422.
 24. Smalley SA. (1981). Management problems of large dairies. *Vet Clin North Am Large Anim Pract*. 3:289-305.
 25. Stevenson JL, Rodriguez JA, Braga FA, Bitente S, Dalton JC, Santos JE, Chebel RC. (2008). Effect of breeding protocols and reproductive tract score on reproductive performance of dairy heifers and economic outcome of breeding programs. *J Dairy Sci* 91:3424-3438.
 26. Stevenson JS, Pursley JR. (1994). Use of milk progesterone and prostaglandin F2 alpha in a scheduled artificial insemination program. *J Dairy Sci* 77:1755-1760.
 27. Tanabe TY, Hann RC. (1984). Synchronized estrus and subsequent conception in dairy heifers treated with prostaglandin F2 α and influence of stage of the cycle at treatment. *J Anim Sci* 58:80-85.
 28. Wahome JN, Stuart MJ, Smith AE, Hearne WR, Fuquay JW. (1985). Insemination management for a one-injection prostaglandin F(2)alpha synchronization system. II. One versus two inseminations following detection of estrus. *Theriogenology*; 24(5):501-7.
 29. Watts TL, Fuquay JW. (1985). Response and fertility of dairy heifers following injection with prostaglandin F(2 alpha) during early, middle or late diestrus. *Theriogenology* 23:55-61.

ANTECEDENTES DE LA TUBERCULOSIS BOVINA EN URUGUAY

Periodo marzo 1888 – enero 1998



Raúl Casas Olascoaga^{a1}

Recibido: 00/Mes/2013
Aprobado: 00/Mes/2013

I. MYCOBACTERIA Y LA ENFERMEDAD

Fracastorius de Verona (1484-1553) llegó a notables conclusiones sobre la naturaleza infecciosa de la tuberculosis y su mecanismo de transmisión. La tuberculosis humana era considerada como contagiosa desde el siglo XVIII y su transmisión fue demostrada por Klenche en 1843 y su infecciosidad en el hombre por Villemin en 1865 y, en 1868, por inoculación en conejos. Robert Koch descubrió el bacilo de la tuberculosis en 1882 cultivando el microorganismo en suero sanguíneo coagulado y reprodujo la enfermedad por inoculación en cobayos. Los postulados enunciados y propuestos por Henle, su maestro, fueron confirmados y probados por Koch y quedaron registrados en la historia científica como “Postulados de Koch”. En 1882, Ehrlich descubrió la característica acido-resistente del bacilo de la tuberculosis. En 1890 R.Koch presentó sus estudios sobre la tuberculina. En 1898, Theobald Smith informó que las cepas de origen humano y de origen bovino eran diferentes y podrían ser separadas por la tasa de desarrollo y las características de cultivo en caldo glicerinado acidificado y por diferente pa-

togenicidad en animales; el tipo bovino era más patogénico para los animales experimentales. El bacilo tuberculoso mamífero, *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis*, causa enfermedad en una amplia diversidad de mamíferos. Si bien son similares en muchas características ellos tienen importantes diferencias que permiten distinguirlos. Estas dos especies también difieren en su patogenicidad para algunas especies animales. Así, por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis* posee baja patogenicidad para los bovinos y conejos cuando se compara con la elevada virulencia de *M. bovis* para estas dos especies. En cambio, las aves son resistentes al *M. bovis*, esta resistencia podría ser debida en parte a la temperatura corporal. *M. bovis* es el que tiene mayor número de hospederos tanto de animales domésticos como silvestres. En muchas especies, incluidos los humanos, los primates no humanos y ciertas especies silvestres de pezuña hendida, la enfermedad producida por *M. bovis* y *M. tuberculosis* no puede ser diferenciada sino por medio de la identificación y caracterización del agente etiológico, lo cual permite confirmar el diagnóstico. *M. tuberculosis* es solo raramente aislado del bovino y las lesiones, generalmente, están limitadas a los ganglios lin-

a: Médico Veterinario. Profesor Emérito de la Facultad de Veterinaria/ Universidad de la República. Presidente de la Academia Nacional de Veterinaria y Académico de Número

¹: Presentado en el Seminario sobre Sanidad Animal, MERCOSUR organizado por la Dirección General de Servicios Ganaderos/MGAP, celebrado en la Dirección de Laboratorios “Miguel C. Rubino” (DILAVE) en Noviembre de 1999.

fáticos. Los bovinos expuestos a personas con tuberculosis activa pueden reaccionar en la prueba tuberculina. Por lo tanto, la hipersensibilidad debida a la infección de los vacunos por *M. tuberculosis* debe ser investigada cuando no se presentan lesiones o se presentan solamente lesiones ganglionares limitadas, en rodeos donde se presentan animales reaccionantes a la tuberculina cuando en el manejo y cuidado de los animales hay personas tuberculosas. *M. bovis*, un microorganismo no cromogénico, ácido resistente y de crecimiento lento, es el agente de la tuberculosis bovina. En los bovinos, *M. bovis* es transmitido principalmente a través del aire por medio de aerosoles contaminados con el agente infeccioso y también, con menor frecuencia e importancia por el agua y los alimentos contaminados. La vía aerógena es la más importante en la transmisión de la tuberculosis por *M. bovis*. El agente infeccioso puede ser aislado de las secreciones nasales de vacunos infectados que reaccionan a la tuberculina. Los exudados pulmonares de los bovinos son usualmente tragados, consecuentemente el microorganismo transita con las heces, contaminando el suelo y los alimentos. El riesgo de exposición a la infección es mayor en lugares cerrados y con poca ventilación donde cohabitan o se alimentan animales susceptibles e infectados. Puede ocurrir la transmisión congénita y por lo tanto la importancia de esta ruta de transmisión e infección debe tenerse en cuenta en un rodeo donde la infección persiste. En la tuberculosis bovina la naturaleza de la enfermedad y su extensión en el organismo varía según la ruta de exposición a la infección. Experimentalmente, para infectar a un bovino por vía aerógena, se necesita una dosis mucho menor que para producir la infección por vía digestiva. La segunda vía en importancia para la infección por *M. bovis* es la digestiva. Una vaca con lesión tuberculosa mamaria puede infectar a la cría que amamanta o infectar animales jóvenes alimentados con su leche contaminada. La tuberculosis de los

bovinos siempre ha disminuido en los países o áreas o poblaciones de bovinos donde se han aplicado programas de control y/o erradicación sistemáticos basados en la prueba tuberculínica y en el sacrificio de los animales reaccionantes.

En el cuadro 1 se presentan registros históricos de los trabajos estadísticos sobre “Distribución de lesiones en vacas lecheras reaccionantes a la tuberculina” efectuados por el Dr. León C. Aragunde sobre 500 vacas reaccionantes y por el Dr. Manuel Castello sobre 250 vacas reaccionantes; los animales de ambos grupos fueron sacrificados y sometidos a examen post mortem por orden de la Dirección de Ganadería. Estos registros estadísticos confirman la amplia predominancia de la vía aerógena en la transmisión de la infección. En comparación, *M. avium* es aislado de lesiones localizadas, no evolutivas (salvo raras excepciones) en los ganglios linfáticos mesentéricos y en otros tejidos de los bovinos. *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. avium* han sido aislados de cerdos con lesiones tuberculosas. Los brotes de *M. tuberculosis* han sido asociados con la alimentación de basura y desperdicios hospitalarios o domiciliarios no tratados contaminados por pacientes tuberculosos. Individuos tuberculosos pueden diseminar la infección directamente a los cerdos a través de esputos u otras excreciones y secreciones contaminadas. En el cerdo las lesiones por *M. tuberculosis* están, a menudo, localizadas en los ganglios linfáticos del tracto gastro intestinal. Las lesiones caseosas son, más comúnmente, encontradas en los ganglios mesentéricos o submaxilares. Sin embargo, lesiones microscópicas han sido descritas en los ganglios torácicos y portales y en el parénquima de los pulmones. Las lesiones se caracterizan por la presencia de células epitelioideas, con presencia ocasional de células gigantes, las cuales no pueden ser diferenciadas por el examen macro o microscópico, de aquellas causadas

Cuadro I. Distribución de lesiones en vacas lecheras reaccionantes a la tuberculina

Lugar de la lesión	Estadística del Dr. León C. Aragunde sobre 500 vacas reaccionantes sacrificadas por orden de la Dirección de Ganadería.	Estadística del Dr. Manuel Castelo sobre 250 vacas reaccionantes sacrificadas por orden de la Dirección de Ganadería
Parénquima Pulmonar	19,2%	67,2%
Ganglios Brónquicos	59,2%	59,6%
Pleuras	34,2%	11,2%
Ganglios Mediastínicos	58,0%
Ganglios Retrofaríngeos	51,2%	46,6%
Ganglios Submaxilares	43,8%	5,2%
Ganglios Parotidianos	38,8%
Ganglios Cervicales Inferiores	10,4%	0,4%
Ganglios Preescapulares	6,3%
Parénquima Hepático	3,6 %	7,2%
Ganglios Hepáticos	2,0%	12,4%
Ganglios Mesentéricos	7,6%	12,8%
Serosa Peritoneal	11,6%	2,4%
Estómago	0,4%
Riñón	0,4%
Bazo	0,6%
Útero	1,0%
Ovario	0,2%
Ganglios Inguinales	4,0%	0,4%
Ganglios Lombo-aórticos	2,0%
Ganglios Ilíacos	0,4%
Ganglios Poplíteos	0,4%
Ganglios Precurales	0,8%
Ganglios Retromamarios	12,4%	3,2%
Parénquima Mamario	7,8%	2,4%
Huesos	0,8%
Articulaciones	0,4%
Piel	0,4%
Sin lesiones macroscópicas visibles	4,40%
Tuberculosis generalizada en vísceras y ganglios	66,4%

Sobre 4633 bovinos reaccionantes a la Tuberculina desde 1942-1945 se obtuvieron con tuberculosis generalizada el 51,8% y con tuberculosis localizada el 48,2%

por *M. avium*. El cerdo se considera una de las especies más susceptible a *M. bovis*. Las lesiones progresivas se observan usualmente en los pulmones. También se presentan tubérculos bien definidos en el hígado, bazo, y ganglios linfáticos de la cavidad torácica y abdominal. Hay presencia usual de células gigantes y epitelioides en las lesiones pulmonares. Microscópicamente, los granulomas pueden contener centros caseificados con cierta mineralización. Si bien puede demostrarse la presencia de bacilos ácido resistentes debe destacarse que solo se pueden observar escasos bacilos de la tuberculosis. Los brotes en cerdos por *M. bovis* usualmente se presentan en predios donde hay ocurrencia de tuberculosis bovina. Los porcinos son infectados más frecuentemente por ingestión. Las pruebas tuberculínicas son valiosas en el diagnóstico de la infección en una pira. *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis (denominado previamente *Mycobacterium paratuberculosis*) es el agente de una enteritis granulomatosa, hipertrófica, crónica de los rumiantes, la Paratuberculosis o Enfermedad de Johne. *Mycobacterium paratuberculosis* fue observado por primera vez por Johne y Frothingham en 1895.

En el Uruguay, la enfermedad fue comprobada por primera vez en 1944-1945 por A. Cassamagnaghi (III Congreso Brasileño de Veterinaria, Porto Alegre, 1945; Anales de la Facultad de Veterinaria, 1947). *M. avium* subespecie paratuberculosis es un pariente relativamente lejano de *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. leprae*. En cambio, es 99% semejante al *M. avium*, bacteria que crece libremente en el medio ambiente y cuyo huésped principal son las aves. Hay una característica genética, un elemento corto de ADN denominado IS 900 que diferencia el *M. paratuberculosis* de *M. avium*. Puede usarse una sonda genética de IS900 para identificar la infección por *M. avium* subespecie paratuberculosis. Epidemiológicamente, debe tenerse en cuenta, el carácter

progresivo lento de la infección, su evolución subclínica y silenciosa, cuyos signos clínicos pueden no observarse hasta transcurridos años desde la infección inicial. Los síntomas clínicos se caracterizan por ataques intermitentes de diarrea que a medida que evoluciona la enfermedad se hace crónica (“diarrea en chorro o en arco”); hay notoria pérdida de peso, anorexia y caquexia final. El animal excretor es la fuente principal directa de infección. Enormes cantidades de microorganismos son excretados en las heces fecales contaminando el medio ambiente y las fuentes de agua. Esta bacteria solo se multiplica en el organismo animal pero puede sobrevivir por años en el medio ambiente debido a su resistencia al calor, frío y deshidratación. La enfermedad se presenta con signos patognomónicos o con carácter subclínico. El diagnóstico se efectúa por los síntomas clínicos y la demostración de *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis en las heces por examen microscópico, cultivo fecal o por el uso de sondas ADN, inmunofluorescencia y la reacción en cadena de la polimerasa (RCP). En la necropsia el diagnóstico se hace en base de las lesiones patognomónicas de la enfermedad en los intestinos, (macroscópica e histológicamente) y por el aislamiento del agente infeccioso.

La detección de la infección subclínica se hace por la hipersensibilidad retardada a la “johnina” o a la tuberculina aviaria, por pruebas serológicas (ELISA, FC, AGID) para demostrar la presencia de anticuerpos específicos o por cultivo de la bacteria recuperada de las materias fecales. En el presente, la prueba de ELISA y el cultivo de las heces fecales son los métodos más usados para detectar la infección subclínica en un rodeo o en un grupo de animales. Las pruebas de ELISA, AGID y cultivo fecal son todas útiles en el diagnóstico en animales con síntomas clínicos. Varias especies y subespecies de *Micobacteria* incluyendo el complejo de

M. avium (M. avium- M. intracelulare-M. scrofulaceum), M. kansasii, M. fortuitum y M. tuberculosis pueden inducir la sensibilidad de la piel a la tuberculina, pero usualmente no producen enfermedad progresiva pulmonar en el bovino.

II. ANTECEDENTES DE LA TUBERCULOSIS BOVINA EN URUGUAY

En 1988, la Academia Nacional de Veterinaria publicó “Tambos y tuberculosis bovina en Uruguay (1834-1963)” obra de Nelson Magallanes que contiene la información disponible en la materia para ese extenso periodo de la vida del país. Es un análisis metódico y preciso, resultado de la revisión histórica hecha por el eximio autor. Felizmente, en esta oportunidad la Academia Nacional de Veterinaria, en homenaje a N. Magallanes, tiene la posibilidad de distribuir 100 ejemplares de ese importante documento que ilustrará a la audiencia sobre ese prolongado periodo histórico. Han transcurrido 111 años desde que Teodoro Visaires, “en marzo de 1888 informó haber hallado y ordenado retirar 17 vacas enfermas, dos de ellas con tuberculosis pulmonar” (N. Magallanes). El 14 de octubre de 1896 la Municipalidad de Montevideo dictó la ordenanza que impuso la intervención del Laboratorio Municipal de Bacteriología y Micrografía como requisito previo a la entrada de animales lecheros a tambos de Montevideo. Dicha ordenanza, que se comenzó a aplicar desde el 15 de febrero de 1897, estableció la observación clínica y tuberculinización en el Corralón Municipal. (N. Magallanes). Han transcurrido 102 años desde que se inició la aplicación de esa disposición reglamentaria. El 11 de enero de 1902 el Ministerio de Gobierno aprobó una ordenanza y reglamento referente al servicio de tuberculinización e inspección veterinaria que estableció que ningún animal destinado a la explotación lechera sería admitido en tambos y lecherías de Montevideo sin contar con autorización otorgada previo examen veterinario y tuberculinización satisfactoria. Se imponía el sacrificio de los animales reaccionantes y con signos clínicos mientras que los reaccionantes sin síntomas clínicos de la enfermedad debían ser marcados a fuego en el cuello y rechazados e identificados por medio de certificado. Los propietarios de los animales decomisados recibían compensación. La ley Nro. 3.606 de Policía Sanitaria de los Animales, promulgada el 13 de abril de 1910, en su artículo 35 incluyó la tuberculosis entre los vicios redhibitorios. El decreto del 5 de diciembre de 1916 extendió la tuberculinización subcutánea a los animales de lechería de todo el país en igual forma y bajo la misma reglamentación que en el departamento de Montevideo. Sin embargo, el Poder Ejecutivo, por decreto el 31 de julio de 1917, otorgó una prórroga de un año ante la oposición e impugnación que presentara la Sociedad Unión de Lecherías Rurales. (N. Magallanes). El decreto del 8 de octubre de 1918 introdujo las tuberculinizaciones practicadas por veterinarios particulares y estableció que la tuberculinización se iniciaría en los animales lecheros de los tambos urbanos y en los establecimientos que expendiesen leche certificada, cualquiera fuera su ubicación. Este decreto dejó sin efecto el de 5 de diciembre de 1916 que no tuvo aplicación práctica. Por ley Nro. 10.045 de 10 de setiembre de 1941 sobre Indemnización al Ganado Lechero y su decreto reglamentario de 20 de febrero de 1941 se establece la identificación, sacrificio e indemnización de los animales reaccionantes a las pruebas tuberculínicas. Las disposiciones contenidas en los textos legales mencionados comenzaron a aplicarse durante el año 1942 organizándose un plan de tuberculinizaciones para el ganado lechero en los departamentos de

zación e inspección veterinaria que estableció que ningún animal destinado a la explotación lechera sería admitido en tambos y lecherías de Montevideo sin contar con autorización otorgada previo examen veterinario y tuberculinización satisfactoria. Se imponía el sacrificio de los animales reaccionantes y con signos clínicos mientras que los reaccionantes sin síntomas clínicos de la enfermedad debían ser marcados a fuego en el cuello y rechazados e identificados por medio de certificado. Los propietarios de los animales decomisados recibían compensación. La ley Nro. 3.606 de Policía Sanitaria de los Animales, promulgada el 13 de abril de 1910, en su artículo 35 incluyó la tuberculosis entre los vicios redhibitorios. El decreto del 5 de diciembre de 1916 extendió la tuberculinización subcutánea a los animales de lechería de todo el país en igual forma y bajo la misma reglamentación que en el departamento de Montevideo. Sin embargo, el Poder Ejecutivo, por decreto el 31 de julio de 1917, otorgó una prórroga de un año ante la oposición e impugnación que presentara la Sociedad Unión de Lecherías Rurales. (N. Magallanes). El decreto del 8 de octubre de 1918 introdujo las tuberculinizaciones practicadas por veterinarios particulares y estableció que la tuberculinización se iniciaría en los animales lecheros de los tambos urbanos y en los establecimientos que expendiesen leche certificada, cualquiera fuera su ubicación. Este decreto dejó sin efecto el de 5 de diciembre de 1916 que no tuvo aplicación práctica. Por ley Nro. 10.045 de 10 de setiembre de 1941 sobre Indemnización al Ganado Lechero y su decreto reglamentario de 20 de febrero de 1941 se establece la identificación, sacrificio e indemnización de los animales reaccionantes a las pruebas tuberculínicas. Las disposiciones contenidas en los textos legales mencionados comenzaron a aplicarse durante el año 1942 organizándose un plan de tuberculinizaciones para el ganado lechero en los departamentos de

Montevideo y Canelones, como primera etapa de la lucha sanitaria, disponiéndose el pago de 75% del valor animal en pie previa tasación y 100% del valor para animales de pedigrí y los puros por cruza. Desde ese momento los animales reaccionantes pasaban a ser propiedad de la Dirección de Ganadería para su sacrificio inmediato bajo control del veterinario oficial, con examen necrópsico. Esta ley tiene virtudes en sus aspectos profilácticos e indudablemente tiene imperfecciones pero su estructura fundamental significa importante herramienta sanitaria. En el orden económico la ley probó ser débil e insuficiente, quizá por su propia generosidad en el otorgamiento de indemnizaciones o compensaciones, sin aportes de primas por parte de los productores. Cumplidos 10 años de ejercicio de las disposiciones de la Ley Nro. 10.045 y su respectivo decreto reglamentario, las actuaciones cumplidas fueron resumidas en el informe de Dr. Miguel Galain, Interventor de la Dirección de Leches, actuando como secretario del Dr. Nelson Magallanes, en la siguiente forma:

- “I. Entre el 1 de diciembre de 1942 y el 30 de setiembre de 1952 se investigaron 202.882 bovinos, de los cuales reaccionaron positivamente: 16.127.”
- “II. Han sido sacrificados más de diez mil bovinos tuberculosos, habiéndose hecho efectivas hasta ahora las indemnizaciones correspondientes a 9.972.”
- “III. Se han gastado por concepto de indemnizaciones, la cantidad de \$1.490.953,17 (desde la promulgación de la ley hasta el 8 de octubre de 1952, fecha del último pago efectuado) permaneciendo impagas un número de boletas que al día 8-11-52 totalizaban \$87.792,25, suma que excede ampliamente el saldo disponible en la cuenta corriente del Banco de la República (\$ 4.795,46).”

- “IV Los índices de infección tuberculosa en el ganado lechero de los tambos de Montevideo son más elevados en la actualidad que en el momento de iniciarse la aplicación de la ley.”

Esta ley y sus disposiciones reglamentarias se aplicaron hasta 1952 en que ocurre una paralización de la acción sanitaria. N. Magallanes en su obra “Tambos y tuberculosis bovina en el Uruguay”, luego de un análisis preciso de la aplicación de la Ley 10.045 expresa: “El saldo netamente desfavorable comprobado al cabo de diez años de aplicación de la ley, tanto en los aspectos administrativos y sanitario como en lo económico, determinó la suspensión del programa y forzó encausar la lucha contra la tuberculosis bovina por vías más consistente que las que siguió la ley nro. 10.045.

El decreto del 9 de setiembre de 1952 suspendió el pago de las indemnizaciones por sacrificio de los animales reaccionantes. La tuberculinización de los veterinarios privados y las tuberculinizaciones oficiales en los remates de ganado lechero y el control de los animales importados/exportados fueron las acciones sanitarias que mantuvieron su aplicación.

III. DISTRIBUCIÓN DE LA TUBERCULOSIS BOVINA EN URUGUAY

Históricamente, han sido muy diferentes los índices de infección por *Micobacterium bovis* en el ganado lechero y en el ganado de carne. Sobre la base de las estadísticas llevadas por los servicios oficiales de Inspección de Carnes, según los exámenes post mortem realizados en los frigoríficos y locales de industrialización de carnes los índices de infección en el ganado de carne han sido siempre muy bajos, ínfimos. En cambio, hasta 1952, las informaciones de los servicios oficiales de tuberculinización esta-

blecían para el ganado lechero de la cuenca lechera de Montevideo un 11.5 -12 por ciento de reaccionantes. Las marcadas diferencias para el ganado de carne y el ganado de leche resultan fundamentalmente de sus sistemas de explotación, cría y producción. La ganadería de carne de régimen extensivo, pastoril “a campo”, de vida al aire libre y con una baja densidad ganadera ha tenido siempre en el Uruguay una muy baja prevalencia de la enfermedad. En cambio, el ganado lechero con un régimen de semi-estabulación, alta densidad de población, salas de ordeño, comunidad de comederos y bebederos y mayor concentración en los pastoreos está expuesta a mayores oportunidades de transmisión de la infección. Se suman otras circunstancias derivadas de los sistemas intensivos de producción de leche y de reproducción del ganado lechero. Un hecho de gran importancia epidemiológica, incidió en la dis-

eminación de la tuberculosis bovina en las cuencas lecheras del país y aún en las estancias que tienen ganado lechero, ha sido la adquisición de animales de descarte sin las debidas exigencias de tuberculización y cumplimiento de los requisitos sanitarios.

En el cuadro 2 se observa en el periodo 1937-1939 se faenaron 2.757.200 bovinos, registrándose un total de 17.779 animales con lesiones tuberculosas (0.64%). León C. Aragunde (1948) en estadísticas llevadas en las playas de faena del Frigorífico Nacional sobre 1.154.077 bovinos faenados durante los años 1943, 1945 y 1946 registró 11.906 animales con lesiones tuberculosas representando 1,04 por ciento. Se incluían en este estudio los bovinos con reacción positiva a la tuberculina los cuales fueron sacrificados en dicho frigorífico por orden de la Dirección de Ganadería. El total de los casos de tu-

Cuadro 2. Vacunos sacrificados en los frigoríficos y decomisados por tuberculosis

Años	Faenados	Tuberculosis Total	Tuberculosis Parcial	Total Tuberculosis	Porcentajes del Total
1937	932.276	2.418	3.880	6.298	0,67
1938	963.827	2.215	3.111	5.326	0,55
1939	961.097	2.555	3.600	6.155	0,64
Total	2.757.200	7.188	10.591	17.779	0,64

Cuadro 3. Tuberculinizaciones totales de 1934 a primer trimestre de 1940 *

Lugar	Animales	Positivos	Porcentajes
Lazaretos	36.729	3.470	9,4%
Insp. Vet. Regionales	30.885	3.360	10,0%
Veterinarios Particulares	5.158	393	7,6%
Veterinarios Oficiales			
Totales	72.772	7.223	10,0%

* Fuente: Dr. Miguel C. Rubino y Dr. Manuel Castelo Boleta Dirección de Ganadería Nro. 3, Año 1940

berculosis generalizada correspondió a 4.151 bovinos (0.37 por ciento) y tuberculosis localizada a 7.835 bovinos (0.67 por ciento). En su mayoría los animales con lesiones tuberculosas correspondían a vacas, especialmente las categorías de conserva, que integraban tropas de descarte de la cuenca lechera, reaccionantes a la tuberculina. (Cuadro 3).

Desde 1943 hasta octubre de 1948 sobre un total de 3.353.477 ovinos faenados en el Frigorífico Nacional no se comprobó ningún caso con lesiones tuberculosas. Según datos de la Dirección de Ganadería recopilados por Manuel Castelo desde 1942 hasta 1947 (inclusive) en los departamentos de Montevideo, Canelones, Florida y San José, sobre un total de 53.908 bovinos tuberculinizados se obtuvo reacción

positiva en 5.110 animales (9.47 por ciento) y reacción sospechosa en 1.127 (2.09 por ciento) con un total de 6.237 bovinos reaccionantes (11.56 %). En ese período se sacrificaron 6.490 bovinos reaccionantes a la tuberculina.

En el cuadro 4 se observan las tuberculinizaciones y porcentajes de animales reaccionantes en bovinos pertenecientes a tambos de Montevideo y el interior del país: período 1934 a primer trimestre de 1940 y período desde 1942 a 1947.

El cuadro 5 muestra los índices de infección tuberculosa correspondientes a tambos de Montevideo y a los diagnósticos efectuados en el interior de la

Cuadro 4. Tuberculinizaciones totales desde 1942-1947

	Número	Porcentajes
Total de animales	53.908	8,0%
Positivos	5.111	9,4%
Dudosos	1.126	2,1%
Total de Reaccionantes	6.237	11,6%

Cuadro 5. Índices de infección tuberculosa correspondientes a tambos de Montevideo y a investigaciones efectuadas en el interior del país durante el período 1941 -1952

Año	Montevideo % (datos de los lazaretos oficiales)	Interior % (datos de las Linsp. Vet. Regionales)
1941	7,12	12,10
1942	7,56	13,76
1943	9,75	11,66
1944	10,59	11,21
1945	11,41	11,04
1946	2,21	3,88
1947	2,89	2,54
1948	12,63	4,68
1949	13,51	4,51
1950	17,92	0,45
1951	18,88	6,97
1952	19,15	2,51

Fuente: Galan, M. L. y Magallanes, N. Informe 1156/952, de 2/12/952; Sección Leches.

República durante el período 1894-1952 (M. Galain, N. Magallanes).

IV. EL PLAN DE PRECIO ESTIMULO POR LECHE CALIFICADA

Por las causas indicadas anteriormente sobre la suspensión de las actividades del control de la tuberculosis según la ley 10.045 se hizo evidente que para encarar un nuevo programa, con base firme, era necesario preparar un plan, teniendo en cuenta los factores: compensación justa, control estricto de las zonas de lucha, reorganización de los servicios oficiales, dotándoles de personal técnico e idóneo y de recursos necesarios para un eficaz cumplimiento y desarrollo de los programas sanitarios, participación activa de los productores y de los veterinarios de ejercicio liberal. La implantación de este plan, en oportunidad de considerarse la fijación del precio a pagar a los remitente a CONAPROLE por el litro de leche cuota en el segundo semestre de 1963 vino a contemplar una aspiración, propuesta desde tiempo atrás por los delegados de la Facultad de Veterinaria en la Comisión Honoraria de la Leche, a saber, fijación de un precio diferencial para aquellos productores que adecuaron sus establecimientos a determinadas condiciones higiénicas, sanitarias y de manejo del ganado lechero. El decreto del Consejo Nacional de Gobierno del 22 de agosto de 1963 y los posteriores decretos en oportunidad de la fijación de los precios semestrales para la leche, reglamentaron aquellas condiciones. Hubo ciertas diferencias entre el decreto del 22 de agosto de 1963 y los posteriores decretos de febrero de 1964 y setiembre de 1964 por modificaciones (aconsejadas por la práctica) introducidas a fin de facilitar la inscripción de mayor número de productores y mejorar las posibilidades de un más eficiente avance del programa

higiénico-sanitario. En todos los casos la inscripción fue voluntaria y el aliciente para la adhesión al sistema fue el precio especial diferencial a pagarse por litro de leche-cuota que el productor remitía, inicialmente fijado en un 15% superior al precio base. Este sistema introdujo un estímulo diferencial en el precio de la leche procedente de establecimientos que alcanzaran un superior estado higiénico-sanitario y de manejo; con esta disposición, se sustituía el pago de la indemnización por el sacrificio de los animales reaccionantes que había generado durante su aplicación grandes problemas éticos y de disponibilidad de recursos. El contralor de los establecimientos que se adhirieron al sistema estuvo a cargo del Servicio de Contralor de Tambos de la Dirección de Sanidad Animal que tuvo la responsabilidad de organizar y dirigir desde mi cargo de Secretario Técnico de la Dirección de Ganadería del Ministerio de Agricultura desde 1965 hasta 1971. Se dispuso de un excelente grupo técnico de veterinarios oficiales que demostraron su capacidad y compromiso profesional en el cumplimiento de sus difíciles funciones y responsabilidades. Por los primeros decretos (agosto de 1963 y febrero de 1964), el productor presentaba por sí solo la declaración jurada, según la cual su establecimiento reunía las condiciones exigidas. A partir del decreto de setiembre de 1964, se estableció la condición que, un veterinario particular, debía refrendar la declaración del propietario del tambo, refrendación que debía reiterarse anualmente, certificando que el establecimiento mantenía las condiciones exigidas en estas disposiciones sanitarias. El decreto de 16 de febrero de 1967 mantuvo en su artículo 30, las mismas condiciones contenidas en los decretos iniciales las cuales se dividen en tres grupos: condiciones higiénicas, sanitarias y de manejo del ganado. El establecimiento debía estar habilitado por la Dirección de Sanidad e Industria Animal y las autoridades municipales, de acuerdo a lo dispuesto por la

ley Nro. 10.707 de 9 de enero de 1946, manteniéndose las condiciones en ella establecidas. Con relación a las medidas de sanidad del ganado se exigía que todos los bovinos debieran estar exentos de tuberculosis y se exigía la eliminación de los animales reaccionantes positivos a la tuberculinización por el método de la intradermorreacción en el pliegue ano-caudal. Se exigía la vacunación contra la brucelosis, la fiebre aftosa y el carbunco según lo dispuesto en las respectivas leyes específicas para la prevención de cada enfermedad. Aceptar y dar cumplimiento a un programa de control de la mastitis bovina. Proceder al tratamiento mensual obligatorio contra la “Tenia equinococo” en todos los caninos del establecimiento y hacer la cocción de todas las vísceras de los animales faenados para el consumo. El productor beneficiado se obligaba a presentar todos los animales a disposición de los técnicos, en oportunidad de las inspecciones y trabajos higiénico-sanitarios y disponer del personal y los medios adecuados para hacer un trabajo eficiente. Por los decretos de 16 de agosto de 1963 y febrero de 1964 previos a la implantación de la refrendación por médico veterinario, se acogieron al sistema 340 productores. Este número reducido de productores que se interesaron y acogieron al sistema, se atribuyó a que el productor recién cobraría al precio diferencial una vez que se hubiera hecho la inspección oficial del establecimiento, aunque con retroactividad a la fecha de inscripción. Por otra parte, en un primer momento, si inscribieron aquellos productores que por propia iniciativa mantenían sus establecimientos en buenas condiciones higiénico-sanitarias lo que les permitió adherirse al sistema de inmediato. Al implantarse la refrendación por médico veterinario particular por decreto de setiembre de 1964, los productores comenzaron a cobrar desde el momento de la inscripción, sin tener que esperar el resultado de la inspección oficial. Amparados en esta modificación

introducida en el decreto ingresaron al sistema en breve tiempo 800 productores. Luego las inscripciones continuaron aumentando, aunque a un ritmo menor, hasta totalizar el 3 de noviembre de 1970 la cantidad de 2.193 establecimientos lecheros inscriptos en el sistema de leche calificada. Los decretos sobre precio estímulo por litro-cuota de leche calificada establecieron condiciones para que el destino de los animales reaccionantes positivos, previa identificación por marcación a fuego, fuera el sacrificio en establecimientos de faena con inspección veterinaria. Se trataba no solamente de formar rodeos saneados, sino también eliminar los animales reaccionantes positivos por medio de su inmediata faena. El primer objetivo era alcanzar la adhesión de la totalidad de los remitentes a CONAPROLE, lo que permitiría tener el control sobre la parte más importante de nuestra industria lechera organizada. A fin de lograr este objetivo la Dirección de Ganadería y su Servicio de Contralor de Tambos realizó un intenso plan de difusión del sistema, en las diversas zonas que componían la cuenca lechera (1965-1967). Se estableció un diálogo directo con grupos de productores en reuniones celebradas en puntos estratégicos de los Departamentos de la cuenca lechera y a través de sus gremiales. Se emitieron circulares a través de la red de transporte de camiones de CONAPROLE, se efectuaron comunicaciones por radio y por el espacio del Ministerio de Ganadería y Agricultura en la radio oficial SODRE y en la prensa uruguaya. En informe de 1967 del Servicio de Contralor de Tambos, dirigido al Director de Ganadería, Dr. Santiago Geninazza, se proponía que “Una vez que se logre el contralor total del ganado de los productores remitentes a CONAPROLE (cuenca lechera que abastece al Departamento de Montevideo), el sistema deberá extenderse a las demás cuencas lecheras del país, aun cuando no se presenten las mismas facilidades que aquella, por cuanto el estado

sanitario alcanzado solo podrá mantenerse y mejorarse si la campaña sanitaria se realiza a nivel nacional.” Los logros sanitarios alcanzados desde 1965 con la aplicación del Plan Precio Estímulo de Leche Calificada, referidos solo a tuberculosis, sin mencionar los demás sustanciales avances sanitarios e higiénicos derivados de la ejecución y cumplimiento del plan los cuales fueron sin duda de extraordinaria entidad, justificaban un prudente optimismo en la culminación del programa de control de la tuberculosis bovina y teniendo como objetivo final la erradicación. Ese logro prestigiaría al país y beneficiaría a los productores lecheros, a los consumidores y a la economía de la nación. Se trataba de un esfuerzo mancomunado del Estado, los productores rurales, la profesión veterinaria y los servicios veterinarios especializados de CONAPROLE en beneficio de los consumidores de productos lácteos y de la economía del país. Eran razones suficientes para no medir esfuerzos para su mantenimiento y extensión a toda la lechería nacional. Es interesante señalar que en el periodo 1966-1967 el Ministerio de Ganadería y Agricultura concretó con el Gobierno de la República Federativa de Brasil un canje importante de camionetas 0 kilómetro por vaquillonas Holando de la Cuenca Lechera renovándose la flota de vehículos de la Dirección de Ganadería y de su Servicio de Contralor de Tambos. Esta renovación dio nuevo impulso a las diversas actividades oficiales inherentes al sistema de leche calificada. Ese intercambio tuvo lugar en la frontera brasileña-uruguayana con la participación del Ministro Wilson Ferreira Aldunate acompañado de los Doctores Joaquín de Freitas, Santiago Geninazza y Raúl Casas Olascoaga. En el mes de marzo de 1967, los vehículos con que contaba el Servicio de Contralor de Tambos, fueron solicitados por el Ministerio de Ganadería y Agricultura para trabajos del Servicio de Contralor de Orujos lo que motivo la interrupción

temporal de los servicios. En 1971, por razones de seguridad nacional, los vehículos del Servicio de Contralor de Tambos fueron confiscados por el Ministerio de Defensa, lo que determinó una reducción significativa de las actividades oficiales de contralor de tambos. En 1976 de un total de 3.200 establecimientos remitentes a CONAPROLE estaban inscritos en el sistema 2.400 (75% del total), los cuales eran controlados anualmente en el plan de Leche Calificada. Por decreto 106/983 se extendió el plan a las cuencas lecheras de todo el país. Desde 1983 se incorporaron progresivamente al sistema los rodeos lecheros productores de leche para la industria y queserías artesanales ante exigencias de los mercados internacionales de productos lácteos. En 1989 se inicia el Programa Voluntario de Declaración de Predios Libres de Brucelosis y Tuberculosis Bovina, dirigido al sector lechero y particularmente a los rodeos del Plan de Leche Calificada. Este Programa tuvo escasa adhesión y corta duración en su aplicación.

V. LOS RESULTADOS DEL CONTROL DE LA TUBERCULOSIS POR EL PLAN DE PRECIO ESTIMULO DE LECHE CALIFICADA

Los datos estadísticos de la Dirección de Industria Animal para el periodo 1969 hasta julio de 1970 (Cuadro Nro. 5) registraron 1.564.147 bovinos faenados y un decomiso total por lesiones tuberculosas de 1.313 animales (0.084 %) y un decomiso parcial de 489 bovinos (0.031 %) con índice total de 0.11% de reaccionantes. En 1974 se faenaron 1.221.412 bovinos en mataderos y frigoríficos decomisándose por la Inspección Veterinaria Oficial (DGSG) 392 animales con lesiones de tuberculosis (0.032%). En

Cuadro 6. Datos estadísticos de bovinos decomisados por tuberculosis

		Porcentaje decomisos
Bovinos faenados	1.564.147	
Decomiso total	1313	0,084%
Decomiso parcial	489	0,031%
Total decomisados	1.802	0,115%

Dirección de Industria Animal. Período: 1969 hasta julio de 1970

1978 sobre 1.090.000 bovinos faenados se estimó una prevalencia para ganado de carne de 0.02% (DGSG). Durante el periodo 1983-1992 se exportaron 93.615 bovinos de carne en pie cuyo destino no era la faena, principalmente vientres de más de dos años de reposición sin encontrarse ningún reaccionante positivo a prueba tuberculínica practicada sistemáticamente de acuerdo a las exigencias de los países importadores (Mercados y Puertos- DGSG). En el período 1989-1991 la información disponible de los animales faenados y los decomisos efectuados por la inspección veterinaria oficial indicaron una prevalencia de 0.01 (1 decomiso por tuberculosis por 10.000 bovinos faenados en ese periodo).

El cuadro 6 refiere las tuberculizaciones (desglo-

sadas por año) realizadas por médicos veterinarios particulares y oficiales desde 1964 hasta 1970. En este cuadro no están computadas las tuberculizaciones efectuadas por el Servicio de Contralor de Tambos para el Programa de Leche calificada. Sobre un total de 585.582 tuberculizaciones se obtuvo en el periodo 1964-1970 un total 21.925 reaccionantes positivos y 2.523 reaccionantes dudosos.

El cuadro 7 muestra la tuberculizaciones realizadas por veterinarios del Servicio de Contralor de Tambos en el Plan de Leche Calificada y sus resultados para el periodo 1965-1970. La información de la División Leche de la Dirección de Sanidad Animal en el peri-

Cuadro 7. Resumen de las tuberculizaciones realizadas por médicos veterinarios particulares y oficiales desde 1964 hasta 1970

Año	Negativos	Positivos	%	Dudosos	%	Total
1964	78.842	8.284	9,4	476	0,6	87.602
1965	101.987	6.715	6,1	508	0,6	109.210
1966	77.745	2.009	2,5	521	0,7	80.275
1967	93.714	1.957	2,0	509	0,5	96.180
1968	86.989	1.411	1,6	170	0,2	88.570
1969	75.488	1.086	1,4	200	0,3	76.774
1970	46.369	463	1,0	139	0,3	46.971
Total	561.134	21.925		2523		585.582

No están computadas las tuberculizaciones realizadas por el Servicio de Contralor de Tambos para el programa de Leche Calificada

Cuadro 8. Tuberculinizaciones Realizadas por veterinarios del Servicio Contralor de Tambos en el plan de leche calificada, y sus resultados entre los 1965 -1970

Años	Establecimientos inspeccionados	Nro. de Animales	Reac. Positivos	Reac. Dudosos	Nro. Reaccionantes
1965	685	39.695	600	162	38.933
1966	839	50.174	222	128	49.824
1967	539	22.228	139	76	22.013
1968 ¹ (2 meses)	264	13.751	75	62	13.614
1969 ² (3 meses)	212	11.555	153	54	11.348
1970 (8 meses)	590	18.515	125	71	18.319
Totales	3129	155.918	1.314	553	154.051
	Índice de infección		0.84%	0.35%	98.81%

¹: 2 meses; ²: 3 meses;

Datos recopilados por: Dr. Raúl Casas Olascoaga, Dr. Carlos Martínez, Dr. Luis Alberto Barros

Cuadro 9. Animales lecheros tuberculinizados (1990 -1991 -1992)
División Leche – Servicio de Contralor de Tambos (DGSG)

Categoría	Animales	Negativos	Dudosos	Porcentaje	Positivos	Porcentaje	Rodeos
L. Calificada	600.541	600.303	151	0,025	87	0,014	6.858
L. Industria	45.540	45.505	7	0,015	28	0,065	1.747
Artesanales	6.550	6.550	0	0,00	0	0,00	118
Totales	652.631	652.358	158	0,024	115	0,018	8.723

Sobre una población de 652.631 animales tuberculinizados el total de 273 animales reaccionantes positivos y dudosos registra un índice de 0.04 por ciento para el período 1990 -1992.

odo 1990-1992 registra sobre un total de 752.245 animales tuberculinizados 345 bovinos reaccionantes positivos (0.04%) y 223 reaccionantes dudosos (0.03%) con un total de 568 animales reaccionantes (0.07%). En el periodo 1990-1992 la División Leche y Contralor de Tambos registró 7.041 establecimientos los cuales se distribuían de la siguiente manera: Establecimientos Plan de Leche Calificada 3.924; Establecimientos Productores de Leche Industria 2.143 y Establecimientos Artesanales (Queserías) 974. El cuadro Nro. 8 muestra para dicho periodo

que fueron tuberculinizados por los servicios oficiales y particulares 652.358 bovinos de un total de 8.723 rodeos examinados resultando reaccionantes positivos 115 (0.018%) y reaccionantes dudosos 158 (0.02%). El total de 273 reaccionantes registra un índice de 0.04%.

VI. EL DECRETO DE 22 DE ENERO DE 1998

El control es la reducción intencional de la prevalencia de una enfermedad específica a niveles relativamente bajos, aunque la transmisión ocurre con frecuencia suficiente como para impedir su desaparición permanente. En la erradicación se establece la ausencia continua de la cadena de transmisión dentro de una zona, un país, una región, o un continente (poliomielitis) o en la globalidad de la Tierra, como es el caso de la viruela humana. La enfermedad puede erradicarse reduciendo el estado de sus reservorios y nichos ecológicos a un nivel tan bajo que la enfermedad no puede perpetuarse en la naturaleza en esas poblaciones humanas y/o animales y en el territorio donde ellas habitan interrumpiéndose la circulación del agente patógeno. Es por consiguiente, necesario obstruir e impedir la transmisibilidad hasta que cesa la endemidad y prevenir luego su reaparición por portadores, casos recurrentes o diversas y múltiples fuentes de infección que, en este mundo dinámico y sin distancias, mantienen esas áreas libres bajo constante peligro y riesgo. El decreto del Poder Ejecutivo de 22 de enero de 1998 tiene como objetivo lograr el país oficialmente libre de Tuberculosis Bovina y de Brucelosis Bovina. Tuve el honor en representación de la Asociación Rural del Uruguay, de la Federación Rural del Uruguay, de las Cooperativas Agrarias Federadas y de la Sociedad de Medicina de Veterinaria del Uruguay de participar con el Dr. Julio Barozzi en la elaboración de este importante instrumento sanitario que, si trabajamos con gran dedicación, eficiencia técnica y ética profesional, en forma mancomunada todas las fuerzas públicas y privadas nos conducirán seguramente a la meta propuesta que nuestra nación viene buscando desde que las acciones sanitarias se iniciaran a fines del siglo pasado.

Caracterización de la microbiota bacteriana ruminal de un bovino a pastoreo mediante técnicas clásicas e independientes del cultivo



Characterization of the ruminal bacterial microbiota of a grazing bovine through classical and cultivation-independent techniques

Fraga M1, Perelmuter K1, Valencia M J1, Cajarville C2, Zunino P1*

Recibido: 00/Mes/2013

Aprobado: 00/Mes/2013

RESUMEN

La microbiota simbiote ruminal ha conferido a los rumiantes la ventaja evolutiva de poder aprovechar la fibra vegetal a través de su metabolismo fermentativo. La fermentación de la fibra en el rumen provee de fuentes de energía mientras que la biomasa microbiana aporta la principal fuente de proteínas. La comunidad bacteriana ruminal comprende varios cientos de especies bacterianas y está distribuida en la fase sólida del contenido ruminal, en el fluido ruminal y en una menor medida asociada al epitelio. Sólo una fracción de la microbiota ruminal, mayoritariamente anaerobia, puede ser cultivada y el advenimiento de los métodos moleculares ha permitido conocer la diversidad microbiana sin la necesidad de cultivo. Los objetivos de este trabajo fueron caracterizar la microbiota bacteriana ruminal cultivable y no cultivable asociada a las fracciones sólida y líquida del contenido ruminal de un bovino a pastoreo y aislar y clasificar bacterias capaces de crecer en un medio de cultivo con celulosa como

SUMMARY

Ruminal microbiota has conferred ruminants the ability to utilize cellulose present in vegetal material. Fiber breakdown provides energy sources to ruminants and the microbial biomass represents the main protein source for grazing animal. Rumen bacterial community is composed by hundreds of species and is distributed in the particulate solid phase, in ruminal fluid and to a lesser extent associated to the ruminal epithelium. Only a small portion of the mainly-anaerobic ruminal microbiota can normally be cultured. Molecular methods have shed light in the study of microbial diversity without cultivation. The objectives of this work were to characterize the cultivable and non-cultivable ruminal bacterial community associated with solid and fluid rumen content fractions of a grazing bovine and to isolate and identify bacteria that are able to grow onto a culture media with pure cellulose as the main energy and carbon sources. Sixteen isolates were identified including members of *Butyrivibrio*, *Pseudobutyri-*

¹: Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Av. Italia 3318, CP 11600, Montevideo, Uruguay.

² Departamento de Nutrición Animal, Facultad de Veterinaria, UdelaR. Lasplaces 1550, CP 11600, Montevideo, Uruguay

*: Autor para correspondencia, e-mail: pmzunino@gmail.com

principal fuente de carbono y energía. Para evaluar la microbiota cultivable se utilizaron medios de cultivo artificiales mientras que el análisis de la comunidad microbiana total se realizó por medio de la técnica de Fluorescent in situ hybridization (FISH). Se identificaron 16 aislamientos incluyendo miembros de los géneros *Butyrivibrio*, *Pseudobutyrvibrio*, *Succinivibrio* y *Selenomonas* además de otros 4 que representan nuevas especies y géneros bacterianos. Este trabajo representa una primera aproximación en el país dirigida a aislar e identificar microorganismos ruminales por medio de técnicas bacteriológicas y moleculares.

PALABRAS CLAVE:

Microbiota bacteriana ruminal, FISH, pastoreo

brio, *Succinivibrio* and *Selenomonas* genera. Four bacterial isolates were representatives of new genera and species. As far as we are concerned, this is the first local approach focused on the identification and characterization of ruminal native microorganisms using classic bacteriology and molecular techniques.

KEYWORDS:

Ruminal bacterial community, FISH, grazing animals

INTRODUCCIÓN

Los rumiantes han desarrollado una compleja microbiota simbiote que incluye bacterias, protozoarios, hongos y arqueas (Van Soest, 1994), la cual les ha permitido adaptarse al consumo de vegetales y la digestión del material fibroso. Para entender mejor las relaciones microbianas y los procesos metabólicos en el rumen es necesario describir y comprender la diversidad de la comunidad así como la influencia de diferentes factores del huésped y de la dieta en su composición (Larue y col., 2005).

La fermentación de la fibra produce ácidos grasos volátiles (AGV), los cuales constituyen la principal fuente de energía para los rumiantes, biomasa microbiana que es utilizada como fuente de proteína así como CO₂ y CH₄, los que se pierden en el ambiente (Van Soest, 1994).

Se estima que la comunidad microbiana ruminal comprende varios cientos de especies bacterianas. La mayoría de estas son anaerobias estrictas o fac-

ultativas y al menos 30 son las predominantes con cantidades de aproximadamente 1011 células bacterianas/mL de fluido ruminal (Hespell, 1987; Miron y col., 2001).

Existe una población microbiana adherida al epitelio ruminal (McCowan y col., 1978; Dehority y Grubb, 1981), otra que se encuentra libre en el fluido y por último una porción adherida y en íntimo contacto con la partículas alimenticias. Estas tres fracciones son diferentes en composición (Olubobokun y col., 1990).

En la fase líquida (fluido o líquido ruminal) los microorganismos se encuentran libres y se nutren de proteínas y carbohidratos solubles. Constituyen entre el 20 y 30% de la biomasa bacteriana (Miron y col., 2001). Más del 70% de la microbiota ruminal está asociada a la fase sólida del contenido ruminal (Forsberg y Lam, 1977) y se calcula que es responsable de entre el 88 y 91% de la actividad fibrolítica, del 70% de la actividad amilasa y del 75% de la ac-

tividad proteolítica del rumen (Miron y col., 2001) constituyendo ésta la fracción metabólicamente más importante del sistema ruminal.

Sólo una fracción de la comunidad bacteriana de la mayor parte de los sistemas microbianos es cultivable. En el caso del rumen se estima que entre el 10 y 50 % de la comunidad bacteriana total puede ser cultivada en medios artificiales (Kobayashi, 2006). Los métodos moleculares han permitido estudiar la microbiota ruminal en forma independiente del cultivo. Los distintos abordajes pueden incluir la secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S, PCR cuantitativo y Fluorescent in situ hybridization (FISH), entre otros. En la técnica de FISH se utilizan sondas de ADN marcadas con fluoróforos que hibridan con regiones específicas del ARNr 16S, lo que permite detectar y cuantificar células bacterianas de interés.

Los objetivos de este trabajo fueron caracterizar la microbiota bacteriana del contenido ruminal de un bovino a pastoreo y el aislamiento e identificación filogenética de miembros de la comunidad potencialmente fibrolítica así como bacterias utilizadoras de ácido láctico. De acuerdo al objetivo planteado se realizaron recuentos en diferentes medios de cultivo, se analizaron grupos seleccionados de microorganismos por medio de la técnica de FISH y se aislaron e identificaron molecularmente miembros de la comunidad microbiana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y muestreos

Para los muestreos de contenido ruminal se utilizó una vaca Holando con una cánula permanente en el rumen alojada en el Campo Experimental N° 2 de Facultad de Veterinaria, Universidad de la República (UdelaR), San José, Uruguay (34° latitud sur, 35° longitud oeste).

El régimen alimenticio del animal consistió en pastoreo de una pradera en estado vegetativo, mezcla de ryegrass (*Lolium multiflorum*), trébol blanco (*Trifolium repens*) y trébol rojo (*Trifolium pratense*). La composición de la misma fue de 17% proteína bruta, 35% fibra ácido detergente y con un rendimiento de 2000kg de MS/ha. Las manipulaciones fueron realizadas siguiendo protocolos aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (C.H.E.A) de la UdelaR, Uruguay.

Una fracción de 25 g del contenido ruminal (muestra C, correspondiente a sólidos y fluido) fue extraída manualmente del fondo del saco ruminal e inmediatamente diluida en 250 mL de buffer salino fosfatado (PBS) suplementado con 0,025 g/L de Na₂-Cisteína (PBS-Cys). Luego, la muestra se procesó en licuadora bajo una corriente de CO₂. La suspensión resultante fue diluida al décimo en PBS-Cys en viales con atmósfera enriquecida en CO₂, se realizaron diluciones seriadas al décimo y se procedió de acuerdo a lo descrito en el siguiente apartado.

Las muestras de la fracción líquida del contenido (fluido ruminal, muestras F) se obtuvieron filtrando porciones de contenido ruminal a través de un paño de queso. El líquido obtenido por este medio fue inmediatamente gaseado con CO₂ y se procedió a diluirlo decimalmente como se explicó en el caso de las muestras C.

Aislamiento y condiciones de cultivo de bacterias ruminales

Dado el carácter anaerobio de la microbiota ruminal, en la preparación de medios de cultivo y soluciones se utilizó siempre agua destilada hervida durante 10 minutos y luego enfriada bajo corriente de CO₂. Todas las botellas contenedoras utilizadas fueron gaseadas con CO₂ por al menos 3 minutos para desplazar el oxígeno.

Los recuentos de bacterias anaerobias fueron reali-

zados utilizando la técnica de roll tube propuesta por Hungate (1969) y modificada por Miller y Wolin (1974). Para el recuento de microorganismos anaerobios totales, aislamiento y mantenimiento de bacterias aisladas se usó un medio de cultivo (MB) que tuvo como base la composición del descrito por Stahl y col. (1988). Este medio de cultivo fue utilizado para diseñar estrategias de recuento y aislamiento de bacterias con potencial fibrolítico de acuerdo a las modificaciones que se especifican. La composición por litro del medio de cultivo MB fue: 166 mL de solución de sales A (composición en g/L) NaCl, 5,4; KH₂PO₄, 2,7; CaCl₂·2H₂O, 0,159; MgCl₂·6H₂O, 0,12; MnCl₂·4H₂O, 0,06; CoCl₂·6H₂O, 0,06; (NH₄)₂SO₄, 5,4; Macy y col. 1982); 166 mL de K₂HPO₄, 2,7 g/L, 200 mL de fluido ruminal clarificado (1000 x g, 10 min y luego 25000 x g, 20 min, Grubb y Dehority, 1976), extracto de levadura, 500 mg; triptona, 500 mg; glucosa, maltosa, almidón, celobiosa y xilosa 1 g de cada uno, 0,62 mL de mezcla de ácidos grasos volátiles (ác. acético, 5,8 mM; ácido propiónico, 1,6 mM; ácido butírico, 8,6 x 10⁻¹ mM, n-valérico, 1,8 x 10⁻¹ mM; isovalérico, 1,8 x 10⁻¹ mM; (Macy y col., 1982) , 0,02 mL de solución de vitaminas (composición en mg/mL: piridoxina clorhidrato, 0,1; riboflavina, 0,1; tiamina clorhidrato, 0,1; nicotinamida, 0,1; Ca-D-pantotenato, 0,1 y ácido p-aminobenzoico, 5x10⁻³), 0,1 mL de vitamina B12 (0,25 mg/mL), solución de vitaminas termolábiles (ác. fólico, 0,5 mg/mL; biotina, 0,5 g/mL, filtrado (0.2 nm) y agregada luego del autoclavado, 0,1 mL cada 5 mL de medio), resarzurina 1 mg, Na₂S-Cys 0,25 g/L, el pH fue ajustado a 6,5 con NaHCO₃, cuando se requirió medio sólido se adicionó agar bacteriológico, 1,5 %.

Las incubaciones en los diferentes medios se realizaron a 39°C y el recuento de microorganismos anaerobios totales se registró luego de cuatro días de incubación.

El recuento y aislamiento de microorganismos potencialmente fibrolíticos se realizó en el medio base-celulosa (MB-Cel) cuya composición fue como la del MB, sin el agregado de los hidratos de carbono y con la adición de celulosa microcristalina (Avicel PH101, 10%) con el objetivo de hacer de la celulosa la principal fuente de carbono y energía. La incubación se realizó durante 10 días.

Para el recuento de microorganismos aerobios se utilizó el caldo Infusión cerebro-corazón (BHI, Difco, USA) suplementado con agar bacteriológico, 1,5%. Se sembraron en superficie diluciones seriadas y las incubaciones se realizaron a 39 °C durante 24 h.

Aislamiento e identificación bacteriana

Con el fin de aislar e identificar miembros cultivables de la comunidad microbiana potencialmente fibrolítica del rumen bovino se repicaron al azar colonias aisladas a partir de los viales de MB-CEL en los que se realizaron los recuentos. Para esto se utilizaron jeringas estériles previamente reducidas con una solución de Na₂S-Cys 0,25 g/L. Cada colonia se inoculó en caldo MB y se registró el crecimiento y se verificó la pureza de los aislamientos. Los aislamientos se conservaron a -80°C en MB-glicerol al 15% en viales con atmósfera anaerobia.

Se seleccionaron al azar 16 aislamientos de la colección para su posterior estudio filogenético y asignación de identidad. Para esto se extrajo ADN genómico empleando el sistema comercial GeneE-lute bacterial genomic DNA extraction kit (Sigma, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, que se usó en reacciones de PCR para amplificar un fragmento del gen que codifica para el ARNr 16S. Se emplearon los cebadores universales para el Dominio Bacteria 27F (5'-AGATTGATCMTGGCTAGGGA-3') y 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') de acuerdo a las condiciones

de reacción descritas por Fraga y col. (2008). Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados por MacroGen Inc., Seúl, Corea del Sur. Las secuencias se ensamblaron y editaron mediante el programa Bioedit, se compararon con la base de datos del Ribosomal Data Base Project (RDP) utilizando la herramienta Classifier (Wang y col., 2007), con esta herramienta es posible afiliar a los aislamientos hasta el nivel de género. Con el fin de conocer los parientes más cercanos a los aislamientos analizados se realizaron árboles filogenéticos utilizando el método de Maximum Likelihood (ML) empleando el programa MEGA versión 5.05 (Tamura y col., 2011).

Detección y cuantificación de grupos bacterianos por FISH

Miembros de la microbiota total, cultivable y no cultivable, fueron cuantificados utilizando la técnica de FISH. Para esto, porciones de las muestras C y F se fijaron en etanol al 50% a 4°C durante 24h y luego se almacenaron a -20°C hasta su utilización. Las muestras fijadas fueron diluidas y filtradas (ISOPORE, 0,2 µm; MILLIPORE, Irlanda).

Las hibridaciones fueron realizadas sobre segmentos de los filtros según Pernthaler y col. (2003). Las sondas utilizadas se presentan en el Cuadro 1, las condiciones de hibridación fueron optimizadas para cada sonda (Perelmuter y col., 2008). Con el fin de cuantificar las bacterias totales y poder calcular la abundancia relativa de los diferentes grupos microbianos elegidos se utilizó una mezcla equimolar de 3 sondas (EUBMIX, Cuadro 1) para la detección de componentes del Dominio Bacteria (Amann y col., 1990; Daims y col., 1999). Se utilizaron sondas dirigidas a: las bacterias celulolíticas *Ruminococcus albus* y *Ruminococcus flavefaciens* (sondas Ralb y Rfla respectivamente, Cuadro 1); bacterias consumidoras de lactato, importantes para evitar una posible acumulación de este ácido: *Selenomonas ruminantium*, *Propionibacterium* spp., *Megasphaera elsdenii* (sondas Srum, Mega y Prop respectivamente, Cuadro 1). A partir de los recuentos en las fracciones de filtro se calcularon los valores de microorganismos por mililitro para las muestras F y por gramo para las muestras C. Los porcentajes relativos se hicieron a partir de los números absolutos calcula-

Cuadro I. Porcentaje de detección de celos (PDC), porcentaje de concepción (PC) y porcentaje de preñez (PP) de acuerdo al número de tratamientos con prostaglandina (PG)

Sonda	Secuencia de las sondas (5'-3')*	% formamida
<i>Selenomonas ruminantium</i> (Srum)	CCCATCTTTGCGGCAGGTTG	40
<i>Megasphaera elsdenii</i> (Mega)	ACCCGTTTGCCACTCGAATC	30
<i>Ruminococcus albus</i> (Ralb)	TGCGGTTAGAACACAGGC	30
<i>Propionibacterium</i> spp. (Prop)	AATTCCATTCTCCCCTACCTTC	35
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> (Rfla)	CCCTCTCTTAAGGTAGG	10
Eubacteria (EUBMIX)	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	35
	GCAGCCACCCGTAGGTGT	
	GCTGCCACCCGTAGGTGT	

* Las sondas estaban marcadas en el extremo 5' con FITC.

Cuadro 2. Recuentos de bacterias cultivables en Fluido (F) y contenido ruminal (C)

Grupo	F (UFC/mL)	C (UFC/g)
Aerobios	(2,10±0) x10 ⁷	3,60±0,70) x10 ⁷
Anaerobios totales en MB	(2,25± 0,75) x10 ⁹	(1,80±0,17) x10 ⁹
MB-CEL*	(2,60± 0,94) x10 ⁸	(7,40± 0,75)x 10 ⁸

* MB-CEL, microorganismos en medio con celulosa como fuente principal de carbono y energía.

dos. Para calcular el total de células, arqueas, bacterias, los filtros se tiñeron con DAPI, un fluorocromo que tiñe el ADN en forma inespecífica.

RESULTADOS

Recuentos bacterianos

En este trabajo se realizaron recuentos de bacterias anaerobias y aerobias totales así como fibrolíticas potenciales ya que conforman un grupo importante de bacterias ruminales por la función que cumplen en la digestión de la fibra. Los resultados de los recuentos se presentan en el Cuadro 2. Los valores entre las muestras de contenido y fluido ruminal fueron similares y se observó que la microbiota bacteriana cultivable en MB-CEL representó aproximadamente

el 10% de la microbiota bacteriana cultivable en condiciones de anaerobiosis. Los recuentos de bacterias aerobias totales resultaron aproximadamente 100 veces menores que los obtenidos en condiciones de anaerobiosis.

Abundancia relativa y absoluta de microorganismos por medio de la técnica FISH

La metodología de FISH se aplicó con el fin de evaluar la microbiota bacteriana sin la necesidad de cultivo, utilizando sondas para diferentes grupos microbianos de interés en el ambiente ruminal. El total de microorganismos (contabilizado mediante la tinción con DAPI) en las muestras C fue 3,3 x 10¹⁰ células/g y los miembros del Dominio Bacteria representaron el 54,6% (sondas EUBMIX, Cuadro 3).

Cuadro 3. Número de células totales y abundancias de grupos bacterianos seleccionados en las muestras de contenido (C) y fluido ruminal (F)

Grupo Bacteriano	C		F	
	células/g	%*	células/mL	%
Dominio Bacteria	1,5x10 ¹⁰		6,7x10 ⁹	
Celulolíticas				
Ruminococcus albus	1,3x10 ⁸	0,8	1,2x10 ⁸	1,8
Ruminococcus flavefaciens	9,4x10 ⁷	0,6	<1 x 10 ⁷	<0,1
Consumidoras de lactato				
Selenomonas ruminantium	1,9x10 ⁸	1,3	1,0x10 ⁸	1,5
Propionibacterium spp	1,6x10 ⁷	0,1	3,4x10 ⁷	0,5
Megasphaera elsdenii	1,3x10 ⁸	0,8	1,0x10 ⁸	1,5

*Las abundancias se calcularon como el porcentaje de células hibridadas con las sondas específicas en función del total de células hibridadas con la sonda para el Dominio Bacteria

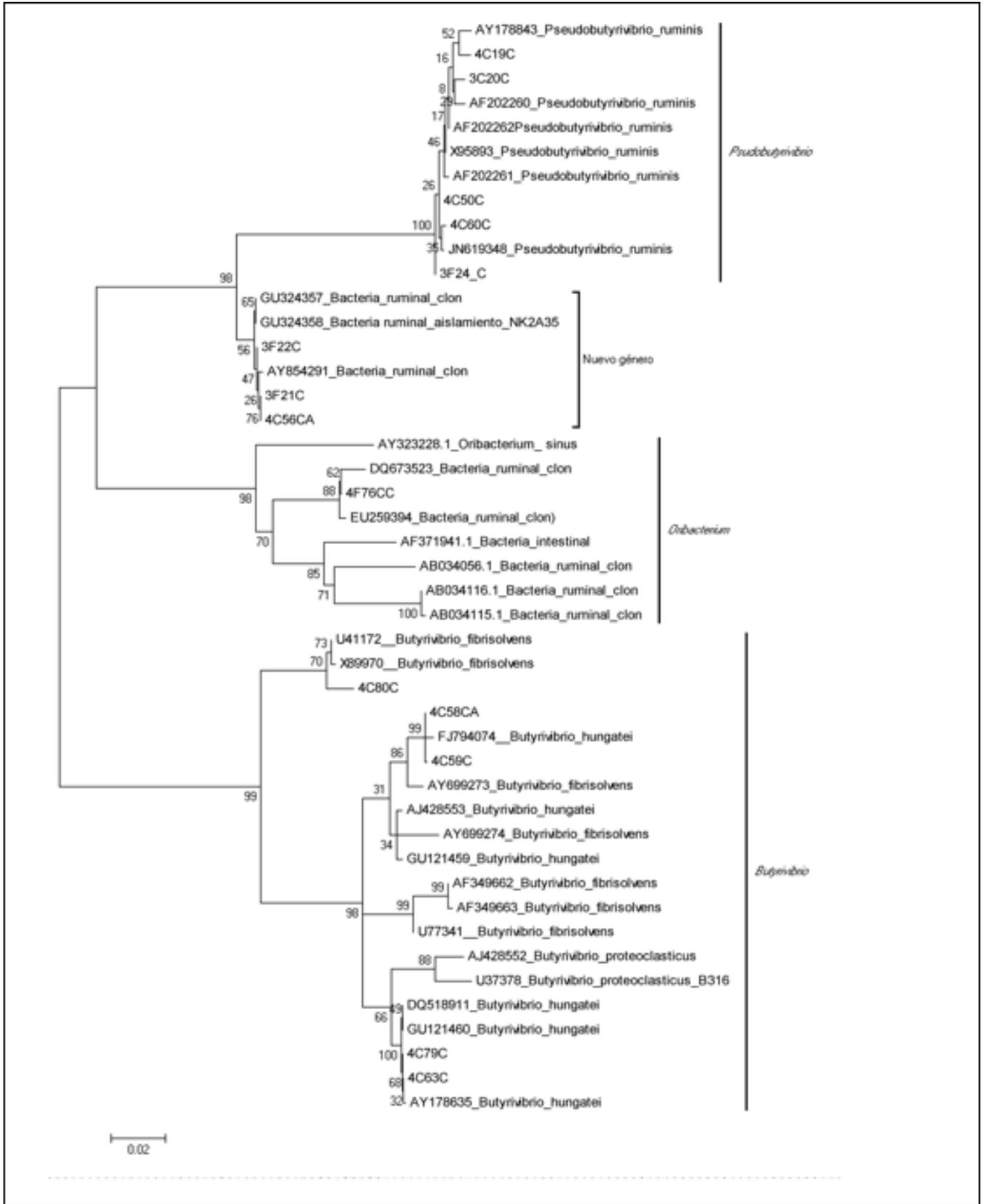


Figura 1. Análisis filogenético por el Método de Maximum Likelihood (ML)

La historia evolutiva de los aislamientos fue inferida por el método ML basado en el modelo de Kimura con 2 parámetros (Kimura 1980). Se muestra el árbol consenso luego de realizadas 500 réplicas y el % en los nodos (Felsenstein 1985). El árbol está representado a escala y la longitud de las ramas representa las sustituciones por sitios, la escala (0.02 sustituciones por sitio) se muestra abajo a la izquierda. Para cada secuencia utilizada en los alineamientos se muestra el número de acceso, género y especie si corresponde.

En F se contabilizaron $1,47 \times 10^{10}$ células/mL con DAPI y los miembros del Dominio Bacteria representaron el 61,1% del total de microorganismos. Se pudo observar que *R. albus* y *R. flavefaciens* representaron menos del 2% de la población bacteriana en ambas muestras y *R. flavefaciens* no pudo ser detectado en la muestras F (Cuadro 3). En las muestras C *Selenomonas ruminantium*, *Propionibacterium* spp. y *Megasphaera elsdenii* (utilizadoras del ácido láctico) sumadas mostraron una abundancia cercana al 2% con un predominio de *S. ruminantium* mientras que en F estos grupos bacterianos estuvieron más representados con una abundancia del 3.5%.

Identificación de los aislamientos

Se identificaron 16 aislamientos de bacterias cultivadas en MB-CEL. La filogenia de estos organismos basada en la secuencia del gen ARNr 16S se presenta en la Figura 1. Con la herramienta Classifier del RDP se pudo afiliar a los aislamientos hasta el nivel de género. 3F24C, 4C50C, 4C60C, 4C19C y 4C20C fueron representantes del género *Pseudobutyrvibrio* mientras que cinco aislamientos pertenecieron al género *Butyrvibrio* (4C80C, 4C63C, 4C79C, 4C58C y 4C59C). 4C53C perteneció al género *Selenomonas* y 4C52C fue identificado como un representante del género *Succinivibrio*. Cuatro aislamientos pertenecieron a la familia *Lachnospireaceae*, 4F76C pudo ser clasificado como representante del género *Oribacterium* mientras que 3F22C, 4F21C y 4C56C resultaron ser representantes de un nuevo género bacteriano. De acuerdo a la filogenia propuesta por el árbol ML estos aislamientos están cercanamente emparentados con el género *Pseudobutyrvibrio*.

El aislamiento 4C80C agrupó con la especie fibrolítica *Butyrvibrio fibrisolvens* mientras que 4C58C, 4C59C, 4C63C y 4C79C agruparon con *Butyrvibrio hungatei*. Dos aislamientos aparecen como muy distantes evolutivamente con respecto al resto y no

se incluyeron en el árbol filogenético, 4C53C perteneció al género *Selenomonas* y por homología en la secuencia del ARNr 16S pudo ser clasificada como *S. ruminantium* mientras que 4C52C es un representante de la especie *Succinivibrio dextrinosolvens*.

DISCUSIÓN

Actualmente existe una tendencia a estudiar los sistemas microbianos con abordajes casi exclusivamente moleculares y la microbiota ruminal no escapa a ella. La biología molecular rompió con la barrera del cultivo y permitió descubrir la existencia de microorganismos previamente desconocidos. Sin embargo también se deben hacer esfuerzos para caracterizar las bacterias a través del cultivo con el fin de potenciar el conocimiento de la diversidad funcional de las poblaciones bacterianas ruminales (Firkins y col., 2006).

El presente trabajo describe aspectos relativos a la microbiota ruminal de un animal en condiciones de pastoreo a través de un abordaje que involucró el cultivo y el aislamiento de microorganismos ruminales así como también un abordaje molecular. Si bien no fue posible establecer asociaciones entre la composición de la microbiota y otras condiciones (ej. alimentación) el presente estudio posibilitó analizar mediante abordajes clásicos y modernos una comunidad bacteriana compleja y con un gran potencial biotecnológico en el medio. Los resultados de los recuentos de bacterias anaerobias totales en este caso en particular tanto en las muestras F (Fluido ruminal) como C (Contenido ruminal) concuerdan con estudios realizados en otros países y ubican los recuentos de bacterias ruminales anaerobias en el entorno de 109 a 1011 UFC por gramo de contenido o mililitro de fluido ruminal (Dehority y Tirabasso, 1989; Guo y col., 2010).

La microbiota bacteriana capaz de crecer en condiciones de aerobiosis (microorganismos aerobios o anaerobios facultativos) fue aproximadamente 100 veces menor que la que creció en condiciones anaerobias, relación que permite visualizar el carácter anaerobio de la microbiota ruminal (Hespell, 1987). Con respecto a la microbiota potencialmente fibrolítica recuperada en el medio MB-CEL (con celulosa como principal fuente de carbono y energía) se pudo observar que representó aproximadamente el 10% del total de microorganismos anaerobios que pudieron crecer en el medio de crecimiento general (MB). En estudios previos en los que se utilizaron métodos similares a los empleados en este trabajo, los resultados de la cuantificación de la microbiota fibrolítica por diferentes métodos de cultivo se ubicaron en el entorno de 108 a 109 UFC/g de contenido ruminal (Leedle y Butine, 1987; Krause y col., 1999). A partir de los viales que presentaron crecimiento con medio MB-CEL se realizaron aislamientos para clasificar miembros cultivables de la microbiota con potencial fibrolítico. Se aislaron e identificaron microorganismos semejantes a *Butyrivibrio* (“*Butyrivibrio*-like organisms”) que pueden llegar a representar del 24 al 30% de las bacterias cultivables del rumen (Forster y col., 1996), incluyendo representantes de las especies *B. fibrisolvens*, *Pseudobutyrvibrio ruminis*, y *Butyrivibrio hungatei*. Estos organismos son importantes miembros del ecosistema ruminal, han sido descritos como integrantes de los llamados consorcios fibrolíticos del rumen y establecen relaciones simbióticas entre ellos. En estos consorcios no hay solamente miembros fibrolíticos sino que también hay bacterias que ayudan a acelerar los procesos de digestión de la fibra sin atacarla directamente. En un estudio reciente se describieron consorcios naturales y artificiales que se formaban junto a *F. succinogenes* que incluían entre otras a *P. ruminis* y *B. fibrisolvens* (Shinkai y col., 2010). La denominación de organis-

mos semejantes a *Butyrivibrio* se debe a que muchos aislamientos ruminales productores de ácido butírico son clasificados en base a consideraciones fenotípicas y metabólicas como *B. fibrisolvens* sin tener en cuenta su relación filogenética (Kopečný y col., 2003). En 1996 y en base a consideraciones genotípicas se describió por primera vez el género *Pseudobutyrvibrio* y la especie *P. ruminis* ya que si bien los aislamientos compartían muchas características con *Butyrivibrio* eran lo suficientemente alejados desde el punto de vista filogenético para ser incluidos en otro género (van Gylswyk y col., 1996; Figura 1).

Succinivibrio dextrinosolvens es una bacteria ruminal descrita en el ganado ovino y bovino. Es Gram negativa, y funcionalmente desempeña el rol de digerir el almidón y filogenéticamente pertenece a la subdivisión γ de las proteobacterias (Hippe y col., 1999). En este trabajo, la cepa identificada como 4C52C se clasificó en esta especie. Este aislamiento así como 4C53C no son microorganismos asociados a las fibrólisis, este último fue clasificado como *Selenomonas ruminantium*.

Cuatro aislamientos no presentaron homología con secuencias de especies bacterianas depositadas en los bancos de datos y representarían nuevas especies e incluso géneros. Las secuencias del ARNr 16S de 3F21C, 3F22C, 4C56C son muy similares entre sí y se incluyeron en la familia *Lachnospiraceae* del Orden *Clostridiales* (Clase *Clostridia* del Phylum *Firmicutes*); organismos similares han sido aislados también en un trabajo reciente pero aún no han sido descritos (Kenters y col., 2011). En esta familia de microorganismos se encuentran géneros de microorganismos importantes en la microbiota ruminal los cuales ya han sido mencionados como *Butyrivibrio* y *Pseudobutyrvibrio*

(Figura. 1). Por último, el aislamiento 4C76CC también fue clasificado como representante de la familia Lachnospiracea y es un representante del género *Oribacterium* que actualmente consta de una sola especie descrita (Carlier y col., 2004).

Todos los aislamientos presentaron homología con especies, géneros o familias pertenecientes al ambiente ruminal y la mayor parte de ellas están relacionados con la función fibrolítica ruminal, bien por ser especies fibrolíticas o por formar parte de los consorcios microbianos fibrolíticos. Esto justificaría el abordaje utilizado y constituye la base para el desarrollo de estrategias de aislamiento y selección de bacterias ruminales.

Al realizar el recuento en diferentes medios fue posible cuantificar la microbiota bacteriana ruminal cultivable y realizar los aislamientos posteriores. Al comparar los resultados de la microbiota total que pudo ser cultivada y la que se calculó a partir de los recuentos microscópicos se pudo comprobar que sólo una fracción de aproximadamente el 10% pudo ser cultivada, hecho que ocurre con la mayor parte de los ecosistemas microbianos (Kobayashi, 2006; Donachie y col., 2007).

Las células bacterianas que efectivamente hibridaron con las sondas dirigidas al Dominio Bacteria representaron entre el 54,6 y el 61,1% de todas las células marcadas con DAPI. Sharp y col. (1998) describieron que el ARNr bacteriano representaba el 57,7% del total del ARNr (la suma de los Dominios Bacteria, Archaea y Eukarya). La representación bacteriana en este trabajo, contabilizado por un método diferente, fue similar a estos resultados previos.

Diversos estudios se han focalizado en estudiar la microbiota fibrolítica y detectar especies predominantes que cumplen esa función. Partiendo de un

conjunto de trabajos previos, en general está aceptado el importante papel de las especies *R. albus*, *R. flavefaciens* en la fibrólisis ruminal (Firkins y col., 2006). Utilizando sondas fluorescentes dirigidas a *R. albus* y *R. flavefaciens* fue posible detectar y cuantificar representantes de estas especies en las muestras C y *R. albus* en las muestras F (Cuadro 3). Diferentes estudios coinciden en que las proporciones de estos microorganismos en el rumen de ovinos y bovinos se encuentran en el entorno del 1 al 2% de la microbiota bacteriana (Uyeno y col., 2007; Krause y col., 1999).

Selenomonas ruminantium, *Megasphaera elsdenii* y especies del género *Propionibacterium* son importantes consumidoras de ácido láctico en el rumen (Meissner y col., 2010). *M. elsdenii* puede llegar a consumir entre el 60 y 95% de todo el ácido láctico disponible en el órgano (Counotte y col., 1981). Según dos técnicas independientes del cultivo se ha indicado que *S. ruminantium* está presente en el rumen en una proporción de entre el 1 y 2% de las bacterias ruminales (Uyeno y col., 2007). Los resultados obtenidos por FISH para los organismos consumidores de lactato estuvieron en proporciones del 1,5% o menores con números absolutos entre $1,6 \times 10^7$ y $1,9 \times 10^8$ células/mL o células/g. *Propionibacterium* spp. fue el grupo que mostró menor cantidad de células hibridadas.

El presente estudio describe por primera vez la aplicación de técnicas moleculares independientes del cultivo a la caracterización de la microbiota bacteriana ruminal en nuestro medio. Por otra parte, la caracterización de bacterias ruminales cultivables en nuestro medio abre las puertas a la selección local de microorganismos que pueden resultar atractivos desde el punto de vista productivo y biotecnológico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Dra. Claudia Piccini por la lectura crítica del manuscrito y la asistencia en los análisis filogenéticos y a la Dra. Cecilia Alonso por la asistencia en el diseño de las sondas para FISH. Este trabajo fue parcialmente financiado con fondos de los proyectos PDT 78/07 y FCE 2493.

BIBLIOGRAFÍA

1. Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol* 56:1919-1925.
2. Carlier JP, K'ouas G, Bonne I, Lozniewski A, Mory F. (2004). *Oribacterium sinus* gen. nov., sp.nov., within the family 'Lachnospiraceae' (phylum Firmicutes). *Int J Syst Evol Microbiol* 54:1611-1615.
3. Counotte GHM, Prins RA, Janssen RHAM, deBie MJA. (1981). Role of *Megasphaera elsdenii* in the fermentation of DL-[2-13C] lactate in the rumen of dairy cattle. *Appl Environ Microbiol* 42:649-655.
4. Daims H, Bruhl A, Amann R, Schleifer KH, Wagner M. (1999) The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst Appl Microbiol* 22:434-444.
5. Dehority B, Grubb J. (1981). Bacterial population adherent to the epithelium on the roof of the sorsal rumen of the sheep. *Appl Environ Microbiol* 41:1424-1427.
6. Dehority BA, Tirabasso PA. (1989). Lyophilization of rumen fluid for use in culture media. *Appl Environ Microbiol* 55:3237-3239.
7. Donachie SP, Foster JS, Brown MV. (2007). Culture clash: challenging the dogma of microbial diversity. *ISME* 1:97-99.
8. Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
9. Firkins JL, Yu Z. (2006). Characterisation and quantification of the microbial populations in the rumen. En: Sejrsen K, Hvelplund, T, Nielsen, MO. Ruminant physiology, digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress. Wageningen Wageningen Academic Publishers pp. 19-54.
10. Forsberg CW, Lam K. (1977). Use of the adenosine 5'-triphosphate as an indicator of the microbiota biomass in rumen contents. *Appl Environ Microb* 33:528-537.
11. Forster RJ, Teather RM, Gong J, Deng SJ. (1996). 16S rDNA analysis of *Butyrivibrio fibrisolvens*: phylogenetic position and relation to butyrate-producing anaerobic bacteria from the rumen of white-tailed deer. *Lett Appl Microbiol* 23:218-222.
12. Fraga M, Perelmuter K, Delucchi L, Cidade E, Zunino P. (2008). Vaginal lactic acid bacteria in the mare: evaluation of the probiotic potential of native *Lactobacillus* spp. and *Enterococcus* spp. strains. *Antonie van Leeuwenhoek* 93:71-78.
13. Grubb JA, Dehority BA. (1976). Variation in colony counts of total viable anaerobic rumen bacteria as influenced by media and cultural methods. *Appl Environ. Microbiol* 31:262-267.
14. Guo TJ, Wang JQ, Bu DP, Liu KL, Wang JP, Li D, Luan SY, Huo XK. (2010). Evaluation of the microbial population in ruminal fluid using real time PCR in steers treated with virginiamycin. *Czech J Anim Sci* 55:276-285.
15. Hespell RB. (1987). Biotechnology and modifi-

- cations of the rumen microbial ecosystem. *Proc Nutr Soc* 46:407-413.
16. Hippe H, Hagelstein A, Kramer I, Swiderski J, Stackebrandt E. (1999). Phylogenetic analysis of *Formivibrio citricus*, *Propionivibrio dicarboxilicus*, *Anaerobiospirillum thomasi*, *Succinimonas amylolytica* and *Succinivibrio dextrinosolvens* and proposal of *Succinivibrionaceae* fam. nov. *Int J Syst Bacteriol* 49:779-782.
 17. Hungate RE. (1969). A roll tube method for cultivation of strict anaerobes En: Norris JR, Ribbons DW. *Methods in microbiology*, vol. 3B. New York, Academic Press Inc. pp. 117-132.
 18. Kenters N, Henderson G, Jeyanathan J, Kittelmann S, Janssen P. (2011). Isolation of previously uncultured rumen bacteria by dilution to extinction using a new liquid culture medium. *J Microbiol Methods* 84:52-60.
 19. Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Mol Evol* 16:111-120.
 20. Kobayashi Y. (2006). Inclusion of novel bacteria in rumen microbiology: need for basic and applied science. *Anim Sci J* 77:375-385.
 21. Kopečný J, Zorec M, Mrázek J, Kobayashi Y, Marin ek-Logar R. (2003). *Butyrivibrio hungatei* sp. nov. and *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* sp. nov., butyrate-producing bacteria from the rumen. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:201-209.
 22. Krause DO, Dalrymple BP, Smith WJ, Mackie RI, McSweeney CS. (1999). 16s rDNA sequencing of *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*: design of a signature probe and its application in adult sheep. *Microbiology* 145:1797-1807.
 23. Larue R, Yu Z, Parisi VA, Egan AR, Morrison M. (2005). Novel microbial diversity adherent to plant biomass in the herbivore gastrointestinal tract, as revealed by ribosomal intergenic spacer analysis and rrs gene sequencing. *Environ Microbiol*. 7:530-43.
 24. Leedle JAZ, Butine TJ. (1987). Enumeration of cellulolytic anaerobic bacteria from the bovine rumen: comparison of three methods. *Curr Microbiol* 15:77-79.
 25. Macy JM, Farrand JR, Montgomery L. (1982). Cellulolytic and non-cellulolytic bacteria in rat gastrointestinal tracts. *Appl Environ Microbiol* 44:1428-1434.
 26. Miron J, Ben-Ghedalia D, Morrison M. (2001). Invited Review: Adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. *J Dairy Sci* 84:1294-1309.
 27. McCowan RP, Cheng KJ, Bailey CBM, Costerton JW. (1978). Adhesion of bacteria to the epithelial cell surfaces within the reticulo-rumen of cattle. *Appl Environ Microbiol* 35:149-155.
 28. Meissner HH, Henning PH, Horn CH, Leeuw K-J, Hagg FM, Fouché G. (2010). Ruminal acidosis: A review with detailed reference to the controlling agent *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125. *S Afr J Anim Sci* 40:79-100.
 29. Miller T, Wolin MJ. (1974). A serum bottle modification of the Hungate Technique for cultivating obligate anaerobes. *Appl Microbiol* 27:985-987.
 30. Olubobokun JA, Craig WM. (1990). Quantity and characteristics of microorganisms associated with ruminal fluid or particles. *J Anim Sci* 68:3360-3370.
 31. Perelmutter K, Fraga M, Valencia M, Pérez A, Zunino P. (2008). Microbiota ruminal: cuantificación, caracterización y aislamiento de potenciales organismos probióticos para prevenir la acidosis bovina. *Jornadas Uruguayas de Buiatría. XXXVI, Paysandú, Uruguay*, pp. 208-209.
 32. Pernthaler J, Glöckner F, Schönhuber W, Amann R. (2003). Fluorescence in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes.

- http://download.arb-home.de/documentation/FISH_chapter_reviewed.pdf (Acceso 28 de agosto de 2012)
33. Sharp R, Ziemer CJ, Stern MD, Stahl DA. (1998). Taxon-specific associations between protozoal and methanogen populations in the rumen and a model rumen system. *FEMS Microbial Ecol* 26:71-78.
 34. Shinkai T, Ueki T, Kobayashi Y. (2010). Detection and identification of rumen bacteria constituting a fibrolytic consortium dominated by *Fibrobacter succinogenes*. *Anim Sci J* 81:72-79.
 35. Stahl DA, Flesher B, Mansfield HR, Montgomery L. (1988). Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Appl Environ Microbiol* 54:1079-1084.
 36. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony. *Mol Biol Evol* 28:2731-2739.
 37. Uyeno Y, Sekiguchi Y, Tajima K, Takenaka A, Kurihara M, Kamagata Y. (2007). Evaluation of group-specific, 16S rRNA-targeted scissor probes for quantitative detection of predominant bacterial populations in dairy cattle rumen. *J Appl Microbiol* 103:1995-2005.
 38. van Gylswyk NO, Hippe H, Rainey FA. (1996). *Pseudobutyrvibrio ruminis* gen. nov., sp. nov., a butyrate-producing bacterium from the rumen that closely resembles *Butyrvibrio fibrisolvens* in phenotype. *Int J Sys Bacteriol* 46:559-563.
- Van Soest PJ. (1994). The nutritional ecology of the ruminant. 2a. ed., Ithaca, NY, Cornell University Press 476 p.
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. (2007). Naïve Bayesian Classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 73:5261-5267.
-

Leucoencefalomalacia en equinos en el litoral oeste de Uruguay



Leukoencephalomalacia in equine on the West coast of Uruguay

Rivero R^{1*}; Collazo S²; Ugarte E³; Nan F³; Mazzolini Y³; Matto C.¹

Recibido: 00/Mes/2013
Aprobado: 00/Mes/2013

RESUMEN

Se describen tres focos de leucoencefalomalacia en equinos diagnosticados por el Laboratorio Regional Noroeste DILAVE "Miguel C. Rubino". Los mismos se presentaron en verano y primavera temprana, asociados al consumo de maíz. En los dos primeros focos se afectó un solo equino, mientras que en el tercero de 15 animales enfermaron y murieron 7 (morbilidad y mortalidad 47%), siendo en los tres brotes la letalidad del 100%. Las lesiones macroscópicas más destacadas se observaron en el sistema nervioso central con áreas amarillas multifocales de reblandecimiento, cavitación y hemorragias, afectando la sustancia blanca principalmente a nivel del tálamo, hipocampo, núcleo caudado y áreas del tronco encefálico. En la histopatología del sistema nervioso central se encontraron áreas de malacia y vacuolización de la sustancia blanca, rodeadas por edema y hemorragias con cambios degenerativos en el endotelio vascular. En el hígado de uno de los animales examinados, había lesiones degenerativas, consistentes con necrosis peri-acinar hemorrágica y vacuolización de los hepatoci-

SUMMARY

Three outbreaks of equine leukoencephalomalacia diagnosed by the Northwest Regional Laboratory DILAVE "Miguel C. Rubino" are described. All of them occurred in summer and early spring associated with ingestion of corn. In the first two outbreaks only one equine was affected respectively, while in the third one, 7 of 15 animals showed symptoms and died (morbidity and mortality 47%); being the lethality 100% in the three situations. The main gross lesions were observed in the central nervous system with multifocal yellow areas of softening, cavitation and hemorrhage on the white matter, mainly in the thalamus, hippocampus, caudate nucleus and brainstem areas. At the histopathology areas of malacia and vacuolation of white matter, surrounded by edema and hemorrhage with degenerative changes in the vascular endothelium were found. One of the affected animals had degenerative lesions in the liver, consistent with periacinar hemorrhagic necrosis and vacuolation of midzonal hepatocytes. In the third outbreak, it was determined the concentration of fumonisins in

¹ Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Av. Italia 3318, CP 11600, Montevideo, Uruguay.

² Departamento de Nutrición Animal, Facultad de Veterinaria, UdelaR. Lasplacas 1550, CP 11600, Montevideo, Uruguay

*: Autor para correspondencia, e-mail: pmzunino@gmail.com

tos mediozonales. En el tercer foco como complemento al diagnóstico, se realizó la determinación de la presencia de fumonisinas en el maíz a través de la técnica de ELISA competitivo, con un resultado de 6,91 µg/g.

Palabras clave: Leucoencefalomalacia equina, micotoxinas, Fusarium.

the corn through a competitive ELISA, with a result of 6,91 µg/g.

PALABRAS CLAVE:

Leucoencefalomalacia equina, micotoxinas, Fusarium.

KEYWORDS:

Equine leukoencephalomalacia, micotoxins, Fusarium.

INTRODUCCIÓN

La leucoencefalomalacia es una enfermedad de etiología tóxica que afecta a los equinos causada por la ingestión de maíz contaminado por micotoxinas (fumonisinas) producidas por varias especies del género *Fusarium*, principalmente *F. verticillioides* (antiguamente *F. moniliforme*) y *F. proliferatum*. Han sido identificadas como A1, A2, B1, B2 y B3 siendo la fumonisina B1 la más importante, ya que constituye el 70% del total de las micotoxinas presentes en el maíz, además de ser la más comúnmente asociada con casos de leucoencefalomalacia (Marasas y col., 1988; Ross y col., 1993; Ross y col., 1994). La patología se ha registrado en animales que consumen granos de maíz enteros o quebrados como único componente de la dieta o mezclados con otros productos como melaza, avena, raciones peleteadas o a través del pastoreo en diferido de plantas de maíz contaminadas por el hongo (Ross y col., 1991; Giannitti y col., 2011). La fumonisina provoca necrosis licuefactiva de la sustancia blanca de uno o los dos hemisferios cerebrales y tronco encefálico. En algunos casos espontáneos y experimentales, también se han descrito lesiones a nivel hepático (Marasas y col., 1988; Ross y col. 1993).

La patogenia de la leucoencefalomalacia aún no está totalmente comprendida. Según Beasley (1999) la fumonisina B1 inhibe la acción de la enzima esfingosina-N-acetiltransferasa, responsable de la síntesis de esfingolípidos, sustancias que regulan el crecimiento y diferenciación celular. Alteraciones en la concentración y función de los esfingolípidos, especialmente a nivel de los endotelios vasculares, contribuirían a un incremento de los signos y lesiones en las intoxicaciones por fumonisinas (Beasley, 1999). En el sur de Brasil y Argentina la enfermedad se presenta más comúnmente en los meses fríos del año, momento en que los animales son suplementados (Riet-Correa y col., 1982; Barros y col., 1984; Giannitti y col., 2011a). En Uruguay, si bien no han sido reportados, se han registrado casos de esta intoxicación por el Departamento de Patobiología del Laboratorio Central y por el Laboratorio Regional Este de la DILAVE “Miguel C. Rubino” (Easton C. y Dutra F. Com. Pers. 2012).

El objetivo de este trabajo es describir los aspectos epidemiológicos, clínicos y patológicos de tres focos de leucoencefalomalacia diagnosticados por el Laboratorio Regional Noroeste DILAVE “Miguel C. Rubino”.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los datos epidemiológicos y clínicos fueron colectados durante las visitas realizadas a los tres predios afectados. Dos focos ocurrieron en el Departamento de Paysandú en el año 2005, donde se practicó la necropsia de un equino en cada foco. Se registró un tercer foco en 2010 en el Departamento de Río Negro donde se autopsiaron 2 animales.

Los órganos obtenidos en las cuatro necropsias realizadas fueron procesados por la sección histopatología del Laboratorio Regional Noroeste de la DILAVE “Miguel C. Rubino”, donde fueron fijadas en formol bufferado al 10%, embebidas en parafina, cortadas en secciones de 5 micras de espesor y teñidas con hematoxilina y eosina (HE).

Se tomaron muestras de silo de maíz del tercer foco para realizar estudios en la sección Toxicología del Laboratorio Central de la DILAVE. Se utilizó un ELISA competitivo para análisis cuantitativo de Fumonisina (Ridascreen® Fast Fumonisin) con un límite de detección de 0,222 µg/g (GIPSA-USDA, 2010).

RESULTADOS

Epidemiología y signos clínicos

El primer foco se registró en Febrero de 2005, en el Departamento de Paysandú, donde se afectó un animal raza Pura Sangre de Carrera de 6 años, que era suplementado con maíz y avena en grano, asociado a heno de alfalfa. El mismo presentó anorexia, trastornos en la locomoción, choque contra objetos, ceguera y muerte 24 horas después del inicio de los síntomas.

El segundo foco ocurrió en Octubre de 2005, en la sexta seccional policial de Paysandú, donde se concurrió ante un caso de un equino hembra, de 4

años de edad, raza Cuarto de Milla que presentaba sintomatología nerviosa. Los síntomas clínicos eran depresión, ceguera, apoyo de cabeza contra objetos, posteriormente decúbito con coma profundo hasta la muerte. La misma era alimentada con maíz que se utilizaba en la dieta de un corral de engorde de novillos del predio. No se registraron casos de mortalidad en bovinos asociado al consumo de este cereal.

En el mes de Setiembre de 2010 se visitó un predio de la cuarta seccional policial de Río Negro ante la consulta por un cuadro colectivo de equinos con sintomatología nerviosa y muerte. Se trataba de 15 animales adultos que eran utilizados para realizar las tareas de campo y que diariamente se los suplementaba con maíz, de los cuales enfermaron 7. El mismo se componía de granos de baja calidad, almacenados en bolsas para silo de grano húmedo. Los granos presentaban una película marrón clara y aspecto mohoso. Los animales afectados presentaron ataxia, ceguera, apoyo de cabeza contra objetos, depresión y muerte. La morbilidad y mortalidad registrada fue de 47%, letalidad 100%.

Hallazgos anátomo-patológicos

En las necropsias realizadas los principales hallazgos macroscópicos se restringían al sistema nervioso central, el mismo presentaba áreas multifocales amarillas de reblandecimiento, hemorragias y necrosis de la sustancia blanca a nivel de hemisferios cerebrales y tronco cerebral (mesencéfalo, protuberancia anular y bulbo raquídeo) (Figura 1).

En la histopatología se observó a nivel de corteza cerebral severa congestión meníngea con discreta infiltración por polimorfonucleares y eosinófilos. La sustancia gris cortical presentaba moderado edema perineuronal y perivascular, algunas áreas pequeñas de necrosis licuefactiva asociado a hemorragias y congestión, gliosis difusa, presencia de manguitos

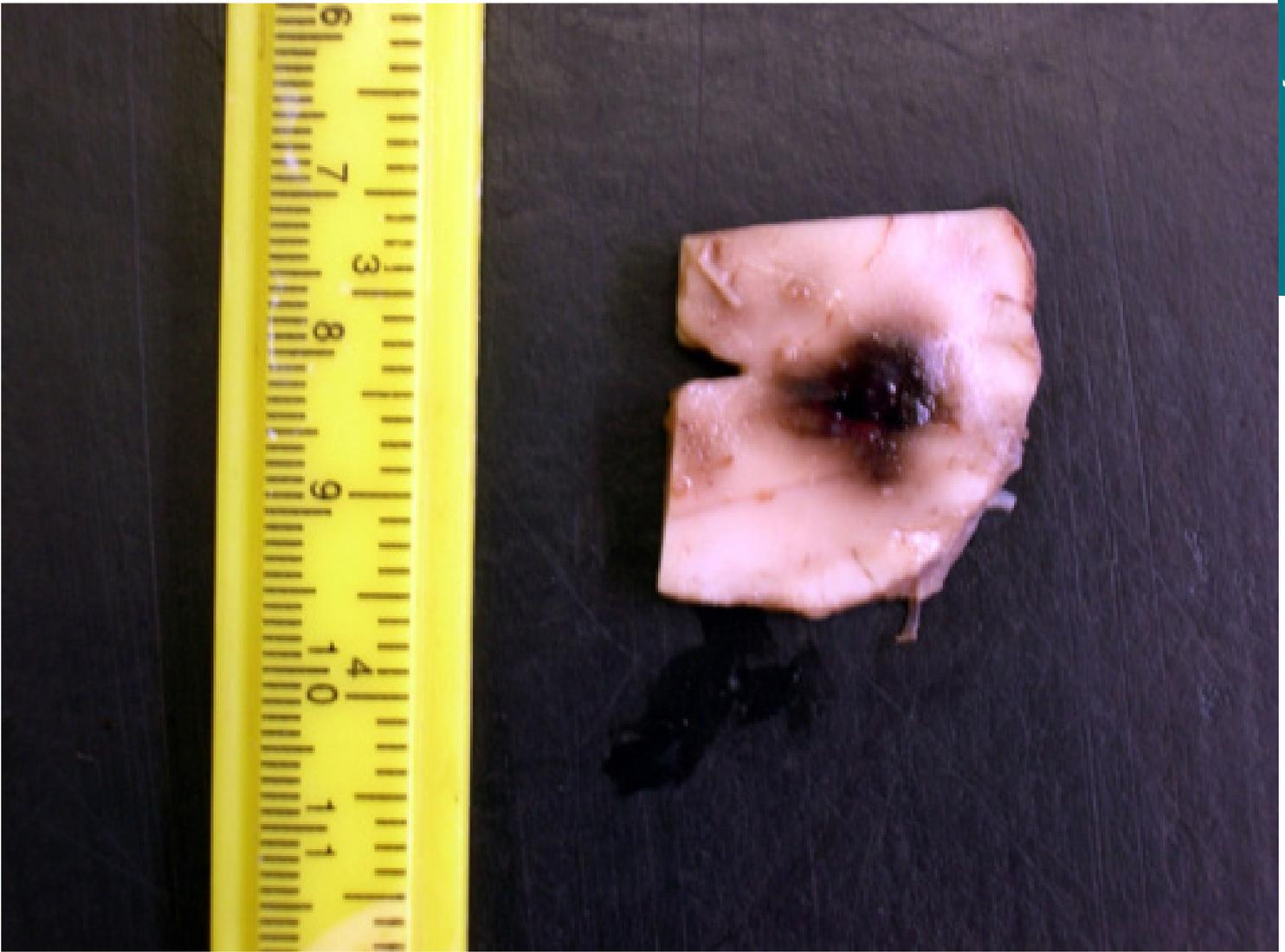


Figura 1. Equino. Mesencéfalo. Hemorragia y malacia focal de la sustancia blanca.

perivasculares, edema astrocitario. Las zonas basales del encéfalo y tronco encefálico presentaban áreas extensas de necrosis licuefactiva de la sustancia blanca, con hemorragias y áreas de severa vacuolización con escasa infiltración por polimorfonucleares, presencia de células de Gitter, con cambios degenerativos en el endotelio vascular (Figura 2). En el cerebelo había vacuolización de la sustancia blanca, hemorragias en la capa molecular, discreta infiltración perivascular por mononucleares y congestión.

En el tercer foco uno de los equinos afectados presentaba en hígado necrosis centrolobulillar hemorrágica difusa con vacuolización de los hepatocitos

mediozonales, hipertrofia de las células de Kupffer y presencia de algunos acúmulos de macrófagos.

Toxicología:

En las muestras de maíz provenientes del tercer foco se determinó la presencia de 6,91 $\mu\text{g/g}$ de Fumonisin, resultando negativo a Aflatoxinas.

DISCUSIÓN

Tomando en cuenta los antecedentes de alimentación con maíz, signos clínicos, hallazgos macroscópicos y lesiones histopatológicas observadas a nivel del sistema nervioso central en los tres focos, son car-

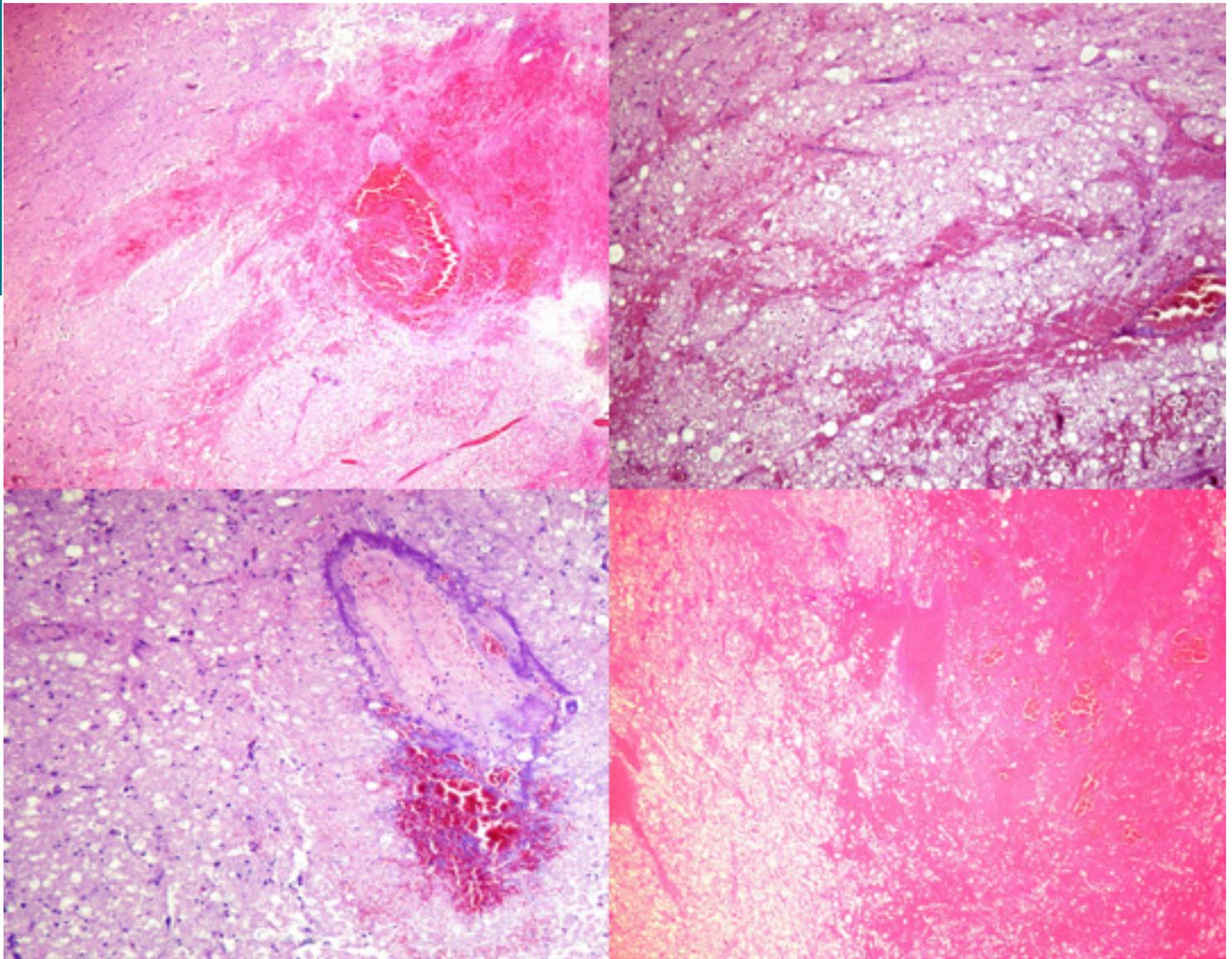


Figura 2. Equino. Leucoencefalomalacia.

A: Tálamo, trombosis vascular, hemorragias, presencia de edema proteinaceo eosinofílico y área de malacia en la sustancia blanca. HE, 150x. - **B:** Mesencéfalo, vacuolización difusa de la sustancia blanca con hemorragias multifocales a coalescentes. HE, 150x. - **C:** Mesencéfalo, trombosis vascular, cambios degenerativos en el endotelio vascular, hemorragia perivascular. HE, 600x. - **D:** Puente: Área focalmente extensa de malacia de la sustancia blanca con hemorragias, congestión y edema proteinaceo eosinofílico.

acterísticos de un cuadro de Leucoencefalomalacia (LEM) por contaminación del maíz con *Fusarium verticillioides*. En el tercer foco se suma además como elemento adicional, el nivel de fumonisinas detectado en el maíz, lo que permite una confirmación del diagnóstico. Años atrás solo existía el aislamiento fúngico y la patología como herramientas para identificar la enfermedad, lo que implica un avance en el

diagnóstico de esta intoxicación.

Según Ross y col. (1991) alimentos que contengan más de 10 µg/g de fumonisina B1 no es recomendable que se utilicen para la alimentación de los equinos. Por otra parte los mismos autores, reportaron casos de LEM donde el nivel de B1 oscilaba entre 1 a 126 µg/g. Este margen de variación en las dosis que provocan intoxicación en los equinos, sugiere que los

animales tienen una susceptibilidad diferente frente a la fumonisina, tal como lo plantean posteriormente en otro trabajo Ross y col. (1993). Esto explicaría lo observado en el tercer foco, donde si bien todos los animales eran suplementados con maíz, solo enfermó el 47% de la población en riesgo.

En uno de los animales intoxicados espontáneamente se observaron alteraciones degenerativas a nivel hepático, caracterizada por necrosis centrolobulillar hemorrágica difusa con vacuolización de los hepatocitos mediozonales. Similares hallazgos son reportados por Marasas y col. (1988) y Ross y col. (1993). Estos últimos alimentaron equinos de raza Pony con cantidades conocidas de fumonisina B1 provocando un cuadro clínico de LEM y observaron varias lesiones en hígado como: vacuolización difusa y severa de los hepatocitos, degeneración y/o necrosis de los mismos, hemorragias, moderada infiltración mononuclear y granulocitaria y proliferación de tejido conectivo. Asimismo, realizaron determinaciones séricas de aspartato amino transferasa, gammaglutamil transpeptidasa y fosfatasa alcalina registrando incrementos significativos de los niveles enzimáticos. Esto sugiere que las fumonisinas tendrían también un efecto hepatotóxico importante en los equinos.

Si bien en el tercer foco no fue posible determinar que subtipo de fumonisina fue la responsable del mismo, tomando en cuenta las reproducciones experimentales realizadas, se reconoce tanto a B1 como B2 como las micotoxinas que provocan lesiones degenerativas a nivel del sistema nervioso central (Marasas y col., 1988; Ross y col., 1993; Ross y col., 1994).

Según diferentes autores que han reportado focos de intoxicación en el sur de Brasil y Argentina la enfermedad es estacional, ya que los casos se concentran principalmente entre Junio a Setiembre, coincidente con el invierno en el Hemisferio Sur, período en

el que los animales son suplementados (Riet-Correa y col., 1982; Barros y col. 1984, Giannitti y col., 2011a). Si bien en este trabajo los focos registrados se observaron en verano y primavera temprana, es probable que las formas de almacenamiento y/o conservación del maíz tengan un rol importante en el desarrollo del *Fusarium* sp. Por otro lado, en los focos descritos por Barros y col. (1984) se observó como factor predisponente para la aparición de casos de leucoencefalomalacia, presencia de ciertas condiciones climáticas en el período previo a la cosecha del maíz (alta precipitación pluviométrica y menor índice de insolación). Estas condiciones se observaron en el foco del año 2010, donde se presentó un verano lluvioso en la región litoral oeste, previo a la cosecha y almacenaje de este cereal (INIA-GRAS, 2012).

La ausencia de lesiones histopatológicas inflamatorias y/o degenerativas específicas en el sistema nervioso central, asociadas a la epidemiología y signos clínicos observados, permiten descartar otras enfermedades que causan sintomatología nerviosa en equinos como: encefalomiелitis vírica (tipo occidental, oriental y venezolana), rabia, Fiebre del Nilo occidental, mieloencefalopatía por herpesvirus (HVE-1), intoxicación por *Centaurea solstitialis* o *Senecio* spp., tétanos, intoxicación por plomo y botulismo (Radostits y col., 2002; Rivero y col., 2011).

El diagnóstico de Leucoencefalomalacia se basa en los síntomas nerviosos causados por las alteraciones en cerebro y tronco encefálico, historia de consumo de maíz o productos que lo contengan y la presencia de lesiones degenerativas en la sustancia blanca del sistema nervioso central. Actualmente se le suman técnicas como el ELISA, HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento derivado de fluorescencia) o TLC (cromatografía en capa fina), que

permiten la identificación y determinación de las micotoxinas presentes en los alimentos para equinos. Estas herramientas podrían utilizarse para la determinación de niveles de fumonisinas previo a la suplementación de los animales.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Barros CSL, Barros SS, Santos MN, Souza MA. (1984). Leucoencefalomalácia em equinos no Rio Grande do Sul. *Pesq Vet Bras* 4:101-107.
2. Beasley V. (1999). Toxicants with mixed effects on the central nervous system. Disponible en: http://www.ivis.org/advances/Beasley/Cp2D/chapter_frm.asp?LA=1#Fumonisin. Fecha consulta 24/10/2012
3. Giannitti F, Diab SS, Pacin AM, Barrandeguy M, Larrere C, Ortega J, Uzal FA. (2011a). Equine leukoencephalomalacia (ELEM) due to fumonisins B1 and B2 in Argentina. *Pesq Vet Bras* 31:407-412.
4. Giannitti F, Odriozola E, Margineda CA, Fernández E, Cámpora L, Weber N, Clemente G, García JP, Campero M. (2011). Leucoencefalomalacia equina por pastoreo de maíz contaminado con fumonisinas en Argentina. *Veterinaria (Argentina)*. Disponible en: <http://www.veterinariargentina.com/revista/2011/09/leucoencefalomalacia-equina-por-pastoreo-de-maiz-contaminado-con-fumonisin-as-en-argentina/>
5. GIPSA-USDA (2010) Disponible en: www.gipsa.usda.gov/fgis/tech-servsup/metheqp/fumonisin_criteria Text versión. Fecha de consulta: 24/10/2012.
6. INIA GRAS (2012) Disponible en: <http://www.inia.org.uy/online/site/684740I1.php>. Fecha consulta 24/10/2012
7. Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. (2002). *Medicina Veterinaria*. 9a. ed., Madrid, Ed. Mc Graw-Hill-Interamericana. 2215 p., 2 v.
8. Riet-Correa F, Meirelles MA, Soares JM, Machado JJ, Zambrano AF. (1982). Leucoencefalomalácia em eqüinos associada à ingestão de milho mofado. *Pesq Vet Bras* 2:27-30.
9. Rivero R, Matto C, Adrien ML, Alvarez V. (2011). Intoxicación por *Senecio* spp. (Asteraceae) en equinos en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* 47:29-32.
10. Ross PF, Nelson PE, Owens DL, Rice LG, Nelson HA, Osweiler GD, Wilson TM. (1994). Fumonisin B2 in cultured *Fusarium proliferatum*, M-6104, causes equine leukoencephalomalacia. *J Vet Diagn Invest* 6:263-265.
11. Ross PF, Ledet AE, Owens DL, Rice LG, Nelson HA, Osweiler GD, Wilson TM. (1993). Experimental equine leukoencephalomalacia, toxic hepatitis, and encephalopathy caused by corn naturally contaminated with fumonisins. *J Vet Diagn Invest* 5:69-74.
12. Ross PF, Rice LG, Reagor JC, Osweiler GD, Wilson TM, Nelson HA, Owens DL, Plattner RD, Harlin KA, Richard JL, Colvin BM, Banton MI. (1991). Fumonisin B1 concentrations in feeds from 45 confirmed equine leukoencephalomalacia cases. *J Vet Diagn Invest* 3:238-241.
13. Marasas WFO, Kellerman TS, Gelderblom WCA, Coetzer JAW, Thiel PG, van der Lugt JJ. (1988). Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort J Vet Res* 55:197-203.



Instrucciones para los autores

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

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

Normas Generales

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

Se aceptan artículos en portugués o inglés, los cuales deben incluir un resumen en inglés y español. El texto debe ser en formato "DOC" o "RTF" y no deberá exceder de 25 páginas tamaño A4 (incluidas referencias), con margen de 2,5 cm a cada lado, de preferencia en letra Times New Roman y con caracteres de 12 puntos, con interlineado doble y numeración continua de líneas.

Los cuadros (se recomienda usar la palabra cuadro y no tabla) y figuras (se recomienda usar la palabra figura y no gráfica) deben ir al final del manuscrito (cada una en hoja aparte). Las leyendas de los cuadros van arriba de los mismos y deben ser autoexplicativas. Las leyendas de las figuras también deben

ser autoexplicativas y van aparte de las mismas, en una hoja a continuación de la bibliografía y antes de los cuadros y figuras. Los cuadros deben ser simples, con líneas horizontales de color negro. En las figuras (cuando corresponda) utilizar tramas en blanco y negro y no en colores.

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

El autor principal o de correspondencia deberá enviar una nota firmada por él y los demás autores por correo electrónico o por fax (2409 9458) indicando dirección postal completa, teléfono, fax y correo electrónico, dejando establecido que se responsabilizan del contenido del trabajo y que el mismo no se ha publicado ni se ha remitido simultáneamente a ninguna otra publicación periódica. También deberá indicar el tipo de trabajo (Científico o Técnico). Se aceptarán trabajos que hubieran sido publicados como resúmenes en congresos, simposios o jornadas.

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

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

1. Trabajo Científico: artículo original, comunicación corta (reporte o caso clínico), revisión.
2. Trabajo Técnico o de Difusión o Nota Técnica (práctica veterinaria, diagnóstico, tecnológico, conferencia).
3. Comunicaciones cortas; no deberán exceder las 12 páginas.
4. Reportes de casos clínicos; no deberán exceder las 10 páginas

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

1. TRABAJOS CIENTÍFICOS

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

2. TRABAJOS TÉCNICOS

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

Normas de redacción para Artículos Originales

Contendrán los siguientes elementos:

Título:

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

Nombre de Autores:

Apellido Inicial del nombre, otro/s nombres ejemplo: Vidal L.1, Gómez, J.2*

Dirección: (en pie de página):

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

RESUMEN

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

Summary

Es la traducción al Inglés del Resumen. Incluir keywords.

Resumo

Para artículos en portugués. Incluir Palavras-chave

INTRODUCCIÓN

Debe ser concisa, pero los autores deben suministrar antecedentes suficientes sobre el tema para que el lector no deba recurrir a otras publicaciones anteriores y para que comprenda la importancia o trascendencia de la investigación que se comunica. Deben referirse al contexto internacional y nacional, eligiendo las informaciones más recientes y más relevantes. Se recomienda evitar una revisión excesivamente detallada de la literatura o un mero resumen de los resultados obtenidos por otros autores. En lugar de esto, se deben dar los fundamentos científicos del estudio y definir claramente las hipótesis de trabajo, a fin de justificar la importancia del artículo. En el último párrafo deben precisarse los objetivos del trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los autores deben dar suficientes detalles para que otro investigador pueda repetir los experimentos. Debe estar escrito en tiempo pasado y en tercera persona del singular o plural según corresponda. De-

scribir claramente el diseño experimental así como los animales utilizados, su número, especie, género, raza, edad. Mencionar los reactivos, drogas o medicamentos por su nombre genérico o químico o por marcas comerciales patentadas. Los métodos y procedimientos deben ser bibliográficamente referenciados detallando las posibles modificaciones de las técnicas. Deben precisarse con claridad, tiempos, temperaturas, etc. En caso de procedimientos con animales, se debe mencionar si los mismos fueron realizados de acuerdo a las normas de la autoridad competente (CHEA, etc.). Los métodos de los análisis estadísticos deben plantearse claramente, incluyendo los efectos considerados, las observaciones y unidad/es experimental/es. Se sugiere incluir los modelos utilizados. Deberán indicarse los niveles de probabilidad utilizados para declarar diferencias significativas y/o tendencias.

RESULTADOS

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

Discusión

La discusión consiste en la búsqueda de una explicación de los resultados obtenidos, para lo cual se recurre a la comparación con datos de la literatura. Debe evitarse la repetición de los resultados en este ítem. Deben mostrarse las relaciones entre los hechos observados, con las hipótesis del propio experimento y/o con las teorías, resultados o conclusiones de otros

autores. Formule las conclusiones en forma clara. Deben aplicarse las referencias bibliográficas al experimento y no abundar en detalles no estudiados. Deben exponerse la significación de los resultados y evitar las repeticiones. Escrito en tiempo pasado en tercera persona del singular o plural según corresponda.

CONCLUSIONES

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

AGRADECIMIENTOS

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

BIBLIOGRAFÍA

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

alfabéticamente y se separarán por punto y coma. Las citas que se utilicen como respaldo no deberían ser más de cuatro para cada contenido.

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

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

En el caso de la cita de libros, se indicará Autores (Año) Título, número de edición (salvo la primera), ciudad de edición, Editorial, cantidad de páginas del libro. Ejemplo: Rosemberger G. (1983). Enfermedades de los bovinos. 2a. ed. Berlín, Ed. Paul Parey 577 p.

En el caso de la cita de capítulo de libros, se indicará Autores (Año) Título del capítulo, En: Autores (editores) del libro, Título del libro, Edición, Lugar de edición, Editor, Páginas inicial y final del capítulo precedido por pp y entre guión. Ejemplo: Dirksen G. (1983). Enfermedades del aparato digestivo. En:

Rosemberger G. Enfermedades de los bovinos. 2a. ed. Berlín, Ed. Paul Parey pp. 235-242.

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

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

Cuadros

Los cuadros deben tener un número de identificación correlativo que figurará en el texto y contendrán un texto de título en la parte superior. La leyenda debe situarse encima del cuadro y debe ser autoexplicativa. Los cuadros deben ser simples, sin líneas verticales y líneas horizontales separando título de las columnas de datos y en color negro. Las referencias o símbolos de los cuadros se presentarán al pie del mismo en letra de tamaño 10 puntos. Ejemplo: Cuadro I. Variación de la temperatura en función del tiempo., Ejemplo de pie de cuadro: T = temperatura, t = tiempo (en minutos). Si el cuadro no es original, citar la fuente (Autor y año) en pie de página.

Figuras

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

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

Fotos

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