



Microbiología e inmunología

Revista
Colombiana de
Ciencias
Pecuarías

Actividad virucida y de inhibición de la adhesión de extractos de dos plantas de la familia Euphorbiaceae contra Herpes Virus Bovino tipo-1

Virucidal activity and adhesion inhibition against Bovine Herpes Virus type-1 of two plants extracts from Euphorbiaceae family

Natalia Andrea Taborda, Liliana Yazmín Acevedo², Albeiro López-Herrera, Jorge E. Forero²

Proyecto financiado por Fundación para la Promoción de la Investigación y la Tecnología Banco de la República, Proyecto 1972, desarrollado por Grupo de Inmunovirología, Universidad de Antioquia y Grupo BIOGEM, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín

Grupo de Inmunovirología Universidad de Antioquia, A.A. 1226, Medellín, Colombia. Grupo BIOGEM; Departamento de Producción Animal. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Medellín, Colombia. jforeroduarte@gmail.com, alherrera@unal.edu.co

El Herpes Virus Bovino (HVB), es un virus neurotrópico que causa una variedad de síntomas clínicos entre los que se encuentran rinotraqueitis, conjuntivitis y manifestaciones genitales. Aunque en algunos casos la infección cursa con manifestaciones clínicas leves, también puede causar abortos, reducción en las tasas de fertilidad y en la producción de carne y leche. Actualmente existe una vacuna que genera inmunidad y previene el desarrollo de la enfermedad; **sin embargo, no evita la infección, la latencia o la reactivación del virus.** Además, las medidas de control de la infección son ineficientes, probablemente por la alta capacidad que tiene el virus de transmitirse entre los hospederos y de inducir latencia neuronal. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio mostraron que extractos de las plantas *H. crepitans* y *C. variegatum*, presentan actividad antiviral contra HVB-1 cepa Cooper. Con el fin de determinar si la acción antiviral de los extractos de estas plantas se ejerce directamente sobre el virión o en etapas iniciales de la infección, los extractos con mayor actividad fueron sometidos a ensayos de actividad virucida y de inhibición de la adhesión. Los ensayos *in vitro* muestran que los extractos metanólico, hexánico y acuoso *C. variegatum* a una concentración de 31.25 µg/ml, tienen una actividad virucida de 97.14, 39.52, y 44.2%, respectivamente. A esa misma concentración los extractos hexánico y acuoso de *H. crepitans* presentan actividad virucida del 60.95 y 84.67%, respectivamente. A la menor concentración evaluada (31.25 µg/ml), el extracto hexánico de *C. variegatum* presentó un porcentaje de inhibición de la adhesión de 18.9%, mientras que en el caso de *H. crepitans* fue de 48.31%. Estos resultados preliminares sugieren que algunos extractos de *C. variegatum* y *H. crepitans* poseen capacidad de interferir en la infectividad del virus y en pasos iniciales de su ciclo replicativo. Sin embargo, para tener una idea

más amplia del efecto antiviral de los extractos sobre HVB-1 cepa Cooper, se hace necesario evaluar la capacidad de inhibición de la penetración y el tiempo mínimo en el cual el extracto ejerce su actividad antiviral después de la infección. Se deben realizar otros estudios en los cuales los extractos con actividad promisoriosa se sometan a fraccionamiento con técnicas cromatográficas, para tratar de encontrar nuevas moléculas activas que presenten una alternativa terapéutica y de control de diseminación y así disminuir las pérdidas económicas generadas por la infección con este virus.

Palabras clave: *actividad biológica, actividad virucida, adhesión viral, Codiaem variegatum, Hura crepitans, rinotraqueitis infecciosa bovina*

Key words: *biological activity, Codiaem variegatum, Hura crepitans, infectious bovine rhinotracheitis, viral adhesion, virucidal activity*

Asociación serológica del virus de la rinoneumonitis viral equina y la anemia infecciosa equina en caballos del departamento del Meta, Colombia

Serological association between equine viral rhinoneumonitis virus and equine infectious anemia virus in horses of Meta State, Colombia

Ángel R Cruz¹, Erica Reyes¹, Agustín Góngora Orjuela², Albeiro López-Herrera², Julián Ruiz Sáenz^{4,5}

¹Ejercicio Particular.

²Grupo de Investigación en Reproducción y Genética Animal GIRGA, Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia.

³Grupo BIOGEM, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Medellín, Colombia.

⁴Grupo de Inmunovirología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

⁵Grupo de Investigación en Microbiología y Epidemiología, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Bogotá, Colombia agongora@unillanos.edu.co

La rinoneumonitis equina y la anemia infecciosa son enfermedades de los equinos responsables de cuantiosas pérdidas económicas para los países que las padecen. La rinoneumonitis es producida por herpesvirus equinos tipos 1 y 4 (HVE-1 y HVE-4), a su vez la anemia infecciosa equina es producida por un retrovirus. Las infecciones ocasionadas por los herpes virus se caracterizan por inducir en el huésped infecciones latentes y frecuentes reactivaciones de este estado, especialmente bajo condiciones de estrés (inmunosupresión) con la consiguiente eliminación del virus al medio ambiente. El virus de la anemia infecciosa equina ocasiona infecciones persistentes y

tiene la capacidad de esquivar la respuesta inmune por parte del hospedero. Dentro de la compleja epidemiología para ambas entidades es frecuente encontrar la presencia de asociaciones de agentes infecciosos en un mismo individuo, las cuales podrían estar involucradas con la severidad de los signos clínicos y las alteraciones patológicas. En Colombia se empieza a conocer una alta reactividad serológica en algunas regiones, para la rinoneumonitis, mientras para la anemia infecciosa equina, la principal medida de control es el sacrificio de los animales positivos. El objetivo del presente estudio fue conocer el nivel de asociación serológica entre HVE-1 y 4 y el virus de la anemia infecciosa equina en caballos de trabajo provenientes de varios municipios del Meta. Se realizó una encuesta transversal en 68 equinos provenientes de los municipios de San Martín, Guamal, Restrepo, Cumaral y Paratebuena. Se utilizó una prueba de ELISA indirecto específico para detectar la presencia de anticuerpos dirigidos contra la glicoproteína G del HVE-1 y HVE-4 (Svanovir™ EHV1/EHV4-Ab ELISA), para la AIE la prueba de Inmunodifusión en Agar de coggins. No se encontraron reactores al HVE-1, para el HVE-4 fue 94.12% (64/68) y AIE 13.32% (9/68); es importante resaltar que todos los animales positivos para AIE presentaron coinfección con HVE-4. El porcentaje de seropositivos por municipio al HVE-4 fue Restrepo 27.9% (19/68), Cumaral 26.4% (18/68), Paratebuena 14.7% (10/68), Guamal 14.7% (10/68), y San Martín 10.2% (7/68); mientras el porcentaje de reactores por municipio a AIE fue Cumaral 5.88% (4/68), Restrepo 4.4% (3/68), Guamal 1.47% (1/68) y San Martín 1.47% (1/68). Se concluye que el porcentaje de coinfectados HVE-4 y AIE es alto y sugiere un aumento de la seropositividad a futuro en la población equina, pues el efecto inmunosupresor del virus de la AIE podría facilitar la reactivación del estado latente del HVE-4 en ciertas épocas del año; la no presencia de reactores al HVE-1 no asegura la ausencia del virus ya que en estudios recientes en la misma región han sido evidente sin alcanzar alta seropositividad como para el HVE-4.

Palabras clave: Meta, HVE-1, HVE-4, AIE

Key words: EHV-1, EHV-4, Meta, EIA

Declaración conflicto de intereses: los autores declaran no tener conflicto de intereses en relación con la investigación realizada.

Construcción de un adenovector recombinante que exprese proteínas inmunogénicas del virus de la Diarrea Viral Bovina

Construction of a recombinant adenoviral expressing immunogenic proteins of the bovine viral diarrhea virus

Diana S Vargas¹, Víctor J Vera Alfonso^{1,2}, Jairo J Correa¹

¹Laboratorio de Virología. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia,

²Instituto de Genética. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

Bogotá, Colombia.

jjaimec@unal.edu.co

El virus de la diarrea viral bovina (VDVB) es uno de los agentes infecciosos más importantes del ganado, presenta distribución mundial

y es endémico en la mayoría de las poblaciones bovinas. A pesar de que existen varias vacunas para el control de la enfermedad, no se ha logrado una reducción evidente de la prevalencia de la enfermedad. Por lo anterior, se han empezado a desarrollar experimentalmente vacunas ADN y vacunas recombinantes para superar los inconvenientes de las vacunas convencionales. Su mayor ventaja es que permiten trabajar con solo una fracción del virus (proteínas más inmunogénicas) evitando la exposición al virus completo; disminuyendo la probabilidad de reversión viral. Los trabajos que se vienen realizando en vacunas recombinantes se fundamentan en la búsqueda de un sistema eficiente para la expresión y presentación de antígenos que generen una potente inmunidad humoral y celular. Esto se logra mediante el empleo de proteínas virales altamente inmunogénicas como la E2 de la envoltura. Los genes que codifican para estas proteínas son introducidos dentro de un vector que permita su expresión. El empleo de los virus como vectores permite el transporte en su genoma de genes extraños (transgenes) en regiones que son eliminadas y no son esenciales para la replicación e infectividad viral. Los adenovirus (AdVs) son usados ampliamente como vectores para transferir genes, entre otras, ya que muchos tipos celulares expresan receptores en su superficie para la unión con este virus, haciendo que los niveles de transducción sean altos una vez que el virus a ingresado al organismo. En este proyecto de investigación se construirán AdVs recombinantes de primera generación que expresen la proteína inmunogénica E2 del VDVB, de una cepa de campo del país y de una cepa de referencia, determinando si estas construcciones presentan una expresión óptima de E2 y si es igual para cada una de ellas. Para esto, primero se amplifica el gen viral E2 mediante RT-PCR empleando primers específicos a los cuales se les adicionan sitios de restricción que faciliten la inserción de la secuencia E2 en un sitio específico de un vector de transferencia, que contiene un cassette bicistrónico que está bajo el control de un promotor constitutivo (CMV5-E2-IRES-GFP); este plásmido es amplificado en bacterias competentes. Una vez purificados, los plásmidos de transferencia se recombinan con plásmidos de expresión que contienen la secuencia adenoviral con delección en la región E1 y E3 (Adeasy system, Qbiogen®) en bacterias electrocompetentes. Una vez obtenido el plásmido adenoviral con el transgen de expresión (CMV5-E2-IRES-GFP) ubicado en la región $\Delta E1$, se evaluará *in Vitro* el nivel de expresión de la construcción en células transfectadas transitoriamente, cuantificando por citometría de flujo de la fluorescencia emitida por el gen reportero (GFP). Finalmente, se amplificará el virus mediante la transfección de células complementarias esperando obtener AdVs recombinantes a títulos que oscilen entre 10^{10} partículas virales/ml, para su posterior empleo en modelos animales. Se ampliará el conocimiento en la metodología de la construcción de estas vacunas para posteriores desarrollos en otros virus con mayor impacto en las explotaciones colombianas.

Palabras clave: plásmido, promotor, transgen, vector adenoviral, vector de transferencia

Key words: adenoviral vector, plasmid, promoter, shuttle vector, transgene

Determinación de la curva de crecimiento y efecto de diferentes concentraciones hipoosmóticas de azúcares sobre el crecimiento de bacterias causantes de mastitis

Growth curve estimation and effect of several hypoosmotic sugar concentrations on growth of mastitis causing bacteria

Luz A Gutiérrez R¹, Biól, MS; Divier Agudelo Gómez¹, Ind. Pec; Jaime Mesa Restrepo¹ Est. Ind. Pec.

¹Facultad Ciencias Administrativas y Agropecuarias, Corporación Universitaria Lasallista, Medellín, Colombia.
diagudelo@lasallista.edu.co

La mastitis es una inflamación de la glándula que ocasiona grandes pérdidas a la industria láctea, pues disminuye la capacidad de producción láctea de las vacas, se descartan animales que reproductivamente son valiosos para la explotación, se generan costos por tratamientos, hay disminuir la calidad higiénica y sanitaria, se ve disminuida la vida útil del producto y se disminuye el rendimiento industrial, entre otros. La enfermedad puede ser ocasionada por traumatismos en la glándula mamaria o por un gran número de microorganismos, los más importantes son los pertenecientes a los géneros *Staphylococcus spp* y *E. coli*; estas bacterias requieren de un medio nutritivo y condiciones ambientales ideales para su desarrollo, sin embargo cuando estos microorganismos son sometidas a condiciones hipoosmóticas se produce su muerte. Los objetivos que se pretenden en este proyecto son: determinar la curva de crecimiento de microorganismos pertenecientes a los géneros antes mencionados, además, evaluar el efecto de diferentes concentraciones de mono y disacáridos sobre el crecimiento *in vitro* de los microorganismos aislados. Se utilizarán muestras de leche vacas enfermas de mastitis de un hato lechero localizado en el municipio de Santa Rosa de Osos (norte del departamento de Antioquia), las muestras se recolectarán asépticamente en tubos estériles y se transportarán bajo condiciones favorables al laboratorio de Ciencias Biológicas de la Corporación Universitaria Lasallista, donde se realizará la investigación. En el caso de los *Staphylococcus* se realizarán pruebas morfológicas, hemolíticas y de coagulasa; mientras que para las coliformes, además de la caracterización morfológica se utilizará un batería bioquímica de reconocimiento para bacterias gram-negativas. Una vez aisladas e identificadas las bacterias se mantendrán a 4 °C. Para cada uno de los microorganismos se analizará la curva de crecimiento y determinará en que momento alcanzan la fase exponencial y estacionaria. El cultivo se realizará en caldo nutritivo con una siembra inicial de 1000 cél/ml, mantenidas bajo condiciones controladas, las mediciones se tomarán cada hora utilizando un turbidímetro. Para evaluar el efecto de los diferentes azúcares los microorganismos aislados se someterán a diferentes concentraciones (20, 35, y 50%) de glucosa, fructosa, maltosa y sacarosa; cada tratamiento tendrá 5 repeticiones y dos réplicas. El número de células sembradas será 1000/ml en 10ml de caldo nutritivo; se contará con un testigo al que no se le aplicará ningún tratamiento; el cultivo se realizará bajo condiciones controladas de temperatura (37 °C). La medición se realizará de acuerdo a los resultados hallados en la estimación de la curva de crecimiento. Se espera determinar a que concentración a la que cada tipo de azúcar inhibe el crecimiento de las bacterias y posteriormente realizar ensayos en condiciones de campo para evaluar el efecto sobre

vacas que padecen mastitis y generar una alternativa económica y eficiente para el control de la mastitis.

Palabras clave: bacterias gram-positivas, bacterias gram-negativas, monosacáridos, disacáridos

Key words: disaccharide, gram-positive bacteria, gram-negative bacteria, monosaccharide

Determinación hematológica y microbiológica de gallinazos (*Coragyps atratus*) presentes en las plazas de mercado del municipio de Bucaramanga (Colombia)

Hematological and microbiological determination in culture (Coragyps atratus) present in the squares of market of the municipality of Bucaramanga (Colombia)

Andrea Jaimes Martínez¹, MVZ; Diego L Fontecha Ariza¹, MVZ; Oscar Alejandro Martínez¹ MVZ; Vilma Castellanos Torres², Julia T Bedoya Mashuth², Víctor H Arcila Quiçeno²

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Cooperativa de Colombia, y ²Grupo de Investigación en Ciencias Animales, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Cooperativa de Colombia.
Bucaramanga, Colombia.
Varcila23@gmail.com

La presencia de avifauna, incluyendo los gallinazos en áreas urbanas (plazas de mercado de Bucaramanga) principalmente en aquellas en donde existe un manejo inadecuado de los residuos sólidos (basuras y desechos orgánicos), dispuestos en lugares de atracción para estas aves, sugiere un posible riesgo para la salud pública, principalmente porque pueden dañar y contaminar alimentos con sus excrementos y plumas (por contacto), y actuar como reservorios de microorganismos patógenos sin manifestaciones o evidencias clínicas de enfermedad. Se capturaron 40 ejemplares clínicamente sanos, para obtener muestras sanguíneas las cuales fueron divididas en cuatro grupos de 10 muestras por semana, arrojando promedios del hematocrito 44,82 %; promedio en diferencial de células blancas, heterófilos 62,57 %, linfocitos 32,18 %, monocitos (0,29%, eosinófilos 4,89%, basófilos 0,12 %; el recuento eritrocitario se encontró en 4.889.875,00 mm³ y para el recuento total de células blancas se esta fue de 96.574,5 mm³. Del análisis bacteriológico aplicado a los 40 gallinazos mediante hisopados faríngeos, los cuales fueron sometidos a siembra por agotamiento con medio enriquecido de agar sangre de cordero mac conkey, lectura con BBL CRYSTAL, para la identificación de bacterias, donde se encontró en todos los cultivos colonias bacterianas mixtas con una totalidad de 13 géneros, siendo la *Escherichia coli*, equivalente al 100 %, seguido de la bacteria *Proteus sp.*, presente en un 77,5 %; *Enterobacter cloacae* 10 %; *Bacillus sp.* 7,5 %; para los géneros *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila* y *Proteus mirabilis* 5 % y cada uno de los siguientes con una participación del 2,5 % correspondiente a *Proteus penneri*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter sakazakii*, *Enterobacter gergoviae*, *Klebsiella pneumoniae* para cada una, de la población estudiada. De lo anterior se puede concluir que, al ser la *Escherichia coli* menos exigente para sobrevivir en el ambiente, la hace más frecuente al contacto con el hombre, favoreciendo la contaminación al ser vía oral, facilitado

por el proximidad de los recolectores de basuras con el contenedor o cuarto de desecho, teniendo en cuenta que los gallinazos se alimentan, eliminan heces y expulsan vomito (mecanismo de defensa); otro factor para la posible contaminación se puede presentar a través de los operarios de barrido, los cuales tienen contacto con vendedores de alimento dentro de las plazas, al igual que presencia de gallinazos sobre los mesones de los puestos de expendio de carne en horario de no atención al público, lo que puede facilitar la presencia de bacterias en los alimentos que allí se expenden, hasta llegar al consumidor final facilitado por mala manipulación y ausencia de medidas higiénicas.

Palabras clave: *aves carroñeras, contaminación bacteriana, análisis de sangre.*

Key words: *blood analysis, contaminating bacteria, rotten birds*

Diagnóstico de *Mycobacterium avium paratuberculosis* a partir de muestra de materia fecal de vacas holstein (*Bos indicus*) mediante técnica de PCR en tiempo real. Resultados preliminares*

*Detection of *Mycobacterium avium paratuberculosis* from Holstein (*Bos indicus*) cows fecal samples by real time PCR. Preliminary report*

Margarita M Zapata¹, MV; Ofelia Arroyave¹, Bact; Juan D Rodas¹ MV, PhD; Juan G Maldonado Estrada¹, MVZ, PhD.

Grupo CENTAURO, Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

*Financiado por la Universidad de Antioquia a través del Comité para el Desarrollo de la Investigación (CODI)

La paratuberculosis bovina (o enfermedad de Johne) es una enfermedad del tracto digestivo de los ruminantes causada por el *Mycobacterium avium paratuberculosis* (Map), que presenta cuatro fases clínicas progresivas: dos asintomáticas (Fases I y II) y dos sintomáticas (Fases III y IV), que culminan con la muerte por caquexia del animal afectado. Los animales portadores pueden eliminar el agente causal en la materia fecal durante las fases II a IV. El Map excretado en las heces de los animales portadores puede ser aislado y detectado mediante el cultivo bacteriológico, una prueba que tiene como inconveniente la alta exigencia de cultivo del Map y el prolongado tiempo de cultivo requerido antes de obtener un resultado positivo. El objetivo del proyecto es establecer un sistema de detección y amplificación del Map a partir de muestras de materia fecal bovina, mediante el uso de la técnica de PCR en tiempo real, como estrategia de apoyo para el establecimiento de un programa de prevención detección y control de la paratuberculosis bovina en el hato lechero de la Universidad de Antioquia. Muestras de materia fecal de bovinos con sintomatología compatible con la infección por el Map, provenientes de un hato enzoótico para la enfermedad de Johne, se han sometido a procedimiento de cultivo bacteriológico en medio para micobacterias, bajo dos protocolos de aislamiento: con o sin inhibidores. Las muestras se han cultivado durante varias semanas hasta observar el crecimiento de colonias compatibles con Map, las cuales se han enviado para tipificación bioquímica y molecular. Como controles se han utilizado muestras de materia fecal de bovinos clínicamente sanos. Adicionalmente,

con el DNA de las muestras aisladas en cultivo se realizará prueba de PCR convencional y en tiempo real, para la amplificación del elemento de inserción IS900 del Map, mediante el uso de cebadores específicos para este elemento. Como controles positivos se utilizará una cepa de referencia del Map. Hasta el momento se ha logrado aislar varias cepas de colonias compatibles con *Mycobacterium* spp, que no han sido tipificados como Map. Para el cultivo bacteriológico del Map se está implementando otros medios de cultivo diferentes a los estudiados hasta el momento. La a amplificación de Map por prueba de PCR está en su fase de estandarización. A la fecha de exposición del trabajo se espera presentar los resultados de las pruebas de PCR sobre material detectado en el cultivo bacteriológico, usando controles positivos de DNA de cepas de referencia de map. Finalmente, se obtendrá el sistema de control para la detección y aislamiento de cepas del Map usando el cultivo bacteriológico con los medios Middelbrook y Lowsten-Jensen; realizar la puesta a punto de los protocolos de PCR en tiempo real y convencional; detectar los animales del hato enzoótico portadores del Map con o sin manifestaciones clínicas de la enfermedad de Johne; y ofrecer la técnica de PCR en tiempo real para el monitoreo de la excreción de Map en todos los animales del hato.

Palabras clave: *bovinos de leche, caquexia, enfermedad de Johne, paratuberculosis, PCR en tiempo real*

Key words: *dairy cattle, caquexia, Johne disease, paratuberculosis, real time PCR*

Encuesta serológica de anticuerpos al virus de la rinoneumonitis equina en caballos criollos de siete municipios del piedemonte llanero, Colombia

Rinoneumonitis serological antibodies survey of the creole horses of seven municipalities of the piedemonte llanero, Colombia

Jordán Martínez¹, Camilo Cortés¹, Agustín Góngora Orjuela², Albeiro López-Herrera³, Julián Ruiz Sáenz^{4,5}

¹Ejercicio Particular.

²Grupo de Investigación en Reproducción y Genética Animal GIRGA, Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia.

³Grupo BIOGEM, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Medellín, Colombia.

⁴Grupo de Inmunovirología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

⁵Grupo de Investigación en Microbiología y Epidemiología, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Bogotá, Colombia
agongora@unillanos.edu.co

La rinoneumonitis viral equina es una enfermedad insidiosa, de alta prevalencia en varios países y que ocasiona severas pérdidas económicas a la industria equina. Es producida por herpesvirus equino tipos 1 y 4 (HVE-1 y 4). Poco se conocía de esta enfermedad en Colombia, sin embargo desde el primer reporte de su presencia en el año 2001, el cual se acompañó del aislamiento del virus, surgió la necesidad de conocer la prevalencia en las diferentes regiones y poblaciones equinas del país. El objetivo de este estudio fue conocer la prevalencia serológica a los HVE-1 y HVE-4 en caballos criollos destinados a actividades de trabajo en siete municipios del Meta. Se realizó una encuesta transversal en 104 equinos provenientes de los municipios de San Martín, Acacias, Castilla la Nueva, Guamal, Restrepo, Cumaral y Paratebueno. Se utilizó una prueba de ELISA indirecto

específico para detectar la presencia de anticuerpos dirigidos contra la glicoproteína G del HVE-1 y HVE-4 (Svanovir™ EHV1/EHV4-Ab ELISA). La población estaba conformada por machos (56.2%) y hembras (43.8%). La seropositividad para el HVE-1 fue 1.92% y HVE-4 91.35%. La seropositividad por municipio para el HVE-1 fue Castilla la nueva 0.24% (1/24) y Acacias 0.11% (1/11); no se encontraron reactores positivos para los otros municipios. Respecto del HVE-4, la seropositividad fue: San Martín 77.7% (7/9), Acacias 100% (11/11), Castilla la nueva 87.5% (21/24), Cumaral 95% (19/20), Restrepo 90% (18/20), Guamal 81.8% (9/11) y Paratebueno 100% (10/10). De acuerdo con la edad, la mayor seropositividad para el HVE-4 se encontró en el grupo entre 5-7 años, seguido del grupo de menos de 4 años. Se concluye que la seropositividad al HVE-1 es baja lo que contrasta con una alta seropositividad al HVE-4, hallazgo que confirma la presencia de HVE en la población de animales de trabajo en el Meta, ya evidenciada recientemente en caballos destinados a actividades deportivas. Quizás el aumento de eventos feriales donde asiste alto número de animales y el posterior contacto con los caballos dedicados a actividades de trabajo podría explicar la diseminación del virus a esta población.

Palabras clave: *anticuerpos, equino, rinoneumonitis*

Key words: *antibodies, equine, rhinopneumonitis*

Declaración conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflicto de intereses en relación con la investigación realizada.

Estudio de la actividad del virus de la bronquitis infecciosa en granjas avícolas, por medio de métodos moleculares

Study of the activity of infectious bronchitis virus in commercial broiler flock, through molecular methods

Diana CM Álvarez Espejo¹, Víctor J Vera Alfonso^{1,2}

¹Laboratorio de Virología. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia,

²Instituto de Genética. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. Bogotá, Colombia.

La bronquitis infecciosa aviar (BIA) es una enfermedad multisistémica que causa pérdidas económicas en avicultura debido a la disminución en la ganancia de peso, altas tasas de morbilidad, disminución de la producción de huevo, decomisos en planta de beneficio y costos por tratamientos y vacunaciones. Esta entidad, es causada por el virus de bronquitis infecciosa (IBV siglas en inglés), el cual pertenece a la familia *Coronaviridae*. Dado que la BIA, se encuentra ampliamente distribuida en las explotaciones avícolas del país y a la gran problemática que la enfermedad genera, los objetivos principales del proyecto son: en primer lugar, identificar y caracterizar molecularmente las cepas actuantes en granjas seleccionadas de la zona centro del país y posteriormente, evaluar la dinámica del virus en aves vivas, comparando la evaluación de la respuesta inmune y la carga viral presente en estas. Para el primer objetivo, se seleccionarán granjas con historia y sintomatología compatible con BIA tomando muestras tanto para el intento de aislamiento del virus, como para caracterización molecular de este. Las muestras de aislamiento, serán inoculadas en embriones libres de patógenos específicos (SPF) y se evaluará la presencia de lesiones específicas para el virus. Para la caracterización molecular de las cepas, se usará

la técnica de reacción en cadena de la polimerasa – transcripción reversa (RT-PCR, siglas en inglés) y se realizará la secuenciación de nucleótidos, con el fin de agrupar genéticamente las cepas actuantes en las granjas estudiadas. En cuanto al segundo objetivo, se tomarán cuatro grupos experimentales divididos así: aves vacunadas con el IBV, bajo condiciones de campo, en una explotación avícola con presencia del IBV comprobada; animales vacunados con el IBV, bajo condiciones controladas de aislamiento, e inoculadas con una cepa de campo a título conocido; aves sin vacunación, bajo condiciones controladas de aislamiento, e inoculadas con una cepa de campo a título conocido; animales vacunados, sin exposición al agente viral. Para evaluar en las aves la dinámica de las partículas virales a través del tiempo, tanto de virus de origen vacunal y de campo, se utilizarán las técnicas de inmunoensayo asociado a enzima (ELISA) para la detección de anticuerpos y RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR). La primera, permitirá estudiar la respuesta de inmune de los animales a la exposición con el virus y la segunda, se usará para cuantificar la carga viral presente en los mismos. Por medio de esta evaluación, se podrá comparar la respuesta inmune de las aves con la carga viral presente en estas. Los resultados obtenidos a través de este proyecto, permitirán establecer las bases para el estudio y control del IBV debido al bajo conocimiento de las cepas actuantes en el territorio y contribuirán al avance del conocimiento de la dinámica del IBV, en Colombia. Tanto la normalización de las pruebas RT-PCR y qRT-PCR detectarán de forma rápida y eficaz las cepas del virus de BIA y proporcionará a la industria avícola pautas para la evaluación del plan vacunal administrado contra la enfermedad.

Palabras clave: *aves, ELISA, qRT – PCR, RT – PCR, secuencia de nucleótidos, VBI.*

Key words: *chickens, ELISA, IBV, nucleotide sequence, RT-PCR, qRT-PCR.*

Evaluación clínica, serológica y molecular de la coinfección con el virus de la enfermedad de Newcastle y con el virus de bronquitis infecciosa

Clinical, serological and molecular evaluation of Newcastle disease virus and infectious bronchitis virus coinfection

Javier A Jaimes Olaya¹, Víctor J Vera Alfonso^{1,2}; Néstor A Mossos Campos³

¹Laboratorio de Virología. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. Bogotá, Colombia.

²Instituto de Genética. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. Bogotá, Colombia.

³Laboratorio Nacional de Diagnóstico Veterinario. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Bogotá, Colombia.

En avicultura, las enfermedades virales son causantes de grandes pérdidas económicas. Dentro de estas, la enfermedad de Newcastle y la bronquitis infecciosa, se reconocen como dos de las más importantes, debido a que están ampliamente distribuidas en las poblaciones avícolas; a pesar de la existencia de estrategias para la prevención y control. En Colombia estas dos enfermedades son endémicas, y constituyen una problemática vigente en el país. A nuestro laboratorio, llegaron aves provenientes del departamento de Cundinamarca con historia y sintomatología compatible con bronquitis infecciosa. Se tomaron muestras para aislamiento viral y para caracterización molecular del virus de virus de bronquitis infecciosa (VBI). Se realizó reacción en cadena de la polimerasa

– transcripción reversa (RT-PCR por sus siglas en inglés) y la posterior secuenciación de nucleótidos del VBI. El aislamiento se realizó en embriones libres de patógenos específicos (SPF por sus siglas en inglés) de 9-11 días de edad. Sin embargo, las lesiones observadas en los embriones SPF aunque fueron características del VBI, también fueron compatibles con infección por el virus de la enfermedad de Newcastle (VENC). Para comprobar la posible coinfección con los dos virus, se reprodujo la infección en aves SPF bajo condiciones controladas. Para este experimento, se utilizaron aves de 21 días de edad, que fueron separadas en tres grupos experimentales, e inoculadas con diferentes pasajes del aislamiento en embriones; igualmente se utilizó un grupo control. Las aves fueron evaluadas diariamente para la observación de signos clínicos, y al mismo tiempo, se realizó una evaluación serológica de estas, tanto para el VBI como para el VENC, a las 36 horas y los días 7, 15 y 21 post inoculación. Por último, se realizó la RT-PCR para la detección del VENC y la posterior secuenciación de nucleótidos. Se comprobó la presencia del VBI y del VENC por medio de la RT-PCR. En el caso del VBI, a través de la secuenciación de nucleótidos, se encontró una estrecha relación genotípica del aislamiento, con cepas de origen chino. Sin embargo, la secuenciación de la cepa del VENC, esta en proceso y aun no se tiene resultado. Se evidenció sintomatología clínica compatible con las dos enfermedades, en los tres grupos inoculados con virus. No obstante, la sintomatología presentada para las dos enfermedades fue muy leve. A nivel serológico la respuesta fue muy similar, con títulos leves o inexistentes a las 36 horas, y con títulos leves para los días 7, 15 y 21 post inoculación. Se logró comprobar la coinfección con dos agentes virales. Al mismo tiempo, se pudo reproducir clínicamente las dos enfermedades y evaluar la respuesta inmune de las aves frente a estas. Es importante resaltar el hecho de encontrar alta similitud entre el aislamiento del VBI y las cepas chinas, dado el hecho de que en el país, no se comercializan aves, ni subproductos, ni suministros avícolas, provenientes de este país o de esta zona geográfica. Por último, este estudio constituye un avance importante en el estudio de las enfermedades virales de las aves.

Palabras clave: VBI, VENC, aves, ELISA, RT – PCR, secuencia de nucleótidos

Keywords: IBV, NDV, chickens, ELISA, RT – PCR, nucleotide sequence

Evaluación de un test de ELISA para el diagnóstico de la fasciolosis bovina en condiciones de campo e identificación del molusco hospedador

Evaluation of an ELISA test for diagnosis of the bovine fasciolosis under field conditions and identification of mollusk host

Juan C Bedoya^{1,2}, Vicky M Gómez¹, Ruth E Pérez¹, José I Calle¹, Luz E Velásquez^{1,2}

¹Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales PECET, Sede de Investigación Universitaria SIU Calle 62 # 52-59. Torre 2, 7° piso, 730, y

²Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. jukbed@yahoo.es

La fasciolosis es ocasionada por el tremátodo *Fasciola hepatica*, que emplea moluscos lymneidos como hospederos intermediarios. Este parásito se encuentra ampliamente distribuido en Colombia, ocasionando abundantes pérdidas en la

industria cárnica y lechera. El diagnóstico de la fasciolosis se realiza rutinariamente mediante la detección de huevos en las heces de los vertebrados parasitados, si embargo el uso de técnicas serológicas como el ELISA, ha incrementado la sensibilidad y la especificidad del diagnóstico de la infección. Este trabajo pretendió evaluar en condiciones de campo un test de Elisa previamente estandarizado, así como determinar las especies de moluscos lymneidos que actúan como hospederos del tremátodo. Esta investigación se realizó en dos hatos lecheros del norte (A) y del oriente (B) de Antioquia. Las muestras de materia fecal y de sangre utilizadas para el diagnóstico se obtuvieron en cuatro y dos ocasiones respectivamente durante un año. Los moluscos fueron recolectados en las acequias y bebederos de los potreros estudiados, e identificados según características morfológicas. Los resultados mostraron en el hato A, una prevalencia de *F. hepatica* del 10,52% (10 de 95 bovinos) por Dennis, mientras que por Elisa del 49,46% (46 de 93 bovinos). En el hato B, mediante coprología se encontró una prevalencia del tremátodo del 94,6% (88 de 93 bovinos) y por ELISA del 93,02% (80 de 86 bovinos). Respecto a los moluscos, en el hato A se colectaron 306 lymneidos todos identificados como *L. columella*, ninguno de ellos parasitados; en el hato B se recolectaron 723 lymneidos, 513 fueron identificados como *L. columella* y 210 como *L. truncatula*. Entre los *L. columella*, 17 individuos presentaron estadios larvarios de *F. hepatica*; 13 especímenes presentaron redias y cercarias de un paramfistómido y en los restantes 483 no se encontraron tremátodos. A su vez la evaluación de *L. truncatula* demostró que 4 especímenes estaban parasitados por *F. hepatica*, 48 por un paramfistómido y en 158 caracoles no se observaron dígeneos. Según lo observado en el estudio, podemos decir que en regiones donde la prevalencia de fasciolosis es alta, como en el hato B, ambos métodos diagnósticos (Dennis y ELISA), permiten detectar la infección de manera eficiente. Por su parte en regiones donde la prevalencia de la fasciolosis es moderada como en el hato A, el test serológico, resulta más eficiente para el diagnóstico parasitológico de la infección, lo cual puede estar relacionado con la fase de la infección en la que se encuentran los animales. Respecto a los caracoles es importante destacar el hallazgo de los lymneidos *L. columella* y *L. truncatula*, que han sido descritos como hospedadores intermediarios de *F. hepatica*, *L. columella* en ambos hatos y *L. truncatula* sólo en el hato B. Dado que *L. columella* fue la única especie encontrada en ambos sitios de muestreo y que además fue la especie con la más alta prevalencia del parásito en el hato B, ésta se convierte en la especie más importante en la transmisión de la enfermedad en esos sectores.

Palabras clave: digenea, *Fasciola hepatica*, ELISA, *Lymnaea*

Key words: digenea, *Fasciola hepatica*, ELISA, *Lymnaea*

Posible transmisión de *Mycoplasma gallisepticum* entre pollos y palomas (*Columbina talpacoti*)

Possible transmission of Mycoplasma gallisepticum between chickens and pigeon (Columbina talpacoti)

Hernández AWI, Ruiz R

Grupo de investigación en producción en ciencia animal (PROCA) UNIPAZ. Barrancabermeja, Colombia.

La micoplasmosis aviar producida por *M. gallisepticum* (MG), es una de las enfermedades que mas inciden negativamente sobre la productividad de las explotaciones avícolas, sobre todo, en países en vía de desarrollo. Su epidemiología no está dilucidada completamente y sus variadas formas de transmisión hacen más complejo su entendimiento. El objetivo del presente trabajo fue establecer la

posible transmisión del MG entre aves de postura infectadas con MG y palomas (*Columbina talpacoti*), lo mismo que la transmisión del MG entre individuos de esta última especie, a través del contacto directo. Fueron realizados dos experimentos. En el primero, se investigó la transmisión del MG entre pollitas infectadas naturalmente y palomas *Columbina talpacoti*. Para ello se capturaron, utilizando redes de nylon, 48 palomas de vida libre que se encontraban consumiendo restos de alimento en un galpón de una granja avícola, el cual se encontraba en período de descanso. Inmediatamente, luego de su captura, cada ave fue identificada y chequeada clínicamente, mediante observación directa. Seguidamente, se realizó un examen serológico a cada una, utilizando sangre sin anticoagulante, para la detección de anticuerpos contra *Mycoplasma gallisepticum*, mediante las pruebas de seroaglutinación rápida en placa (SAR) y ELISA. La totalidad de las palomas resultaron negativas a *Mycoplasma gallisepticum*. Y no mostraron síntomas de enfermedad respiratoria. Posteriormente, la mitad de estas palomas fueron alojadas en una jaula de alambre y puestas en contacto directo, durante ocho semanas, con siete pollitas que presentaban la sintomatología de la micoplasmosis y diagnosticadas como positivas a MG mediante SAR. Durante el experimento las aves recibieron alimento concentrado y agua compartiendo los mismos utensilios dentro de la jaula. En el segundo experimento, se investigó la transmisión del MG entre palomas *Columbina talpacoti*. Para ello se tomaron 12 palomas de las 48 iniciales y se llevaron a un ambiente aislado. Allí fueron introducidas a otra jaula junto con siete palomas que habían estado en contacto directo con las pollitas enfermas y que después de ocho semanas resultaron positivas a MG mediante SAR y ELISA. Diariamente estas aves fueron chequeadas clínicamente mediante observación directa durante seis semanas. Los resultados del primer experimento indicaron que el 29% de las palomas expuestas al contacto directo con las pollitas infectadas resultaron positivas al MG, sin embargo, no se observaron signos clínicos en ninguna de estas palomas. Los resultados del segundo experimento mostraron que el 41.6% de las palomas resultaron positivas a MG mediante SAR y ELISA, sin mostrar signos clínicos. Se concluye que, bajo las condiciones de este trabajo, es posible la transmisión del MG entre aves de postura comercial y palomas *Columbina talpacoti*. También es posible la transmisión de la bacteria entre individuos de la especie de columbiformes. Por lo anterior, la paloma (*Columbina talpacoti*) se constituye un potencial riesgo en la perpetuación del MG en las granjas avícolas de la región.

Palabras clave: micoplasmosis aviar, avicultura, postura de huevos

Key words: avian mycoplasmosis, poultry, egg laying

Uso de cultivos de macrófagos como sistema de amplificación para el aislamiento y tipificación de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*

In vitro macrophage culture for amplification and isolation of *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*

María A Espinel¹, Est. MV; Margarita M Zapata¹, MV; Juan G Maldonado Estrada¹, MVZ, PhD.

¹Grupo CENTAURO, Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
zapatamar@gmail.com, juanguimal@rccp.udea.edu.co

El *Mycobacterium avium avium* subespecie *paratuberculosis* (Map) es el agente etiológico responsable de la enfermedad de Johne, una enteritis granulomatosa crónica de los rumiantes, de prevalencia mundial en animales domésticos, y causante de un gran impacto económico adverso en la ganadería. El cultivo bacteriológico a partir de heces o tejidos es el método más ampliamente utilizado para detectar el Map, pero suele ser un proceso bastante dificultoso debido a que el Map es una bacteria nutricionalmente exigente, dependiente de micobactina y con un crecimiento lento, que requiere más de 12 semanas para obtener colonias visibles. Por otro lado, a pesar de tener una especificidad cercana al 99%, la prueba muestra poca sensibilidad a la hora de detectar animales con infección subclínica. Lo anterior tiene repercusiones epidemiológicas graves dentro de las poblaciones, porque durante el tiempo de espera que supone la realización del cultivo, el animal positivo al Map elimina el microorganismo en heces poniendo en riesgo a los demás individuos. La demora de esta prueba diagnóstica hace que los programas de control y erradicación sean poco eficaces debido a la imposibilidad de eliminar del hato al animal infectado en el momento apropiado. Nuestro proyecto de investigación propone una alternativa al cultivo bacteriológico para el aislamiento del Map, como lo es la utilización de un cultivo de macrófagos como sistema de amplificación, fundamentados en el hecho del papel central que juega el macrófago bovino en el establecimiento de la infección, al ser en los macrófagos de animales susceptibles en donde la micobacteria evade el mecanismo bactericida de la célula, e incluso prolifera. Teniendo en cuenta lo anterior, nuestra hipótesis de trabajo propone que los cultivos de macrófagos serían el sustrato inicial para hacer la detección y posible aislamiento *in vitro* del genoma del Map, para efectos de estudios moleculares de caracterización y tipificación.

Palabras clave: cultivo de macrófagos, diagnóstico *ex situ*, enfermedad de Johne, *paratuberculosis* bovina

Palabras clave: bovine *paratuberculosis*, *ex situ* diagnostic, Johne's disease, macrophage culture