

# AISLAMIENTO DE UN HERPES VIRUS BOVINO TIPO-1 (HVB-1) DE SECRECIÓN NASAL Y ESMEGMA PREPUCIAL EN UN TORO REPRODUCTOR

*Agustín Góngora O.\**

*Luis C. Villamil J.\**

*Víctor J. Vera A.\**

*Jorge L. Parra A.\**

*Gloria C. Ramírez\**

*Guillermo López\**

## RESUMEN

Con el objeto de confirmar el estado de latencia viral al HVB-1 se inmunodeprimió un toro Jersey de 6 años de edad con aplicación intramuscular de 40 mg de Dexametasona Azium<sup>R</sup> por 5 días, el cual fue reactor a la prueba de seroneutralización con títulos de 1:64 a 1:256 por 6 muestreos consecutivos con intervalos de 1 mes. A partir de la segunda aplicación se tomaron muestras de secreción nasal y esmegma prepucial hasta el día 5 y se sembraron en cultivo primario de RFB libre de virus de diarrea viral bovina (VDVB) por IFI.

En los dos tipos de muestras sembradas se observó efecto citopático (ECP) a las 24 horas. El virus se adaptó a la línea celular MDBK, donde se tituló al 2, 3 y 5 pase con títulos de  $10^{3.5}$ ,  $10^{4.3}$  y  $10^{5.7}$  DICT<sub>50</sub>% respectivamente.

La prueba de IFI con un antisuero específico denotó fluorescencia en la membrana nuclear. El virus fue neutralizado en las mismas diluciones por sueros bovinos reactivos a 1000 DICT<sub>50</sub> de la cepa colorado. Por tinción negativa en microscopio electrónico escasas partículas virales fueron observadas existiendo dificultades en la técnica para su detección.

El ECP clásico, así como la prueba de IFI y reconocimiento antigénico por sueros reactivos a

la cepa colorado, permiten deducir que el virus aislado es el HVB-1, este hallazgo confirma la presencia de reproductores con infección latente y el riesgo de transmisión que ofrecen dentro y fuera de predios infectados y libres.

## INTRODUCCION

La rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) es producida por el herpes virus bovino tipo-1 (HVB-1), clasificado dentro de la familia herpesviridae, subfamilia alphaherpesvirinae, posee cubierta lipídica, cápside icosaédrica y ácido nucleico DNA (Roizman y Batterson, 1985).

Múltiples copias del DNA viral pueden permanecer como episomas integrados al genoma celular de las neuronas de los ganglios nerviosos en donde establece infecciones latentes (Hammerschmidt et. al., 1990).

Dentro de las infecciones producidas por el HVB-1 se reconocen diferentes formas clínicas, la respiratoria (IBR) es la de mayor presentación y causante de infertilidad, mortalidad embrionaria y aborto (Miller, 1991).

La forma genital conocida como vulvovaginitis-balanopostitis pustular infecciosa (IPV-IPB) es una infección venérea caracterizada por infertilidad temporal (Donkersgoed y Babuik, 1991; Miller, 1991), la forma encefálica

descrita como una enfermedad altamente mortal en terneros (George, 1991). Otras presentaciones incluyen dermatitis, mastitis y metritis (Bwangamoi y Kaminjolo, 1971; Greig y Bannister, 1965; Lomba et. al., 1976).

Análisis electroforéticos de la cápside y estudios por endonucleasas de restricción del DNA de las cepas causantes de los mencionados cuadros clínicos han permitido reconocer tres cepas diferentes: La cepa I que ocasiona la forma respiratoria (se incluyen las cepas de referencia Coopers y Colorado). La cepa II responsable de infecciones respiratorias y genitales en donde se ubica el aislamiento K-22 y la cepa III que incluyen los aislamientos N-569 y A-663 ambas responsables de lesiones neurológicas (Simard et. al., 1991).

El diagnóstico de la infección por el HVB-1 en sus distintas formas de presentación, requiere valoración especial en el reproductor por diversas causas: El riesgo de transmisión de la enfermedad a fincas libres, con la subsecuente presentación epidémica; el estado de latencia viral que conlleva que los animales infectados permanezcan como portadores de por vida y la frecuente reactivación viral por estrés en condiciones naturales con eliminación del virus (Straub, 1990).

La literatura internacional es amplia en describir cuadros respiratorios y genitales por este virus en toros de centros de inseminación artificial (IA) (Bitsch, 1973; Bwangamoi y Kaminjolo, 1971; Goffaux et. al., 1976; Huck et. al., 1971; Jansen et. al., 1981). Suiza, país que se encontraba en la fase final de erradicación de IBR sufrió una reinfección por semen contaminado (Kupferchmid 1986; Thielscher y Wilhelm Huth, 1987) por esta razón las legislaciones sanitarias de muchos países han adoptado drásticas medidas con el objeto reglamentar la comercialización internacional de semen y embriones (Hare, 1982, Thielscher y Wilhelm Huth, 1987).

La preservación de embriones infectados con el HVB-1 ofrece un riesgo potencial a receptoras seronegativas ya que se ha confirmado que el virus se adhiere firmemente a la zona pelúcida y después de sucesivos lavados pueden aún vehicular el virus (Hare, 1982). El aislamiento a partir de testículo también se ha reportado (Thiry, 1981).

En un estudio realizado por Góngora (1993) en toros de la Sabana de Bogotá, se encontró un 15% de reproductores serológicos a IBR, a pesar de la reactividad serológica baja, el autor considera que la situación en nuestro país es preocupante debido al uso de reproductores sin control sanitario, a la

\* Respectivamente: Médico Veterinario M.Sc. Unillanos A.A. 2621 M.V. M.Sc. Ph.D. Universidad Nacional. M.V. M.Sc. Universidad Nacional. MV. M.Sc. Corpoica Villavicencio, M.V. M.Sc. Universidad Nacional., M.V. Particular. Azium<sup>R</sup> Marca registrada de laboratorios Schering.

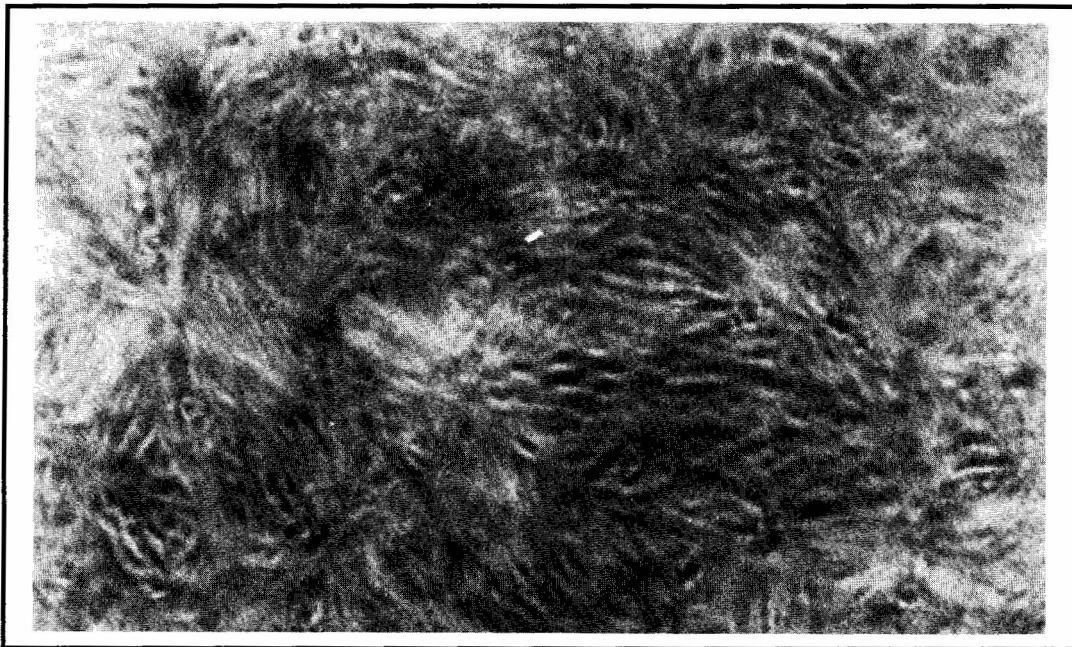


FIGURA 1. Monocapa normal de un cultivo de riñón fetal bovino.

falta de diagnóstico especializado y al poco conocimiento que se tiene de la enfermedad.

Actualmente solo 37 toros donantes de semen poseen registro sanitario oficial vigente, entre ellos: 20 holstein, 13 cebú, 3 Pardo Suizo y 1 Romosinuano (ICA, 1993). Lo anterior evidencia la existencia de un mercado de reproductores y semen de dudosa calidad sanitaria.

## MATERIALES Y METODOS

**Toro.** Se inmunodeprimió un toro Jersey de 6 años de edad, proveniente del hato para docencia de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia. El animal había presentado títulos entre 1:64 y 1:256 a la prueba de SN consecutivamente por seis meses.

**Inmunodepresión.** El animal fue aislado e inmunodeprimido con corticoides siguiendo el esquema propuesto por Whestone et. al. (1989). Diariamente se aplicaron 40 mg de Dexametasona (Azium<sup>®</sup>), vía intramuscular (IM) por 5 días, después de la segunda inyección se tomaron muestras de secreciones nasales y prepucales que se suspendieron en 5 ml de medio Hank's.

**Inoculación en Cultivo de Riñón Fetal Bovino.** Las muestras fueron filtradas por membrana Millipore de 0.22  $\mu$ , e inoculadas

0.5 ml en monocapa con 80% de confluencia de subcultivo 2 de riñón fetal bovino (RFB) libre de virus de Diarrea Viral Bovina biotipo no citopático (VDVB-NCP) y suplementadas con suero fetal bovino (SFB) al 10% igualmente libre del citado virus. El tiempo de adsorción virus-células fue de 1 hora a 37°C.

**Replicación del virus.** Cuando se reconoció ECP se efectuó disrupción celular por congelación y descongelación a -70°C por 3 veces, con el objeto de liberar más virus al medio de cultivo; el sobre-

nadante se centrifugó a 4.500 xg por 1 hora a 4°C Bekman J2-21<sup>R</sup> y se efectuaron nuevos pases en el mismo subcultivo de RFB que había sido conservado a 28°C.

**Adaptación a la línea Madin Darby Bovine Kidney (MDBK).** Después que el cultivo viral se adaptó en RFB se transplantó a células MDBK, inoculando 0.5 ml de suspensión viral en frascos kimax con un 80% de confluencia celular, efectuando pases cada 48 horas hasta su adaptación a esta línea celular.

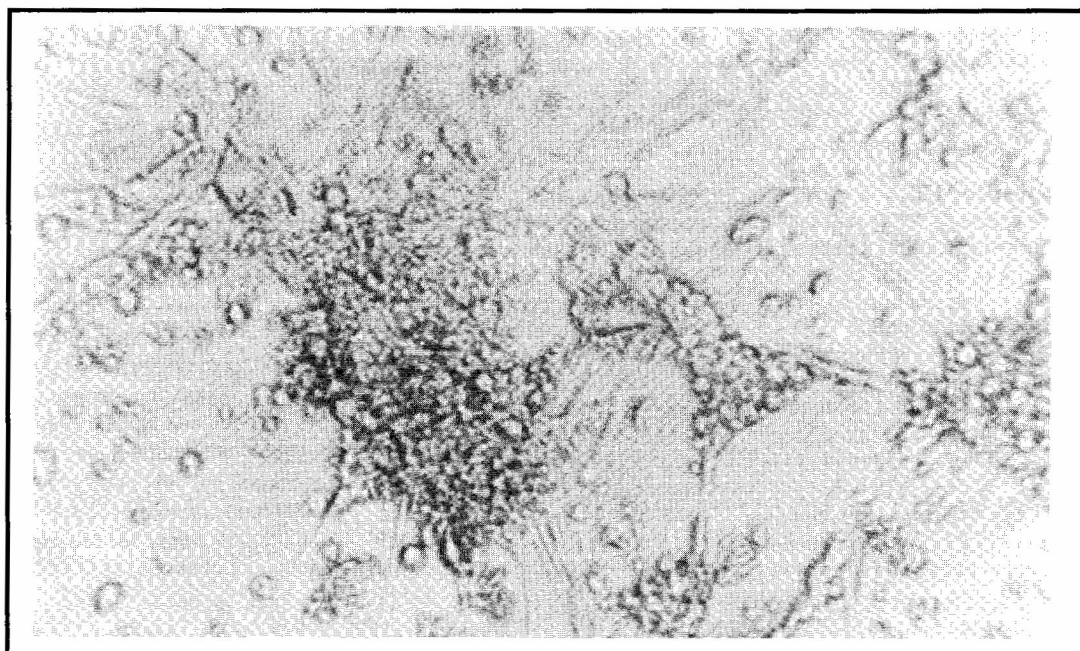


FIGURA 2. Efecto citopático del Herpes virus bovino Tipo 1.

**Cosecha y titulación viral.** El aislamiento fue sometido a 3 pases sucesivos en RFB, pasado a la línea MDBK y titulado en ambos sistemas siguiendo el método de Reed and Muench (1935) (citado por Carnero, 1982). Brevemente se cosechó la suspensión del sobrenadante celular después de 48 horas de incubación a 37°C, por congelación-descongelación de -70°C a temperatura ambiente por 3 veces, la cosecha se clarificó por centrifugación a 4.500 x g por 45 minutos a 4°C y se fraccionó en alícuotas de 1.0 ml. Para la titulación se emplearon diluciones de la suspensión viral desde 10<sup>0</sup> a 10<sup>-10</sup> con 10 repeticiones por dilución empleando como indicador de ECP células de RFB y MDBK.

## Identificación del virus

**Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).** Se empleó la técnica descrita por Villate (1988), el primer anticuerpo fue un suero bovino anti-IBR (IOWA STATE UNIVERSITY) y el conjugado un suero de conejo antiIgG bovina marcado con isotiocianato de fluoresceína (FICT) el cual fue filtrado por presión positiva con membrana de 0.45  $\mu$  para remover precipitados de FICT (Parra J. L. 1994).

Ambos reactivos fueron diluidos 1:20 y 1:40 respectivamente en PBS pH 7.2 0.01M, como colorante de contraste se empleó

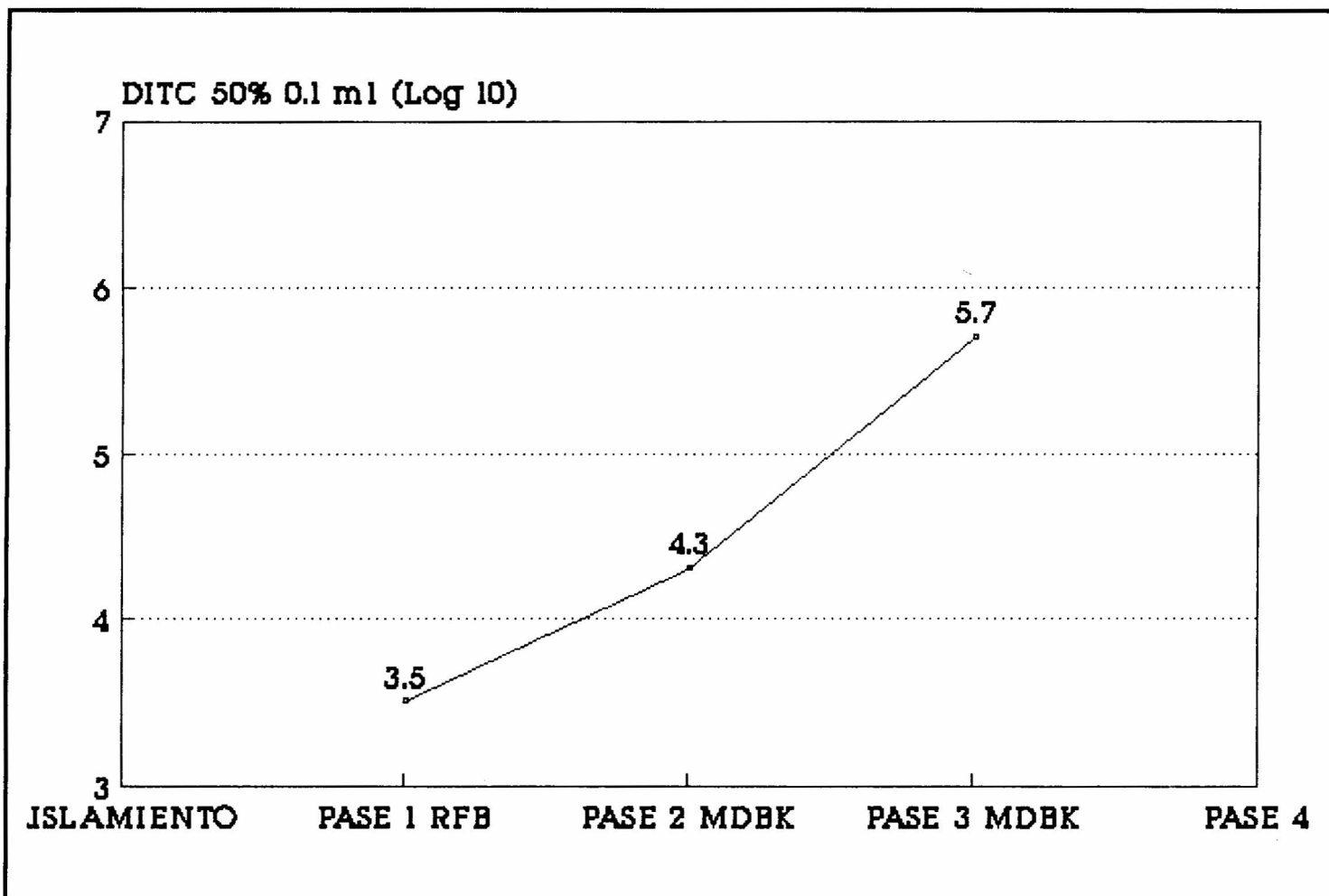


FIGURA 3. Curva de crecimiento viral por pases en cultivos de RFB y MDBK.

azul de evans 1:20.000 y se leyó en microscopio Leitz<sup>R</sup> a 280 nm.

Tubos con laminilla que contenían una monocapa de RFB con un 80% de confluencia fueron infectados con 0.5 ml de la suspensión viral 100 dejando adsorber el inóculo por 1 hora, removiendo el exceso y sustituyendo el medio Hank's sin SFB, siendo incubados a 37°C retirando 3 tubos a las 10.24 y 48 horas posinfección. Como control positivo se empleó un set de tubos infectados con la cepa colorado y control negativo cultivo de células de RFB sin infectar.

**Prueba de seroneutralización (SN).** Se empleó el método de suero variable-virus fijo, siguiendo la técnica descrita por el Laboratorio de Virología del Centro de Investigación en Salud y Producción Animal ICA-CEISA (Cortés, 1988). Se utilizaron cajas para microtécnica de 96 celdas de fondo plano Dynatech<sup>R</sup>, utilizando 1.000 DITC<sub>50</sub> del virus aislado

frente a sueros reconocidos como positivos y negativos en pruebas anteriores a 1.000 DITC<sub>50</sub>% de la cepa colorado, el título serico fue dado por la más alta dilución del suero que no presentó ECP.

**Microscopía Electrónica.** Se utilizó la técnica de tinción negativa siguiendo los protocolos establecidos por el laboratorio de Microscopía electrónica del Instituto Nacional de Salud (INS) (Rodríguez, 1983). Se usaron rejillas de cobre de 400 Mehrs cubiertas con colodión, la lectura se llevó a cabo en microscopio electrónico Zeiss EM 109<sup>R</sup>, a un voltaje de 50 kilovoltios (Kv), la observación por rejilla no fue mayor de 15 minutos.

#### RESULTADOS Y DISCUSION

Durante el tiempo de inmunodepresión no se evidenció deterioro en la salud del animal, a pesar de las dosis empleadas, que hacían pensar un efecto cata-

bólico y un aumento en el riesgo de infecciones. El desafío con corticoides se ha propuesto como la medida más segura para descartar infecciones latentes en toros portadores a los cuales se les quiere congelar y comercializar el semen (Dennet et. al., 1973).

La presencia de actividad viral fue reconocida por ECP a las 24 horas de infectados los cultivos con las secreciones orgánicas. En la Figura 1 se observa la morfología de una monocapa normal de un cultivo de RFB antes de ser infectada; El ECP consistió en redondeamiento y agrupamiento de las células en forma de racimos, acompañado de un aumento de la granularidad, reducción del tamaño celular y daño en la continuidad de la monocapa Figura 2.

El aislamiento en ambos tipo de muestras, sugiere que la reactivación viral fue seguida por una fase de viremia y excreción del virus en las secreciones naturales. Otra posibilidad es que el

virus haya estado latente por infecciones de tipo respiratorio o genital adquiridas previamente y que su localización estaba relacionada con la primoinfección, tal como lo señala Whetstone y Miller (1989), para quienes es posible obtener el aislamiento de dos virus que en forma latente infectan el mismo ganglio o ganglios diferentes.

#### AUMENTO DEL TITULO VIRAL

La primera titulación en RFB el título fue de 10<sup>3.5</sup> DITC 50/0.1 ml. y se incrementó al pasarlo a MDBK, haciéndose cada vez mayor la virulencia sobre las células aumentando su título Figura 3.

En la identificación por IFI los mejores resultados se obtuvieron en las laminillas fijadas a las 10 horas posinfección, en donde la fluorescencia específica se observó a nivel de la membrana nuclear. En laminillas fijadas en períodos de incubación posterior la

fluorescencia fue mayor a nivel citoplasmático, estos hallazgos coinciden con los obtenidos por otros autores y son atribuidos en parte al mayor conocimiento que se tiene del ciclo celular de las células MDBK (Góngora, 1993; Miller, 1991).

A pesar de que la purificación viral fué escasa, pues solo se em-

pleó clarificación, el aislamiento fué neutralizado en diluciones similares por los sueros reactivos a la cepa colorado. La identificación por ME no fué fácil y varias rejillas tuvieron que ser leídas, muy pocas partículas virales con cubierta o sin ella fueron reconocidas, su morfología y tamaño viral (180-200 nm) coincidían con

el virus estudiado, este resultado es consistente al no tener un virus demasiado purificado a pesar de concentrar la muestra por ultrafiltración antes de ser colocadas en las rejillas.

Así el uso de esta técnica no haya sido de gran valor en este estudio, la microscopia electrónica debe seguir siendo usada

como prueba de rutina en la identificación de virus de importancia que afectan la salud animal tal como lo señala (Gibbs et al, 1980) para quienes el valor de esta técnica es mayor cuando se tienen muestras con  $10^4$  partículas virales o más.

## BIBLIOGRAFIA

- BITSCH, V. Infectious bovine rhinotracheitis virus infection on bulls, with special reference to preputial infection. *Applied Microbiology* 26, 3:337-343, 1973.
- BWAGAMOI, O.; KAMINJOLO, J. S. Isolation of IBR/IPV virus from semen and skin lesions of bulls at Kabete, Kenya. *Zentralb Veterinarmed [B]* 18: 262-269, 1971.
- CARNERO, R. Fiebre porcina africana. Serie: Salud animal. Publicación Científica No. 3. Instituto Interamericano de Cooperación para la agricultura, IICA. San José, Costa Rica, pp. 176-185, 1982.
- CORTES, E. C. Seroneutralización para Diarrea Viral Bovina In: Curso Latinoamericano Teórico-práctico de actualización en Inmunología Veterinaria. Organización Panamericana de la Salud, OPS., Instituto Nacional de Investigaciones, forestales y agropecuarias de México, Instituto Colombiano Agropecuario, ICA. Bogotá (Colombia), agosto 1-12, 1988.
- DAVIES, D. H. and DUNCAN, J. R. The pathogenesis of recurrent infections with infectious bovine rhinotracheitis virus induced in calves by treatment with corticosteroids. *Cornell Vet.* 64:340-366, 1974.
- DENNETT, D. P.; ALLAN, J. P. and JHONSON, R. H. The use of corticosteroids to aid detection of bulls carrying infection bovine rhinotracheitis virus. *Austr. Vet. Jour.* 49:594-595, 1973.
- DONKERSGOED, J. V. and BABUIK, L. A. Diagnosing and managing the respiratory form of infectious bovine rhinotracheitis. In: Symposium on IBR virus. *Veterinary Medicine*, 1991.
- GEORGE, L. W. Understanding the encephalitic form of infectious bovine rhinotracheitis. *Veterinary Medicine* 335-337, 1991.
- GIBBS, E. P. J.; SMALE, C. J.; VOYLE, C. A. Electron microscopy as an aid to the rapid diagnosis of virus diseases of veterinary importance. *Veterinary Record*. 106:451-458, 1980.
- GOFFAUX, M.; HARLAY, T. and ALLIETA, M. Occurrence of IBR/IPV virus in semen of A.I. bulls. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 83: 544-547, 1976.
- GONGORA, O. A. Dignóstico de las principales enfermedades reproductivas en toros de la Sabana de Bogotá. Enfoque en rinotraqueitis infecciosa bovina. Tesis M.Sc. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia, 1993.
- GRATZEK, J. B.; JENKINS, R. A.; PETER, C. P.; RAMSEY, F. K. Isolation and characterization of a strain of infectious bovine rhinotracheitis virus associated with enteritis in cattle: Comparative developmental study by fluorescent antibody tracing and electron microscopy. *Am. J. Vet. Res.* 27, 121: 1573-1582, 1966.
- GREIG, A. S. and BANNISTER, G. L. Infection of the bovine udder with bovine herpesvirus. *Can. J. Comp. Med.* 29:57-62, 1965.
- GRIFFITHS, J.; GALLEGO, M. I. y VILLAMIL, L. C. Factores de infertilidad y pérdidas económicas en ganado de leche en Colombia. Documento ICA-ANALAC, mayo, 1982.
- HAMMERSCHMIDT, W.; LURZ, R.; LUDWIG, H. and BUHK, HANS-JORG. Recombination of genomic terminus of bovine herpesvirus-1 with cellular DNA. *Journal of General Virology*. 71:2043-2051, 1990.
- HARE, W. C. D. Infectious diseases transmission by semen, In: Disease Transmissible by semen and embryo transfer techniques. Technical series No. 4 Office International Epizooties, 1982.
- HOMAN, E. J. and EASTERDAY, B. C. Isolation of bovine herpesvirus-1 from trigeminal ganglia of clinically normal cattle. *Am. J. Vet. Res.* 41:1212-1213, 1980.
- HUCK, A. R.; MILLAR, P. G. and EVANS, D. H. Penoposthitis associated with infectious pustular vulvovaginitis (IBR/IPV) virus in a stud of bulls. *Veterinary Record*. 88: 292-297, 1971.
- INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO, ICA. División de Insumos Pecuarios, 1993.
- JANSEN, E. D.; SMART, J. N. and NICHOLSON, H. H. Observations on an outbreak of infectious bovine rhinotracheitis in a bull test station. *Can. Vet. J.* 21: 24-27 1980.
- KUPFERCHMIED, H. U.; KIHM, U.; BACHMANN, P.; MULLER, K. H. and ACKERMANN, M. Transmission of IBR/IPV virus in bovine semen: A case report. *Theriogenology*. 25, 3:439-443, 1986.
- LOMBA, F.; BIENFET, V.; WELLMANS, G. IBR virus and occurrence of metritis at parturition in the bovine belgian blue white breed. *Br. Vet. J.* 132:178-181, 1976.
- MILLER, J. M. The effects of IBR virus infection on reproductive function of cattle. In: Symposium on IBR virus. *Veterinary Medicine* 95-98, 1991.
- PARRA, J. L. Influencia de la infección por Diarrea viral bovina en el comportamiento productivo de cuatro hatos lecheros de la Sabana de Bogotá. Tesis Msc. Universidad Nacional. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 1994.
- RODRIGUEZ, T. G. Microscopía electrónica de la infección viral. Instituto Nacional de Salud. Bogotá Colombia, 1983.
- ROIZMAN B. and BATTERSON, W. Herpesvirus and their replication. *Virology*, Edited by B.N. Fields et al. Raven Press, New York, 1985.
- SCHIPPER and CHOW, T. L. Detection of infectious bovine rhinotracheitis (IBR) by immunofluorescence. *Can. J. Comp. Med.* 32:412-415. 1968.
- SIMARD; NADON, F.; SEGUIN, C.; LABOISSIERE, S.; TRUDEL, M. Genomic heterogeneities in bovine herpesvirus type 1 viral isolates: A major variant select from a field isolate. *Intervirology* 32: 117-126, 1991.

STRAUB, O. C. Descubrimiento, transmisión y diagnóstico de la IBR/IPV. *In*: Simposio sobre leucosis viral bovina y rinotraqueitis infecciosa bovina. Proyecto "Mejoramiento genético y nutrición del ganado bovino" Convenio MAG-UNAGTZ. Costa Rica, 1990.

THIELSCHER, H. H. and WILHELM HUTH, F.; IBR/IPV: Vaccination or eradication?

Animal Research and Development 25:97-108, 1987.

THIRY E.; PASTORET P.; DESSY-DOIZE C.; HANSEN C. Herpesvirus in infertile bull's testicle. *Veterinary Record* 420, 1981.

VILLATE, J. E. Inmunofluorescencia. *In*: Curso latinoamericano teorico-práctico de actualización en inmunología veteri-

naria. Organización Panamericana de la Salud, OPS; Instituto Nacional de investigaciones forestales y agropecuarias de México, Instituto Colombiano Agropecuario, ICA 147-153, Bogotá (Colombia), agosto, 1988.

WHESTONE, C. A.; MILLER, J. M.; BORTNER, D. M. and VANDER MATEN, M. J. Changes in the bovine herpesvirus 1 genome during acute infec-

tion, after reactivation from latency, and after superinfection in the host animal. *Arch. Virol.* 106:261-279, 1989.

\_\_\_\_\_. Two different strains of an alphaherpesvirus can establish latency in the same tissue of the host animal: evidence from bovine herpesvirus 1. *Arch. Virol.* 107:27-34, 1989.

## UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y DE ZOOTECNIA

### CURSOS DE EXTENSION 1995

INVENTARIOS Y ESTADOS FINANCIEROS  
EN EL SECTOR AGROPECUARIO

Junio 5-7

INDICADORES FINANCIEROS

Junio 8-9

SEMINARIO INTERNACIONAL "LA MEDICINA VETERINARIA  
EN EL CONTEXTO DE LA SALUD PUBLICA"

Junio 21-22

CURSO INTERNACIONAL DE ENFERMEDADES EXOTICAS

Julio 24-28

GENETICA CELULAR EN ESPECIES SILVESTRES

Agosto 24-25

SEMINARIO INTERNACIONAL DE COCCIDIOSIS  
Y VIROLOGIA AVIAR

Septiembre 25-29

CURSO DE ACTUALIZACION  
EN VIROLOGIA VETERINARIA

Octubre 18-20

CURSO INTERNACIONAL DE DESARROLLO  
AGROINDUSTRIAL PARA EL SECTOR RURAL


Octubre 23-27

GERENCIA EMPRESARIAL EN EL SECTOR PECUARIO

Agosto 8-9  
Noviembre 26-29

### INFORMES

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

 368 1294 - FAX 368 1330

---

# **NORMAS PARA LA PUBLICACION DE ARTICULOS EN LA REVISTA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

---

1. La revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia acepta para su publicación artículos sobre investigaciones científicas y desarrollos tecnológicos originales e inéditos en las diferentes disciplinas relacionadas con la Medicina Veterinaria y la Zootecnia.

En este sentido, se entiende por documento inédito el que haya sido preparado especialmente para publicación en la revista.

2. El Comité Editor de la revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia se reserva los derechos de impresión, reproducción total o parcial del material, así como el aceptarlo o rechazarlo; igualmente se reserva el derecho de hacer cualquier modificación editorial que se estime conveniente. En tal caso, el autor recibirá una fotocopia del manuscrito modificado para su aprobación. Esta fotocopia debe devolverse al Comité Editor antes de la fecha indicada en la carta remisoría para que pueda ser publicado en la fecha programada.

3. Las propuestas para publicación se deben regir por las siguientes normas:

- 3.1. Remitir un original y una copia en disquete de 3.5' (90mm), procesado en Word Perfect 5.1 o 6.0. Se emplearán tipos estándares comunes como Times, Roman o similares de 12 puntos. El original irá escrito a doble espacio, en papel tamaño carta (220mm por 280mm), con márgenes de 30mm. Irán escritos en una sola cara de la hoja y las páginas numeradas consecutivamente. La impresión debe ser en calidad láser o similar.

- 3.2. El título debe ser explicativo del artículo, ir escrito en mayúsculas y preferiblemente no tener una longitud superior a 80 caracteres incluyendo espacios.

- 3.3. En toda propuesta debe presentarse el autor o los autores: nombre, formación académica, cargo actual e instituciones a las que está vinculado.

- 3.4. La extensión máxima del artículo propuesto será de 12 páginas, incluyendo gráficas y tablas que cumplan las especificaciones anteriores.

- 3.5. El trabajo debe ir acompañado de un resumen de máximo 200 palabras.

- 3.6. Las tablas e ilustraciones deben estar técnicamente elaboradas. Las ilustraciones deben presentarse en hojas individuales en impresión calidad láser o elaboradas en díngrafo. Las tablas e ilustraciones irán numeradas con números arábigos, según el orden de aparición.

- 3.7. Las fotografías deben presentarse en blanco y negro y en papel brillante y acompañadas por los negativos correspondientes.

- 3.8. Las referencias bibliográficas se incluirán al final del artículo, clasificadas por orden alfabético (no numeradas) de acuerdo a las siguientes normas:

--Apellido de los autores en mayúscula seguido por las iniciales de sus nombres, título del artículo o libro, datos de la revista (si es artículo), datos de la editorial, ciudad, año, páginas (si es artículo).

--En el texto las referencias se deben citar nombrando el apellido del autor y el año de publicación. Si los autores son más de tres, en el texto cite solo al primero, seguido por la expresión "et. al."

- 3.9. Un artículo no debe estar sometido simultáneamente a consideración de ninguna otra revista.

4. En la carta remisoría de la propuesta se debe incluir el número de teléfono (Fax), y dirección del autor.

5. Las propuestas deben ser enviadas a:

**COMITE EDITORIAL**  
**REVISTA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y DE ZOOTECNIA  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
APARTADO AEREO 14490  
FAX: 368 1330  
SANTAFE DE BOGOTA, D.C., COLOMBIA