

Analecta Veterinaria

Publicación de la Facultad de Ciencias Veterinarias

Volumen 18 N° 1/2 1998



Universidad Nacional de La Plata



*Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Veterinarias*

ANALECTA VETERINARIA

ANALECTA VETERINARIA vol.18 n° 1/2, 1998

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

Autoridades

Decano

Méd.Vet. Eduardo Rafael Pons

Vicedecano

Dra. María Elisa Etcheverrigaray

Secretario Académico

Méd.Vet. Juan Carlos Chiaravalli

Secretario de Postgrado

Dra. Pilar Peral García

Secretario de Extensión Universitaria

Dra. Cecilia Di Lorenzo

Secretario de Ciencia y Técnica

Dr. Edgardo Noseto

ANALECTA VETERINARIA

Director

Dr. Nestor Oscar Stanchi

Editor Responsable

Dr. Eduardo Marotta

Secretario de Redacción

Méd. Vet. Daniel O. Arias

Comité editorial

Dra. Liliana Lagrecca

Dr. Eduardo Gimeno

Bact. Carlos Gómez

Dr. Florestán Maliandi (h)

Dr. Pablo E. Martino

Méd.Vet. Enrique Pennimpe

Dra. Pilar Peral García

Responsable Versión Electrónica

Méd.Vet. Santiago Corva

ISSN 0365-5148 Versión Impresa
ISSN 1514-2590 Versión Electrónica
Registro Propiedad Intelectual 77383
Dirección postal:
CC 296 (1900) La Plata,
Buenos Aires, ARGENTINA

La revista ANALECTA VETERINARIA es una publicación semestral de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Está destinada a la difusión de trabajos científicos en el campo de las Ciencias Veterinarias, generados en esta Unidad Académica y en otras instituciones. Asimismo, reflejará las actividades académicas de postgrado y de extensión que se desarrollan en esta Casa de Estudio. ANALECTA VETERINARIA está indizada en el Índice Latinoamericano de Revistas Científicas.

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

Queda prohibida la reproducción total o parcial por cualquier metodología actual o a crearse del material impreso en esta revista sin el consentimiento expreso del Editor. Autorizada la reproducción con fines académicos-docentes mencionando la fuente. El uso de nombres comerciales está destinado únicamente para la identificación y no implica el respaldo directo, o indirecto del Ministerio de Salud de la Nación Argentina ni de los países respectivos de donde provengan los trabajos. Tampoco se garantizan ni respaldan los productos promocionados en los avisos de publicidad.

Acceso Electrónico a ANALECTA VETERINARIA

Si tiene acceso a INTERNET, puede recuperar la revista electrónicamente y en forma gratuita mediante el protocolo de traslado de archivo (File Transfer Protocol) (FTP anónimo). Los números de la revista a partir del Volumen 18 están disponibles en formato de archivo: pdf (Adobe Acrobat Reader®) siendo idéntica a la versión impresa de la revista y puede imprimirse en cualquier impresora que permita diferenciar escala de grises o colores. Se recomienda que la misma posea un resolución mínima de 600 x 600 dpi.

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

Costa E.F. y col. Alteraciones en la diferenciación y proliferación celular cutánea en bovinos, inducidas por Hipervitaminosis D de origen vegetal. *Analecta Veterinaria (VE)* 1998; 18,1/2: 7-13 (7 pantallas). Recuperable de: <http://www.fcv.medvet.unlp.edu.ar/publicaciones/analecta.htm>

Dirección electrónica:

Puede recuperar la revista accediendo a la página en la **Web**
<http://www.medvet.unlp.edu.ar/publicaciones>

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

Si tiene dificultades para recuperar la revista electrónicamente envíe un mail a:
sgcorva@fcv.medvet.unlp.edu.ar

Supervisión de Estilo

Méd.Vet.Julio Bernal
Prof.Nora B. Vázquez

Impreso en Argentina
Printed in Argentina

ANALECTA VETERINARIA Vol 18 N° 1/2

Contenido

Artículos de Investigación

- IMPORTANCIA DE LOS ANIMALES ACUMULADORES DE PARÁSITOS (WORMY ANIMALS) EN REBAÑOS DE OVINOS Y CAPRINOS NATURALMENTE INFECTADOS
G. Morales C, L. A. Pino, E. Sandoval, L. G. de Moreno 1-6
- ALTERACIONES EN LA DIFERENCIACIÓN Y PROLIFERACIÓN CELULAR CUTÁNEA EN BOVINOS, INDUCIDAS POR HIPERVITAMINOSIS D DE ORIGEN VEGETAL
E.F. Costa, E.L. Portiansky, A.R. Massone, F.P. Marino, J.R. Idiart, E.J. Gimeno 7-13
- MASTOCITOS AZUL ALCIANO POSITIVOS EN LA MUCOSA DEL CIEGO DE CONEJOS NORMALES Y ESPLENECTOMIZADOS, SENSIBILIZADOS Y DESAFIADOS CON OVOALBÚMINA
N. Bassan, M. Vinuesa, F. Perez, S. Roma, S. Bernardi, M. Lagrutta 15-20
- CARACTERIZACIÓN DE LAS EXPOSICIONES POR MORDEDURAS DE ANIMALES EN LA CIUDAD DE LA PLATA Y ALREDEDORES
C.F. Amasino, O.E. González, M.I. Urrutia, L.S. Fuentes 21-28
- CARACTERIZACIÓN ENTEROTOXIGÉNICA Y ESTUDIO DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* AISLADAS DE CERDOS CON CUADROS CLÍNICOS DE DIARREA PRE Y POSDESTETE
F. Moredo, G. Vigo, M. Sanz, J. Aguirre, A. Armocida, C. Perfumo 29-33
- VIRUS HERPES EQUINO TIPO 1 (EHV-1): PATRONES DE RESTRICCIÓN DE ADN, PERFILES PROTEICOS Y ESTUDIO DE PATOGENICIDAD EN RATONES
C.M. Galosi, M.G. Echeverría, M.V. Vila Roza, V. Cid de La Paz, G.A. Oliva¹, M.E. Etcheverrigaray 35-40
- AISLAMIENTO DE *MYCOPLASMA SYNOVIAE* DE POLLOS PARRILLEROS Y GALLINAS REPRODUCTORAS PRIMERA COMUNICACIÓN EN LA REPÚBLICA ARGENTINA
R. O. Cerdá, J. A Xavier, M. A. Petruccelli, M. E. Etcheverrigaray 41-46
- VALORES HEMATOLÓGICO DE REFERENCIA EN TORTUGA TERRESTRE ARGENTINA (*Chelonoidis chilensis chilensis*)
J.C. Troiano, M.C. Silva 47-51
- PURIFICACIÓN DE VACUNA ANTIRRÁBICA POR EXTRACCIÓN LIPÍDICA
J. De Filippo, C.C. Paolazzi 53-58
- Artículos de Revisión**
- ALGUNOS ASPECTOS DE LA DISPLASIA DEL CODO DE LOS CANINOS
E.J. Durante, M.C. Brusa 59-70
- DETERMINACIONES HORMONALES
M.C. Gobello, O.A. Brown, J.R. Rondero 71-81
- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE LÍQUIDO SINOVIAL. NUEVOS ASPECTOS RELACIONADOS A LOS PROTEOGLICANOS Y GLICOSAMINOGLICANOS
G. E. Lasta 83-98

ANALECTA VETERINARIA Vol 18 N° 1/2

Contents

Research articles

- EVIDENCE FOR DIFFERENTIAL PREDISPOSITION TO GASTROINTESTINAL STRONGYLID WITHIN ADULTS EWES AND GOATS NATURALLY INFECTED
G. Morales C, L. A. Pino, E. Sandoval, L. G. de Moreno 1-6
- EFFECTS OF PLANT INDUCED HYPERVITAMINOSIS D ON CUTANEOUS STRUCTURE, CELL DIFFERENTIATION AND CELL PROLIFERATION, IN CATTLE
E.F. Costa, E.L. Portiansky, A.R. Massone, F.P. Marino, J.R. Idiart, E.J. Gimeno 7-13
- MUCOSAL ALCIAN BLUE POSITIVE MAST CELLS IN CECUM FROM NORMAL AND SPLENECTOMIZED RABBITS SENSITIZED AND CHALLENGED WITH OVA
N. Bassan, M. Vinuesa, F. Perez, S. Roma, S. Bernardi, M. Lagrutta 15-20
- HARACTERIZATION OF THE EXPOSITIONS CAUSED BY ANIMAL BITES IN THE CITY OF LA PLATA AND SURROUNDINGS
C.F. Amasino, O.E. González, M.I. Urrutia, L.S. Fuentes 21-28
- ENTEROTOXIGENIC CHARACTERIZATION AND *IN VITRO* ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF *ESCHERICHIA COLI* ISOLATED FROM PIGS WITH CLINICAL SIGNS OF PRE AND POSTWEANING DIARRHOEA
F. Moredo, G. Vigo, M. Sanz, J. Aguirre, A. Armocida C. Perfumo 29-33
- EQUINE HERPESVIRUS TYPE 1 (EHV-1): RESTRICTION FRAGMENT PATTERNS, POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS PROFILES AND PATHOGENICITY IN BABY MICE
C.M. Galosi, M.G. Echeverría, M.V. Vila Roza, V. Cid de La Paz, G.A. Oliva, M.E. Etcheverrigaray 35-40
- ISOLATION OF *MYCOPLASMA SYNOVIAE* FROM BROILER CHICKENS AND BREEDERS. FIRST REPORT IN ARGENTINA
R. O. Cerdá, J. A Xavier, M. A. Petruccelli, M. E. Etcheverrigaray 41-46
- REFERENCE HEMATOLOGICAL VALUES IN ARGENTINIAN TERRESTRIAL TURTLE (*Chelonoidis chilensis chilensis*)
J.C. Troiano, M.C. Silva 47-51
- PURIFICATION OF RABIES VACCINE BY LIPIDIC EXTRACTION
J. De Filippo, C.C. Paolazzi 53-58
- Review articles**
- ASPECTS OF ELBOW DYSPLASIA IN DOGS 59-70
E.J. Durante, M.C. Brusa
- HORMONAL DETERMINATIONS 71-81
M.C. Gobello, O.A. Brown, J.R. Rondero
- BIBLIOGRAPHIC REVISION OF SYNOVIAL FLUID. NEW ASPECTS RELATED WITH PROTEOGLYCANS AND GLYCOSAMINOGLYCANS 83-98
G. E. Lasta

IMPORTANCIA DE LOS ANIMALES ACUMULADORES DE PARÁSITOS (WORMY ANIMALS) EN REBAÑOS DE OVINOS Y CAPRINOS NATURALMENTE INFECTADOS

G. Morales C¹, L. A. Pino¹, E. Sandoval²,
L. G. de Moreno¹

¹Laboratorio de Parasitología. Instituto de investigaciones Veterinarias, CENIAP-FONIAP.

²Centro de Investigaciones Agropecuarias del Estado Yaracuy, FONIAP, San Felipe, Venezuela

RESUMEN: Una encuesta helmintológica llevada a cabo mediante análisis coprológico cuantitativo y necropsias parasitarias a un total de 72 ovinos y 72 caprinos adultos provenientes de la localidad de Pedregal, Edo Falcón, Venezuela, reveló que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las prevalencias de strongilos digestivos, *Strongyloides papillosus*, *Moniezia expansa* y *Trichuris ovis*, en los ovinos y caprinos muestreados. Así mismo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los conteos de huevos por gramo (hpg) de strongilos digestivos. La disposición espacial de los vermes y del hpg fue en agregados. Los más altos conteos de hpg y las mayores cargas de vermes fueron albergadas por sólo el 15,3% de los hospedadores, quienes a similitud del concepto usado en parasitología humana, podrían ser denominados «acumuladores de parásitos» o «Wormy animals». Se discuten las medidas de control a aplicar, considerando el tratamiento diferencial de los animales de acuerdo a la carga, considerando criterios como la predisposición individual a las infecciones parasitarias.

PALABRAS CLAVES: Nematodos, strongilos digestivos, ovejas, cabras, predisposición diferencial, acumuladores de parásitos, agregación.

EVIDENCE FOR DIFFERENTIAL PREDISPOSITION TO GASTROINTESTINAL STRONGYLID WITHIN ADULTS EWES AND GOATS NATURALLY INFECTED

ABSTRACT An helminthological survey of 72 adult ewes and 72 adults goats coming from the locality of Pedregal (Falcón state, Venezuela) based on coprological and post-mortem examination with isolation of gastrointestinal worms, was carried out. The results obtained showed that there were no significant differences between goats and sheep in relation to the faecal nematode egg per gram count (Epg) and prevalence of gastrointestinal helminths. The spatial disposition of the strongylid worm burden and epg count were of contagious type and the highly epg count and strongylid worm burden were harbored by only the 15.3% of the hosts. The control of the strongylids parasites is discussed in the context of targeting drug treatment at the wormy animal segments of the flock.

KEY WORDS: Nematode, Strongylids, ewes, goats, «wormy.animal» differential predisposition, overdispersion.

INTRODUCCIÓN

El parasitismo gastrointestinal constituye una de las patologías más importantes de los pequeños rumiantes, por ser responsable de la disminución de la fertilidad y muerte de animales jóvenes (Mandonnet, 1995), además de tener efectos negativos sobre la tasa de crecimiento y la producción de leche y lana, como consecuencia de los trastornos fisiológicos que ocasiona (Gruner y Cabaret, 1985). Afortunadamente, la intensidad del parasitismo no es similar en todos los animales de un rebaño, ya que la agregación de los parásitos en el seno de la población de hospedadores es un hecho común que se traduce en que tan sólo una minoría de los individuos parasitados concentra las mayores cargas de vermes (Cabaret y Morales, 1983; Barger, 1985; Morales, 1989), lo cual está asociado a la predisposición individual, a su vez relacionada con factores como edad, sexo, estado fisiológico, constitución genética e interacción de condiciones ambientales-receptividad del hospedador (Kennedy, 1975; Wakelin, 1985; Morales et al., 1986).

Los individuos más receptivos o susceptibles a los parásitos son de una gran importancia epidemiológica por su rol como contaminadores ambientales, por lo cual es de sumo interés su identificación en el rebaño, para el desarrollo de estrategias de control de las parasitosis, en vista de que su tratamiento selectivo garantizaría la remoción de un alto porcentaje de parásitos del sistema hospedador-parásito y por ende, una drástica disminución de la contaminación ambiental con las formas de diseminación de dichas comunidades de parásitos (Crofton, 1971; Morales, 1989).

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El presente trabajo se llevó a cabo con animales provenientes de Pedregal (70° 7' N; 11° 2' W), Estado Falcón, Venezuela. Esta localidad está a una altitud de 158 m sobre el nivel del mar, tiene una baja precipitación (\bar{X} = 34,12 mm/mes) y una temperatura promedio mensual de 29,9 °C.

Métodos Parasitológicos

Necropsia parasitaria: Para este estudio se colectó un total de 144 tractos gastrointestinales de hembras adultas (72 ovejas y 72 cabras), sacrificadas en el Matadero de la ciudad de Coro (Estado Falcón, Venezuela).

Las vísceras fueron colocadas en bolsas plásticas debidamente y llevadas en cavas refrigeradas al laboratorio, en donde se conser-

varon en congelación hasta el momento de su procesamiento mediante técnicas clásicas (Skerman y Hillard, 1966; Morales y Pino, 1977).

Se examinó el volumen total de cada compartimiento en ovejas y cabras mediante la prueba de «U» de Mann y Whitney (Morales y Pino, 1995).

En vista de que uno de los objetivos del trabajo era evaluar si existían diferencias entre ambos hospedadores como contaminadores ambientales con huevos de estrongilos digestivos, se consideraron únicamente los animales positivos a este grupo de parásitos.

RESULTADOS

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las prevalencias establecidas por coproscopía para estrongilos digestivos, *Strongyloides papillosus*, *Moniezia expansa*, *Trichuris ovis* (Tabla N°1)

Tabla N°1 Prevalencias comparadas, establecidas mediante coproscopía, de las helmintiasis gastrointestinales en ovejas y cabras adultas infectadas en condiciones naturales

Helminthos parásitos	Prevalencia (%)		
	Ovejas	Cabras	J ²
Estrongilos digestivos	55,5	26,94	0,03 (N.S.)
<i>Strongyloides papillosus</i>	25,0	18,5	1,02 (N.S.)
<i>Trichuris ovis</i>	20,8	23,61	0,16 (N.S.)
<i>Moniezia expansa</i>	13,9	11,11	0,25 (N.S.)

J²: estadístico de prueba

En la Tabla N°2 se observa que la comparación de los conteos de huevos por gramo (hpg) de estrongilos digestivos entre las ovejas y las cabras estudiadas, no arrojó diferencias estadísticamente significativas.

Tabla N°2 Comparación del número de huevos por gramo de heces de estrongilos digestivos considerando únicamente a las ovejas y cabras positivas (Intensidad promedio).

Hospedador	N	IP	Mediana	P
Ovejas	40	966	500	0,36 (N.S.)
Cabras	41	902	300	

N: número de animales muestreados

IP: intensidad promedio

P: probabilidad

N.S.: no significativo

Tanto los huevos de estrongilos digestivos como los vermes de este grupo, presentaron valores bajos del coeficiente K, por lo que se concluye que ambos estaban sobredispersados en la materia fecal y en la población de hospedadores respectivamente (Tabla N°3).

Tabla N°3 Coeficiente de agregación (K) para los huevos (hpg) y los vermes de estrongilos digestivos en ovejas y cabras adultas infectadas en condiciones naturales y provenientes de la localidad de Pedregal, Estado Falcón (Venezuela).

Hospedador	N	K _{hpg}	K _{vermes}
Ovejas	72	0,301	0,046
Cabras	72	0,254	0,002

N: número de animales muestreados

El número de ovejas y cabras con cargas superiores a 1000 hpg de estrongilos digestivos resultó muy bajo (15,3 %) en ambas especies hospedadoras. Sin embargo, en ese bajo porcentaje de hospedadores se concentró el 86,97% de los hpg y el 85,8% de los vermes del mencionado grupo de parásitos en los ovinos, mientras que en los caprinos esos porcentajes fueron del 83,4% y 89,9% respectivamente (Tabla N°4).

Tabla N°4 Abundancias (\bar{X}) del número de huevos de estrongilos digestivos por gramo de heces y de vermes del mencionado grupo, en ovejas y cabras adultas infectadas en condiciones naturales y discriminadas de acuerdo a la condición de «acumuladores de parásitos» (AP) o «no acumuladores de parásitos» (NAP).

Hospedador	Número de huevos por gramo de heces			
	N.A.P. (N)	A.P. (N)	N.A.P. \bar{X}	A.P. \bar{X}
Ovejas	61	11	356,9	2159,0
Cabras	61	11	2573,0	290,0
Vermes				
Ovejas	61	11	371	55,6
Cabras	61	11	244,5	48,7

N: número de hospedadores muestreados.

DISCUSIÓN

Morales (1989) reportó para una zona árida de Venezuela que las comunidades de helmintos parásitos de ovinos y caprinos eran similares. Los resultados coproscópicos del presente trabajo indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las prevalencias de estrongilos digestivos, *Strongyloides papillosus*, *Trichuris ovis* y *Moniezia expansa*. De la misma manera al considerar la intensidad promedio de la carga parasitaria por estrongilos digestivos, tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas, lo cual es indicativo de que las heces de ovejas y cabras adultas, presentan una importancia similar como contaminadoras ambientales con huevos de estrongilos digestivos.

La distribución de frecuencias de las cargas parasitarias en la población de hospedadores tiene considerable importancia por sus efectos reguladores sobre el equilibrio hospedador-parásito (Anderson, 1982), estando dichas cargas sobredispersadas en el seno de la población hospedadora (Cabaret y Morales, 1983; Barger, 1985).

Se evidenció que tanto la carga en vermes como el número de hpg gastrointestinal para el establecimiento de la carga parasitaria por animal examinado. Los parásitos adultos fueron aislados con la ayuda de un estereomicroscopio (12X) e identificados al microscopio, mediante las claves diagnósticas suministradas por Ransom (1911) y Skerman y Hillard (1966). Las especies del Orden *Strongylida* aisladas fueron contadas y agrupadas bajo la denominación común de estrongilos digestivos.

Examen de la materia fecal:

A cada animal se le tomó una muestra de heces de la porción terminal del recto. Las mismas fueron etiquetadas y conservadas en refrigeración hasta su procesamiento en el laboratorio, mediante la técnica de Mc Master modificada, en la cual se empleó como líquido de dilución una solución sobresaturada de cloruro de sodio (Morales y Pino 1977).

Análisis de los datos:

Intensidad del parasitismo: para establecer el grado de infección se consideró el número de huevos de estrongilos digestivos (hpg) por gramo de heces.

Los animales fueron discriminados en dos grupos a) con conteos de hpg de estrongilos digestivos < 1000 y b) con conteos de hpg de estrongilos digestivos > 1000; estos últimos definidos como «animales acumuladores de parásitos» o «animales con parasitismo elevado».

Se realizó el cálculo de las siguientes estadísticas epidemiológicas:

Prevalencia: número de hospedadores positivos dividido entre el número de hospedadores examinados (Margolis et al., 1982).

Abundancia: media aritmética de la carga parasitaria (Margolis et al., 1982).

Sobredispersión: llamada también agregación, fue calculada para los estrongilos digestivos y sus huevos, mediante el uso del coeficiente «K», según fórmula suministrada por Southwood (1975) y Morales y Pino (1995). El índice «K» ha sido definido como el parámetro de contagio de la distribución binomial negativa (Rabinovich, 1980). Para su interpretación se considera que a mayor agregación o contagiosidad, le corresponden menores valores del mencionado índice, el cual se aproxima a cero cuando la distribución de frecuencias es altamente sobredispersada y al infinito en caso de distribuciones al azar (Grafen y Woolhouse, 1993).

Análisis estadístico: las prevalencias de los helmintos gastrointestinales (estrongilos digestivos, *Strongyloides* sp. *Trichuris ovis* y *Moniezia* spp, fueron comparadas mediante la prueba de Ji-cuadrado (Morales y Pino, 1995).

La comparación del número de huevos por gramo de heces presentes de estrongilos digestivos, presentaron valores muy bajos del coeficiente de agregación K, lo cual significa que ambas variables están sobredispersadas al interior de ambas poblaciones de hospedadores; lo cual es un reflejo de la heterogeneidad existente tanto en los hospedadores como en las poblaciones de parásitos, hecho que a su vez favorece la concentración de los parásitos en aquellos hospedadores que le son más favorables o más susceptibles. Esta situación se traduce en la práctica en que unos pocos hospedadores albergan las mayores cargas y el resto o está negativo o tiene bajas cargas (Crofton, 1971; Barger, 1985).

La heterogeneidad que fue observada en el presente caso en animales infectados en condiciones naturales, también ha sido señalada en animales inoculados experimentalmente con dosis iguales de formas infectantes de parásitos, en los cuales los conteos post inoculación presentaron una varianza superior a la media (Kennedy, 1975) hecho que se corresponde con una distribución binomial negativa (Cancela Da Fonseca, 1966), la cual provee una buena descripción empírica de la sobredispersión de los parásitos en el seno de la población de hospedadores (Anderson y Gordon, 1982; Morales, 1989; Cabaret y Morales, 1983). Estos individuos que dentro de la población de hospedadores albergan las mayores cargas parasitarias, tienen gran importancia en la dinámica de transmisión de las parasitosis, debido a que constituyen la mejor fuente de contaminación

ambiental y por consiguiente, de infección para otros hospedadores; pero también tienen interés estratégico, en efecto, su identificación dentro del rebaño es importante, pues serían los individuos blanco para el tratamiento selectivo y para ser monitoreados en los programas de control parasitario (Anderson, 1966; Morales, 1989).

Actualmente, los programas de control de las helmintiasis se realizan empleando productos de amplio espectro y bajo el sistema conocido como en masa, o sea tratando indiscriminadamente todo el rebaño, o en el mejor de los casos separando los animales por sexo o edad y suministrando a cada lote conformado la dosis correspondiente al animal más pesado, tal como fue propuesto por Besier y Hopkins (1988), lo cual además de ser antieconómico, aumenta la presión de selección de cepas resistentes a los antihelmínticos empleados (Gruner et al., 1986; Waller, 1986).

En un análisis teórico realizado por Anderson y May (1982) sobre las estrategias de control de infecciones helmínticas en humanos, plantean que el tratamiento selectivo del 8% de los individuos con cargas elevadas, conlleva a una reducción del 50% de la carga parasitaria a nivel poblacional, cuando los parásitos están altamente sobredispersados ($K= 0,05$). Los resultados del presente estudio reflejan una alta agregación de las cargas parasitarias tanto en ovejas como en cabras. Se observó además que un bajo porcentaje de hospedadores (15,3%) concentra las mayores cargas parasitarias. En consecuencia, su tratamiento garantizaría la remoción del sistema hospedador parásito, de un elevado porcentaje de vermes ocasionando una drástica reducción de la contaminación ambiental.

Si consideramos que el parasitismo helmíntico en rumiantes depende poco de la edad de los animales (Mandonet, 1995), y que en el rebaño existe gran variabilidad en las cargas parasitarias (Morales, 1989), se justifica plenamente el tratamiento selectivo de los animales receptivos e identificados como acumuladores de parásitos, que en similitud con los «wormy persons» de Anderson (1986), podemos definir como «wormy animals». El examen coproscópico periódico de dichos animales sería utilizado para establecer la frecuencia de los tratamientos selectivos, mediante el empleo de antihelmínticos con espectro de acción sobre las especies presentes en nuestro medio o al menos con efecto preferencial sobre las más dominantes y patógenas (Pino et al, 1986) y con acción prolongada, como las lactonas macrocíclicas (Bulman et al, 1995).

Los tratamientos selectivos de los animales más infectados se traducen en ventajas ta-

les como reducción de costos por uso de drogas, del porcentaje de efectos colaterales y de la presión de selección de cepas resistentes a los antihelmínticos (Barger, 1985). En el caso de los estrongilos digestivos que presentaron una fuerte agregación, el tratamiento efectivo del 15,37% del rebaño tanto en ovejas como en cabras, ocasionarla una reducción superior al 80% tanto en la carga verminosa como en la producción de huevos y en consecuencia de la contaminación ambiental que ellos ocasionan.

BIBLIOGRAFÍA

1. Anderson, R.. The population dynamics and epidemiology of intestinal nematode infections. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 1986; 80:686-96
2. Anderson, R. MAY, R. Population dynamics of human helminth infections: control by chemotherapy, *Nature* 1982; 297: 557-63
3. Anderson, R. Gordon, D. Processes influencing the distribution of parasite numbers within host population with special emphasis of parasite induced host mortalities. *Parasitology* 1982; 85:373-98
4. Bager, I. The statistical distribution of Trichostrongylids nematodes in grazing lambs. *International Journal for Parasitology* 1965; 15: 645-9
5. Besier, R. Hopkins, D.. Anthelmintic dose selection by farmers. *Australian Veterinary Journal* 1988; 65:193-4
6. Bulman, G., Caracostantologo J., Eddi, C., Ambrustolo, R., Muñoz, M., Morley, M., Shapiro, J. El control prolongado de los antihelmínticos: concepto, realidad e importancia de esta acción frente a los parásitos internos de bovinos y ovinos. *Revista ASOCRIA* 1995; 15:16-9
7. Cabaret, J. Morales, G. Stratégie comparée des infestations naturelles par *Teladorsagia circumcincta* et *T.trifurcata* chez les ovins. *Parasitologia* 1983; 25: 171-7
8. Cancela de Fonseca, J. L'outil statistique en biologie du sol. III. Indices d'inter'êt écologique. *Rev Ecol Biol Sol* 1966; 3:381-407
9. Crofton, H. A model of host parasite relationships. *Parasitology* 1971; 63: 343-64
10. Grafen, A.; Woolhouse, M. Does the negative binomial distribution add up? *Parasitology Today* 1993; 9: 475-7
11. Gruner, L. Cabaret, J. Currents methods for estimating parasite populations. Potential and limits to control gastrointestinal and pulmonary strongyles of sheep on pasture. *Livestock productions Science* 1985; 13:53-70
12. Gruner, L., Kerboeuf, D., Beaumont, C. Huber, J. Resistance to Benzimidazole of *Haemonchus contortus utkalensis* in sheep on Martinique. *Veterinary Record* 1986; 118: 276
13. Kennedy, C. Ecological animal parasitology. Blackwell Scientific Publications Gran Bretaña, 1975 p 163
14. Mandonnet, N. Analyse de la variabilité génétique de la résistance aux strongyles gastrointestinaux chez les petits ruminants. Eléments pour la définition d'objectifs et de critères de sélection en milieu temperé ou tropical. Thèse de Docteur en Sciences, Université Paris XI, Orsay, (Francia) 1995. 120 pp.
15. Margolis, L., Esch, G., Holmes, J., Kuris, A. Shad, G. The use of ecological terms in parasitology. *J Parasitol* 1982; 68:131-3
16. Morales, G. Epidemiología y sinecología de helmintos parásitos de ovinos y caprinos de zonas áridas del Estado Lara (Venezuela). *Rev Fac Ciens Vets UCV* 1989; 36: 9-52
17. Morales, G.; Pino, L.. Manual de diagnóstico helmintológico en rumiantes. Edit. Colegio de Médicos Veterinarios del Estado Aragua, Maracay (Venezuela) 1977p 100
18. Morales, G. Pino, L. Parasitometría Edit. Universidad de Carabobo, Valencia (Venezuela) 1995 p 224
19. Morales, G., González, L., Pino, L.A., Domínguez, J.; Parra, M. Caracterización eco-epidemiológica de los helmintos gastrointestinales presentes en bovinos de cuatro regiones de Venezuela. *Rev Facs Ciens Vets UCV*, 1986; 35: 77-91
20. Pino, L.A. Morales, G., Aldana, E., Perdomo, L., Molina, E. Caracterización microecológicas de los nematodos parásitos de ovinos de zonas áridas de Venezuela. (Un nuevo criterio para el control). *Rev Ibérica Parasitol* 1986; 46: 395-401
21. Rabinovich, J. Introducción a la ecología de poblaciones animales. CECSA (México), 1980. 313 PP.
22. Ransom, B. The nematode parasitic in the alimentary tract of cattle, sheep and other ruminants. Bulletin 127, U.S. Department of Agriculture (USDA), Washington (U.S.A.), 1911 p 132
23. Skerman, K., Hillard, J. A handbook for studies of helminth parasites of ruminants, F.A.O. Roma (Italia) 1966 p 196
24. Wakelin, D. Genetic control of immunity to helminth infections. *Parasitology Today* 1985. 1: 7-23.
25. Waller, P. Anthelmintic resistance in Australia. *Parasitology Today* 1986; 2: 16-8

ALTERACIONES EN LA DIFERENCIACIÓN Y PROLIFERACIÓN CELULAR CUTÁNEA EN BOVINOS, INDUCIDAS POR HIPERVITAMINOSIS D DE ORIGEN VEGETAL*

E.F. Costa^{1,2}, E.L. Portiansky², A.R. Massone², F.P. Marino²,
J.R. Idiart², E.J. Gimeno².

¹CEDIVE (Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias); ²Instituto de Patología. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata

RESUMEN: El «duraznillo blanco» (*Solanum glaucophyllum*, sinónimo *S. malacoxylon*) es el agente causal de la calcinosis enzoótica, una enfermedad caracterizada por la calcificación de los tejidos blandos. La planta es altamente tóxica para los bovinos y produce considerables pérdidas económicas en la Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay. En el resto del mundo se han encontrado otras plantas calcinogénicas que originan enfermedades similares. *S. glaucophyllum* contiene altos niveles de 1,25 dihidroxivitamina D₃. Los efectos de la Vitamina D₃ son importantes, no sólo en la homeostasis del calcio, sino también en la regulación inmune, el crecimiento y la diferenciación celular. En la piel, la vitamina D y sus metabolitos regulan el crecimiento y la diferenciación celular. En el presente trabajo, se analizaron la proliferación y la diferenciación celular en la piel, mediante la expresión inmunohistoquímica de citoqueratinas, involucrina y antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). Los resultados fueron objetivamente obtenidos mediante el procesamiento y análisis de imágenes y estadísticamente evaluados. Los bovinos intoxicados con *S. glaucophyllum* mostraron una marcada disminución del espesor epidérmico, atrofia de los folículos pilosos y de las glándulas, tanto sebáceas como sudoríparas. La proliferación celular, evaluada por la expresión del PCNA, no se presentó disminuida. Los marcadores de diferenciación, tales como involucrina y citoqueratinas 10 y 11, modificaron su expresión por efecto de la intoxicación con *S. glaucophyllum*. Los resultados parecen indicar que el adelgazamiento de la epidermis no se debe a un bloqueo en la proliferación de células basales, sino que sería atribuible a una estimulación de la diferenciación terminal de los queratinocitos suprabasales. Por lo tanto, los mencionados cambios cutáneos, deberían ser considerados en la patología de la calcinosis enzoótica.

PALABRAS CLAVE: Calcinosis enzoótica, *Solanum glaucophyllum*, atrofia cutánea, diferenciación celular, proliferación celular.

EFFECTS OF PLANT INDUCED HYPERVITAMINOSIS D ON CUTANEOUS STRUCTURE, CELL DIFFERENTIATION AND CELL PROLIFERATION, IN CATTLE

ABSTRACT: *Solanum glaucophyllum* (synonym *S. malacoxylon*) is a plant toxic for cattle due to its high levels of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ as glycoside derivatives. *S. glaucophyllum* causes a disease characterized by wasting and calcification of soft tissues. Other calcinogenic plants produce similar diseases in different countries. The effects of vitamin D are not only important in calcium homeostasis, but also in immune regulation, cell growth, and cell differentiation. In the skin, vitamin D and its metabolites regulate the growth and differentiation of keratinocytes. We had analyzed histologically the skin in *S. glaucophyllum* -intoxicated and in control heifers. Cellular differentiation and proliferation were analyzed by immunohistochemical expression of cytokeratins, involucrin, and PCNA. The results were objectively obtained by image processing and analysis and statistically evaluated. *S. glaucophyllum* -intoxicated cattle showed atrophy of epidermis, and severe involution of hair follicles, sebaceous, and sweat glands. Cellular proliferation, as judged by PCNA expression, was not reduced. The analyzed markers of differentiation, e.g. involucrin and cytokeratins 10 and 11, changed in relation to *S. glaucophyllum* -poisoning. The present study indicated that the epidermal atrophy was the result of stimulation of a terminal differentiation of keratinocytes, and not due to a reduction of basal cell proliferation. Cutaneous changes should, therefore, be included in the pathology of the enzootic calcinosis.

KEY WORDS: Key words: Enzootic calcinosis, *Solanum glaucophyllum*, cutaneous atrophy, cell differentiation, cell growth.

*Este trabajo fue presentado en el «48 th. Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathology», Albuquerque, Nuevo México, EEUU, Noviembre de 1997. EJG y ELP son miembros de la Carrera del Investigador del CONICET.

Dirección para correspondencia: E.F. Costa, C.C. 296, (1900) La Plata, ARGENTINA.
E-mail: nono@fcv.medvet.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

El *Solanum glaucophyllum* (sinónimo *S. malacoxylon*) es el agente causal de una enfermedad denominada calcinosis enzoótica, caracterizada principalmente, por la calcificación de tejidos blandos. La planta es altamente tóxica para el ganado bovino y causa considerables pérdidas económicas en Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay (Okada et al., 1977; Puche y Bingley, 1995). En otras latitudes, diversos herbívoros desarrollan enfermedades similares debido a otras plantas calcinogénicas (Morris, 1978). Esto ocurre porque el *S. glaucophyllum* contiene altos niveles de 1,25 dihidroxivitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃) (Haussler et al., 1976) y otros derivados de la vitamina D₃ (Esparza et al., 1982).

La piel ocupa un papel central en el metabolismo de la vitamina D; es la única fuente del colecalciferol o vitamina D₃ a partir del 7-dehidrocolesterol (Holick, 1981). Los queratinocitos no sólo producen vitamina D₃, sino también varios metabolitos relacionados: 1,25(OH)₂D₃, 24,25(OH)₂D₃ y 1,24,25(OH)₂D₃ (Bikle y Pillai, 1993). Diversas estructuras cutáneas contienen receptores para el 1,25(OH)₂D₃ y por lo tanto la piel es considerada un órgano blanco de la vitamina D (Eckert et al., 1997). Esos receptores han sido identificados especialmente en la vaina radicular externa de los folículos pilosos, y en menor cantidad, en los estratos granuloso, espinoso y basal de la epidermis. También se encuentran receptores para el 1,25(OH)₂D₃ en las células del bulbo piloso, vaina radicular interna y células basales de las glándulas sebáceas; sin embargo, no se presentan en el tejido conectivo dérmico (Stumpf et al., 1979).

Las células epidérmicas son programadas para proliferar y diferenciarse desde la capa de células basales hasta las células cornificadas muertas del estrato córneo. En un complejo proceso de transformación, los queratinocitos modifican su morfología y su composición química; las células del estrato espinoso inician la producción de citoqueratinas 10 y 11, las cuales son características de una mayor diferenciación celular epidérmica. En el estrato espinoso también se presenta una proteína denominada involucrina que constituye el substrato para la enzima transglutaminasa, responsable del eslabonamiento de la lisina ε-(γ-glutamil) de ese substrato dentro de una envoltura cornificada insoluble (Eckert et al., 1997; Suter et al., 1997).

La división celular puede estimarse, entre otros métodos, mediante la identificación "in situ" de marcadores de proliferación. Uno de ellos es el antígeno nuclear de proliferación ce-

lular (PCNA), un polipéptido intranuclear sintetizado principalmente durante la fase S del ciclo celular en todas las células de la piel (Lee y Hurwitz, 1990).

Los efectos de la vitamina D en la diferenciación y proliferación celular a nivel cutáneo, han sido extensamente analizados en condiciones normales y patológicas: osteopatías, psoriasis, cáncer, etc. (Clemens et al., 1983; Suda et al., 1986; Milde et al., 1991; Walters, 1992; Rice et al., 1992; Bikle y Pillai, 1993). El 1,25(OH)₂D₃ estimula su diferenciación terminal y disminuye la proliferación de los queratinocitos (Wu et al., 1996). No obstante, no se ha estudiado como se modifican esos procesos en casos de hipervitaminosis D.

La hipervitaminosis D de origen vegetal debería acelerar la diferenciación terminal de los queratinocitos y retardar la proliferación celular, lo que se traduciría en atrofia de diferentes estructuras de la piel. En el presente estudio se intenta demostrar esta hipótesis analizando la expresión de marcadores de diferenciación y de proliferación celular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectaron plantas de *S. glaucophyllum* en distintas áreas y se las secó a 37° C durante 48 horas; se separaron las hojas que fueron finamente molidas. Cuatro vaquillonas clínicamente sanas recibieron dos dosis semanales de 25 g de polvo de hojas de *S. glaucophyllum*, mientras que dos vaquillonas fueron usadas como control. El polvo de hojas se administró mediante sonda intrarruminal. Los animales fueron sacrificados después de 2, 4, 6 y 8 semanas de comenzada la experiencia. Durante la necropsia se tomaron muestras de piel de la región interescapular, se fijaron en formol neutro al 10% y se procesaron para histología e inmunohistoquímica empleando portaobjetos tratados con 3-aminopropiltriethoxisilano (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, USA). Se emplearon métodos de recuperación antigénica ya descritos (Portiansky et al., 1996; Portiansky et al., 1997: sonicación, calentamiento en horno de microondas y olla a presión) para recuperar la inmunorreactividad alterada por la fijación en formalina.

Para evaluar la diferenciación epidérmica se emplearon anticuerpos monoclonales anti-involucrina (Novocastra Laboratories Ltd, UK) 1:100 y anti-citoqueratinas 10 y 11 (K8.60, Sigma Chemical Co., USA) 1:3.000. La proliferación celular fue determinada utilizando un anticuerpo monoclonal contra PCNA (PC10, Sigma Chemical Co., USA) 1:3.000.

Para la detección inmunohistoquímica se

empleó el sistema del polímero marcado con peroxidasa (EnVision™ System, Dako Co., Carpintería, USA). Se utilizó diaminobencidina como cromógeno y los cortes fueron contrastados con hematoxilina.

Los resultados fueron valorados mediante el procesamiento y análisis de imágenes. Brevemente, las imágenes histológicas fueron capturadas por una cámara de video color (Sony, CCD cámara, Tokio, Japón) montada sobre un microscopio de luz (Olympus, Tokio, Japón) con un objetivo x40 y digitalizadas con un formato TIFF de 24 bits (RGB) mediante la utilización de un programa de análisis de imágenes específico (Image-Pro Plus for Windows v 3.0, Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA). La resolución espacial fue de 500 x 300 pixels, de forma tal de establecer la proporción de 0,32 mm/pixel. Luego de la calibración espacial y de intensidad de luz, se aplicó la operación de segmentación de color que permitió resaltar la porción de imagen que correspondía a la tinción inmunohistoquímica. Se procedió posteriormente al recuento del área inmunomarcada previamente resaltada, con discriminación de intervalos de densidad óptica de la reacción colorimétrica, definida por los complejos antígeno-anticuerpo (Wells et al., 1993).

Las mediciones histomorfológicas fueron llevadas a cabo sobre secciones seriadas. Se obtuvieron no menos de 10 imágenes de cada determinación experimental. Los valores obtenidos de los histogramas fueron exportados a una planilla de cálculo para realizar el análisis estadístico.

El análisis de la varianza fue utilizado para evaluar la significación entre los diferentes grupos. El método de Tuckey fue usado como una prueba de localización de la significación. Diferencias significativas entre los métodos de recuperación elegidos fueron definidas como aquellas con un valor probable $P < 0,05$. Diferencias altamente significativas fueron definidas como aquellas con un valor de $P < 0,01$. La significación de los estudios de densidad óptica fue determinada mediante la aplicación del test de t de las diferencias entre grupos apareados.

RESULTADOS

Los animales intoxicados mostraron la sintología clínica bien conocida en la calcinosis enzoótica, incluyendo la cobertura pilosa de aspecto áspero y descolorido (Puche y Bingley, 1995). A la necropsia, fue evidente la mineralización de tejidos blandos especialmente en aorta, corazón y pulmón, pero también en muchos otros órganos. Los huesos estaban extremadamente duros en los animales intoxicados durante 8 semanas. Microscópicamente fueron detectadas calcificaciones en varios tejidos. Estas observaciones corroboran las características bien conocidas de esta afección (Collier, 1927; Eckell et al., 1960; Okada et al., 1977; Morris, 1978; Puche y Bingley, 1995).

El análisis histológico de la piel demostró conspicuas diferencias entre los animales intoxicados y los controles: las vaquillonas afectadas por calcinosis enzoótica mostraron una marcada disminución del espesor epidérmico,

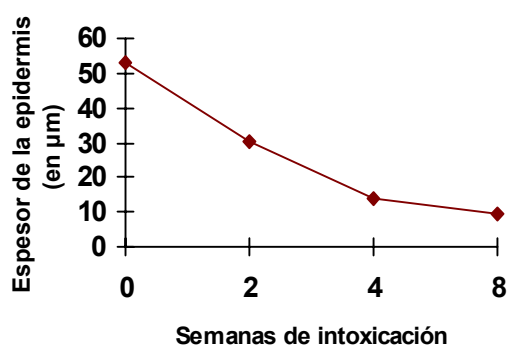


Gráfico N° I. Espesor de la epidermis viable. Las diferencias entre controles y animales intoxicados fueron altamente significativas.

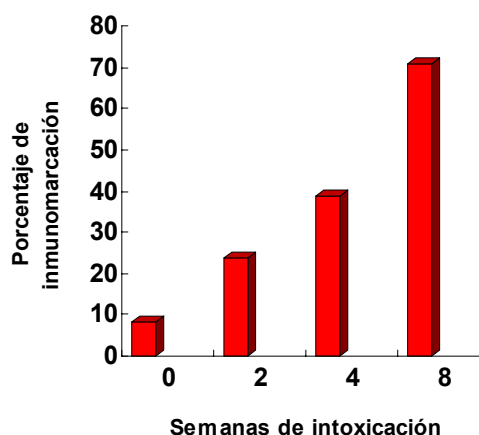


Gráfico N° II. Porcentaje de inmunomarcación de involucrina en células epidérmicas. Las diferencias entre los animales intoxicados y los controles fueron altamente significativas.

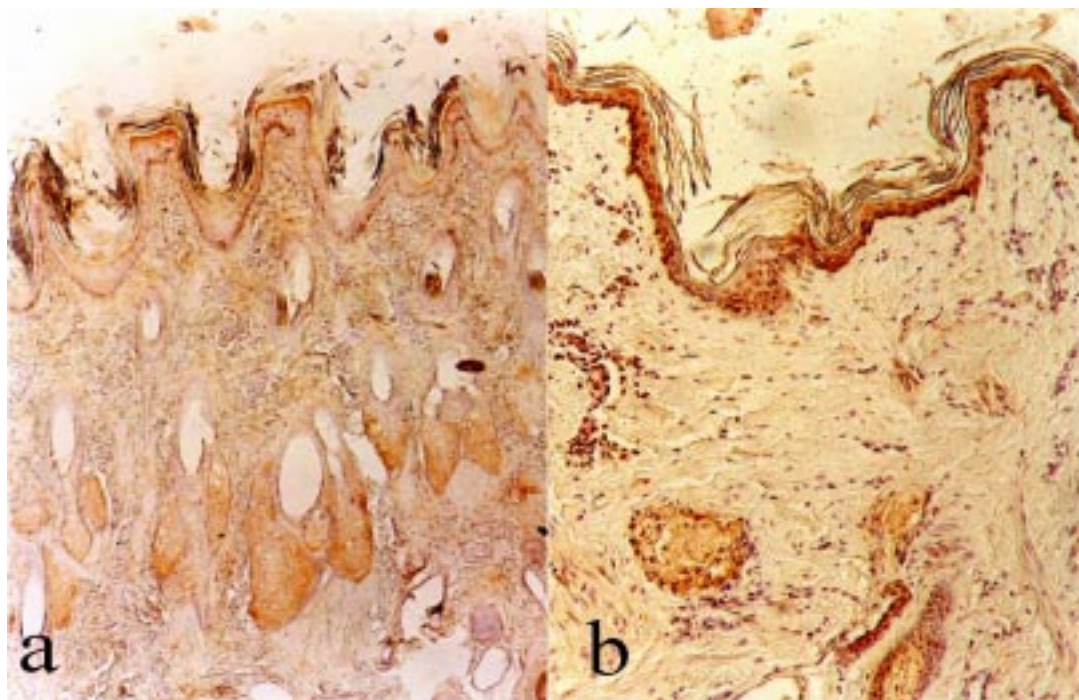


Foto N° I. Piel de un animal control (a) y después de 8 semanas de intoxicación con *S. glaucophyllum* (b). Nótese la reducción del espesor del epitelio y la atrofia pilosebácea. Marcación de involucrina (flechas) mediante un método indirecto de inmunoperoxidasa. Aumento: 100x.

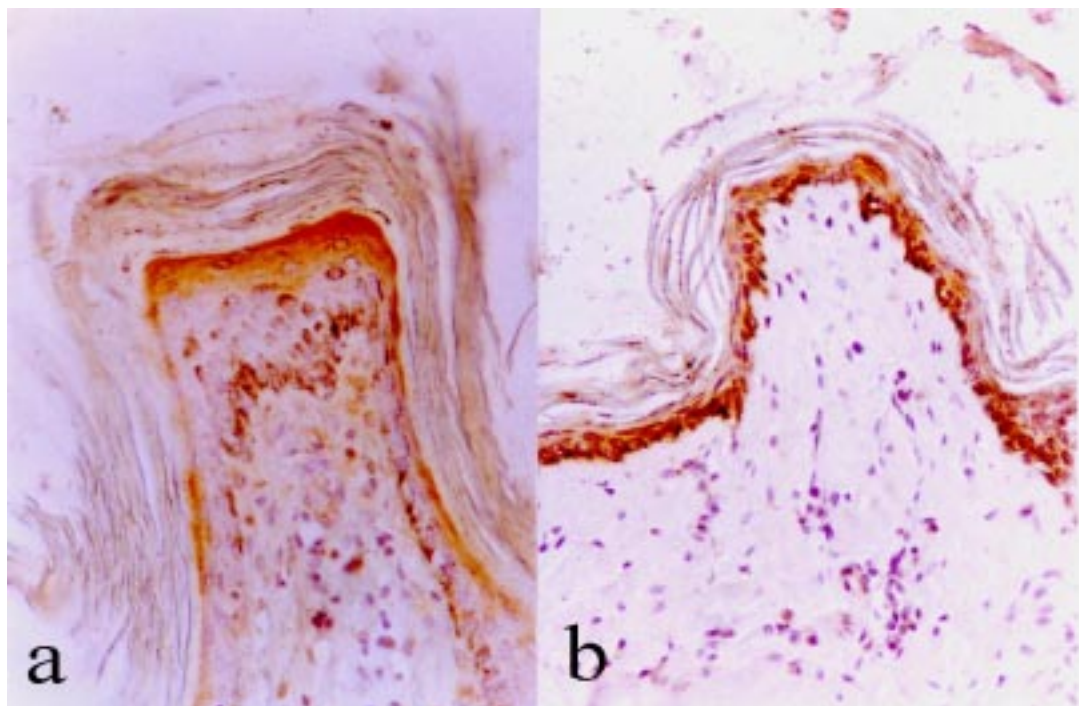


Foto N° II. Expresión de involucrina. En un animal control (a) y después de 8 semanas de intoxicación con *S. glaucophyllum* (b). Nótese el adelgazamiento del estrato espinoso. Marcación de involucrina (flechas) mediante un método indirecto de inmunoperoxidasa. Aumento: 200x.

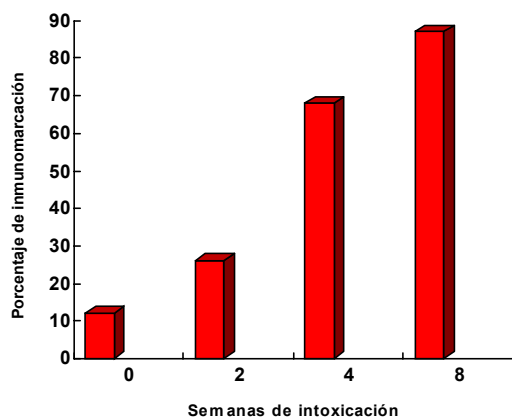


Gráfico N° III. Porcentaje de inmunomarcación de citoqueratinas 10 y 11 en células epidérmicas. Las diferencias entre los animales intoxicados y los controles fueron altamente significativas.

atrofia de los folículos pilosos y de las glándulas, tanto sebáceas como sudoríparas (Foto N° I y Gráfico N° I).

Los marcadores de diferenciación analizados también modificaron su expresión tanto en intensidad como en distribución. Así por ejemplo, la involucrina fue detectada en los estratos suprabasales en los animales control, mientras que en los enfermos se observó en todas las capas de la epidermis (Foto N° II y Gráfico N° II). En la inmunodetección de citoqueratinas 10 y 11 pudo comprobarse un cambio similar (Gráfico N° III).

La intoxicación afectó igualmente la expresión de PCNA. La presencia de este marcador de proliferación fue detectada en diferentes estructuras de la piel normal. En los animales intoxicados se constató una reducción en la expresión de PCNA, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Gráfico N° IV).

DISCUSIÓN

En este estudio, se ha demostrado que la intoxicación de los bovinos con *S. glaucophyllum* indujo una atrofia severa de la epidermis, folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas.

La expresión prematura de involucrina y citoqueratinas 10 y 11 en todas las capas de la epidermis, incluyendo al estrato germinativo, es lo esperable según los efectos conocidos del $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Regnier y Darmon, 1991; Eckert et al., 1997). Este efecto puede ser también consecuencia de un probable aumento de la concentración local de Ca^{2+} . Es bien conocido que el

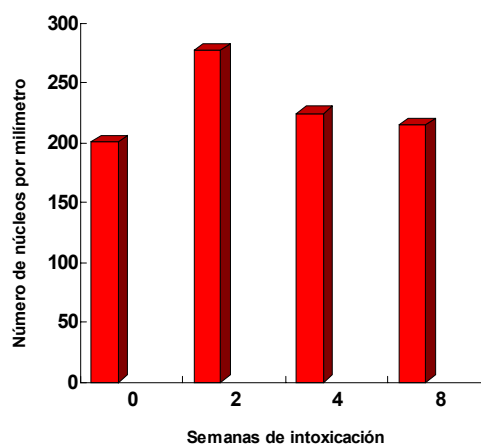


Gráfico N° IV. Núcleos celulares que expresan PCNA por mm de epidermis. Las diferencias entre grupos no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

aumento de calcio juega un papel central como estimulante de la diferenciación de los queratinocitos (Bikle y Pillai, 1993) y, si bien no se han estudiado los niveles de calcio en la piel de los bovinos, resulta altamente probable que se encuentre elevado en animales afectados de calcinosis, debido al bien conocido incremento en la absorción intestinal (Haussler et al., 1976; Okada et al., 1977; Morris, 1978; Puche y Bingley, 1995).

La disminución de la proliferación celular observada no fue estadísticamente significativa; esta observación no es demasiado sorprendente. Si bien la mayoría de los trabajos disponibles comunican un efecto negativo del $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre la división celular (Wu et al., 1996; Eckert et al., 1997), otros hablan de un efecto estimulante (Rougi et al., 1996), o de ausencia de efecto (Regnier y Darmon, 1991). Los antecedentes son, en consecuencia, contradictorios. Por otro lado, los modelos empleados hasta el presente para evaluar los efectos de la vitamina D en la división celular cutánea, se basan en tejidos "in vitro" (Binderup y Bramm, 1988), en animales de laboratorio durante períodos cortos (Rougi et al., 1996) o en el tratamiento de psoriasis en la especie humana (Milde et al., 1991). En un sistema "in vitro" en condiciones altamente controladas, bajas dosis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ estimularon la división de queratinocitos, mientras que concentraciones altas la deprimieron (Bollag et al., 1995).

La bibliografía consultada no hace referencia acerca de los efectos en la proliferación de las células epidérmicas ocasionados por una administración prolongada de altas dosis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Con respecto a los folículos pilosos, se los ha calificado como miniórganos altamente sensibles para la vitamina D₃ (Reichrath et al., 1994) y se han identificado receptores de 1,25(OH)₂D₃ en el bulbo piloso y en las vainas radiculares interna y externa (Stumpft et al., 1979; Reichrath et al., 1996). El metabolito activo de la vitamina D ha demostrado ser un potente inhibidor de división e inductor de diferenciación en las células de la vaina radicular externa (Arase et al., 1991).

De cualquier manera, el papel de la vitamina D en los folículos pilosos no es aún conocido (Reichrath et al., 1994). En este trabajo es muy evidente la severa regresión de los folículos pilosos en bovinos intoxicados con *S. glaucophyllum*. Menos aún se conoce acerca de los efectos de esta vitamina sobre las glándulas sebáceas y sudoríparas.

Los resultados obtenidos parecen indicar, "a priori", que la reducción en el compartimiento intermedio de diferenciación epidérmica no se debe a un bloqueo en la proliferación de las células basales, siendo atribuible a una estimulación de la diferenciación terminal en los queratinocitos suprabasales.

AGRADECIMIENTOS

El presente estudio fue financiado parcialmente con subsidios del CONICET (Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas) y de la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de La Plata. Se agradece la labor técnica de la Sra. Rosa Villegas de Guidi.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arase S., Sadamoto Y., Kuwana R., Nakanishi H., Fujie K., Takeda K., Takeda E. The effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on the growth and differentiation of cultured human outer root sheath cells from normal subjects and patients with vitamin D-dependent rickets type II with alopecia. *Journal of Dermatological Sciences* 1991; 2:353-60
2. Bikle D.D., Pillai S. Vitamin D, calcium, and epidermal differentiation. *Endocrine Reviews* 1993; 14: 3-19
3. Binderup L., Bramm E. Effects of a novel vitamin D analogue MC 903 on cell proliferation and differentiation in vitro and on calcium metabolism in vivo. *Biochemical Pharmacology* 1988; 37:889-95
4. Bollag W.B., Ducote J., Harmon C.S. Biphasic effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on primary mouse epidermal keratinocyte proliferation. *Journal of Cellular Physiology* 1995;163:248-256
5. Clemens T.L., Adams J.S., Horiuchi B.A., Cho H., Tsuchiya Y., Matsuo N., Suda T., Holick M.F. Interaction of 1,25-dihydroxyvitamin-D₃ with keratinocytes and fibroblasts from skin of normal subjects and a subject with vitamin-D-dependent rickets type II: A model for study the mode of action of 1,25-dihydroxyvitamin-D₃. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1983; 56:824-30
6. Collier W.A. Zur Kenntnis einer als "Enteque" bezeichneten Krankheit der Rinder in der Provinz Buenos Aires. *Zeitschrift Infection Krankheiten Haustiere* 1927; 31:81-92
7. Eckell O.A., Gallo G.G., Martín A.A., Portela R.A. Observaciones sobre el "Enteque Seco" de los bovinos. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias (La Plata)* 1960; 6:193-211
8. Eckert R.L., Crish J.F., Robinsin N.A. The epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation. *Physiological Review* 1997; 77:397-424
9. Esparza MS, Vega M, Boland RL. Synthesis and composition of vitamin D-3 metabolites in *Solanum malacoxylon*. *Biochemical and Biophysical Acta* 1982; 719: 633-40
10. Haussler M.R., Wasserman R., McCain T.A., Peterlik M., Bursac K.M., Hughes M.R. 1,25-dihydroxyvitamin D₃-glycoside: identification of a calcinogenic principle of *Solanum malacoxylon*. *Life Science* 1976; 18:1049-56
11. Holick M.F. The cutaneous photosynthesis of previtamin D₃: a unique photoendocrine system. *Journal of Investigative Dermatology* 1981;77:51-8
12. Lee S.H., Hurwitz J. Mechanism of elongation of primed DNA by DNA polymerase delta, proliferating cell nuclear antigen and activator 1. *Proceeding National Academy of Sciences USA* 1990; 87:5672-6
13. Milde P., Hauser U., Simon T., Mall G., Ernst V., Haussler M.R., Frosch P., Rauterberg E.W. Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors in normal and psoriatic skin. *Journal of Investigative Dermatology* 1991; 97:230-9
14. Morris K.L.M. Plant induced calcinosis. *Veterinary and Human Toxicology* 1978; 24:34-48
15. Okada K.A., Carrillo B.J., Tilley M. *Solanum malacoxylon* Sendtner: A toxic plant in Argentina. *Economic Botany* 1977; 31:225-36
16. Portiansky E.L., Gimeno E.J. A new epitope retrieval method for detection of structural cytokeratines in the bovine prostatic tissue. *Applied Immunohistochemistry* 1996; 4:208-14
17. Portiansky E.L., Massone A.R., Gimeno E.J. Kinetics of epitope retrieval techniques for unmasking cytokeratins in bovine prostatic tissues after different formaldehyde fixation times. *Applied Immunohistochemistry* 1997; 5:194-201
18. Puche R.C., Bingley J.B. Calcinosis of cattle in Argentina. First English edition, Universidad Nacional de Rosario Editora, ISBN 950-673-112-8 1995
19. Regnier M., Darmon M. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ stimulates specifically the last steps of epidermal differentiation of cultured human keratinocytes. *Differentiation* 1991; 47:173-88
20. Reichrath J., Schilli M., Kerber A., Bahmer F.A., Czarnetzki B.M., Paus R. Hair follicle expression of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors during the murine hair cycle. *British Journal of Dermatology* 1994; 131:477-82
21. Reichrath J., Collins E.D., Epple S., Kerber A., Norman A.W., Bahmer F.A. Immunohistochemical detection of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors (VDR) in human skin. *Pathology Research and Practice* 1996; 192:281-9
22. Rice R.H., Qin Q., Pilato A.L. Keratinocyte differentiation markers: Involucrin, transglutaminase, and toxicity. *Journal National Institute of Cancer Monographs* 1992; 13:87-91
23. Rougui Z., Pavlovitch J., Rizk-Rabin M. In vivo effects of vitamin D on the proliferation and differentiation of rat keratinocytes. *Journal of Cellular Physiology* 1996; 168:385-94
24. Stumpf W.E., Sar M., Reid F.A., Tanaka Y., DeLuca H.F. Target cells for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in intestinal tract, stomach, kidney, skin, pituitary, and parathyroid. *Science* 1979; 206:1188-90
25. Suda T., Miyaura Ch., Abe E., Kuroki T. Modulation of cell differentiation, immune responses and tumor promotion by vitamin D compounds. In: *Bone and Mineral Research/4*, Edit. William A. Peck. Elsevier, Amsterdam. 1986 p 1-48
26. Suter M.M., Cramer F.M., Olivry T., Mueller E., von Tschanner C., Jensen P.J. Keratinocyte biology and pathology. *Veterinary Dermatology* 1997; 8:67-100.
27. Walters M.R. Newly identified actions of vitamin D endocrine system. *Endocrine Reviews* 1992; 13:719-764.
28. Wells WA, Rainer RO, Memoli VA. Equipment, standardization, and application of image processing. *American Journal of Clinical Pathology* 1993; 99: 48-56
29. Wu S., Geilen C., Tebbe B., Orfanos C.E. 1,25-Dihydroxyvitamin D; its role for homeostasis of keratinocytes. *Nutritional Biochemistry* 1996; 7:642-9

MASTOCITOS AZUL ALCIANO POSITIVOS EN LA MUCOSA DEL CIEGO DE CONEJOS NORMALES Y ESPLENECTOMIZADOS, SENSIBILIZADOS Y DESAFIADOS CON OVOALBÚMINA

N. Bassan¹, M. Vinuesa¹, F. Perez¹, S. Roma¹,
S. Bernardi², M. Lagrutta¹

¹Cátedra de Histología y Embriología . Facultad de Ciencias Médicas. Rosario.

²Cátedra de Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Casilda.

RESUMEN: La sensibilización por vía intraperitoneal produce síntesis de IgE que se une a mastocitos. Los mastocitos mucosos, cuya proliferación depende de linfoquinas de células T, permanecen sensibilizados hasta 12 semanas. Un segundo contacto con el antígeno libera mediadores de hipersensibilidad local. La esplenectomía disminuye las inmunoglobulinas circulantes y modifica la respuesta inmunitaria. Por la cecotrofia, llegan al ciego moléculas en diferentes etapas de degradación, posibilitando el contacto de antígenos con la barrera mucosa. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la cantidad de mastocitos mucosos detectables con azul alciano (AB) en el ciego de conejo normales y esplenectomizados, sensibilizados con Ovoalbúmina (OVA) y desafiados por vía oral. Conejos neozelandeses se dividieron en Grupo 1 (n=10) control no sensibilizado, Grupo 2 (n=10) sensibilizado intraperitonealmente en dos oportunidades con 2 ml de una solución de 70 µg de OVA y 30 mg de hidróxido de aluminio (ALUM)/ml, Grupo 3 (n=10) esplenectomizados y sensibilizados como el grupo 2. Los títulos de IgE específica anti-OVA fueron determinados por el test de anafilaxia cutánea pasiva. Los conejos de los grupos 2 y 3 fueron desafiados, previo ayuno de 24 horas, por instilación con sonda intragástrica, con 150 mg de OVA en 20 ml de PBS. Muestras de ciego, obtenidas 24 horas post desafío y fijadas en Carnoy se colorearon con AB pH < 1. Los mastocitos AB + se contaron en 20 campos en cada animal a 400X. El grupo 1 mostró $1,33 \pm 0,82$ mastocitos por campo. El grupo 2: $12,88 \pm 2,17$ ($p < 0,05$) y el grupo 3: $11,67 \pm 2,37$ ($p < 0,05$). Los resultados muestran un marcado incremento de mastocitos mucosos en animales sensibilizados y desafiados que indicaría liberación de factores mediadores determinantes del reclutamiento mastocitario y que la esplenectomía no afectó el incremento mastocitario a nivel del ciego, con un comportamiento similar al del grupo no esplenectomizado.

PALABRAS CLAVE: Conejo, Mastocitos mucosos, Ciego, Esplenectomía, Sensibilización

MUCOSAL ALCIAN BLUE POSITIVE MAST CELLS IN CECUM FROM NORMAL AND SPLENECTOMIZED RABBITS SENSITIZED AND CHALLENGED WITH OVA

ABSTRACT: The intraperitoneal sensitization induces IgE synthesis which binds to mast cells. Mucosal mast cells proliferation depends on lymphokines from T cells and remains sensitized up to 12 weeks after contact with antigen. A second interaction with antigen produces the delivery of mediators which generate a local anaphylactic reaction. Splenectomy in rabbits determines a significant decrease in seric immunoglobulins as well as modification in the immune response. Cecotrophy is a particular mechanism of rabbit digestive physiology which allows the entire antigenic molecules to be in close contact with cecal mucosal barrier. The aim of the present work was to evaluate the number of Alcian Blue (AB)-positive mast cells in cecum from both normal and splenectomized rabbits, sensitized with OVA and oral challenge. New Zealand rabbits were divided into 3 groups: Group 1 (n=10) not sensitized control. Group 2 (n=10) was twice sensitized intraperitoneally with 2 ml of a 70 micrograms OVA and 30 mg aluminium hydroxide (ALUM)/ml PBS solution. Group 3 (n=10) was splenectomized and sensitized as group 2. Anti-OVA IgE titers were determinate by Passive Cutaneous Anaphylaxis Test (PCA). Rabbits from groups 2 and 3 were challenged with 150 mg OVA in 20 ml PBS by instillation with an intragastric canula. Samples from cecum were fixed in Carnoy and stained with AB pH<1 24 hours after challenge. AB- positive mast cells were counted in 20 fields per animal at X400. Group 1 showed $1.33 + 0.82$ mast cell per field; group 2: $12.88 + 2.17$ ($p < 0.05$); Group 3: $11.67 + 2.37$ ($p < 0.05$). Results showed, firstly, an important increase in the number of mucosal mast cell in sensitized and challenged groups which indicates the delivery of chemoattractants for recruitment of mast cell and secondly, that splenectomy induces no modifications in such mast cell increase, as seen in the not-splenectomized group.

KEY WORDS: Rabbit, Mucosal mast cell, Cecum, Splenectomy, Sensitization.

Dirección para correspondencia: N. Bassan Facultad de Ciencias Médicas. U.N.R. Santa Fe 3100. (2000) Rosario. ARGENTINA.

INTRODUCCIÓN

En intestino, los antígenos penetran en las placas de Peyer a través de las células M que los transportan envueltos en membrana y los liberan en el espacio látero basal. (Costa-Batllori et al. 1991; Gebert, A. et al., 1992; Gebert, A. et al. 1993). En ese espacio se encuentran linfocitos intraepiteliales T y B. De acuerdo a las particularidades del antígeno, éste puede interactuar con linfocitos T supresores, que inhiben la respuesta, o estimular a linfocitos B sensibles al antígeno (Ermak, T. et al. 1994) que pasan al folículo, donde se activan. Luego éstos drenan a los ganglios linfáticos mesentéricos donde proliferan y maduran, algunos a linfocitos B memoria y la mayoría a plasmoblastos (MC Ghee, J. et al. 1989). Por vía linfática pasan al torrente sanguíneo, luego a la lámina propia, a las placas de Peyer del intestino y al tejido linfático de otras mucosas, proliferan y se diferencian a plasmocitos formadores de IgA, primordialmente secretoria (MC Kay, D. et al. 1993; Xu-Amano, J. 1993).

En determinadas condiciones experimentales o patológicas se sintetiza IgE que se adhiere a la superficie mastocitaria (Perdure, M. et al. 1976). En roedores, la administración por vía intraperitoneal de OVA en dosis adecuadas genera elevados niveles de IgE anti-OVA (Tomoe, S. 1992). Un nuevo contacto del antígeno, a nivel del intestino, con células inmuno-competentes (linfocitos y mastocitos sensibilizados) desencadenan una cascada de hechos que conduce a la generación de una reacción inflamatoria aguda anafiláctica, con liberación de mediadores, edema e infiltración de eosinófilos (Ogra, P. 1996; Vinuesa, M. et al. 1997).

Los mastocitos provienen de células multipotenciales hematopoyéticas, abandonan la médula ósea como precursores mastocitarios (no morfológicamente reconocibles como tales) y adquieren su diferenciación definitiva en los tejidos colonizados (Kitamura, Y. et al. 1995).

Se diferencian dos variedades de mastocitos. Los conectivos, de ubicación preferentemente peritoneal y subcutánea, que muestran una vida media mayor de 40 días, dependen de factores liberados por fibroblastos, contienen abundante heparina e histamina, sintetizan escasos leucotrienos y tienen pocos receptores para IgE en su membrana plasmática. Los mastocitos mucosos, que predominan en intestino y pulmón, son T dependientes, su proliferación depende de linfoquinas de células T, su vida media es menor de 40 días, contienen condroitín sulfato, poca histamina, sintetizan leucotrienos C4 y B4, presentan abundantes receptores de membrana para IgE y permanecen sensibilizados hasta 12 semanas después del contac-

to con el antígeno (De Crescenzo, G. et al. 1997; Kitamura, Y. et al. 1993; Kitamura, Y. et al. 1995; Wagelie-steffen, A. et al. 1997).

La esplenectomía realizada en forma experimental en animales, o en humanos por traumatismos abdominales, produce modificaciones en los parámetros inmunológicos. En distintas especies existe disminución de IgG e IgM, de la respuesta primaria a los antígenos y de los linfocitos T (Aaberge, I. et al. 1990; Bassan, N. et al. 1997; Demeter, J. et al. 1990; Holdsworth, R.J. et al. 1990).

Es de importancia remarcar que la esplenectomía en conejos no produce, al menos en tiempo relativamente breve, hipertrofia compensadora de órganos linfáticos, como ocurre en otras especies.

En la fisiología digestiva del conejo la cecotrofia es un mecanismo típico con una influencia decisiva tanto en sus características nutricionales como en los procesos patológicos que se relacionan con la misma, siendo el ciego el órgano central de este proceso.

Los nutrientes ingeridos por el conejo son sometidos a una digestión enzimática fundamentalmente a nivel del intestino delgado y luego pasan al ciego donde se realiza la digestión bacteriana. Allí, macromoléculas en distintas etapas de degradación y potencialmente antigénicas, permanecen en contacto con la mucosa cecal entre dos y doce horas.

Si el producto de la digestión cecal abandona dicho órgano en las primeras horas de la mañana, recibe una envoltura de moco colónico, constituyendo los cecotrofos. Estos salen por el ano y son ingeridos por el animal reiniciándose el ciclo digestivo, que puede repetirse dos o tres veces (Costa-Batllori, P. et al. 1991; Fekete, s. et al. 1985; Fekete, s. 1987; Hollyster, A. et al. 1989).

Este mecanismo hace que el ciego se comporte, desde el punto de vista de la digestión, como el rumen de los poligástricos.

El ciego de conejo, donde moléculas en diferentes grado de digestión y con potencialidad antigénica permanecen en contacto con la mucosa un tiempo prolongado, constituye un modelo de sumo interés para el análisis de la reacción local de hipersensibilidad en el tubo digestivo.

En trabajos anteriores (Bassan, N. et al. 1997; Bassan et al. 1997) mostramos que en conejos sensibilizados y desafiados por vía oral con OVA se produce a nivel del ciego edema, linfangiectasia, aumento de la cantidad de eosinófilos, indicativos del pasaje de OVA a través de la barrera mucosa y su interacción con mastocitos con IgE anti-OVA. A través de la inmunomarcación con anticuerpos monoclonales se visualizaron los linfocitos intraepiteliales CD4+

que expresaron marcadores de activación MHC II R-DQ lo cual indicó: a) la penetración del antígeno (macromolécula intacta) a la mucosa intestinal; b) su contacto con células inmunes; c) el posterior desencadenamiento de anafilaxia local.

En conejos no sensibilizados, la administración de antígenos (OVA) por vía oral, no generó reacciones inflamatorias. Esto se debería a la activación de mecanismos supresores, a partir de linfocitos intraepiteliales que generan tolerancia antigénica (Bassan, N. et al.1997; Bassan, N.et al.1997).

La administración de antígenos por vía digestiva, en intestino sin alteraciones, no produce sensibilización debido a una supresión mediada por linfocitos T, mientras que si la administración es por vía intraperitoneal o subcutánea, se logra una sensibilización importante. Estos hechos nos llevaron a analizar el posible rol del bazo.

A partir de que la esplenectomía reciente produce una caída de IgM e IgG, de la respuesta primaria a los antígenos y de los linfocitos T, hipotetizamos que este hecho favorecería la tolerancia al antígeno ingresado por vía intraperitoneal. En esta etapa evaluamos la capacidad de reclutamiento mastocitario en el ciego dependiente de linfoquinas producidas por linfocitos T, contando los mastocitos de la mucosa detec-

tables con azul alciano (AB) a $\text{pH} < 1$ en el ciego de conejos normales y esplenectomizados, sensibilizados con OVA y desafiados por vía oral.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron conejos neozelandeses adultos divididos en tres grupos. Grupo 1: ($n=10$) se tomó como control no sensibilizado. Grupo 2: ($n=10$) sensibilizado por vía intraperitoneal en dos oportunidades con 2 ml de una solución de 70 μmg de OVA y 30 mg de ALUM/ml Grupo 3: ($n=10$) esplenectomizados y sensibilizados de la misma forma que el grupo 2.

Los títulos de IgE específica anti-OVA fueron determinados por el test de anafilaxia cutánea pasiva (PCA).

Los conejos de los grupos 2 y 3 fueron desafiados, previo ayuno de 24 horas, por instilación con sonda intragástrica, de 150 mg de OVA en 20 ml de PBS. Las muestras de ciego, obtenidas 24 horas post desafío, se fijaron en Carnoy y se colorearon con AB $\text{pH} < 1$. Los mastocitos AB+ se contaron en 20 campos de 400X por cada animal.

Los resultados cuantificados se expresan como valores promedio y se analizaron estadísticamente con el test de "t student".

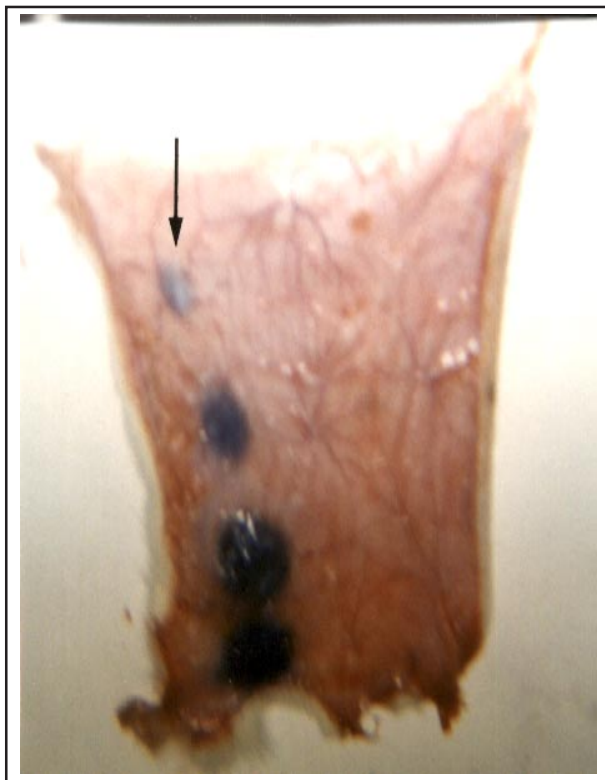


Foto N°I. Test de PCA. Positivo 1/640 para grupo 2 y 3.

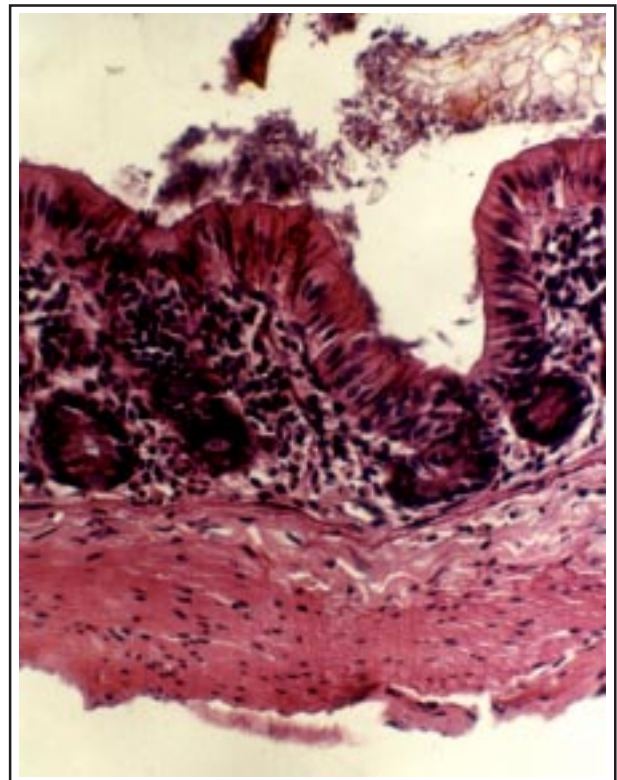


Foto N°II. Mucosa normal de ciego de conejo. HE. Aumento: 100 X.

RESULTADOS

El test de PCA fue negativo para el grupo control y positivo a la dilución 1/640 para los grupos 2 y 3 (Foto N° I).

En los grupos experimentales se observó, histopatológicamente, un intenso edema focalizado tanto en mucosa como en submucosa, con marcadas linfangiectasias y cúmulos de eosinófilos próximos al epitelio (Fotos II y III). No se detectaron diferencias entre los esplenectomizados y no esplenectomizados. El grupo 1 (control no sensibilizado) mostró $1,33 \pm 0,82$ mastocitos por campo. El grupo 2 (no esplenectomizado, sensibilizado y desafiado) $12,88 \pm 2,17$ ($p < 0,05$ en relación al grupo control) y el Grupo 3 (esplenectomizado, sensibilizado y desafiado) $11,67 \pm 2,37$ ($p < 0,05$ en relación al grupo control). No hubo diferencias significativas entre los grupos 2 y 3. (Fotos N° IV, V y VI) Tabla N°1.

Tabla N°1 Media de Mastocitos AB+ por campo 400X en ciego de conejo

GRUPOS	MASTOCITOS
GRUPO	$1,33 \pm 0,82$
GRUPO	$212,88 \pm 2,17$
GRUPO	$311,67 \pm 2,37$
Grupo 2 vs. Grupo 1 $p < 0,05$	
Grupo 3 vs. Grupo 1 $p < 0,05$	
Grupo 3 vs. Grupo 2 no significativo	

DISCUSIÓN

La dificultad para estudiar alergia alimentaria en el humano, hace necesario el desarrollo de modelos animales alternativos donde simular las condiciones capaces de producir reacciones inflamatorias de hipersensibilidad a nivel intestinal.

El conejo, por las características particulares en su fisiología digestiva, es especialmente adecuado (Fekete, S. et al. 1985; Fekete, S. et al. 1987) para su utilización como modelo en el estudio de inmunidad e hipersensibilidad mucosa. Mediante la cecotrofia realiza una primera digestión enzimática parcial a nivel del estómago e intestino delgado. Los alimentos, en distintas etapas de degradación, llegan al ciego donde continúan su digestión mediante la acción enzimática y de la flora local. Esta condición especial de la fisiología digestiva determina que macromoléculas enteras o parcialmente digeridas entren en contacto con la barrera mucosa del intestino delgado, particularmente a nivel del íleon terminal, en donde las placas de Peyer son el sitio de generación de la respuesta inmune mucosa. La permanencia en el ciego de las moléculas potencialmente antigé-



Foto N°III. Mucosa cecal de conejo sensibilizado y desafiado. Marcado edema y linfangiectasias. HE. Aumento: 200X.

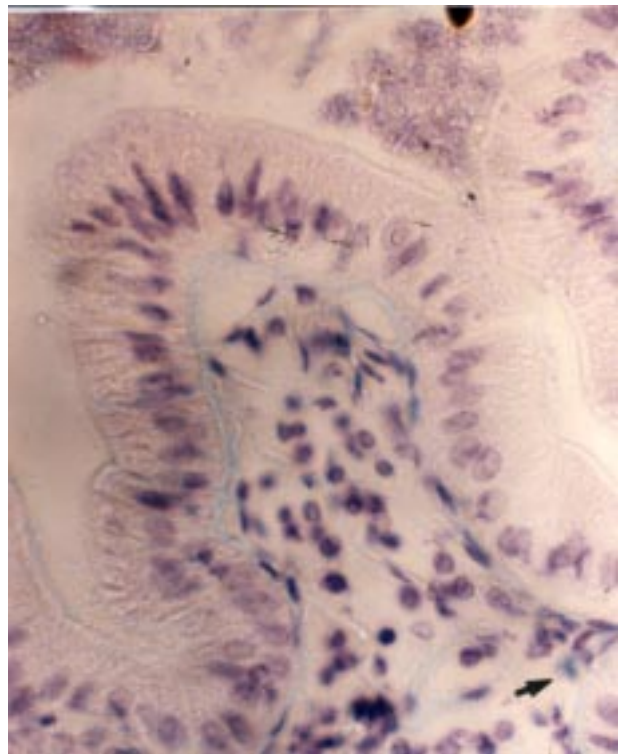


Foto N°IV. Mucosa cecal de conejo no sensibilizado. Se observaron escasos mastocitos. AB pH < 1. Aumento: 400X.

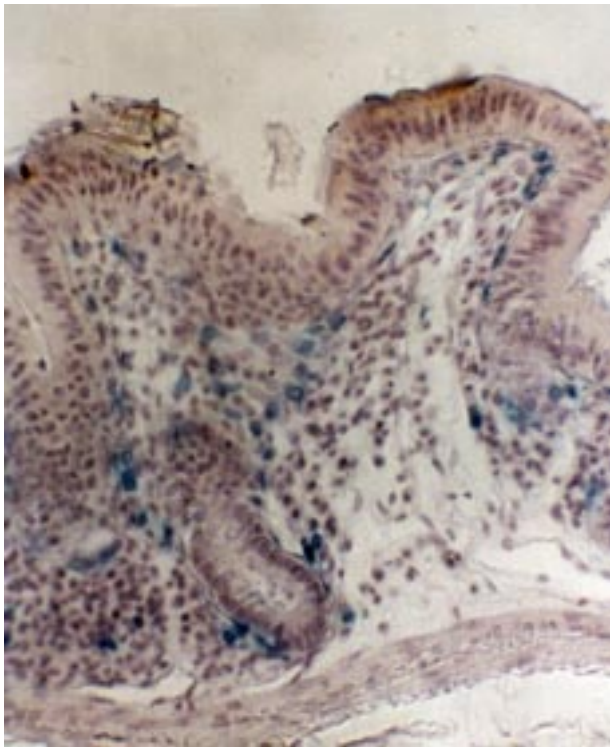


Foto N°V. Mucosa cecal de conejo sensibilizado y desafiado. Se observan abundantes mastocitos. AB pH < 1. Aumento: 200X.

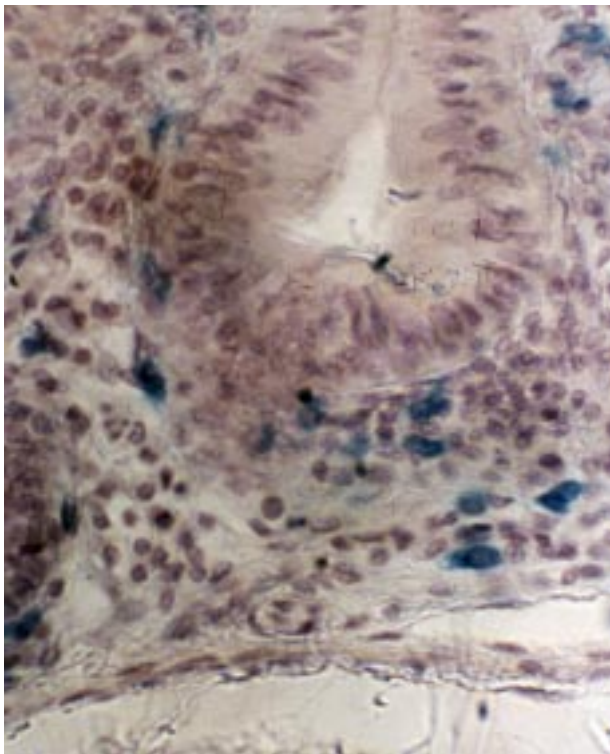


Foto N°VI. Mucosa cecal de conejo esplenectomizado, sensibilizado y desafiado. Se observan abundantes mastocitos. AB pH < 1. Aumento: 400X.

nicas por un tiempo prolongado, posibilita una respuesta anafiláctica local a nivel de la mucosa de dicho órgano. Los hechos mencionados, característicos del conejo, presentan similitud con algunas condiciones patológicas del humano, donde en individuos con alteraciones de digestibilidad o de la barrera mucosa intestinal, ingresan a nivel del íleon, macromoléculas potencialmente antigénicas.

En nuestro estudio demostramos en los animales sensibilizados, mediante el test de anafilaxia cutánea pasiva (PCA), elevado nivel de IgE anti-OVA, lo cual permite inferir la presencia en las mucosas, de mastocitos con moléculas de IgE anti-OVA adheridas a su membrana.

En los animales sensibilizados y desafiados, la liberación de factores vasoactivos se detecta por el edema, la dilatación vascular y el aumento de eosinófilos a nivel de la mucosa cecal, lo cual es indicativo del pasaje de OVA a través de la barrera mucosa y su interacción con los mastocitos con IgE anti-OVA.

El aumento de mastocitos se debería a la producción de IgE e IgG como respuesta a la sensibilización. La IgE actúa sobre el receptor Fc épsilon 1 del mastocito y la IgG lo hace sobre el receptor Fc Gamma 3, estimulando en forma directa la producción de mastocitos. (Male, D. 1991). También lo hacen las interleucinas 3, 4, 9 y 10, la primera en forma directa y las restantes como cofactores para la proliferación mastocitaria (Kitamura, Y et al. 1993).

Los resultados muestran, en primer lugar, un marcado incremento de mastocitos que indicaría liberación de factores mediadores determinantes del reclutamiento mastocitario; y en segundo lugar, que la esplenectomía no afectó el incremento mastocitario a nivel del ciego, con un comportamiento similar al del grupo no esplenectomizado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aaberge, Y. et al.. IgG subclasses antibody responses to pneumococcal polysaccharide vaccine in splenectomized, otherwise normal, individuals. *Scand J Immunol* 1990; 31:711-6.
2. Bassan, N. et al.. Characterization of intraepithelial T cell population in terminal ileum from OVA sensitized New Zealand rabbit. Presentado en el XVI International Congress of Allergology and Clinical Immunology, Cancún, México, Octubre 19-24. 1997
3. Bassan, N. et al. Ciego de conejos sensibilizados con ovoalbúmina y desafiados por vía oral: histoinmunopatología. Presentado en el XXXIV Congreso Argentino de Patología, Rosario, Argentina. 1997.
4. Bergmann, L. et al. Quantitative and functional restorations and alterations of peripheral lymphocytes in patients with autologous spleen implantation. *Arch Orthop Surg* 1990; 109:102-5.
5. Costa-Batllori, P.; Marzo, Y. Influencia de la nutrición en la patología cunícola. XVI Symposium Nacional de Cunicultura. 41-53. Castellón. España. 1991.
6. De Crescenzo, G. et al. Functional interactions between human mast cells and eosinophils. Proceedings of the XVI International Congress of Allergology and Clinical Immunology, Cancún. México. 1997.
7. Demeter, J. et al. Immunoglobulin profiles and antibody levels in 50 patients a long time after post-traumatic splenectomy. *J Clin Lab Immunol* 1990; 33:7-9.
8. Ermak, T. et al. Lymphocyte compartments in antigen sampling regions of rabbit mucosal lymphoid organs. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50:14-28.
9. Fekete, S.; Bonori, J. The effect of the fiber and protein level of the ration upon the cecotrophy of rabbit. *J Appl Rabbit Res* 1985; 8: 68-71.
10. Fekete, S. Recent finding and future perspectives of rabbit's digestive physiology. *Cuni-Sciencis* 1987; 4:1-9.
11. Gebert, A. et al. Co-localization of vimentin and cytokeratins in M-cells of rabbit gut-associated lymphoid tissue (GASLT). *Cell Tissue Res* 1992; 269: 331-40.
12. Gebert, A.; Hach, G. Differential binding of lectins to M-cells and enterocytes in the rabbit cecum. *Gastroenterol.* 1993; 105: 1350-61.
13. Holdsworth, R.J. et al. The role of the spleen in the immune response following naturally acquired exposure to encapsulated bacteria. *Int J Pathol* 1990;71: 853-63.
14. Hollyster, A. et al. Effects of water administrated probiotics and acidifiers on growth feed conversion and enteritis mortality of weaning rabbit. *J Appl Rabbit Res* 1989; 12:143-147.
15. Kitamura, Y. et al. Development of mast cells and basophils: processes and regulation mechanisms. *Am J med Sciences* 1993; 306:185-191.
16. Kitamura, Y. et al. Biological and molecular aspects of mast cell and basophil differentiation and function. New York: Raven Press. 1995.
17. Male, D. "Advanced immunology". Second Edition. Gower Medical Publishing London. 1991 p 2.12-17.5
18. Mc Ghee, J. et al. Regulation of IgA synthesis and immune response by T cells and interleukins. *J Clin Immunol* 1989; 9: 175-199.
19. Mc Kay, D.; Perdue, M. Intestinal epithelial function: The case for immunophysiological regulation. Cells and mediators. (First of two parts). *Dig Dis and Sciences* 1993; 38:1377-87.
20. Ogra, P. Mucosal immunology: Past, present and future. *Vaccinia, Vaccination and Vaccinology: Jenner, Pasteur and their successors*, 33 - 41. 1996.
21. Perdue, M. et al. Effect of intestinal anaphylaxis in rat as model of food allergy. *Clin Exp Immunol* 1976; 24:352-6.
22. Tomoe S. The in vivo depletion of CD4+ T cells prevents antigen - induced eosinophil infiltration into mouse skin. *Jpn J Allergol* 1992; 18:572-8.
23. Vinuesa. M. et al. I . In - situ expression of interleukin - 4, 5 and 6 in Peyer's Patch from Ovalbumin (OVA) - sensitized BALB/c mice after oral challenge. *International Allergology* 1997; 46:22-8.
24. Wagelie - Steffen. A. ; Metcalfe. D. Molecular mechanisms that regulate mast cell differentiation and survival . Proceeding of the XVI International Congress of Allergology and Clinical Immunology. Cancún. México. 1997.
25. Xu - Amano. J. Helper T cells subsets for IgA response: Oral immunization with tetanus toxoid and cholera toxin as adjuvant selectively induces Th2 cells in MALT. *J Exp Med* 1993; 178:1309- 20.

CARACTERIZACIÓN DE LAS EXPOSICIONES POR MORDEDURAS DE ANIMALES EN LA CIUDAD DE LA PLATA Y ALREDEDORES

C.F. Amasino^{1,2}, O.E. González², M.I. Urrutia³, L.S. Fuentes^{1,2}

¹Laboratorio Central de Salud Pública de la Provincia de Buenos Aires.

²Facultad de Ciencias Veterinarias y ³Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata.

RESUMEN: El presente trabajo está orientado a tipificar las características de las exposiciones por mordeduras de animales durante doce meses en una zona actualmente libre de rabia desde hace más de 15 años, para utilizar las conclusiones en el mejoramiento de la acción sanitaria antirrábica. Los datos utilizados fueron recabados durante la actividad normal de un servicio asistencial antirrábico que atiende todas las consultas por mordeduras de la ciudad de La Plata y alrededores, considerando los siguientes aspectos: edad de la persona, sexo, región del cuerpo afectada, gravedad de la exposición, zona geográfica en que se produjo la exposición y cantidad de dosis de vacuna antirrábica administrada en cada caso. Con respecto al animal mordedor se estudió especie, raza, edad, tamaño, sexo y tipo de control antirrábico con que se lo controló. Las evaluaciones realizadas permitieron formular los siguientes resultados: casos de exposiciones en doce meses: 3.702, sexo más afectado: masculino, región del cuerpo más afectada: piernas, edad que registró la mayor frecuencia de mordeduras: menores de 18 años, tratados con 9 dosis: 432, con 3 dosis: 462 y no tratados: 2.808. Animales mordedores: especie canina: 94% con un 64% de mestizos, edad predominante: alrededor de 4 años, sexo: 71 % machos, tamaño: 52% grandes, control antirrábico: 56 % privado y 44% estatal. Como conclusiones se desprenden las siguientes: En las áreas céntricas cada 345 habitantes se registró una exposición por mordedura, mientras que en las suburbanas hubo un mordido cada 131 habitantes, probablemente por una más estrecha relación entre el hombre y animales. El segmento poblacional más afectado, con exposiciones más graves y mayor cantidad de tratamientos fue el de menores de 13 años. Recomendaciones: estudiar específicamente la relación perros/habitantes en las diversas zonas estudiadas y confeccionar un censo de población animal fehaciente.

PALABRAS CLAVE: Rabia, mordeduras, caracterización, exposiciones por mordedura.

CHARACTERIZATION OF THE EXPOSITIONS CAUSED BY ANIMAL BITES IN THE CITY OF LA PLATA AND SURROUNDINGS

ABSTRACT: The present work is guided to know the characteristics of the expositions caused by animal bites during twelve months in a now free zone of rabies from more than 15 years ago. The conclusions of the present work will be used to improve the anti-rabies sanitary action. The used data were collected during the normal activity of an anti-rabies assistential service that receives all the consultations about bites of the city of La Plata and surroundings, considering the following aspects: age of the patient, sex, region of the body that was affected, gravity of the exposition, geographic zone in which the exposition was produced and quantity of anti-rabies vaccine dose administered in each case. In relation with the biter animal: the kind, race, age, size, sex and type of anti-rabies control with which the animal was controlled were studied. The accomplished evaluations allowed us to get the following results: cases of expositions in twelve months: 3.702, sex that was the most affected: male, part of the body that was the most affected: legs, age that registered the highest frequency of bites: less than 18-years-old, treated with 9 dose: 432, with 3 dose: 462 and cases that weren't treated: 2.808. Bitter animals: canine 94% with a 64% of mestizos, most common age: about 4 years, sex: 71 % male, size: 52% large, anti-rabies control: 56 % private control and 44% state's control. We can obtain the following conclusions: In the central areas one exposition by bite was registered every 345 inhabitants while in the suburban areas there was one bitten person every 131 inhabitants. This is probably caused by a closer relationship between the man and the animal than in the central areas. The populational segment that was the most affected, with the most serious expositions and the biggest quantity of treatments was the one that is composed by less than 13-year-old youngs. Recommendations: We suggest to study specifically the relation dogs/inhabitants in the different studied zones. We also recommend to make a census of the animal population.

KEY WORDS: Rabies, bites, characterization, animal bites.

Dirección para correspondencia: C. Amasino CC 219 (1900) La Plata, ARGENTINA.

INTRODUCCIÓN

La rabia es la zoonosis urbana más importante dentro del área latinoamericana (Amasino, 1991) y en varias regiones del resto del mundo (Acha et al., 1986).

Por otra parte, la rabia urbana es una de las zoonosis más gratificantes en cuanto a respuesta a las acciones sanitarias constantes, ya que la educación sanitaria, las campañas de vacunación y control de animales, los controles antirrábicos de animales mordedores y el uso de vacunas efectivas y estables (Amasino et al., 1989), permiten importantes resultados en el control de la enfermedad.

La ciudad de La Plata y su área de influencia epidemiológica (Berisso y Ensenada) son una prueba de ello. La ciudad fue parte del gran foco de rabia urbana que afectó a la provincia de Buenos Aires, cuyo pico alcanzó 4759 casos animales y 13 humanos en 1976 (Bol. Zoonosis Urbanas, 1981), registrándose en la ciudad 372 casos animales y 3 humanos (Estadística Dpto. Antirrábico, 1976). Este foco rábico pico, en la ciudad tuvo su último caso humano en 1976 y el último caso animal en 1980.

Esto hizo que la región pasara en lo epidemiológico, de ser una zona endémica con respecto a rabia a ser una zona libre de la enfermedad, pero como es lógico, en la que las exposiciones por mordeduras de animales siguen ocurriendo y en la que los efectores sanitarios de control y tratamiento de la enfermedad siguen funcionando, ya que para levantar dichas medidas haría falta declarar zona libre y organizar controles de frontera con respecto a los animales involucrados entre la zona libre y la infectada.

Esta circunstancia hace particularmente importante caracterizar cuál es el problema actual con respecto a las exposiciones humanas por mordedura en la zona, luego de 15 años de estar libre de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se relevó información correspondiente a 3702 casos de mordeduras, que fueron notificadas a la División Asistencial Humana del Departamento Antirrábico y datos de los animales mordedores registrados en la División Diagnóstico Veterinario del mismo (dependientes del Laboratorio Central del Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires), que atiende casos de los partidos de La Plata, Berisso y Ensenada, en el período comprendido entre Febrero de 1993 y Enero de 1994.

Se recolectó información sobre:

1.-La persona mordida: identificación, edad y sexo, zona de origen del individuo, lugar del cuerpo afectado por la mordedura, gravedad de ésta, lugar donde se produjo el inciden-

te, cantidad de dosis antirrábicas administradas a la misma.

2.-El animal mordedor: especie, raza, edad, tamaño y sexo; también se registró el tipo de control veterinario al que recurrió el propietario del animal (privado o estatal).

Se analizaron estadísticamente los datos consignados de acuerdo a las diferentes variables evaluadas, en las distintas zonas que integran el partido de La Plata, a saber:

Lisandro Olmos, Tolosa, City Bell, Gonnet, Los Hornos, Villa Elvira, Melchor Romero, Villa Elisa, San Lorenzo, San Carlos, Casco Urbano (Centro), como así también, los partidos de Berisso y Ensenada.

Los datos de los habitantes para cada zona fueron extraídos del Censo General 1991 (Censo General, 1991).

RESULTADOS

El promedio mensual fue de 308,5 casos, observándose valores del índice estacional superiores en los meses de septiembre a enero (Gráfico N° I).

Tabla N° 1.-Cantidad de mordeduras y porcentaje por grupo etáreo

Edad de la persona	Frecuencia	Porcentaje mordida
0 - 2 años	209	7,0
3 - 5 años	335	11,2
6 - 12 años	841	28,1
13 - 18 años	350	11,7
19 - 30 años	422	14,1
31 - 40 años	235	7,8
41 - 50 años	207	6,9
51 - 60 años	169	5,6
61 y más años	230	7,7
TOTAL	2998	100,0

Analizando el sexo de la persona mordida, se puede ver que no existen diferencias entre la cantidad de hombres y mujeres expuestos en la población estudiada (Gráfico N°II).

La edad de los pacientes en que se registró el mayor porcentaje de exposiciones fue en la franja de 6 a 12 años, como muestra la Tabla N° I que expresa la cantidad de observaciones correspondientes a cada grupo etario y su respectivo porcentaje (Tabla N° 1).

La zona de residencia que registró más afectados fue el centro de la ciudad de La Plata, siendo menor lo registrado en las zonas suburbanas (Tabla N° 2).

La gran mayoría de las personas, entre el 75 y el 95%, fueron atacadas por animales en su misma zona de residencia (Tabla N° 3).

La región del cuerpo más afectada fue la de las piernas, como expresan el Gráfico N° III y la Tabla N°4. Solamente el 17,2 % de las mordeduras fueron profundas, y dentro de ellas el

Tabla N° 2.-Cantidad de casos que presentan las distintas zonas de origen de las personas que sufrieron las mordeduras.

Zona donde vive la persona mordida	Frecuencia	Porcentaje
San Carlos	148	4,6
San Lorenzo	128	4,0
Olmos	92	2,9
Villas Elisa	111	3,4
City Bell	164	5,1
Melchor Romero	119	3,7
Gonnet	197	6,1
Tolosa	401	12,5
Los Hornos	315	9,8
Centro	728	22,6
Ensenada	172	5,3
Berisso	322	10,0
Villa Elvira	293	9,1
Capital Federal	29	0,9
TOTAL	3219	100,0

Se observa que la mayor frecuencia corresponde a personas que residen en la zona céntrica.

mayor porcentaje fue sufrido por los pacientes de la franja etárea de 6 a 12 años.

La mayor cantidad de exposiciones en cuello y cabeza ocurrió en niños de hasta dos años (67,3%) seguido por los de 3-5 años (54,5%) como se ve en la Tabla N° 4.

Dentro de las personas que debieron recibir tratamiento vacunal, el 52% recibió 3 dosis y el 48% el esquema completo de 9 dosis (Gráfico N°IV).

La edad que recibió mayor porcentaje de esquemas de tres dosis fue la de 3 a 5 años y la que más recibió el esquema completo la de 19 a 30 años (Tabla N° 6). El 81,20 % de las exposiciones se produjeron en la calle y el 18,8 % en el domicilio de la persona con el animal de su propiedad (Gráfico N°V). El mayor porcentaje de los mordidos en su domicilio corresponde a niños de 0 a 2 años (Tabla N°7).

Las especies responsables de las mordeduras fueron principalmente los caninos, luego los felinos y en tercer lugar el resto de las especies (Gráfico N°VI). Dentro de los caninos, los

Tabla N° 3.-Porcentaje de personas mordidas en su zona de residencia

Zona	Porcentaje
San Carlos	87,23
San Lorenzo	82,78
Olmos	88,50
Villa Elisa	93,20
City Bell	91,92
Melchor Romero	95,60
Gonnet	87,95
Tolosa	84,77
Los Hornos	89,50
Centro	75,21
Ensenada	86,41
Berisso	91,74
Villa Elvira	86,83

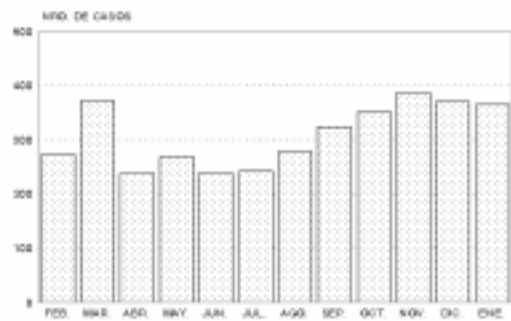


Gráfico N°I. Número de casos entre Febrero de 1993 y Enero de 1994

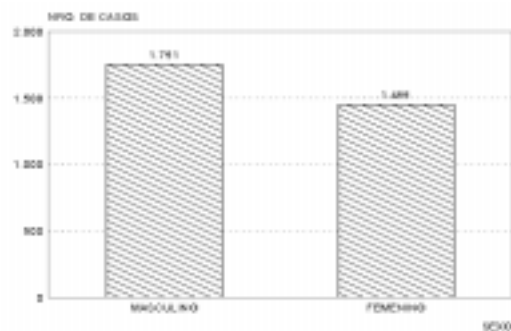


Gráfico N°II. Sexo de la persona mordida

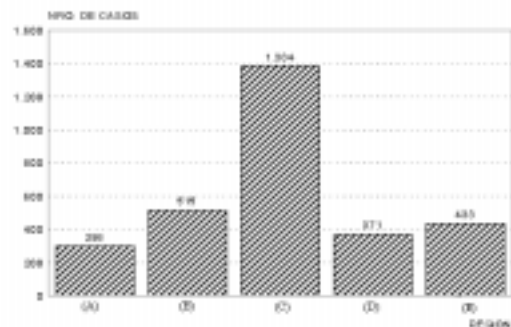


Gráfico N°III. Región del cuerpo afectada.

- (A) Brazo izquierdo, brazo derecho, antebrazo y codo.
- (B) Cabeza, cara, cuello y oreja.
- (C) Pierna izquierda, pierna derecha, pie izquierdo, pie derecho, rodilla, pantorrilla y tobillo.
- (D) Mano y dedos.
- (E) Nalga derecha, nalga izquierda, muslos, glúteos, espalda, abdomen y cadera.

mestizos ocasionaron la mayor cantidad de exposiciones (Gráfico N°VII). Dentro de las razas definidas, los ovejeros alemanes fueron la mayoría (Tabla N°8).

Los animales jóvenes de alrededor de 4 años fueron los más mordedores (Gráfico N°VIII). Los machos fueron los más agresivos (Gráfico

Cuadro N° 4. Región del cuerpo afectada para cada edad

Edad de la persona Mordida	Región del Cuerpo que ha sido afectada (%)					Total
	(A)	(B)	(C)	(D)	(E)	
0-2 años	22 (10,6)	140(67,3)	12 (5,8)	29 (13,9)	5 (2,4)	208
3-5 años	19 (5,7)	182(54,5)	52 (15,6)	41 (12,3)	40 (11,9)	334
6-12 años	73 (8,7)	118(14,1)	381(45,7)	61 (7,3)	201 (24,1)	834
13-18 años	32 (9,2)	27 (7,8)	193(55,6)	49 (14,1)	46 (13,3)	347
19-30 años	35 (8,5)	18 (4,3)	256(62,0)	49 (11,8)	55 (13,4)	413
31-40 años	24 (10,6)	6 (2,7)	139(61,1)	33 (14,6)	25 (11,0)	228
41-50 años	19 (9,4)	10 (5,0)	125(61,6)	35 (17,3)	14 (6,7)	203
51-60 años	35 (20,8)	4 (2,4)	81 (48,2)	30 (17,8)	18 (10,8)	168
61 y más años	33 (14,5)	4 (1,8)	128(56,4)	38 (16,7)	24 (10,6)	227
Total						2962

Los porcentajes están referidos al total de la fila.

El mayor porcentaje, correspondiente a cuello y cabeza se produce en el grupo etáreo de hasta 2 años (67,3 %). Este porcentaje se mantiene elevado, para el grupo de niños entre 3 y 5 años (54,5 %). Estas cifras se relacionan con las dosis administradas de vacunas, ya que las lesiones en esta zona del cuerpo obligan a iniciar el tratamiento.

(A) Brazo izquierdo, brazo derecho, antebrazo y codo.

(B) Cabeza, cara, cuello y oreja.

(C)Pierna izquierda, pierna derecha, pie izquierdo, pie derecho, rodilla, pantorrilla y tobillo.

(D) Mano y dedos.

(E) Nalga derecha, nalga izquierda, muslos, glúteos, espalda, abdomen y cadera

Cuadro N° 5. Heridas profundas por edad

Edad de la persona Mordida	Presencia de herida profunda	
	Frecuencia	Porcentaje
0 - 2 años	43	6,8
3 - 5 años	57	9,0
6 - 12 años	152	24,0
13- 18 años	74	11,7
19- 30 años	89	14,0
31- 40 años	45	7,1
41- 50 años	58	9,1
51- 60 años	44	6,9
61 y más años	72	11,4
TOTAL	634	100

En cuanto a la gravedad de la injuria, se observa que el 39,8 % de las mismas, fueron profundas hasta los 12 años. Encontramos que en la edad preescolar se alcanza el 15,8 % de los casos.

Cuadro N° 6. Número de dosis de vacuna administrada por edad

Edad de la persona mordida (años)	3 Dosis		9 Dosis	
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
0 - 2	134	15,0	16	1,8
3 - 5	162	18,1	17	1,9
6 - 12	106	11,9	72	8,1
13- 18	25	2,8	69	7,7
19- 30	16	1,8	93	10,4
31- 40	4	0,4	57	6,4
41- 50	9	1,0	37	4,1
51- 60	3	0,3	29	3,2
61 y más	3	0,3	42	4,7
TOTAL	462		432	

Se administran: 3 dosis en pacientes que presentan mordeduras de alto riesgo: cuello y/o cabeza, con animales sanos bajo control veterinario y 9 dosis cuando los animales no están bajo control veterinario (casos de animales muertos o desconocidos). Total de dosis administrada en el período estudiado: 5274.

Cuadro N° 7. Distribución por edad de los mordidos en su domicilio

Edad de la Persona	Mordidos en su domicilio
0 - 2 años	95 (45,45 %)
3 - 5 años	90 (26,86 %)
6 - 12 años	129 (15,33 %)
13 - 18 años	46 (13,14 %)
19 - 30 años	53 (12,55 %)
31 - 40 años	31 (13,19 %)
41 - 50 años	31 (14,97%)
51 - 60 años	31 (18,34 %)
61 y más años	37 (16,08%)
TOTAL	543

Los porcentajes están referidos al total de personas mordidas para esa categoría.

Cuadro N° 8. Perros mordedores de raza definida

Raza del animal	Frecuencia	Porcentaje
Ovejero Alemán	530	61,0
Doberman	94	10,8
Dálmata	63	7,2
Collie	32	3,6
Pekínés	30	3,6
Otras	120	13,8
TOTAL	869	100,0

N°IX). Los animales grandes fueron los más involucrados en las mordeduras (Gráfico N°X).

La mayor cantidad de mordeduras profundas se registró en la región de las piernas (Tabla N°9). Dentro de cada raza, siempre el

Cuadro N° 9. Regiones afectadas con mordeduras profundas

Región afectada	Frecuencia	Porcentaje
(A)	74	11,62
(B)	102	16,01
(C)	304	47,72
(D)	66	10,36
(E)	91	14,29
TOTAL	637	

(A) Brazo izquierdo, brazo derecho, antebrazo y codo.
 (B) Cabeza, cara, cuello y oreja.
 (C) Pierna izquierda, pierna derecha, pie izquierdo, pie derecho, rodilla, pantorrilla y tobillo.
 (D) Mano y dedos.
 (E) Nalga derecha, nalga izquierda, muslos, glúteos, espalda, abdomen y cadera.
 Se evidencia, que el 47,72 % de los accidentes se produce en la región correspondiente a los miembros inferiores.

Cuadro N° 10. Distribución por raza y sexo de los animales analizados

Raza del animal	Macho	Hembra
Mestizo	1272 (73,0 %)	471 (27,0 %)
Ovejero Alemán	359 (70,0 %)	154 (30,0 %)
Doberman	48 (54,0 %)	41 (46,0 %)
Collie	24 (80,0 %)	6 (20,0 %)
Dálmata	35 (60,3 %)	23 (39,7 %)
Pekinés	21 (75,0 %)	7 (25,0 %)
Otras razas	80 (69,6 %)	35 (30,4 %)
TOTAL	1844	737

Cuadro N° 11. Razas que provocaron heridas profundas y porcentaje de cada una de ellas con respecto al total de mordedores de cada raza

Raza del animal	Carácter profundo de la mordedura
Mestizo	300 (15,86 %)
Ovejero Alemán	100 (18,86 %)
Doberman	22 (23,40 %)
Collie	6 (18,75 %)
Dálmata	10 (15,87 %)
Pekinés	3 (10,01 %)
Otras razas	19 (15,83 %)
TOTAL	460

Cuadro N° 12. Animales muertos luego de producir la mordedura

Especie	Nro. de casos muertos
Canino	313
Felino	49
Roedor	29
Nutria/Conejo	3
Quiróptero	2
Comadreja	3
TOTAL	399

Cuadro N° 13. Proporción de habitantes por mordeduras, según zona

Zona	Mordeduras por habitantes
L. Olmos	1 cada 131 habitantes
Tolosa	1 cada 137 habitantes
City Bell	1 cada 138 habitantes
Gonnet	1 cada 146 habitantes
Los Hornos	1 cada 162 habitantes
Villa Elvira	1 cada 175 habitantes
M. Romero	1 cada 182 habitantes
Villa Elisa	1 cada 203 habitantes
San Lorenzo	1 cada 216 habitantes
Berisso	1 cada 249 habitantes
San Carlos	1 cada 264 habitantes
Ensenada	1 cada 295 habitantes
Casco Urbano	1 cada 345 habitantes

Estos valores fueron calculados estableciendo la relación entre la cantidad de habitantes de cada zona y las mordeduras producidas en las mismas

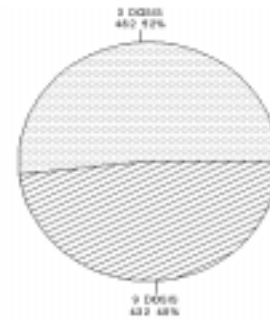


Gráfico N°IV. Cantidad de dosis administrados.

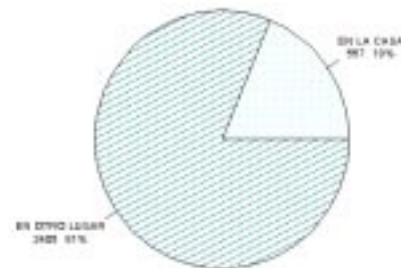


Gráfico N°V. Lugar donde de produjo el episodio.

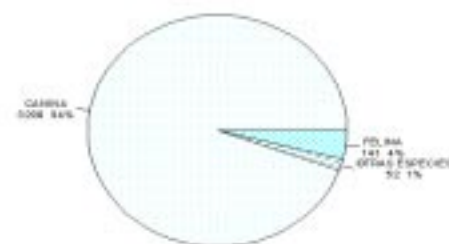


Gráfico N°VI. Especie responsable del episodio.



Gráfico N°VII. Distribución dentro de la especie canina.

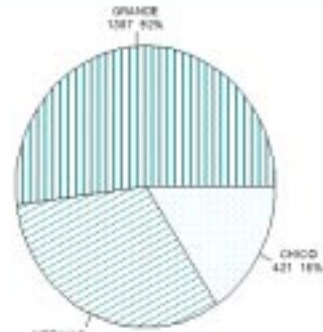


Gráfico N°X. Tamaño del animal.

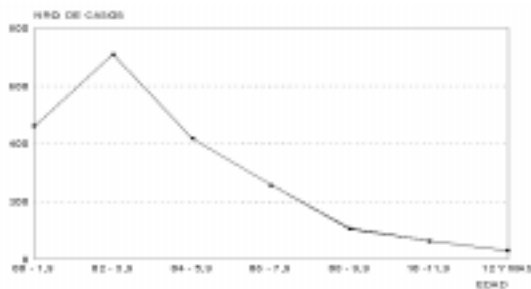


Gráfico N°VIII. Edad del animal (en años).

La mayor parte de los controles fueron externos, aunque con cantidades similares (Gráfico N°XI).

De acuerdo a la zona y su cantidad de habitantes, se pudo ver que en el casco urbano fue donde hubo menos expuestos en relación al total de habitantes (Tabla N°13).

DISCUSIÓN

Los datos obtenidos en cuanto a raza, edad, sexo y tamaño de los animales mordedores probablemente coincidan con características de demografía canina que hasta el momento desconocemos en la ciudad de La Plata.

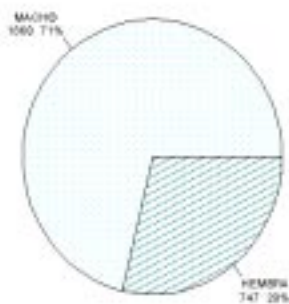


Gráfico N°IX. Sexo del animal.

porcentaje de machos fue superior al de hembras en cuanto a mordeduras (Tabla N°10). Las heridas profundas fueron causadas porcientualmente por perros de las razas Doberman en primer lugar, luego Ovejero alemán y luego mestizos (Tabla N°11).

De los animales mordedores que han muerto al comunicarse el caso y que implica el tratamiento y diagnóstico de laboratorio, la mayor cantidad son perros (Tabla N°12).

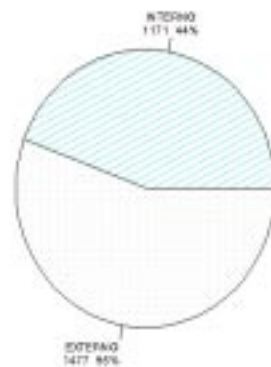


Gráfico N°XI. Tipo de consultorio

En cuanto a la gravedad de las mordeduras, pensamos que con el aumento de la edad se produciría una mejor actitud defensiva de las personas y por consiguiente una menor cantidad de heridas profundas.

El mayor uso del consultorio externo en la zona céntrica se debe probablemente, al mayor poder adquisitivo de sus habitantes que le permiten recurrir al veterinario privado sin alejarse de sus mascotas.

CONCLUSIONES

El segmento poblacional más afectado consistió en el de menores de 13 años, que abarcó el 46,3 % de los casos.

En este grupo, se produjeron las heridas más graves y en las zonas del cuerpo consideradas de alto riesgo con respecto a rabia. Además, la mayor cantidad de tratamientos antirrábicos (56,7 % de dosis administradas).

Las exposiciones en su gran mayoría (94,5 %) fueron ocasionadas por perros, siendo la mayoría de ellos mestizos. Entre las razas definidas, se destaca el ovejero alemán (61 %).

En cuanto a la edad, el 57,27 % de los perros mordedores eran mayores de 4 años, correspondiendo la mayoría de ellos (84,2 %) a las categorías grandes y medianos, con una preponderancia de los machos sobre las hembras.

Las observaciones por Consultorio Externo, que deben ser solventadas por los propietarios fueron más frecuentes en el casco urbano.

Con respecto a las zonas de la ciudad donde fueron mordidas las personas, en su gran mayoría el hecho ocurrió en la zona donde habitaban oscilando estas cifras entre 75,2 % y 95,6 %.

Al relacionar los habitantes de las distin-

tas zonas con las mordeduras producidas en ellas, se manifiestan diferencias en cuanto a la presentación de las mismas, que varían entre una mordedura cada 131 habitantes en L. Olmos y una cada 345 habitantes en el Centro.

Consideramos de gran utilidad estudiar la relación perro-habitante en estas zonas para encontrar posibles explicaciones a los resultados hallados además de la relación habitante - mordedura, como sustento a la programación de acciones sanitarias futuras. Resaltamos, así mismo la necesidad de un censo urbano de población animal.

La vigilancia epidemiológica constituye una metodología que ayudará a conocer y controlar mejor las variables enunciadas, facilitando la medición de factores de riesgo y aportando datos que nos permitan analizar y tomar decisiones.

Pensamos que el riesgo a mordeduras a que están expuestos los habitantes de una ciudad, varían de zona en zona y por lo tanto aconsejamos este tipo de estudio a fin de detectar regiones de distinto riesgo epidemiológico.

El presente mapeo de exposiciones de 12 meses en una zona actualmente libre de rabia, facilitará el diseño de acciones antirrábicas adecuadas a la situación epidemiológica actual.

BIBLIOGRAFÍA

1. Acha y Szyfres. Zoonosis y Enfermedades Transmisibles comunes al Hombre y a los Animales. 2a. edición. Edic OPS. Buenos Aires. Argentina. 1986 p 511
2. Amasino, C.F. Enfermedades Infecciosas de los Animales. 1a. Ed.. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires. Argentina. 1991 p 71-85
3. Amasino, C.F.; Maio, T.A.; Giménez, J.; Sganzzetta, M.E. Efectividad e inocuidad de la vacuna Fuenzalida Palacios para uso humano evaluada retrospectivamente en un año pico de Rabia. Medicina Social N° 2. 1989 p 61-3
4. Boletín del Departamento Zoonosis Urbanas. Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires. Avellaneda. Argentina. 1981
5. Censo General Instituto Nacional de Estadísticas y Censo (INDEC) de la República Argentina. Buenos Aires. Argentina. 1991
6. Estadística mensual del Departamento antirrábico. Laboratorio Central de Salud Pública. Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires. La Plata. Argentina. 1976
7. Organización Mundial de la Salud. 8vo. Informe del Comité de Expertos en Rabia. Serie N°824 1992 p 29-34
8. Padola, N.L.; Schettino, D.M.; Olmos, M.R. Determinación de la variación estacional de los perros mordedores como antecedente en la transmisión de la rabia canina. Vet Arg 1993; 10:330-3
9. Szyfres, L.; Arrosi, J.C.; Marchevsky, N. Rabia urbana: el problema de las lesiones por mordedura de perro. Boletín Of Sanit Panam 1982; 92,4:310-327

CARACTERIZACIÓN ENTEROTOXIGÉNICA Y ESTUDIO DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* AISLADAS DE CERDOS CON CUADROS CLÍNICOS DE DIARREA PRE Y POSDESTETE

F. Moredo¹, G. Vigo¹, M. Sanz³, J. Aguirre², A. Armocida², C. Perfumo²

¹ Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. ² Instituto de Patología "Dr.B.Epstein", ³ Área de Inmunoquímica y Biotecnología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires.

RESUMEN: Se estudió la capacidad toxigénica y la sensibilidad antimicrobiana, de 29 cepas de *Escherichia coli* aisladas de lechones con cuadros de diarrea pre y posdestete. Las muestras fueron obtenidas de materia fecal, hisopados rectales, contenido intestinal, bazo y cerebro. Se sembraron en Agar Eosina Azul de Metileno y se incubaron a 37°C durante 24 horas. La identificación bioquímica y fisiológica consistió en las determinaciones habituales que se siguen para la caracterización de enterobacterias. De todas las muestras procesadas, se aisló *E. coli*. Se llevó a cabo la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con el objeto de identificar cepas toxigénicas, para ello se extrajo el ADN, por lisado celular en caliente; se utilizaron "primers" para determinar genes codificantes de las toxinas STIa (toxina termoestable), LTI (toxina termolábil) y verotoxinas VTI y VTII. Se utilizaron cepas controles para determinar la especificidad del producto amplificado. El producto de reacción fue visualizado en gel de agarosa al 1,5%, obteniéndose los siguientes resultados: de las 29 cepas, 6 fueron positivas para STIa y 1 para LTI. No se detectaron genes codificantes para verotoxinas. Las muestras positivas fueron aisladas, en distintos períodos, de una granja con un cuadro clínico de diarrea posdestete con alta morbimortalidad. De todas las cepas aisladas, se determinaron las Concentraciones Inhibitorias Mínimas (CIM) de las siguientes drogas: ampicilina (AMP), gentamicina (GEN), amikacina (AKN), ceftiofur (CTF), enrofloxacin (ENF), danofloxacin (DNF), sulfametoxazol (SMX) y trimetoprima-sulfametoxazol (TMS), por el método de dilución en agar, utilizando agar Müller-Hinton adicionado de diluciones seriadas de base dos de cada antimicrobiano. Los resultados de la CIM, expresados en µg/ml, para el 50% y el 90% de las cepas probadas fueron respectivamente: AMP 16 - 1024, GEN 2 - 64, AKN 4 - 16, CTF 0,25 - 0,5, ENF y DNF 0,12 - 0,5, SMX >1024 - >1024 y TMS 0,5 - > 512. Se observó un alto nivel de resistencia de las cepas estudiadas frente a la AMP, GEN, SMX y TMS.

PALABRAS CLAVES: Diarrea, *Escherichia coli*, enterotoxinas, susceptibilidad antimicrobiana.

ENTEROTOXIGENIC CHARACTERIZATION AND *IN VITRO* ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF *ESCHERICHIA COLI* ISOLATED FROM PIGS WITH CLINICAL SIGNS OF PRE AND POSTWEANING DIARRHOEA

ABSTRACT: The enterotoxigenic capacity and the antimicrobial susceptibility of 29 *Escherichia coli* strains isolated from piglets with pre and post weaning diarrhea were studied. Samples were taken from feces, rectal swabs, intestinal content, spleen and brain. Isolation were carried out on eosin methylene blue agar at 37°C during 24 hours. Biochemical and physiological identification consisted on commonly used determination for Enterobacteriaceae family characterization. From all processed samples *E. coli* were isolated. Polymerase chain reaction (PCR) was carried out to identify toxigenic strains. To performed it, DNA was extracted by hot cell lysated. Primers to determine STIa toxin (thermostable toxin) encoded genes, LTI (thermolabil toxin) and verotoxins VTI and VTII were used. Standard control were use to determine the specificity of amplified product. The reaction product was visualized on agarose gel 1.5%. Results were the following: from 29 strains, 6 contained STIa and 1 for LTI. Verotoxin encoded genes could not be detected. All positive samples were isolated in different periods from pig farm with a high mortality post weaning diarrhea and. Minimal Inhibitory Concentrations (MIC) of the following drugs: ampicillin (AMP), gentamicin (GEN), amikacin (AKN), ceftiofur (CTF), enrofloxacin (ENF), danofloxacin (DNF), sulfamethoxazole (SMX) and trimethoprim-sulfamethoxazole (TMS), were determined by agar dilution method using Müller-Hinton agar added with serial two fold dilutions of each drug. The MIC results in µg/ml for 50% and 90% of the strains tested were respectively: AMP 16 - 1024, GEN 2 - 64, AKN 4 - 16, CTF 0.25 - 0.5, ENF and DNF 0.12 - 0.5, SMX >1024 - >1024 and TMS 0.5 - >512. High level of resistance against AMP, GEN, SMX and TMS was observed on studied strains

KEY WORDS: Diarrhea, *Escherichia coli*, enterotoxin, antimicrobial sensibility.

Dirección para correspondencia: F. Moredo C.C. 296, (1900) La Plata, ARGENTINA.

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli en el cerdo produce diversas entidades como: septicemia, diarrea, colibacilosis, Enfermedad de los Edemas, infecciones del tracto genitourinario y complejo Mastitis-Metritis-Agalactia (Bertschinger, 1992). Existe una gran variedad de cepas de *E. coli*, la mayoría de las cuales son habitantes normales del tracto gastrointestinal. Las cepas causantes de enfermedades entéricas (diarrea neonatal, diarrea posdestete y enterotoxemia) se distinguen por su potencial de colonizar la mucosa del intestino delgado y de producir una o varias toxinas: enterotoxina termolábil (LTI), enterotoxinas termoestables I y II (STI y STII) y verotoxinas I y II (VTI y VTII). La diarrea neonatal es producida predominantemente por cepas de *E. coli* con fimbria F4 de adhesión y con capacidad de producir toxinas STII y LT (Smith, 1970; Middlebrook y Dorland, 1994). Las cepas con fimbrias F5, F6 y F41 producen con más frecuencia una toxina y en menor grado las dos toxinas termoestables. La diarrea posdestete con alta morbimortalidad, en la mayoría de los casos, es causada por cepas de *E. coli* productoras de la toxina LTI.

En la actualidad, el uso de antibióticos y quimioterápicos ya sea en bajas dosis y por períodos prolongados como promotores de crecimiento, o bien a dosis terapéuticas sin una confirmación etiológica del o de los agentes involucrados, ha llevado al desarrollo de cepas de *E. coli* resistentes, complicando el control de las entidades por ellas producidas, así como también, siendo una potencial fuente de infección para el hombre (Courvalin, 1996). Es de suma importancia confirmar el diagnóstico de infección por *E. coli* a través de su aislamiento, caracterización y la realización de pruebas de sensibilidad antimicrobiana, debido su amplia variabilidad. Si bien existe una amplia información sobre estudios de sensibilidad antimicrobiana de cepas de *E. coli* aisladas de cerdos (Salmon et al., 1995), en la mayoría de éstos, sólo se mencionan los valores de Concentración Inhibitoria Mínima para el 50% y el 90% de las cepas (CIM_{50} y CIM_{90}) sin determinar la sensibilidad o resistencia de las mismas frente a los antibióticos probados, por no contar con los puntos de corte de las drogas empleadas en veterinaria. Sólo se realiza una extrapolación de los mismos en función a los datos sobre humanos, los cuales no se relacionan con los de los animales. En este estudio se contó con la información que otorga el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1994) para microorganismos aislados de animales, a través del cual se puede inferir la resistencia y sensibilidad.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la capacidad enterotoxigénica y los patrones de sensibilidad frente a los agentes antimicrobianos más utilizados para el control de la infección por *E. coli*, aisladas de lechones con cuadros de diarrea pre y posdestete.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las muestras: se procesaron 29 muestras, provenientes de 22 lechones con cuadros de diarrea pre y posdestete, las cuales consistieron en: 5 de materia fecal, 3 de hisopados rectales, 10 de contenido intestinal, 8 de bazo y 3 de cerebro.

Medios de cultivo: se utilizaron agar Eosina Azul de Metileno (EMB); agar Trypticase Soya (ATS); ATS adicionado con 5% de sangre ovina (AS); caldo Luria Bertani.

Metodología de aislamiento: las muestras se sembraron en EMB y se incubaron durante 24 horas a 37°C. Para la identificación bioquímica se utilizaron las siguientes pruebas: producción de indol, acetoína, ácido sulfhídrico y catalasa; prueba del rojo de metilo y oxidasa; utilización del citrato de sodio; fermentación de glucosa, lactosa y sacarosa; producción de hemólisis. Las cepas identificadas como *Escherichia coli* fueron sembradas en caldo Luria Bertani a 37°C durante 18 horas para realizar la posterior extracción de ADN. La conservación de las cepas aisladas se realizó a -80°C en caldo cerebro corazón con 30% de glicerol.

Extracción de ADN y Técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): el ADN fue extraído por calentamiento de las células, empleándose entre 1 a 10 ng para su amplificación por PCR en un volumen total de 50 µl (Woodward et al., 1992). Los "primers" fueron STA-1/STA-2 para el gen de la toxina termoestable (STIIa) y LT-I/LT-II para el gen de la termolábil (LTI). El "cocktail" de reacción para amplificación de LTI estaba constituido por: 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,4; 0,01% gelatina; 200 µM de cada dNTP; 0,5 µM de cada "primer"; 5,5 mM de MgCl₂ y 1,25 U Taq ADN polimerasa. Para la amplificación de STIIa se cambió la concentración de MgCl₂ a 4,7 mM. El programa de termociclado consistió de un ciclo inicial de 94°C - 120 segundos, un ciclo final de 72°C - 300 segundos y 30 ciclos de 94°C - 90 segundos, 59°C - 90 segundos, 72°C - 120 segundos. Las condiciones para amplificar el gen de VTI fueron: 50 mM de KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,4; 0,01% gelatina; 200 µM de cada dNTP; 0,5 µM de cada "primer" (VTI-1/VTI-2); 1,75 mM de MgCl₂ y 1,25 U Taq ADN polimerasa, termociclando en las mismas condiciones que para LTI y STIIa. Para la detección del gen para verotoxina II (VTII) el cocktail de reacción estuvo

constituido por: 50 mM de KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,4; 0,01% gelatina; 200 µM de cada dNTP; 0,3 µM de cada "primer" (VTII-1/VTII-2); 3,5 mM de MgCl₂ y 1,25 U Taq ADN polimerasa. El termociclador se programó así: un ciclo inicial de 94°C - 120 segundos, un ciclo final de 72°C - 300 segundos y 30 ciclos de 94°C - 90 segundos, 66°C - 60 segundos, 72°C - 120 segundos (Parma et al., 1996). Alícuotas de las muestras amplificadas fueron analizadas en gel de agarosa 1,5% con bromuro de etidio. Como control de cada amplificación, se utilizó ensayos en blanco y las siguientes cepas de referencia de *E. coli*: para ST, B41 O101, K-, K99+, F41+; para LT, cepa ANASTRA Coleca o de Culturas Oswaldo Cruz y para VTI y VTII, *E. coli* ATCC 43895 VTI+ VTII+.

Prueba de sensibilidad antimicrobiana: la prueba de sensibilidad antimicrobiana se llevó a cabo según el método de dilución en agar bajo las normas NCCLS para muestras de origen animal (1994). Se utilizaron los siguientes antimicrobianos aprobados para el tratamiento de enfermedades porcinas: ampicilina (AMP), gentamicina, (GEN), amicacina (AKN), ceftiofur (CTF), enrofloxacin (ENF), danofloxacin (DNF), sulfametoxazol (SMX) y trimetoprima-sulfametoxazol (TMS). Las cepas de *E. coli* se sembraron en caldo tripticasa soya y se incubaron a 37°C durante 18 horas. El cultivo de cada cepa se diluyó hasta obtener una concentración de 10⁶ UFC/ml y se sembró, utilizando el multi inoculador tipo Steer, en agar Müeller-Hinton adicionado con una dilución seriada en base dos de cada droga. La concentración final de los antimicrobianos utilizados fue (µg/ml): AMP 2-1024; GEN 1-64; AKN 4-256; CTF 0,25-32; ENF 0,12-8; DNF 0,12-8; SMX 64-1024; TMS (relación 1:19) 0,5-512. La CIM se determinó luego de 18 horas de incubación a 37°C y se consideró como la mínima concentración del agente antimicrobiano que inhibió el desarrollo bacteriano. Se incluyó *E. coli* ATCC 25922 como cepa control de calidad recomendada por NCCLS de 1994.

RESULTADOS

Según los resultados de las características culturales y las determinaciones bioquímicas y fisiológicas se aislaron 29 cepas de *Escherichia coli*. Los mismos se expresan en la Tabla N°1

De las 29 cepas de *E. coli* caracterizadas, aisladas de lechones con diarrea pre y postdestete, sólo 6 mostraron ser productoras de STIa, 1 de LTI y ninguna cepa produjo VTI o VTII. Las 7 cepas enterotoxigénicas fueron aisladas a partir muestras de lechones con diarrea postdestete provenientes de una granja con cuadro de alta morbimortalidad (Tabla N°2).

Tabla N°1: Resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas y fisiológicas que se utilizaron para la caracterización de las cepas de *E.coli* aisladas de lechones con diarrea pre y postdestete.

Determinaciones bioquímicas y fisiológicas	Resultados
Producción de: Indol	+
Acetoína	-
Acido sulfhídrico	-
Catalasa	+
Oxidasa	-
β-hemolisina	3 cepas fueron positivas
Rojo de Metilo	+
Utilización del citrato de sodio	-
Fermentación de: glucosa	+
Lactosa	+
Sacarosa	+

Tabla N°2: Caracterización enterotoxigénica de las cepas de *E.coli* aisladas de lechones con cuadros clínicos de diarrea pre y postdestete.

Clase de enterotoxina	Cepas positivas (porcentaje)	D-Pre	D-Post
Stal	6 (23%)	0	6 (23%)
LTI	1 (4%)	0	1 (4%)
VTI	0	0	0
VTII	0	0	0

STal: toxina termoestable aI; LTI: toxina termolábil I; VTI y VTII: verotoxina I y II; D-Pre: diarrea predestete; D-Post: diarrea postdestete.

Los valores CIMs50, CIMs90 y los rangos de susceptibilidad antimicrobiana frente a AMP, GEN, AKN, CTF, ENF, DNF, SMX y TMS de las 29 cepas de *E. coli* se expresan en la Tabla N°3.

Los porcentajes de susceptibilidad y resistencia de las cepas de *E. coli* aisladas frente a los 8 antimicrobianos anteriormente citados, se expresan en la Tabla N°4.

Cuatro de las 6 cepas productoras de STIa demostraron ser resistentes a AMP y TMS.

DISCUSIÓN

Las 29 cepas de *E. coli* fueron aisladas de 22 lechones con cuadros diarreicos. Las 7 cepas toxigénicas fueron aisladas en distintos períodos de tiempo de una misma granja, pero de diferentes animales, con un cuadro clínico de diarrea postdestete con alta morbimortalidad (Armocida, 1997). El estudio por PCR de la capacidad toxigénica de las cepas aisladas permitió correlacionar la signología clínica, lesiones anatomopatológicas y etiología. Por el contrario, las cepas aisladas de cuadros de diarreas predestete no fueron toxigénicas por lo que cabría considerar que en su etiología participan otros agentes, en particular virus (coro-

Tabla 3: Valores de rango obtenidos de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de 8 agentes antimicrobianos y concentraciones que inhibieron como mínimo 90% (CIM₉₀) y 50% (CIM₅₀) de 29 cepas de *E. coli* aisladas de lechones con diarrea pre y posdestete.

Agente Antimicrobiano	Rango	CIM ₅₀	CIM ₉₀
AMP	4-1024	16	1024
GEN	1-64	2	64
AKN	4-32	4	16
CTF	0,25-1	0,25	0,5
ENF	0,12-0,5	0,12	0,5
DNF	0,12-0,5	0,12	0,5
SMX	64-1024	>1024	>1024
TMS	0,5-512	0,5	>512

AMP: ampicilina; GEN: gentamicina; AKN: ampicacina; CTF: ceftiofur; ENF: enrofloxacina; DNF: danofloxacina; SMX: sulfametoxazol; TMS: trimetoprima-sulfametoxazol (1:19). Expresado en µg/ml.

na y rotavirus) y parásitos (*Isospora suis*) (Perfumo, 1996).

Ampicilina es utilizada frecuentemente para el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas porcinas (Friendship, 1993). Los valores de CIM₅₀ de 16 µg/ml coincidieron con los encontrados por Salmon et al. (1995) mientras que los valores de CIM₉₀ no fueron equiparables: 1024 µg/ml y >32,0 µg/ml. Se observó un porcentaje de resistencia del 34% y 48% de susceptibilidad.

Dentro de la familia de los aminoglucósidos se evaluaron GEN y AKN, siendo esta última la que obtuvo mejor resultado: 93% de sensibilidad, mientras que con la primera fue de 62%.

Ceftiofur demostró ser el antimicrobiano con el cual se logró el 100% de sensibilidad, siendo los valores de CIM₅₀ y CIM₉₀ de 0,25 µg/ml y 0,5 µg/ml respectivamente, los cuales fue-

Tabla 4: Porcentajes de sensibilidad y resistencia de 29 cepas de *E. coli* frente a 8 antimicrobianos utilizados para el tratamiento de la diarrea pre y posdestete.

Agente Antimicrobiano	Sensibles	Intermedios	Resistentes
AMP	48	17	34
GEN	62	10	28
AKN	93	0	7
CTF	100	0	0
ENF	100	0	0
DNF	100	0	0
SMX	17	0	83
TMS	62	0	38

AMP: ampicilina; GEN: gentamicina; AKN: ampicacina; CTF: ceftiofur; ENF: enrofloxacina; DNF: danofloxacina; SMX: sulfametoxazol; TMS: trimetoprima-sulfametoxazol (1:19).

ron ligeramente inferiores a los obtenidos por Salmon et al. (1995) para quienes fueron de 0,5 µg/ml y 1,0 µg/ml.

Dentro del grupo de las fluoroquinolonas, que generalmente demuestran buena actividad contra bacilos Gram negativos, ENF y DNF han sido desarrolladas para su uso en veterinaria. Estudios previos han mostrado que estos antimicrobianos son eficaces en el tratamiento de enfermedades bacterianas porcinas (Yeh y Kim, 1992; Food and Chemical News, 1994). En el estudio realizado se observó que tanto ENF como DNF, tuvieron una excelente acción sobre *E. coli*: 100% de sensibilidad con valores de CIM₉₀ de 0,5 µg/ml, valor superior al obtenido por Salmon et al. (1995) que fue de 0,06 µg/ml.

Las sulfamidias y las sulfamidias potenciadas (combinación Trimetoprima-sulfametoxazol) son ampliamente utilizadas para el tratamiento de numerosas enfermedades porcinas (Friendship, 1993). En el presente estudio se utilizó SMX como representante de este grupo antimicrobiano. Se observó que el mismo no fue activo contra *E. coli* siendo la CIM₉₀ de >1024 µg/ml con un porcentaje de resistencia del 83%. Estos resultados son coincidentes con otros previamente publicados (Salmon et al., 1995). La correlación también se observa con sulfamidias potenciadas. Se demostró que TMS fue inactiva contra *E. coli* a las concentraciones probadas (CIM₉₀ >512 µg/ml).

CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos, la determinación de la capacidad toxigénica de las cepas de *E. coli* por PCR, constituye una metodología necesaria para precisar las implicancias de estos microorganismos, como productores de diarreas en lechones. Se comprobó que cepas de *E. coli* aisladas de un brote de diarrea posdestete eran toxigénicas, 6 de ellas produjeron STIa y 1 LTI.

En función al alto porcentaje de resistencia obtenido con los antimicrobianos: AMP, GEN, SMX y TMS se sugieren la realización de estudios de sensibilidad antimicrobiana antes de su utilización. Ceftiofur, ENF y DNF demostraron ser los antimicrobianos más efectivos contra las 29 cepas de *E. coli* estudiadas, observándose un 100 % de sensibilidad en cada una de las drogas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Armocida, A.; Aguirre, J.I.; Moredo, F.; Vigo, G.; Sanz, M.; Machuca, M.; Idiart, J.; Perfumo, C.J. Diarrea y muerte súbita de carácter enzoótico producidas por *Escherichia coli* enterotoxigénicas. Resúmenes del VII Congr. Latinoam. Esp. Cer. y V Congr. Nac. Produc. Porc. Río Cuarto, Córdoba. 1997
2. Bertschinger, H.U.; Fairbrother, J.M.; Nielsen, N.O.; Pohlenz, J. Diseases of Swine. 7th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, (United States) 1992 p 552-9
3. Courvalin, P. Evasion of antibiotic action by bacteria. *J. Antimicrob Chemother* 1970; 37:855-69
4. Friendship, R.M. Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. Iowa State University Press, Ames, Iowa, (United State) 1993
5. Middlebrook, J.L.; Dorland, R. Bacterial Toxins: Cellular Mechanisms of Action. *Microbiol Rev.* 1984; 48:199-221
6. National Committee For Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. 2nd ed. Approved Standards. NCCLS document M7-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa. 1990
7. National Committee For Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals. 2nd ed. Proposed Standards. NCCLS document M31-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa. 1994
8. Parma, A.E.; Viñas, M.R.; Sanz, M.E.. Improvement of the Polymerase Chain Reaction to Detect *Escherichia coli* Shiga-like Toxin II Gene from Clinical Isolates. *J Microbiol Methods* 1996; 26:81-5
9. Perfumo, C.J.; Venturini, L.; Sanguinetti, H.R.; Aguirre, J.I.; Armocida, A.; Petrucelli, M.; Moredo, F. Infección por *Isospora suis* Sola o Asociada a Virus Entérico Como Causa de Alta Morbimortalidad en Lechones Lactantes. En prensa. 1996
10. Salmon, S.A.; Watts, J.L.; Case, C.A.; Hoffman, L.J.; Wegener, H.C.; Yancer, R.J. Comparison of MICs of Ceftiofur and Other Antimicrobial Agents against Bacterial Pathogens of Swine from United States, Canada and Denmark. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2435-44
11. Smith, H.W.; Gyles, C.L. The relationships between two apparently different enterotoxins produced by enteropathogenic strains of *Escherichia coli* of porcine origin. *J Med Microbiol* 1970; 3:387-401
12. Woodward, M.J.; Carroll, P.J.; Wray, C. Detection of Enterotoxin and Verocytotoxin Genes in *Escherichia coli* from Diarrhoeal Disease in Animals Using the Polymerase Chain Reaction. *Vet Microbiol* 1992; 31:251-61
13. Yeh, J.; Kim, B. Effect of enrofloxacin on post weaning diarrhea in pigs. In Proceedings of 12th Annual Meeting of The International Pig Veterinary Society. Animal Health Service, Boxtel, The Netherlands 1992

VIRUS HERPES EQUINO TIPO 1 (EHV-1): PATRONES DE RESTRICCIÓN DE ADN, PERFILES PROTEICOS Y ESTUDIO DE PATOGENICIDAD EN RATONES

C.M. Galosi^{1,2}, M.G. Echeverría^{1,3}, M.V. Vila Roza^{1,4}, V. Cid de La Paz^{1,5},
G.A. Oliva¹, M.E. Etcheverrigaray¹

¹Cátedra de Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias,
Universidad Nacional de La Plata

²Investigador Adjunto c/D CIC, Provincia de Buenos Aires.

³Investigador Asistente CONICET. ⁴Becaria de Iniciación de CIC, Provincia de Buenos Aires

⁵Profesional de Apoyo de CIC, Provincia de Buenos Aires

RESUMEN: Se estudiaron siete cepas de herpesvirus equino 1 (EHV-1) aisladas en Argentina desde 1979 hasta 1996 y una cepa de referencia japonesa, analizándose los patrones de restricción del ADN, perfiles proteicos en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y los biotipos, para determinar posibles diferencias entre las mismas y su correlación con la patogenicidad en el ratón. El análisis genómico con enzimas de restricción demostró que todas las cepas pertenecen al tipo 1P de EHV-1. Sólo el primer aislamiento realizado en el país (cepa SP) mostró diferencias en su patrón de restricción del ADN. Esta cepa y la cepa aislada en el año 1985 (cepa LP) presentaron además diferencias en sus perfiles proteicos. El estudio de patogenicidad en ratones indicó la presencia de tres biotipos, no encontrándose correlación con las variaciones halladas en los electroferotipos y con la sintomatología clínica en el equino.

PALABRAS CLAVES: Virus herpes equino 1, Patrones de restricción del ADN, Electroforesis en geles de poliacrilamida, Patogenicidad en ratones.

EQUINE HERPESVIRUS TYPE 1 (EHV-1): RESTRICTION FRAGMENT PATTERNS, POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS PROFILES AND PATHOGENICITY IN BABY MICE

ABSTRACT: Seven strains of equine herpesvirus 1 (EHV-1) isolated in Argentina from 1979 to 1996 and reference Japanese strain, were compared by restriction fragments analysis (RFA), polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and inoculation of baby mice. The RFA revealed that all EHV-1 strains belonged to genome type 1P. Only the first isolate (SP strain) showed differences. This strain and the LP strain isolated in 1985 presented a small differences for SDS-PAGE analysis. Baby mice inoculation revealed that three biotypes could be distinguished on the basis of pathogenicity. However, no strict correlation with pathogenicity in the natural host was seen.

KEY WORDS: Equine herpesvirus 1, Restriction enzyme patterns, Polyacrylamide gel electrophoresis, Pathogenicity in baby mice

INTRODUCCIÓN

El virus herpes equino tipo 1 (EHV-1) fue aislado por primera vez de material de fetos abortados en EE.UU. en 1933 (Dimock et al., 1947). Se encuentra distribuido por todo el mundo y produce cuatro manifestaciones clínicas importantes en el equino: enfermedad respiratoria, aborto, síndrome neonatal y enfermedad nerviosa (Allen y Bryans, 1986; Crabb y Studdert, 1995).

En nuestro país se detectaron anticuerpos (Ac) por primera vez en el año 1965 (Matumoto et al., 1965) y en 1978 se determinó la existencia de 25% de reactores en la Provincia de Buenos Aires (Etcheverrigaray et al., 1978). En 1979 se realizó el primer aislamiento a partir de un feto abortado (Etcheverrigaray et al., 1982), en 1984 se describieron brotes epizooticos de enfermedad nerviosa asociada a este virus (Nosetto et al., 1985) y en 1985 se realizó el aislamiento a partir de leucocitos de un equino con cuadro clínico respiratorio (Galosi et al., 1989). Desde ese momento han sido aisladas numerosas cepas, tanto de animales vacunados como de no vacunados.

El control de esta virosis se realiza por medio de vacunas atenuadas e inactivadas (Kirisawa et al., 1994). En Argentina, desde el año 1982, sólo está permitido el uso de vacunas inactivadas no existiendo ningún tipo de información sobre el uso de otro tipo de vacunas antes de esa fecha.

Distintos grupos de investigación han realizado varios estudios *in vivo* e *in vitro* para demostrar diferencias entre las cepas aisladas de fetos abortados y enfermedad neonatal de aquellas provenientes de casos respiratorios (Engels et al., 1986; Kirisawa et al., 1994). Las endonucleasas de restricción, útiles para detección de heterogeneidad entre los aislamientos virales han confirmado que el EHV-1 posee un genotipo simple y dos electroferotipos [1P y 1B] (Allen et al., 1983) aunque algunos autores hallaron cepas compuestas de variantes atenuadas y virus salvaje (Palfi y Christensen, 1995). El análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida de las proteínas estructurales y no estructurales del virus aportan datos sobre diferencias de movilidad intratípicas (Allen et al., 1983). Los estudios en ratones lactantes demostraron que existen cuatro biotipos de acuerdo al organotropismo y patogenicidad, que no hay correlación con la patogenicidad en el equino y que los diferentes signos clínicos se deben a las condiciones del mismo (Allen et al., 1983; Nowotny et al., 1987; Palfi y Christensen, 1995; Patel y Edington, 1983).

El propósito del presente trabajo fue determinar el perfil proteico, el genotipo y el bioti-

po de 7 cepas de EHV-1 aisladas en Argentina entre 1979 y 1996 para determinar el grado de homogeneidad entre las mismas y establecer su correlación con la patogenicidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

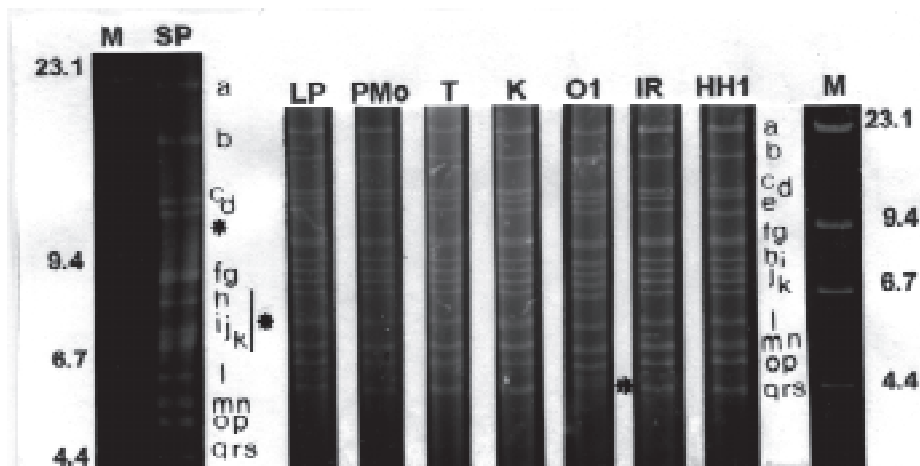
Virus y aislamientos virales: Se estudiaron siete cepas de EHV-1 aisladas en Argentina (Tabla N° 1). Las cepas SP y LP fueron aisladas en cultivos primarios de riñón de feto equino (EFK) y las restantes fueron aisladas en células de línea RK₁₃ (riñón de conejo). La cepa SP fue replicada 62 veces en células heterólogas; LP y PMo fueron replicadas 18 veces en células RK₁₃ y las restantes cepas fueron estudiadas a partir de su aislamiento. La cepa japonesa HH1, de electroferotipo 1P, fue incluida como cepa de referencia (Kawakami, Y, 1993).

Cultivos celulares: se utilizaron células RK₁₃ desarrolladas con Medio Mínimo Esencial (MEM) (Lab. Nissui, Japón) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), antibióticos y antimicóticos. Para el mantenimiento de las células se usó el mismo medio de cultivo con 2% de SFB.

Extracción del ADN viral: monocapas de células RK₁₃ fueron infectadas con cada una de las cepas utilizando multiplicidad de infección (mdi) = 0,5. Cuando el efecto citopático (ECP) fue extensivo, las monocapas se levantaron, se lavaron con solución tamponada de fosfatos (PBS), se lisaron con TEN (100 mM de Tris-HCl pH 8,5, 12,5 mM de EDTA pH 8,0, 150 mM de ClNa y 1% de SDS) y luego se trataron durante 4 horas a 50° C con 0,2 mg/ml de Proteinasa K. El ADN fue extraído con una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y luego precipitado con etanol puro (Echeverría et al., 1994).

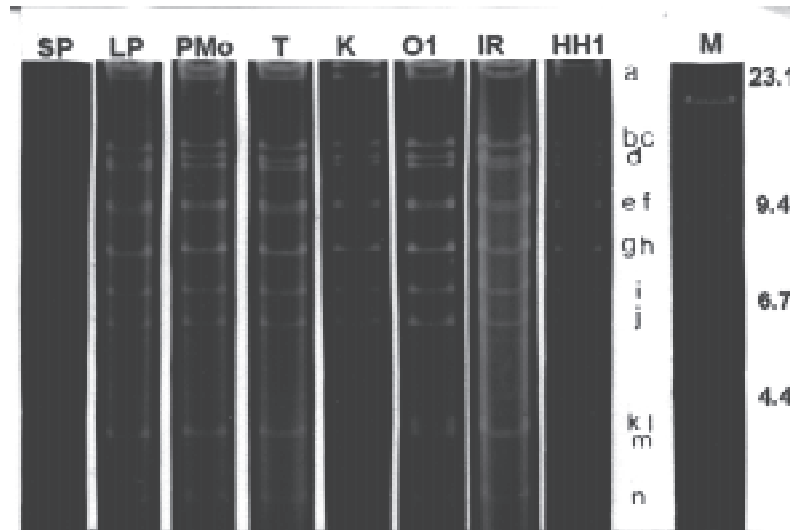
Análisis con endonucleasas de restricción (RE): aproximadamente 1,5 µg de ADN de cada una de las cepas fueron digeridos a 37° C durante toda la noche con las enzimas *Bam*HI y *Bg*III. Luego se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 0,7% (140 x 150 x 5 mm) en solución de Tris-acetato (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 8,0) a 20 V durante 16 horas, se tiñeron con bromuro de etidio (1 µg/ml) y se visualizaron con luz UV.

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE): Monocapas de células RK₁₃ fueron infectadas con cada una de las cepas virales con mdi= 0,5 y mantenidas con MEM libre de SFB. Cuando el ECP fue generalizado, las células y los sobrenadantes se levantaron, se cen-



M: marcador de peso molecular (λ DNA digerido con *Hind*III) expresado en kilobases. La nomenclatura de los fragmentos se cita a la derecha de la cepa de referencia HH1. Los asteriscos indican las variaciones halladas.

Foto 1: Patrones de restricción del ADN obtenidos con *Bam* HI, de 10 cepas de EHV-1 aisladas en la Argentina entre 1979 y 1996.



M: marcador de peso molecular (λ DNA digerido con *Hind* III) expresado en kilobases. La nomenclatura de los fragmentos se cita a la derecha de la cepa de referencia HH1

Foto N°2: Patrones de restricción del ADN obtenidos con *Bgl*III, de 10 cepas de EHV-1 aisladas en la Argentina entre 1979 y 1996.

trifugaron y los paquetes celulares obtenidos se lavaron con PBS y se solubilizaron con Nonidet P-40 al 1% en TEN. Se procedió de la misma manera con células sin infectar como control (AgC). Estas muestras (Ags) fueron procesadas para trabajar en condiciones reducidas y se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 7,5% (170 x 190 x 1 mm) empleando un sistema de buffer discontinuo (Laemmli 1970) durante 7 horas a 30 mA. Los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie y se decoloraron en solución de metanol ácido.

Patogenicidad en ratones: Se utilizaron 7 ratones (cepa CF-1) de 3 días de edad por cada una de las cepas virales en estudio y 7 ratones como controles. Se inocularon vía intracerebral

(IC) utilizando 0,01 ml de cada suspensión viral clarificadas por centrifugación (DICT 50%= $10^{4.5}$ - $10^{5.0}$) y sobrenadante de células no infectadas para el caso de los controles. Los ratones muertos en las primeras 48 horas post-inoculación (pi) no fueron considerados y aquellos que murieron y/o mostraron síntomas nerviosos a partir del tercer día pi fueron sacrificados y sus órganos (cerebro, pulmón, hígado, riñones y bazo) conservados a -70° C. Los ratones sobrevivientes fueron sacrificados a los 21 días pi. Todas las muestras se procesaron para el reaislamiento de las cepas y se inocularon sobre monocapas preformadas de células RK₁₃. Se realizaron tres pasajes ciegos antes de dar por negativa a la muestra.

Tabla N^a 1: Cepas de herpesvirus equino 1 (EHV-1) empleadas en este estudio.

CEPA VIRAL	LUGAR DE AISLAMIENTO	AÑO DE AISLAMIENTO	SIGNOS CLÍNICOS
SP	Buenos Aires	1979	Aborto
LP	Buenos Aires	1985	Rinoneumonitis
PMo	Buenos Aires	1990	Aborto
T	Tucumán	1990	Aborto
K	Comrientes	1991	Aborto
O1	Buenos Aires	1991	Enfermedad neonatal
IR	Buenos Aires	1996	Aborto
HH1*	Japón	1967	Aborto

* Cepa japonesa de referencia

Tabla N^o 2: Clasificación de acuerdo a su patogenicidad en ratón (cepa CF-1) de 3 días de edad, de cepas de EHV-1 aisladas en Argentina entre 1979 y 1996.

GRUPO	CEPAS	MUERTE (días pi)	RE AISLAMIENTO VIRAL	
			cerebro	vísceras
A	HH1*, PMo, T, K, IR	5-7	+	+
B	SP	5-10	+	-
C	LP, O1	0	+	-

* Cepa japonesa de referencia

RESULTADOS

La foto 1 muestra los patrones de restricción obtenidos con *Bam*HI. La cepa SP puede ser diferenciada de las otras por la variación en la movilidad del grupo de fragmentos "h, i, j y k". Además esta cepa carece del fragmento "e" que está presente en el resto de los aislamientos aunque con diferente movilidad que la cepa de referencia HH1. El grupo "q, r, s" es similar en todas las cepas excepto en O1 en la que este grupo demuestra poseer menor movilidad.

En los electroferotipos con *Bg*III (Foto N^o2) puede observarse que la cepa SP se diferencia de las restantes por la movilidad del grupo de fragmentos "b, c, y d". Las cepas K y O1 demuestran una leve diferencia de movilidad del grupo "k, l y m" al igual que en la cepa HH1 aunque en este último caso, este grupo de fragmentos demuestra ser mas liviano.

Mediante el uso de la técnica de SDS-PAGE, los Ag de membranas celulares modificadas por la acción de cada uno de los virus en estudio y el AgC otorgaron un número elevado de bandas proteicas. La única diferencia hallada fue la pérdida de la banda correspondiente al peso molecular de 200 kD en las cepas SP y LP.

Por su patogenicidad en ratones lactantes las cepas fueron categorizadas de acuerdo a los siguientes criterios: letalidad (*), y capacidad de reaislamiento a partir de cerebro (**) y vísceras (***) (Nowotny et al., 1987; Palfi y

Christensen, 1995; Patel y Edington, 1983) tal como se demuestra en la Tabla N^o2.

En el grupo A se encuentran las cepas que mataron a la totalidad de los ratones y que pudieron ser reaisladas de cerebro y vísceras. En el grupo B se incluyen a las cepas que no mataron a la totalidad de los ratones (SP) y en el grupo C se presentan las cepas que no fueron letales (LP). En estos dos últimos grupos el virus sólo fue reaislado de cerebro.

DISCUSIÓN

El RE análisis con *Bam*HI demostró que todas las cepas pertenecen al tipo 1P y no se observan variantes 1B (Allen y Bryans, 1986). Los patrones de restricción no presentaron características de recombinaciones entre genomas 1P y vacunas atenuadas como hallaron otros autores (Meyer et al., 1987; Palfi y Christensen, 1995). No se demostró variabilidad en el fragmento "g" reafirmando que éste es altamente estable. Únicamente en la cepa SP se observó pérdida del fragmento *Bam*HI "e", lo que podría deberse al efecto de la mayor cantidad de pasajes de esta cepa en células heterólogas (Allen et al., 1983; Studdert et al., 1986). Las cepas restantes presentaron pequeñas diferencias de movilidad de algunos de los fragmentos de restricción.

En el estudio de movilidad de las proteínas, las variaciones halladas en la banda correspondiente a la glicoproteína (gp) de 200 kD

de PM en las cepas SP y LP confirman los datos aportados por otros grupos de trabajo que indican que esta gp es variable dentro del mismo tipo viral (Turtinen y Allen, 1982).

En concordancia con Patel y Edington (1983), las cepas de reducida letalidad y no letales (grupos B y C) sólo pudieron ser reaisladas de cerebro y a diferencia de otros autores no se encontraron cepas "no letales y no reaisladas" clasificadas en el grupo denominado D (Palfi y Christensen, 1995). Por otro lado, las cepas LP y O1, provenientes de casos clínicos diferentes en equinos presentaron las mismas características patogénicas para el ratón, reafirmando que no existe correlación entre las manifestaciones clínicas en equinos y la patogenicidad en ratón lactante.

Como conclusión del presente trabajo podemos inferir que no existen mayores diferencias entre los perfiles proteicos de las cepas

en estudio como así tampoco se observó correlación entre las variaciones halladas en los electroferotipos y la patogenicidad en el ratón.

Esta es la primera investigación epidemiológica de cepas argentinas de EHV-1. Debemos identificar y determinar en el futuro, la implicancia de la heterogeneidad hallada en los patrones de restricción del primer aislamiento realizado en el país.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Cátedra de Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP por haber provisto gratuitamente los animales de experimentación utilizados en este estudio. Este trabajo ha sido financiado por la Universidad Nacional de La Plata y la Agencia Internacional de Cooperación del Japón (JICA).

BIBLIOGRAFÍA

1. Allen, G.P.; Yeargan, M.R.; Bryans, J.T. Alterations in the equine herpesvirus 1 genome after in vitro and in vivo virus passage. *Infection and Immunity* 1983; 40: 436-9
2. Allen, G.P.; Yeargan M.S.; Turtinen, M.S.; Bryans, J.T.; Mc Collum W.H. Molecular epizootiologic studies of equine herpesvirus-1 by restriction endonuclease fingerprinting of viral DNA. *American Journal Veterinary Research* 1983; 44: 263-71
3. Allen, G.P.; Bryans, J.T. Molecular epizootiology, pathogenesis and prophylaxis of Equine Herpesvirus-1 infections. *Progress in Veterinary Microbiology and Immunology* 1986; 2: 78-144.
4. Crabb, B.S.; Studdert, M. Equine herpesviruses 4 (Equine rhinopneumonitis virus) and 1 (Equine abortion virus). *Advances in Virus Research* 1995; 45: 153-90
5. Dimock, W.W.; Edwards, P.E.; Bruner, D.W. Infections observed in equine fetuses and foals. *Cornell Vet* 1947; 37: 88-9
6. Echeverria, M.G.; Norimine, J.; Galosi, C.M.; Oliva, G.A.; Etcheverrigaray, M.E.; Noretto, E.O.; Tohya, Y.; Mikami, T. The genotype of Aujeszky's disease viruses isolated in Argentina. *Journal of Veterinary Medical Sciences* 1994; 56: 985-7
7. Engels, M.; Nowotny, N.; Metzler A.E.; Wyler R.; Burki, F. Genomic and antigenic comparison of an equine herpesvirus-1 (EHV-1) isolate from the 1983 lipizan abortion storm with EHV-1 reference strains. *Microbiologica* 1986; 9:221-34
8. Etcheverrigaray, M.E.; Sciutto, D.; Schudel, A.A.; Perez Azumendi, R. Rinoneumonitis equina I: detección de anticuerpos precipitantes en caballos de la provincia de Buenos Aires. *Revista Militar Veterinaria* 1978; 25: 173-5
9. Etcheverrigaray, M.E.; Oliva, G.A.; Gonzalez, E.T.; Noretto, E.O.; Martin, A.A. Comportamiento de una cepa de HVE-1 aislada de un feto abortado. *Revista Militar Veterinaria* 1982; 30: 138-9
10. Galosi, C.M.; Noretto, E.O.; Gimeno, E.J.; Gomez Dunn, C.; Etcheverrigaray, M.E.; Ando, Y. Equine herpesvirus-1 (EHV-1): characterization of a viral strain isolated from equine plasma in Argentina. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 1989; 8,1:117-22
11. Kawakami, Y. The genomic diversity among equine herpesvirus-1 strains isolated in Japan. *Archives of Virology* 1993; 129: 11-22
12. Kirisawa, R.; UI, S.; Takahashi, A.; Kawakami, Y.; Iwai, H. Comparison of the genomes of attenuated equine herpesvirus-1 strains with their parent virulent strain. *Virology* 1994; 200: 651-60
13. Laemmli, V. Cleavage and structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5
14. Matumoto, M.; Ishizaki, R.; Shimizu, T. Serological survey of equine rhinopneumonitis virus infections in various horses in various countries. *Arch Ges Virusforsch* 1965; 50: 606-23
15. Meyer, H.; Hubert, P.H.; Eichhorn, W. Changes in restriction enzyme pattern of the Equine herpes virus type 1 (EHV-1) strain Rac H DNA during attenuation. *J Vet Med B* 1987; 34: 310-13
16. Noretto, E.O.; Monina, M.I.; Baschar, H.; Galosi, C.M.; Gallo, G.; Idiart, J.R.; Gimeno, E.J. Síndrome neurológico asociado a herpes virus equino tipo 1 (HVE-1). *Med Vet* 1985; 2: 583-8
17. Nowotny, N.; Burtscher, H.; Burki, F. Neuropathogenicity for suckling mice of Equine herpesvirus 1 from the Lipizzan outbreak 1983 and of selected other EHV 1 strains. *J Vet Med B* 1987; 34: 441-8
18. Palfi, V.; Christensen, L.S. Analysis of restriction fragment patterns (RFPs) and pathogenicity in baby mice of equine herpesvirus 1 and 4 (EHV-1 and EHV-4) strains circulating in Danish horses. *Veterinary Microbiology* 1995; 47: 199-204
19. Patel, J.R.; Edington, N. The pathogenicity in mice of respiratory, abortion and paresis isolates of equine herpesvirus-1. *Veterinary Microbiology* 1983; 8: 301-5
20. Studdert, M.J.; Fitzpatrick, D.R.; Browning, G.F.; Cullinane, A.A.; Whalley, J.M. Equine herpesvirus genomes: heterogeneity of naturally occurring type 4 isolates and of a type 1 isolate after heterologous cell passage. *Arch Virol* 1986; 91: 375-81
21. Turtinen, L.W.; Allen, G.P. Identification of the envelope surface glycoproteins of equine herpesvirus type 1. *J Gen Virol* 1982; 63: 481-5

AISLAMIENTO DE MYCOPLASMA SYNOVIAE DE POLLOS PARRILLEROS Y GALLINAS REPRODUCTORAS PRIMERA COMUNICACIÓN EN LA REPÚBLICA ARGENTINA

R. O. Cerdá^{1,2}, J. A. Xavier², M. A. Petruccelli³, M. E. Etcheverrigaray⁴

¹Cátedra de Microbiología. Facultad de Ciencias Veterinarias

²Laboratorio de Investigaciones y Diagnóstico Bacteriológico

³Cátedra de Patología de Aves y Pilíferos, ⁴Cátedra de Virología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

RESUMEN: En sucesivos muestreos realizados sobre 29 pollos parrilleros y 72 gallinas reproductoras pesadas de 2 establecimientos avícolas de la Provincia de Buenos Aires, se aislaron 23 cepas de *Mycoplasma synoviae* (5 de pollos parrilleros y 18 de gallinas reproductoras pesadas). Los parrilleros presentaban signos clínicos de Sinovitis Infecciosa (SI), mientras que los reproductores manifestaban trastornos respiratorios compatibles con la Enfermedad Respiratoria Crónica de las aves (ERC). En ambas categorías de animales se detectó serología positiva a *Mycoplasma synoviae* (Pruebas de Aglutinación Rápida en Placa e Inhibición de la Hemoaglutinación). La tipificación de las cepas aisladas, se llevó a cabo mediante el estudio de sus propiedades culturales, bioquímicas y serológicas, siendo ésta la primera comunicación de aislamiento de este microorganismo en la República Argentina.

PALABRAS CLAVES: Sinovitis infecciosa, *Mycoplasma synoviae*, Aislamiento, Caracterización.

ISOLATION OF MYCOPLASMA SYNOVIAE FROM BROILER CHICKENS AND BREEDERS. FIRST REPORT IN ARGENTINA

ABSTRACT: Twenty three *Mycoplasma synoviae* strains (5 from broiler chickens and 18 from broiler breeders) were isolated from 2 farms of broiler chickens and broiler breeders of Buenos Aires province. The broilers presented symptoms of Infectious Synovitis and the breeders showed clinical signs of Chronic Respiratory Disease. Both categories of animals were serologically positive to *Mycoplasma synoviae* (Rapid Plate Agglutination Test and Hemagglutination Inhibition Test). The isolated strains were characterized as *Mycoplasma synoviae* on the bases of their cultural, biological and serological properties. This is the first report of isolation of this organism in Argentina.

KEY WORDS: Infectious Synovitis; *Mycoplasma synoviae*; Isolation, Characterization

INTRODUCCIÓN

La Micoplasmosis Aviar es una enfermedad ampliamente difundida por todo el mundo, pudiéndose presentar como Enfermedad Respiratoria Crónica (ERC) o como Sinovitis Infecciosa (SI), siendo *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae* respectivamente los responsables de las mismas (Olson et al, 1956). Este último organismo está también comprometido en la ERC produciendo trastornos a nivel respiratorio tales como traqueítis, sinusitis, inflamación de sacos aéreos y pulmones (Olson et al, 1964), presentando estas manifestaciones principalmente luego de las vacunaciones contra Enfermedad de Newcastle y Bronquitis Infecciosa (Kleven et al, 1972). A partir de estos órganos puede diseminarse por vía sanguínea y alcanzar las articulaciones y producir artritis y sinovitis (Kleven et al, 1991). Si bien la mortalidad en estas dos formas de presentación es baja, la morbilidad es muy alta, lo cual se traduce en importantes pérdidas económicas producto del bajo incremento de peso en los planteles de pollos parrilleros (Mollison, 1985) y descenso de la postura en las gallinas ponedoras (Mohammed et al, 1987).

En nuestro país existen pocos estudios sobre Micoplasmosis Aviar (Colusi et al., 1962, 1963; Cerdá et al, 1993), pero de mucho valor como antecedentes de la presencia de esta enfermedad en las granjas de nuestro medio rural. Por otro lado, es una preocupación frecuente entre los veterinarios y productores avícolas la detección de esta enfermedad en sus planteles, ya sea mediante la observación de signos clínicos característicos o por los monitoreos serológicos positivos.

Este trabajo tiene como objetivo comunicar los primeros aislamientos en el país de cepas de *M. synoviae* a partir de pollos parrilleros y reproductoras pesadas con lesiones articulares y síntomas respiratorios, así como también la metodología empleada para la caracterización de las mismas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales: Durante un período de 5 meses, se tomaron muestras en dos granjas de la Provincia de Buenos Aires productoras de pollos parrilleros y gallinas reproductoras pesadas. El muestreo abarcó un total de 29 pollos parrilleros (5 correspondientes a la granja I y 24 a la granja II) y 72 gallinas reproductoras pesadas (30 de la granja I y 42 de la granja II). Tanto los parrilleros de la granja I como los de la granja II presentaban una marcada inflamación de las articulaciones y dificultad para ca-

minar al momento de la toma de las muestras. Del mismo modo, las reproductoras de las dos granjas presentaban leves signos respiratorios consistentes en rales y chasquidos, y en algunas de ellas, una escasa descarga mucosa óculonasal.

Histopatología: Se extrajeron muestras de tendones de la región de los gastrocnemios, pulmón, hígado, bolsa de Fabricio y riñón de los pollos parrilleros, y muestras de pulmón de las reproductoras, las que fueron fijadas en formol neutro al 10%. Las mismas fueron deshidratadas y embebidas en parafina, cortadas y coloreadas con la técnica convencional de hematoxilina y eosina.

Serología: Antes del sacrificio de los animales, se realizaron sangrados por punción cardíaca en los parrilleros y punción de la vena del ala en las reproductoras. Una vez separado el suero, se realizó la prueba de aglutinación rápida en placa (ARP) con antígeno de Intervet (Intervet International B.V. Boxmeer-Holland) para *M. gallisepticum* y *M. synoviae*, y de inhibición de la hemoaglutinación (IH) con antígenos de producción propia siguiendo la técnica descrita por Vardamann et al (1969).

Muestras bacteriológicas: Las muestras tomadas consistieron en hisopados traqueales de las reproductoras e hisopados traqueales y de exudado articular de las articulaciones fémorotibiales de los pollos parrilleros. Los hisopos se sembraron en forma directa sobre placas de Petri con medio sólido de Frey adicionado con 12% de suero porcino, y luego se inocularon en tubos con 2 ml de medio líquido de Frey (Frey et al, 1968). A partir de estos tubos, se realizaron 4 diluciones 1:10 para disminuir los contaminantes y las sustancias inhibitorias para los micoplasmas presentes en los tejidos. Tanto las placas como los tubos sembrados se incubaron a 37°C.

Aislamiento y caracterización: Los procedimientos para el aislamiento e identificación de cepas fueron descritos previamente (Cerdá et al., 1993; Koshimizu et al., 1993). En esta oportunidad se logró mejorar el método de aislamiento mediante el agregado, en los tubos con medio líquido, de alícuotas de antisueros producidos contra las especies saprófitas de micoplasmas más comunes en el tracto respiratorio (*M. gallinarum* y *M. gallinaceum*) y que por su rápido crecimiento (24 h) dificultan el desarrollo de *M. synoviae* (4 a 6 días).

Luego de varios días de incubación de los cultivos en medio líquido, se realizaron repiques en medio sólido (medio de Frey con el agregado de agar noble al 0,9%). Las placas se llevaron a incubación a 37°C en cámara húmeda y en aerobiosis hasta la detección, mediante el uso de lupa estereoscópica, de colonias típicas del

género *Mycoplasma*. Las cepas aisladas fueron clonadas tres veces para la obtención de cepas puras, conservándose a -20°C en medio líquido de Frey con 10% de glicerol.

Con las colonias que crecieron sobre las placas sembradas en forma directa, se realizó la prueba de inmunofluorescencia directa a fin de obtener un resultado más rápido.

Pruebas bioquímicas: Sobre las cepas clonadas se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas :

Ensayo de requerimiento de colesterol para diferenciación del género *Acholeplasma*. Esta prueba se llevó a cabo sembrando las cepas aisladas en medio sólido de Frey sin suero.

Fermentación de la glucosa: se realizó mediante la inoculación de 0,2 ml de cada cepa en 2 ml de medio líquido de Frey, el cual contiene una concentración final de glucosa del 1% (pH 7,6).

Hidrólisis de la arginina: se inocularon tubos con medio líquido de Frey con el agregado de L-arginina (0,2 g/100 ml de medio, pH 7,0).

Actividad de la fosfatasa: se comprobó la presencia de esta enzima de acuerdo a la técnica de Bradbury (1983).

Reducción del tetrazolium: se llevó a cabo según la técnica de Erno et al (1973).

Detección de la producción de "film & spot" (Freundt et al, 1983).

Pruebas serológicas:

Prueba de Inhibición del Crecimiento: La misma se llevó a cabo según la técnica descrita por Clyde (1964) en la cual se emplearon sueros anti-*M. gallisepticum*, anti-*M. synoviae*, anti-*M. gallinarum* y anti-*M. gallinaceum* preparados en conejos con cepas de referencia de acuerdo a la técnica descrita por Senterfit (1983). Para la producción de los antisueros se utilizaron conejos californianos de aproximadamente 2 Kg de peso, los cuales fueron inoculados con una suspensión de micoplasmas desarrollados en 1.000 ml de medio líquido de Frey, centrifugados a 12000 rpm y lavados 3 veces con solución "buffer" de fosfato (PBS) pH 7,1. El sedimento fue finalmente resuspendido en 10 ml de PBS y conservado a -30°C hasta el momento de su uso. Para la inmunización se realizó una emulsión de 4 ml de la suspensión de antígeno con igual cantidad de adyuvante completo de Freund procediéndose a la inoculación intramuscular de 0,5 ml de antígeno en cuatro sitios distintos y 0,2 ml intradérmicos en otros cuatro lugares. A los 21 días se realizó una segunda descarga de 0,5 ml de antígeno por vía intramuscular en cuatro sitios. A los 42 días de la primer inoculación se realizó el sangrado de los animales y se midió el título de

anticuerpos de cada suero por medio de la prueba de inhibición del crecimiento, obteniéndose en todos los casos, títulos satisfactorios (halos de inhibición entre 10 y 15 mm). Para el desarrollo de esta prueba, se embebieron discos de papel de filtro estéril con los distintos antisueros. Estos se colocaron en el centro de las placas sembradas con cada una de las cepas aisladas y las de referencia. Luego se incubó durante 3 días a 37°C y se evaluó la presencia de halos de inhibición en torno a los discos de papel.

Prueba de Inmunofluorescencia Directa: Se llevó a cabo mediante el empleo de conjugados de *M. gallisepticum* y *M. synoviae* cedidos gentilmente por el Dr. S.H. Kleven (Department of Avian Medicine, University of Georgia). La misma se realizó según la técnica del "bloque de agar" descrita por DelGiudice y Barile (1983), con las siguientes modificaciones: luego de varios días de incubación de las distintas cepas en placas de agar, se seleccionaron dos zonas con colonias separadas. Sobre éstas se colocaron cilindros de plástico de 15 mm de largo por 13 mm de diámetro, de manera que las colonias quedaran dentro de un pocillo formado por el cilindro y el agar. Se colocaron 2 gotas de cada conjugado en cada pocillo y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Luego se procedió al lavado de las colonias con PBS, se retiraron los cilindros, se levantaron las piezas circulares de agar colocándose sobre un portaobjetos. Por último, se adicionaron algunas gotas de solución de montar (60% de glicerol en PBS) sobre las piezas de agar y se examinaron las colonias con microscopio de epi-fluorescencia.

Cepas de referencia: Para la producción de los sueros hiperinmunes y el control positivo de las distintas pruebas bioquímicas y serológicas, se emplearon las cepas de referencia de *M. gallisepticum* PG-31, *M. synoviae* WVU 1853, *M. gallinarum* PG-16 y *M. gallinaceum* DD, cedidas gentilmente por el National Institute of Animal Health de Tsukuba, Japón.

RESULTADOS

El estudio histopatológico de las articulaciones mostró una marcada hiperplasia de las vainas sinoviales donde se observó una gran infiltración de heterófilos y una infiltración difusa de linfocitos. En el hígado se observaron múltiples focos de necrosis e infiltración de células linfocitarias. En la bolsa de Fabricio se pudo observar edema interfolicular y despoblamiento medular de los folículos linfocitarios. No se observaron alteraciones significativas en pulmón. En las muestras de pulmón de las reproductoras, se observaron algunas áreas neumónicas

Tabla N°1: Lugar de aislamiento de las cepas de *Mycoplasma synoviae*.

Granja	Animales	N° de cepas aisladas/ N° de muestras	Lugar de aislamiento	
			Tráquea	Articulación
I	Parrilleros	2/5	2	-
	Reproductoras	4/30	4	-
II	Parrilleros	3/24	1	2
	Reproductoras	14/42	14	-

con leve infiltración linfocítica y escasas lesiones granulomatosas.

Del total de las 101 muestras procesadas, se logró el aislamiento de 23 cepas de micoplasmas (5 de pollos parrilleros y 18 de gallinas reproductoras) (Tabla N°1), las cuales se caracterizaron por el lento desarrollo (4 días) de colonias con la típica forma de "huevos fritos". Todas las cepas demostraron requerir medios con suero para su crecimiento, fermentaron la glucosa y no hidrolizaron la arginina. Todas fueron negativas a la prueba de fosfatasa y a la de reducción del tetrazolium, y produjeron "film & spot". Las cepas aisladas fueron inhibidas en su crecimiento por el antisero anti-*M. synoviae*.

Mediante la técnica de epi-inmunofluorescencia directa se detectó fluorescencia específica en las colonias frente al conjugado anti-*M. synoviae*. Esta técnica permitió detectar colonias de *M. synoviae* entre colonias de otras especies de micoplasma en las placas sembradas en forma directa, con lo cual se obtuvo un diagnóstico rápido (4 días) de la enfermedad.

En el estudio serológico, todos los sueros analizados reaccionaron positivamente frente al antígeno de *M. synoviae* en la prueba de ARP y negativamente a *M. gallisepticum*. En la prueba de IH, el 100% de las muestras fueron negativas a *M. gallisepticum*, mientras que el 80% fueron positivas a *M. synoviae* (Tabla N°2).

Tabla N°2: Resultado de las pruebas serológicas de aglutinación rápida en placa e inhibición de la hemoaglutinación

Granja	Animales	N° de muestras	ARP		IH	
			MG ^a (+/td.)	MS ^b (+/td.)	MG (+/td.)	MS (+/td.)
I	Parrilleros	5	0/5	5/5	0/5	0/5
	Reproductoras	30	0/30	30/30	0/30	24/30
II	Parrilleros	24	0/24	24/24	0/24	16/24
	Reproductoras	42	0/42	42/42	0/42	40/42

a: *Mycoplasma gallisepticum*

b: *Mycoplasma synoviae*

DISCUSIÓN

Según las características de crecimiento, el tamaño de las colonias y sus propiedades bioquímicas y serológicas, los organismos aislados corresponden a cepas de *M. synoviae*.

El aislamiento de *M. synoviae* a partir de muestras extraídas de articulaciones es, por sí misma, muy dificultosa debido al poco tiempo de viabilidad del microorganismo en estos tejidos (Olson et al., 1984). Por tal motivo es importante destacar el aislamiento de dos cepas de estos sitios, confirmando el tropismo de esta especie de micoplasma por los tejidos articulares.

El empleo de antiseros contra las especies saprofitas de micoplasmas frecuentemente presentes en el tracto respiratorio, según recomendaciones de Kleven (datos no publicados) fue de gran utilidad para inhibir el desarrollo de las mismas y permitir el crecimiento de *M. synoviae*, el cual requiere hasta de una semana o más días para su crecimiento.

Coincidiendo con los estudios de otros investigadores (DelGiudice y Barile, 1983), la técnica de inmunofluorescencia directa confirmó ser un método rápido, sensible, y de fácil realización para la identificación de cepas aisladas a campo, principalmente cuando se trata de cultivos mixtos dado que no es necesario realizar el clonado de las mismas.

Con respecto al estudio serológico y según se detalla en la Tabla N°2, es importante hacer referencia a algunos puntos. En primer lugar destacar la alta prevalencia de animales seropositivos a *M. synoviae* en contraposición a la no detección de positivos a *M. gallisepticum*. Esto se correlaciona con observaciones hechas a campo por numerosos productores y profesionales avícolas. Por otra parte es válido destacar la importancia de la técnica de IH como prueba confirmatoria en el diagnóstico de la Micoplasmosis Aviar debido a su alta especificidad, pero sólo cuando un bajo porcentaje de muestras reaccionan positivamente por ARP (Kleven, 1975). El empleo de esta técnica en animales con brotes agudos puede conducir a diagnósticos equivocados por obtención de resultados "falsos negativos", como se observa en las 5 muestras de parrilleros de la granja I. Por tal motivo, sería recomendable utilizar la técnica de ARP como prueba tamiz para el análisis de un número grande de muestras y confirmar el diagnóstico mediante aislamiento o IH en caso de obtener un bajo número de muestras positivas, o bien repitiendo el estudio en un lapso de 10 A 15 días.

Al igual que en la mayoría de los países de alta producción avícola, tanto la ERC como

la SI están desempeñando un importante papel en las pérdidas de producción en nuestro país. Los brotes de estas enfermedades han ido en aumento desde hace unos años como producto del marcado incremento en la importación de pollitos BB de reposición de los plantales de reproductoras. Esto se debe a que en muchas oportunidades, los controles serológicos que se realizan a la entrada de estos lotes, no llegan a detectar a los animales positivos por falta de sensibilidad de las técnicas empleadas como pudo observarse en este trabajo.

Durante varios años hemos intentado aislar a este microorganismo de diferentes brotes

de ERC y SI pero sin éxito. Mediante la estandarización de las técnicas de aislamiento y el apoyo de laboratorios privados y empresas avícolas se logró aislar e identificar por primera vez en el país cepas de *M. synoviae*.

En trabajos posteriores se realizarán estudios de las cepas aisladas a fin de conocer su grado de virulencia mediante la inoculación de pollos SPF (libres de patógenos específicos), estudios de sensibilidad a distintos antibióticos de uso comercial, y estudios de los perfiles proteicos y de los fragmentos de restricción a fin de obtener datos acerca de la epidemiología de esta enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bradbury, J. Phosphatase activity, en *Methods in Mycoplasmaology*. First edition. Academic Press Inc. New York (USA) Vol. I. 1983 p 363-6
2. Cerdá, R.O.; Copes, J.; Moredo, F.; Villat, C.; Stanchi, N. Aislamiento de *Mycoplasma gallisepticum* a partir de gallos reproductores con síntomas de Enfermedad Respiratoria Crónica (ERC). Resumen de los trabajos científicos presentados al I Congreso Internacional de la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Plata. Av-137 1993
3. Clyde. *Mycoplasma* species identification based upon growth inhibition by specific antisera. *J Immunol* 1964; 92:958-65
4. Colusi, A.; Capaul, E.; Garbini, J. Enfermedad Crónica Respiratoria (PPLo). *Rev Med Vet (Buenos Aires)* 1962; 43, 3:155-63
5. Colusi, A.; Garbini, J. Nueva Comprobación de Enfermedad Crónica Respiratoria (CRD). *Rev Med Vet Buenos Aires* 1962; 43,5:295-301
6. Colusi, A. Estudio Microbiológico de cepas de *Mycoplasma gallisepticum* aisladas en la Argentina. *Rev Med Vet (Buenos Aires)* 1963; 44,1:55-61
7. Delgiudice, R. Barile, M. Immunofluorescence, en *Methods in Mycoplasmaology*. First edition. Academic Press Inc. New York (USA) Vol. I 1983 p 431-9
8. Erno, H. Stipkovits, L. Bovine mycoplasmas: Cultural and biochemical studies. II *Acta Vet. Scand.* 1973; 14:450-63
9. Freundt, E. A. Film and Spot Production, en *Methods in Mycoplasmaology*. First edition. Academic Press Inc. New York (USA) Vol. I 1983 p 373-4
10. Frey, M.c., Hanson, R. P. Anderson, D. P. A medium for the isolation of avian Mycoplasmas. *Am J Vet Res* 1968; 29: 2164-71
11. Kleven, S.; King, D. Anderson, D. Airsacculitis in broilers from *Mycoplasma synoviae*: Effect on airsac lesions of vaccinating with infectious bronchitis and Newcastle virus. *Avian Dis* 1972; 16: 915-24
12. Kleven, S. Antibody response to avian mycoplasmas. *Am J Vet Res* 1975; 36: 563-5
13. Kleven, S.; Rowland, G. Olson, N. *Mycoplasma synoviae* infection, en *Diseases of Poultry*, 9th edition. Iowa State University Press, Ames, Iowa, (USA) 1991 p 223-31
14. Koshimizu, K.; Saito, T.; Shinozuka, Y.; Tsuchiya, K.; Cerdá, R. Isolation and Identification of *Mycoplasma* strains from various species of wild rodents. *J Vet Med Sci* 1993; 55,2:323-4
15. Mollison, E. MS erodes profit margins. *Poult Dig* 1985; 44: 204-7
16. Mohammed, H. O.; Carpenter, T. E. Yamamoto, R. Economic impact of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in commercial layer flocks. *Avian Dis* 1987; 31: 477-82
17. Olson, N.; Shelton, D.; Bletner, J.; Munro, D.; Anderson, G. Studies of infectious synovitis in chickens. *Am J Vet Res* 1956; 17: 747-54
18. Olson, N.; Adler, H.; Damassa, A.; Corstvet, R. The effect of intranasal exposure to *Mycoplasma synoviae* and infectious bronchitis on development of lesions and agglutinins. *Avian Dis* 1964; 8: 623-31
19. Olson, N. *Mycoplasma synoviae* infection, en *Diseases of Poultry* 8th Ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, (USA) 1984 p 212-20
20. Senterfit, L. Preparation of antigen and antisera, en *Methods in Mycoplasmaology*. First edition. Academic Press Inc. New York (USA) Vol. I 1983 p 401-4
21. Vandarmann, T. H. And Yoder, H.W. Jr. Preparation of *Mycoplasma synoviae* hemagglutinating antigen and its use in the hemagglutination inhibition test. *Avian Dis* 1969; 13: 654-61

VALORES HEMATOLÓGICOS DE REFERENCIA EN TORTUGA TERRESTRE ARGENTINA (*Chelonoidis chilensis chilensis*)

J.C. Troiano¹, M.C. Silva²

¹Medico Veterinario. Área de Iología. Museo Argentino de Ciencias Naturales (CONICET)

²Medico Veterinario. Área de Patología Clínica. Departamento de Medicina.
Facultad de Ciencias Veterinarias. Buenos Aires.

RESUMEN: Se tomaron muestras sanguíneas de 150 ejemplares sanos de tortuga terrestre argentina (*Chelonoidis chilensis chilensis*) por medio de punción de la vena coccygea superior. Las determinaciones que se realizaron incluyeron recuentos de glóbulos rojos, leucocitos y trombocitos, hematocrito, concentración de hemoglobina, índices hematimétricos y fórmulas leucocitarias relativas, las que se compararon con otras especies de Testudinidae. No se observaron cambios estadísticamente significativos en los parámetros sanguíneos como función de la edad o el sexo ($p > 0,01$). En el invierno se observó un aumento de los valores de glóbulos rojos, hematocrito y hemoglobina ($p < 0,01$), mientras que en el verano aumentaron los glóbulos blancos y trombocitos ($p < 0,01$). La fórmula leucocitaria no resultó afectada por los factores en estudio.

PALABRAS CLAVE: Tortuga terrestre, parámetros hematológicos, referencia.

REFERENCE HEMATOLOGICAL VALUES IN ARGENTINIAN TERRESTRIAL TURTLE (*Chelonoidis chilensis chilensis*)

ABSTRACT: Blood samples were taken from 150 healthy specimens of argentine terrestrial turtle (*Chelonoidis chilensis chilensis*) by means of venipuncture of upper coccygeal vein. The determinations red blood cells, leucocyte and thrombocyte count, hematocrit, hemoglobin concentration, hemathimetric index and differential leucocyte count were performed and compared with other Testudinidae species. No statistically significant changes were observed as function as sex and age ($p > 0.01$). In winter were observed high values of red blood cell counts, hematocrit and hemoglobin ($p < 0.01$), while in summer increased leucocyte and thrombocyte counts were observed ($p < 0.01$). The differential leucocyte counts were not affected by the studied factors.

KEY WORDS: terrestrial turtle, hematological parameters, reference.

INTRODUCCIÓN

El estudio de los indicadores fisiológicos de los animales mantenidos en cautiverio es de importancia, ya que permite contar con una rápida herramienta diagnóstica que ofrece mucha información referida al estado de salud de los animales. Uno de los primeros sistemas que deben ser examinados es el sanguíneo, que cumple importantes funciones como el transporte de gases, nutrientes y eliminación de los desechos metabólicos que resultan de dichos procesos por distintas vías del organismo.

Si se compara el estudio hematológico de los reptiles con los efectuados en otros vertebrados, se encuentran pocas citas en la bibliografía generada en el país, a pesar que existe una metodología analítica aplicada a los mamíferos y aves, las cuales han sido exhaustivamente estudiadas.

En las especies autóctonas, esta falencia de información se hace más evidente, tal el caso de un quelonio autóctono y considerado por CITES como un animal en riesgo de extinción e incluido en el apéndice I de dicha convención. Si bien la bibliografía consultada menciona estudios hematológicos en testudínidos, estas especies estudiadas pertenecen a otros hábitats y las muestras no están bien definidas en cuanto a la cantidad de animales, su estado de salud y otros aspectos igualmente importantes.

Los objetivos del presente trabajo son establecer los parámetros hematológicos de referencia normales para una especie autóctona de tortuga, así como su variación debida a factores tales como sexo, edad y época del año.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante los años 1996 y 1997 se procedió a la toma de muestras de 150 ejemplares de distinta procedencia y clínicamente sanos de tortuga terrestre argentina (*Chelonoidis chilensis chilensis*) pertenecientes a diferentes sexos y edades. La toma de muestras se realizó por medio de la punción de la vena coccígea superior (Richter et al., 1977) utilizando para ese fin, material descartable. La sujeción de los animales fue realizada manualmente evitando el uso de anestésicos o tranquilizantes que pueden hacer variar los componentes cuali o cuantitativos de la sangre. (Duguy, 1982).

De cada animal se tomaron 2 ml de sangre, la cual se depositó en tubos de vidrio con tapón de goma, conteniendo heparina como anticoagulante a razón de 20 μ l/ml de sangre. La muestra se acondicionó en recipientes de poliestireno con hielo molido para una mejor

conservación. Las determinaciones que se realizaron fueron: recuentos de glóbulos rojos, leucocitos y trombocitos por medio de una dilución 1:200 en pipetas para recuento de glóbulos rojos en líquido de Natt & Herrick (Otis, 1974) y recuento en la cámara de Neubauer, multiplicando los glóbulos rojos observados en cinco campos del retículo central por 5.000 y los leucocitos teñidos en los retículos laterales por 1.000 para obtener la cuenta de estas células por mm^3 de sangre. En el caso de los trombocitos, el recuento por mm^3 , se realizó contando estas células observadas en el retículo central de la cámara y multiplicados por 2.000. Las ventajas que tiene este método son las de permitir un rápido conteo de células sanguíneas cargando la cámara y realizando la dilución una sola vez.

El hematocrito se determinó por el método del microhematocrito y la concentración de hemoglobina fue medida mezclando 20 μ l de sangre entera en 5.0 ml de reactivo de Drabkin (Wiener Laboratorios, Argentina). Después de la centrifugación de los núcleos de los eritrocitos se midió espectrofotométricamente la concentración de cianmetahemoglobina a una absorbancia de λ 540 nm comparado con una solución estándar de 15,5 g/dl de hemoglobina (Wiener Laboratorios, Argentina). Los índices hematimétricos (VCM, HCM y CHCM) se calcularon con las formulas de Wintrobe. El recuento diferencial de leucocitos se realizó sobre frotis hechos en el momento de tomar la muestra, secados al aire y teñidos por la técnica pancromática de May-Grünwald & Giemsa, modificada por Rosenfeld (1947). La clasificación de las células de la serie blanca se hizo sobre la base de la terminología tintorial y morfológica propuesta por Hawkey & Dennett (1994).

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo con metodología estadística paramétrica utilizando el software Prism 2.1 (Graph Pad Inc.). Los datos de la estadística analítica se expresan como media (\bar{x}) \pm desvío estándar (DS). La diferencia entre grupos fue analizada por medio de un test "t" de Student y la media entre grupos por medio de una Análisis de Varianza utilizando como modelo experimental un ensayo factorial del tipo 2³.

RESULTADOS

Los resultados se expresan en las tablas N°1 a 3, referidos como valores de referencia en función de la estación del año (Tabla N°1), edad (Tabla N°2) y sexo de los animales (Tabla N°3).

El análisis estadístico demuestra que la época del año es el factor que causa variaciones en los componentes sanguíneos. Durante

el invierno se observa un aumento de glóbulos rojos, hematocrito y hemoglobina ($p < 0.01$). Durante el verano, descienden estos valores aumentan proporcionalmente los recuentos de glóbulos blancos y trombocitos ($p < 0.01$). La edad y el sexo no tienen una influencia significativa en la variación de los parámetros sanguíneos ($p > 0.01$). Las fórmulas leucocitarias relativas no resultan alteradas por ninguna de las variables en estudio ($p > 0.01$).

Tabla N°1. *Chelonoidis chilensis chilensis*
Parámetros Hematológicos Analizados en Función de la Variable Época del año

Determinación	Invierno (n:75)	Verano (n:75)
Recuento de Glóbulos Rojos ($10^9/l$)	700 \pm 74	599 \pm 25
Hematocrito (%)	25,2 \pm 8	21,35 \pm 3,5
Hemoglobina (g/dl)	11 \pm 3,7	9,4 \pm 1,3
V.C.M. (pg)	360 \pm 36	356 \pm 23
H.C.M. (pg)	157 \pm 62	156 \pm 63
C.H.C.M. (%)	43,6 \pm 32	44,6 \pm 5,7
Recuento de Glóbulos Blancos ($10^9/l$)	9,2 \pm 1,9	11,2 \pm 2,5
Recuento de Trombocitos ($10^9/l$)	4,2 \pm 1,3	6,2 \pm 2,5
Linfocitos (%)	26 \pm 8,6	25 \pm 2,3
Monocitos (%)	5 \pm 2,1	4 \pm 2,5
Azurófilos (%)	9 \pm 5	8 \pm 2
Heterófilos (%)	28 \pm 2	29 \pm 2,3
Eosinófilos (%)	32 \pm 8	32 \pm 5
Basófilos (%)	0	1 \pm 1,3

V.C.M. (Volumen Corpuscular Medio) H.C.M. (Hemoglobina Corpuscular Media) C.H.C.M. (Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media)

Tabla N°2. *Chelonoidis chilensis chilensis*
Parámetros Hematológicos Analizados en Función de la Variable Edad

Determinación	Juveniles (n:75)	Adultos (n:75)
Recuento de Glóbulos Rojos ($10^9/l$)	660 \pm 34	658 \pm 32
Hematocrito (%)	22,3 \pm 1,26	23 \pm 3,98
Hemoglobina (g/dl)	10,1 \pm 1,65	10 \pm 1,84
V.C.M. (pg)	337 \pm 32	349 \pm 43
H.C.M. (pg)	152 \pm 67	151 \pm 63
C.H.C.M. (%)	45 \pm 4	42,3 \pm 3,4
Recuento de Glóbulos Blancos ($10^9/l$)	8,9 \pm 2,5	9 \pm 2,6
Recuento de Trombocitos ($10^9/l$)	4,25 \pm 1,7	4,3 \pm 1,5
Linfocitos (%)	26 \pm 11	25 \pm 2,6
Monocitos (%)	5 \pm 2,3	5 \pm 1,5
Azurófilos (%)	8 \pm 2,4	7,2 \pm 3,32
Heterófilos (%)	28 \pm 4	29 \pm 2,4
Eosinófilos (%)	31 \pm 12	32,7 \pm 3,78
Basófilos (%)	1 \pm 0,5	0,9 \pm 0,2

V.C.M. (Volumen Corpuscular Medio) H.C.M. (Hemoglobina Corpuscular Media) C.H.C.M. (Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media)

Tabla N°3. *Chelonoidis chilensis chilensis*
Parámetros Hematológicos Analizados en Función de la Variable Sexo

Determinación	Machos (n:75)	Hembras (n:75)
Recuento de Glóbulos Rojos ($10^9/l$)	689 \pm 34	688 \pm 24
Hematocrito (%)	22 \pm 1,8	23 \pm 3,8
Hemoglobina (g/dl)	10 \pm 1,54	10,4 \pm 1,49
V.C.M. (pg)	319 \pm 42	334 \pm 35
H.C.M. (pg)	145 \pm 21	151 \pm 23
C.H.C.M. (%)	45,4 \pm 4	45,2 \pm 6
Recuento de Glóbulos Blancos ($10^9/l$)	8,8 \pm 2,3	8,9 \pm 2,3
Recuento de Trombocitos ($10^9/l$)	4,2 \pm 9	4,2 \pm 1,3
Linfocitos (%)	26 \pm 11	26 \pm 2,36
Monocitos (%)	5,5 \pm 1,4	5 \pm 1,5
Azurófilos (%)	7,8 \pm 1,9	8 \pm 3
Heterófilos (%)	27,5 \pm 5	28 \pm 2,1
Eosinófilos (%)	32 \pm 14	31 \pm 9,5
Basófilos (%)	1 \pm 0,8	2 \pm 0,2

V.C.M. (Volumen Corpuscular Medio) H.C.M. (Hemoglobina Corpuscular Media) C.H.C.M. (Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media)

DISCUSIÓN

Los valores hallados en el recuento de glóbulos rojos de *Chelonoidis chilensis chilensis* son menores a los descriptos para otros testudínidos como *Gopherus agasizii* (Roszkopf, 1982), *Testudo hermannii* (Muro et al., 1994) y *Xerobates spp* (Jacobson et al., 1991) con recuentos de glóbulos rojos que superan 1.000.000 glóbulos rojos/mm³, mientras que nuestra cuenta de estos elementos no supera las 700.000 células/mm³. Otras citas para especies similares como *Geochelone gigantea* (Hart et al., 1991), *Geochelone geometrica* (Pienaar, 1962), *Testudo hermannii* y *Testudo graeca iberica* (Lawrence & Hawkey, 1986; Muro et al., 1994).

Los valores de hemoglobina y hematocrito se encuentran dentro del rango de variación descripto para *Gopherus agasizii* (Roszkopf, 1982) y *Xerobates spp* (Jacobson et al., 1991), pero son mayores a aquellos descriptos para *Geochelone gigantea* (Hart et al., 1991) *Geochelone geometrica* (Pienaar, 1962), *Testudo hermannii* y *Testudo graeca iberica* (Lawrence & Hawkey, 1986; Muro et al., 1994).

Con respecto a los valores de glóbulos blancos y trombocitos, estos datos se asemejan a los reportados para algunos testudínidos como *Testudo hermannii* y *Testudo graeca iberica* (Lawrence & Hawkey, 1986; Muro et al., 1994), pero son menores a los descriptos para *Geochelone gigantea* (Hart et al., 1991).

En *Gopherus agasizii* (Rosskopf, 1982) se reportan valores mas altos en el recuento de glóbulos blancos, pero esta diferencia podría ser debida a que este autor cuenta los trombocitos cada 100 leucocitos y no por la técnica de Natt y Herrick que utilizamos en el presente trabajo. Los reportes de varios autores (Pienaar, 1962; Hart et al., 1991; Rosskopf, 1982; Wood & Ebanks, 1984; Frair, 1972; Sheeler & Barber, 1964; Semple et al., 1970; Stenross & Bowman, 1968) indican que la fórmula leucocitaria de los quelonios tiene un alto porcentaje de eosinófilos (31-33%) tal como lo muestran las tablas N°1 a 3, le siguen los heterófilos en un porcentaje de 26 a 29%, luego los linfocitos 24 a 26%, los azurófilos, monocitos y finalmente los basófilos que no superan el 2% de la cuenta de leucocitos. En este punto Pienaar (1962) refiere en *Geochelone pardalis* de Sudáfrica un recuento de 20% de basófilos.

La variación de los parámetros hematológicos en función de la época del año se ha reportado por varios autores que trabajan con reptiles y dentro de ellos especialmente los quelonios (Pienaar, 1962; Hart et al., 1991; Roskopff, 1982; Wood & Ebanks, 1984; Lawrence & Hawkey; Sheeler&Barber, 1964; Semple et al., 1970; Stenross&Bowman, 1968). De acuerdo a los datos encontrados en nuestro trabajo, es posible observar un aumento de glóbulos rojos, hemoglobina y hematocrito en el invierno y un aumento proporcional de glóbulos blancos y trombocitos en el verano.

Las causas de este fenómeno aún se encuentran en el ámbito de conjeturas, pero dos teorías pretenden explicar este hecho. Por un lado se menciona que la deshidratación resultante de la hibernación y el menor consumo de alimentos y agua determina una disminución del plasma, con secuestro de líquidos en el intersticio y un aumento del recuento de glóbulos rojos y hematocrito. Frair (1977) y Stenross & Bowman (1984) mencionan un hecho similar a nuestros hallazgos en varias especies de tortugas como *Chelydra serpentina*, *Lysemmys punctata*, *Chrysemys scripta* y *Emydoidea blandingii*. Por otro lado, otra teoría propone que

el aumento de glóbulos rojos, hematocrito y hemoglobina en la época invernal se debería a un estímulo de la eritropoyetina por caída en la tensión de oxígeno cuando el animal hiberna (Gaummer&Goodnigth, 1957; Duguy, 1982). Gilles-Baillen& Schoffeniles (1965) y Lawrence & Hawkey (1986), por el contrario, mencionan en *Testudo hermannii* una situación diferente, con disminución de los valores de glóbulos rojos, hematocrito y hemoglobina en el invierno, por secuestro de líquidos al intersticio y retención de agua en la vejiga. Finalmente O'Connor et al (1994) mencionan que la variación de los parámetros sanguíneos debido a la época del año no existe, trabajando con *Gopherus agasizii*, especie similar a nuestra tortuga terrestre.

La edad y el sexo no tienen una influencia significativa sobre los parámetros sanguíneos, a pesar de los reportes de Wood & Ebanks (1984), que mencionan diferencias en el recuento de glóbulos rojos, hemoglobina y hematocrito en los adultos de *Chelonia mydas* comparados con los juveniles ($p<0.01$). Hart (1991) menciona una diferencia estadísticamente significativa ($p<0.01$) entre los valores hematológicos de machos y hembras de *Geochelone gigantea*, mientras que Frair (1977) menciona variaciones referidas al tamaño de los animales en *Malayemys spixii*; en los animales de mayor tamaño aumentan los valores de glóbulos rojos, blancos y hematocrito comparados con animales de tamaño menor.

Las fórmulas leucocitarias no resultan alteradas por ninguna de las variables en estudio, en contraste con la opinión de otros autores (Duguy, 1982) que mencionan un leucograma de invierno con aumento de linfocitos y un hemograma de verano con aumento de los eosinófilos.

Los valores de referencia presentados en el presente trabajo constituyen en primer reporte para el país y representan el primer escalón de trabajos más exhaustivos destinados a evaluar el impacto de otros factores, además de los estudiados, sobre los componentes sanguíneos, por ejemplo el cautiverio o la libertad.-

BIBLIOGRAFÍA

1. Duguay, R. Biology of the Reptilia (III), Carl Gans (Ed), Academic Press, New York, 1982 p 155-88
2. Frair, W. Turtle blood cells packed cell volume, sizes and numbers. *Herpetologica* 1977; 33: 167-90
3. Frair, W.. Sea turtle blood cells parameters correlated with carapace length. *Comp Biochem Physiol* 1972; 56(A): 467-72
4. Gaumner, A.H.; Goodnigh, C.J. Some aspects of the hematology of turtles related to their activity. *The American Midland Naturalist*. 1957; 58: 332-40
5. Giles-Baillen, M.; Schoffeniles, E. Variation saisonnières dans la composition du sang de la tortue grecque *Testudo hermanni*. *Ann Soc Roy Zool Belgique* 1965; 95:75-9
6. Hart, M.G.; Samour, H.; Spratt, M.J.; Savage, B.; Hawkey, C.N. An analysis of hematological findings of a feral population of Aldabra giant tortoises (*Geochelone gigantea*) *Comp Hem Int* 1991; 1:145-9
7. Hawkey, C.N.; Dennet, T.B. A Color Atlas of Comparative Hematology. Wolfe Medical Publications Ltd, Ipswich, England, 1994 p 1-195
8. Jacobson, E.R.; Schumacher, J.; Green, M. Field and clinical techniques for sampling and handling blood for hematologic and selected biochemical determinations in the desert tortoise *Xerobates spp.* *Copeia* 1991; 11: 237-41
9. Lawrence, K.; Hawkey, C.N. Seasonal variations in hematological parameters in long term captive Mediterranean tortoises (*Testudo graeca* and *Testudo hermanni*). *Res Vet Scien* 1986; 43: 379-83
10. Muro, J.; Cuenca, R.; Viñas, L., Lavin, L. Interés del hemograma en la clínica de quelonios. *Veterinaria en Praxis* 1994; 9,3:24-9
11. O'Connor, M.P.; Grumbles, J.S.; George, R.H.; Zimmermam, L.C., Spotila, J. Potential hematological and biochemical indicators of stress in free-ranging desert tortoises exposed to a hydric stress gradient. *Herpetological Monographs* 1994; 8: 5-26
12. Otis, V.S. Leucocyte and erythrocyte diluent for reptilian blood cells count. *Copeia* 1974; 1: 253-5
13. Pienar, U de V. Hematology of Some South African reptiles. University of Witwatersrand Press. Johannesburg (RSA) 1962 p 1-29
14. Richter, G.; Olsen, K.; Fletcher, J.; Benirscke, T.; Bogart, J. Collecting blood from Galapagos tortoises and box turtle. *V.M./S.A.C.* 1977; 12: 1376-8
15. Rosenfeld, G. Corante pancroamtico para hematologia e citologia humana. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num so corante de emprego rapido. *Mem Inst Butantan* 1947; 20: 328-34
16. Roskopf, W. Normal hemogram and blood chemistry values for California desert tortoise. *V.M. / S.A.C.* 1982; 1: 185-7
17. Sheeler, P.; Barber, A.A. Comparative hematology of the turtle, rabbit and rat. *Comp Biochem Physiol* 1964; 11: 139-45
18. Semple, R.e.; Sigsworth, D.; Titt, J.T. Seasonal observations on the plasma, red blood cells and blood volume of two turtle species natives to Ontario. *Can J Physiol Pharm* 1970; 4: 282-90
19. Stenross, O.O.; Bowman, V.M. Turtle blood. I. Concentrations of various constituents. *Comp Biochem Physiol* 1968; 25(A): 219-22
20. Wood, E.f.; Ebanks, G.K. Blood cytology and hematology of the green sea turtle *Chelonia mydas*. *Herpetologica* 1984; 40: 345-9

PURIFICACIÓN DE VACUNA ANTIRRÁBICA POR EXTRACCIÓN LIPÍDICA

J. De Filippo, C.C. Paolazzi

Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud
"Dr. Carlos G. Malbrán" Instituto Nacional de Producción de Biológicos.
Servicio Vacuna Antirrábica.

RESUMEN: *Un nuevo método para la purificación de vacuna antirrábica fue desarrollado con el objeto de disminuir el contenido lipídico proveniente del sustrato animal empleado en la producción de vacuna. Dos técnicas extractivas fueron aplicadas sobre una vacuna de uso veterinario: uno de los métodos fue realizado empleando un homogeneizador Omnimixer Sorvall, seguido por centrifugación; el otro fue una extracción convencional realizada en ampolla de decantación. Ambos métodos fueron llevados a cabo utilizando n-hexano y n-heptano, alternativamente. La extracción con n-heptano en ampolla de decantación mostró ser adecuada para nuestro propósito disminuyendo el contenido lipídico en aproximadamente un 30% y preservando el 80% de la potencia de la vacuna con respecto al control.*

PALABRAS CLAVE: Vacuna antirrábica, purificación, extracción lipídica.

PURIFICATION OF RABIES VACCINE BY LIPIDIC EXTRACTION

ABSTRACT: *A new purification method for rabies vaccines was developed in order to diminish lipid content arising mainly from the animal substrate employed in vaccine production. Two extractive techniques were performed on a vaccine for veterinary use: one method was performed employing a Sorvall Omnimixer homogenizer, followed by centrifugation; the other was a conventional extraction carried out in a drop funnel. Both methods were performed with n-hexane and n-heptane, alternatively. Extraction with n-heptane in a drop funnel proved to be suitable for our purpose by diminishing lipid content some 30%, preserving 80% vaccine potency with respect to the control.*

KEY WORDS: Rabies vaccine, purification, lipidic extraction.

Dirección para correspondencia: Dr. Claudio C. Paolazzi, Instituto Nacional de Producción de Biológicos, Servicio Vacuna Antirrábica, Av. Vélez Sarsfield 563, (1281) Buenos Aires, Argentina. Teléfono: (54)-01-303/1806 al 11, interno: 225. E-mail: mhedrera@ffyba.uba.ar

INTRODUCCIÓN

Las vacunas antirrábicas producidas con tejido nervioso de animales adultos presentan dos desventajas importantes:

(1) una baja concentración de antígeno por dosis, lo que hace necesario largos planes de inmunización para lograr la cobertura deseada (Abdussalam y Bogel, 1971; Kuwert, 1967); y

(2) la presencia de tejido heterólogo, responsable de severas reacciones encefalomielíticas post-vacunales causadas principalmente por el llamado factor encefalitogénico, una proteína básica asociada a la mielina de composición predominantemente lipídica, procedente del tejido nervioso (Wolman, 1968; Chaleomchan, et al. 1990; Ubol, et al. 1990) y ligado a la causa de accidentes neuroparalíticos que van desde leves parestesias temporarias a daño neurológico permanente y eventualmente muerte (Hemachudha, et al. 1987; Swaddiwuthipong, et al. 1988).

Estas dificultades han sido reducidas por el empleo de animales lactantes (Fuenzalida y Palacios 1955; Gispén, et al. 1965; Svet-Moldavskij, et al. 1965) con los cuales se logró una mayor productividad viral y disminuir el riesgo por el factor encefalitogénico. La vacuna producida en cerebro de animales lactantes ha sido ampliamente usada en América Latina permitiendo el control de la enfermedad en la región. Los métodos de producción han sido modificados con la intención de minimizar los riesgos de accidentes post-vacunales provenientes del sustrato empleado, sin afectar la potencia de la vacuna. De esta manera, la utilización de animales de no más de un día de vida y la purificación por centrifugación de la vacuna a 17000 g (Larghi, et al. 1976) fueron algunas de las modificaciones más importantes realizadas para minimizar el contenido de mielina proveniente de la masa cerebral cosechada. Otra de las estrategias utilizadas es el empleo de ratas lactantes en lugar de ratones (Díaz, et al. 1989; Karakujumcan, et al. 1973; Segre 1984); este procedimiento permitió mantener una alta productividad viral ($10^6 - 10^7$ $DL_{50} / 0,03 \text{ ml}$) así como también una mayor masa infectada (50% mayor que en ratón), sin incrementar los riesgos causados por el factor encefalitogénico.

En el presente trabajo desarrollamos otra técnica de purificación la cual, combinada con el método de centrifugación a 17000 g, demostró ser una buena alternativa para disminuir el contenido lipídico y reducir en consecuencia el riesgo por el factor encefalitogénico. El proceso involucra la extracción de lípidos provenientes del tejido animal y fue aplicado a una vacuna veterinaria producida sobre la base de ratas lactantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Producción de vacuna:

La vacuna empleada en este trabajo es del tipo Fuenzalida-Palacios; identificada como lote V-134 (uso veterinario). El método de elaboración de este tipo de vacuna consiste en utilizar ratas lactantes de hasta un día de vida provenientes de madres sanas y controladas. Diferentes lotes de ratas lactantes fueron inoculados intracerebralmente con las tres cepas de virus rábico fijo semilla 91, 51 y CVS. Luego de 72 horas de incubación, los animales con síntomas fueron sacrificados con cloroformo y la masa cerebral fue cosechada en forma aséptica en flujo laminar de seguridad biológica. Las diferentes cosechas de las cepas 51, 91 y CVS en relación 1:1:2 respectivamente, fueron diluidas convenientemente, homogeneizadas y centrifugadas a 17000 g a 4°C, 15 minutos. El sobrenadante así obtenido fue inactivado en forma continua utilizando un equipo Dill, por radiación germicida ultravioleta. La vacuna terminada consiste en una suspensión viral inactivada (diluida al 2,5%) conteniendo fenol y merthiolate como preservadores. La vacuna fue sometida a los controles de proceso sugeridos por OMS cuyos resultados se pueden observar en la Tabla N° 1.

Purificación de vacuna:

Se ensayaron extracciones utilizando dos solventes orgánicos, n-hexano y n-heptano grado analítico, esterilizados por medio de una membrana filtrante de 0,2 μm (Whatman poly cap 36 TF. Cat. n° 6700-3602). Las experiencias fueron realizadas según los métodos extractivos descriptos a continuación:

Método A: La vacuna fue mezclada con el solvente orgánico (n-hexano o n-heptano) en una relación 10:1 (vacuna:solvente) y posteriormente homogeneizada a máxima velocidad, a 4°C y por 10 minutos en condiciones de esterilidad; en homogeneizador Omnimixer Sorvall (Dupont Instruments Mod. 17106). La emulsión resultante de color blanquecina fue centrifugada a 2500 rpm por 15 minutos a 4°C. Luego de la centrifugación se obtienen dos fracciones: una transparente acuosa inferior y otra de consistencia semisólida color marrón claro superior de aproximadamente 8 mm de espesor (emulsión estable). La fracción acuosa (llamada $A_{\text{aq n-hex}}$ para la extracción realizada con n-hexano y $A_{\text{aq n-hep}}$ con n-heptano) fue bombeada dentro de un kitasato, luego las trazas de solvente orgánico fueron removidas por burbujeo de nitrógeno estéril a través de filtro de 0,2 μm (Gelman acro 50 Cat. N° 4251) a 4°C durante 12 horas. La fracción acuosa fue utilizada en el ensayo de potencia y analizada su composición por electroforesis en SDS-PAGE.

La fracción semisólida (llamada $A_{\text{org n-hex}}$ para la extracción con n-hexano y $A_{\text{org n-hep}}$ con n-heptano) fue tratada posteriormente, con la finalidad de romper la emulsión y analizar la composición proteica por electroforesis en SDS-PAGE.

Método B: La vacuna contenida en ampolla de decantación fue tratada tres veces con el solvente orgánico (n-hexano o n-heptano), en una relación 30:1 (vacuna:solvente) cada vez. En los dos casos se obtuvieron dos fases claramente separadas. Una fase superior orgánica transparente y una inferior acuosa de aspecto similar a la vacuna original, aunque un poco más clarificada (llamada $B_{\text{aq n-hex}}$ para la extracción n-hexano y $B_{\text{aq n-hep}}$ con n-heptano). Las trazas de solvente orgánico en la fracción acuosa fueron removidas como se describió para el método A. La fracción acuosa fue utilizada en los ensayos de potencia y analizada su composición por electroforesis en SDS-PAGE.

La fracción orgánica (llamada $B_{\text{org n-hex}}$ para la extracción realizada con n-hexano y $B_{\text{org n-hep}}$ con n-heptano) fue analizada posteriormente por electroforesis en SDS-PAGE.

Controles:

Luego de finalizadas las experiencias extractivas los controles que se especifican más adelante fueron realizados sobre las diferentes fracciones.

Lípidos: Los lípidos totales fueron cuantificados en todas las fracciones acuosas, como así también en la vacuna de origen no tratada utilizada como control. El contenido lipídico fue determinado por un método colorimétrico basado en la reacción de la sulfosfovainillina (Postma y Stroes, 1968) modificado por nuestro grupo de trabajo como sigue: a) 2 ml de ácido sulfúrico concentrado fueron agregados a 500 μl de muestra; b) una vez mezclado, la solución fue calentada a 100°C en baño de agua por 10 minutos, luego enfriada a temperatura ambiente; c) a 500 μl de esta solución se agregaron 2,5 ml de reactivo (el cual consiste en ácido fosfórico 14 mol l^{-1} y vainillina 13 mmol l^{-1}); d) la solución obtenida fue mezclada por inversión y mantenida a 25°C durante 30 minutos; y e) el contenido lipídico fue determinado por lectura a 530 nm dentro de los siguientes 30 minutos (luego de los cuales el color no es estable). La solución blanco fue preparada agregando 2,5 ml de reactivo a 500 μl de ácido sulfúrico concentrado. La curva de calibración fue confeccionada empleando un "pool" de suero humano normal conteniendo 7080 mg l^{-1} (titulado con un estándar comercial) diluido en un rango de 800 mg l^{-1} a 2 mg l^{-1} ; los parámetros de regresión lineal obtenidos fueron: $m = 0.007629$ (s.e. 3%) y $r^2 = 0.98$. Se utilizó un pool de suero hu-

mano como control debido a que los lípidos de las muestras respectivas se encuentran en un contexto biológico de mayor similitud a este estándar que a uno de origen comercial.

Dosaje de solvente orgánico: La ausencia de solvente orgánico en las diferentes fracciones acuosas fue determinada por cromatografía gaseosa en un equipo Konik KNK-3000-HRGC empleando Supelco type capillary column Petrocol DH (i.d. 0.2 mm, 50 m long, film thickness 0.5 μm).

Potencia: Fueron evaluadas las potencias de las diferentes fracciones acuosas por el test de NIH (Seligmann, 1973). La vacuna estándar (lote 406/04/90) con un título de 1 UI ml^{-1} fue suministrada por el Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis (INPPAZ, Argentina) y el virus rábico de desafío fue una cepa CVS segundo pasaje con un título original de $10^{6.9}$ DL₅₀ / 0,03 ml. Se emplearon cuatro diluciones de las muestras respectivas y de la vacuna de referencia (1:5, 1:25, 1:125, 1:625). La descarga viral fue realizada con 38 DL₅₀, titulada intraensayo.

Esterilidad: Las fracciones acuosas de las vacunas tratadas fueron sometidas a controles para establecer la presencia de hongos y bacterias empleando tres medios de cultivo diferentes: tioglicolato, soja y Sabouraud. Cinco diluciones seriadas 1:10 de las fases acuosas fueron realizadas en cada medio de cultivo. Las temperaturas y tiempos de incubación fueron: tioglicolato y soja, 7 días a 37°C, y 7 días a 25°C sucesivamente; Sabouraud, 14 días a 25°C.

Toxicidad específica: Este test tiene por objeto verificar la ausencia de virus rábico vivo en la vacuna. Se utilizaron tres especies de animales para el test, ratones de 18 - 20 gramos de peso, conejos y ratas lactantes, los que fueron inoculados intracerebralmente con 0,03 ml, 0,25 ml y 0,01 ml de vacuna inactivada, respectivamente. En nuestro laboratorio utilizamos 20 ratones, 2 conejos y 20 ratas lactantes, por lote de vacuna, atento a las recomendaciones internacionales (Seligmann, 1973). Estos animales se mantienen bajo observación 14 días durante los cuales deben permanecer libres de síntomas de rabia para considerarse una prueba satisfactoria.

Toxicidad inespecífica: Este test se utiliza para detectar cualquier sustancia tóxica que pudiera contener la vacuna.

Se utilizaron dos especies de animales, ratones de 20 gramos y cobayos de 350 gramos de peso, los que fueron inoculados vía parenteral con 0,5 ml y 5,0 ml de vacuna inactivada, respectivamente. En nuestro laboratorio utilizamos no menos de 2 animales por especie los que son observados por un período mínimo de 7 días. Los animales no deben presentar sig-

Tabla N° 1: Controles de producción efectuados sobre el lote de vacuna utilizado en el ensayo.

Vacuna Lote	Título DL ₅₀ ml ⁻¹	Esterilidad	Toxicidad específica	Toxicidad inespecífica	Timerosal mg ml ⁻¹	Fend mg ml ⁻¹	pH
V-134	10 ^{7.8}	Satisfactorio	Satisfactorio	Satisfactorio	0,1	0,09	6,60

Tabla N° 2: Tabla comparativa de resultados de las diferentes fracciones acuosas y la vacuna control.

Prueba	Control (1)	A _{org.n-hex} (2)	A _{aq.n-hep} (2)	B _{org.n-hex} (2)	B _{aq.n-hep} (2)
Tox. inespecífica	Satisf.	Satisf.	Satisf.	Satisf.	Satisf.
Potencia (IU dosis ⁻¹)	3,00	0	0,04	0,12	2,43
Potencia % (1)	100	0	1	4	81
Lípidos (mg l ⁻¹)	204	66	26	152	144
Lípidos % (1)	100	32	13	75	71

(1) Vacuna Lote V-134, no tratada (2) Fracciones acuosas el Lote V-134 tratada por los diferentes métodos A y B. (3) Potencia porcentual referida al control. (4) Lípidos porcentual referido al control.

nos de enfermedad, disminución de peso o muerte durante el período evaluado para considerarse una prueba satisfactoria (Seligmann, 1973).

Análisis de proteínas virales por electroforesis en SDS-PAGE: Se analizaron las diferentes fracciones obtenidas por los dos métodos de purificación.

Fracciones correspondientes al método A: Las fracciones orgánicas (emulsiones estables semisólidas), A_{org.n-hex} y A_{org.n-hep}, fueron resuspendidas en un buffer PBS (pH = 7,20). Las fracciones acuosas correspondientes, A_{aq.n-hex} y A_{aq.n-hep}, y las resuspendidas, A_{org.n-hex} y A_{org.n-hep}, se centrifugaron a 20.000 rpm, 2 horas, en rotor Sorvall S-20 sobre un colchón de sacarosa 30%, con la finalidad de extraer las proteínas de la emulsión semisólida de las fracciones orgánicas y analizar los «pellets» correspondientes a las cuatro fracciones. En el caso de las fracciones orgánicas después de la centrifugación se obtuvieron 3 fases: una orgánica superior, una interfase semisólida de color marrón oscuro de 2 mm de espesor, y una fase acuosa inferior transparente con sus respectivos «pellets» (llamado P-A_{org.n-hex} el proveniente de la emulsión semisólida con n-hexano y P-A_{org.n-hep} el proveniente de n-heptano). En el caso de las fracciones acuosas, A_{aq.n-hex} y A_{aq.n-hep}, se obtuvieron dos «pellets», P-A_{aq.n-hex} y P-A_{aq.n-hep}, respectivamente.

Fracciones correspondientes al método B: Las fracciones orgánicas, B_{org.n-hex} y B_{org.n-hep}, y las fracciones acuosas, B_{aq.n-hex} y B_{aq.n-hep}, se centrifugaron a 20.000 rpm, 2 horas, en rotor Sorvall S-20 sobre un colchón de sacarosa 30%, obteniéndose los respectivos «pellets» (P-B_{org.n-hex}, P-B_{org.n-hep}, P-B_{aq.n-hex} y P-B_{aq.n-hep}).

Todos los «pellets» fueron resuspendidos en buffer desnaturizante (Tris-HCl 0,1 M, SDS 2%, 2-mercaptoetanol 1%, PMSF 0,002 M, azul

de bromofenol 2 mg%, sacarosa 30%). Los «pellets» resuspendidos fueron calentados 3 minutos a 95°C y luego sembrados en un gel discontinuo de poliacrilamida (4% - 10%). La electroforesis se llevó a cabo con un voltaje constante (100 volts) durante 1 hora 45 minutos. Las bandas se evidenciaron por coloración con azul brillante de coomasie.

RESULTADOS

Los controles de esterilidad fueron satisfactorios en todos los casos y no se encontraron trazas de solvente en las vacunas tratadas por los métodos A y B. El contenido lipídico y la potencia fueron medidas antes y después de las experiencias A y B, y los resultados se muestran en la Tabla N° 2. Empleando el método A, el contenido lipídico disminuyó considerablemente (se obtuvo una suspensión clarificada). No obstante, como se observa en la Tabla N° 2, el método A es muy drástico tanto en la técnica en que se utiliza n-hexano, como en la que se usa n-heptano, y las fracciones acuosas (A_{aq.n-hex} y A_{aq.n-hep} respectivamente) no retienen el suficiente valor antigénico para constituir una vacuna que supere el requisito mínimo de potencia exigido (rpm: 1,0 UI dosis⁻¹, para vacunas en cerebro de animales lactantes de uso veterinario). El análisis por electroforesis en SDS-PAGE coincidió con este resultado, no encontrándose bandas proteicas correspondientes en los «pellets» de las fracciones acuosas ni en los de las fracciones orgánicas.

Por otra parte el método B fue satisfactorio para nuestros propósitos: usando n-heptano (fase acuosa B_{aq.n-hep}), más del 30% de los lípidos contenidos en la vacuna original pueden ser eliminados preservando el valor antigénico por encima del mínimo requerido. Utilizando n-

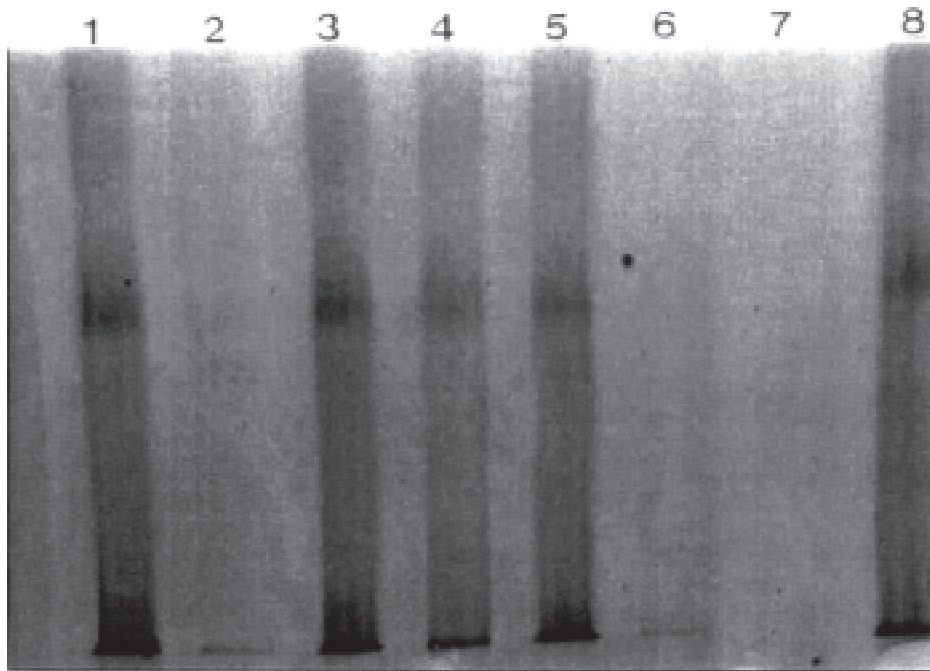


Figura N° I: Método B: Análisis por electroforesis en SDS-PAGE discontinuo (4-10%). Se describen a continuación las siguientes calles: 1- $P-B_{org\ n-hep}$ (fracción orgánica n-heptano) concentrada 10:1; 2- $P-B_{org\ n-hep}$ (fracción orgánica n-heptano) sin concentrar; 3- $P-B_{aq\ n-hep}$ (fracción acuosa n-heptano); 4- $P-B_{aq\ n-hex}$ (fracción acuosa n-hexano); 5- $P-B_{org\ n-hex}$ (fracción orgánica n-hexano) concentrada 10:1; 6- $P-B_{org\ n-hex}$ (fracción orgánica n-hexano) sin concentrar; 7- libre; 8- Control (vacuna sin tratar).

hexano no se obtuvieron resultados de potencia satisfactorios. El análisis por electroforesis SDS-PAGE reveló que en ambos casos (n-hexano y n-heptano) existe una pérdida de fracción proteica vacunal en la fase orgánica, no existiendo una diferencia cuantitativa significativa con ambos solventes (Figura N°I).

DISCUSIÓN

De los resultados anteriores puede inferirse que la extracción llevada a cabo en ampolla de decantación con n-heptano resulta ser una técnica de purificación satisfactoria la cual, combinada con una purificación previa por centrifugación, provee una vacuna antirrábica con un menor contenido lipídico, no mostrando una significativa reducción en su potencia. La pérdida de potencia aproximadamente un 20 %, está relacionada con la partición del contenido proteico entre la fase acuosa y el solvente orgánico, que pudo corroborarse por SDS-PAGE (Figura N° I).

El método A no fue satisfactorio para nuestro objetivo, puesto que las fracciones proteicas vacunales, la glicoproteína y la nucleoproteína viral principalmente, quedaron atrapadas en una emulsión estable semisólida de color marrón descrita anteriormente. Estas proteínas, reconocidas como los mayores inductores de la producción de anticuerpos protectores, no pudieron ser extraídas de la emulsión semisólida, no encontrándose ninguna banda por electroforesis en SDS-PAGE.

En el método B con n-hexano, aunque se evidencian proteínas en el gel de SDS-PAGE en la fase acuosa, los valores de protección hallados fueron muy bajos. Estos resultados indicarían que el método utilizado como así también el tipo de solvente y la relación utilizada podrían optimizarse para obtener un mayor rendimiento y minimizar la pérdida de valor antigénico. Por último, la relación costo beneficio para procesos productivos, ya sea en pequeña o gran escala, aún deben ser evaluados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abdussalam, M.; Bogel K. The problem of antirabies vaccination. International Conference on the Application of Vaccines Against Viral, Rickettsial and Bacterial Diseases of Man, Pan-American Health Organization, W.H.O., Washington, D.C. (USA), Scientific Publications No. 226: 1971 p 54-9
2. Chaleomchan, W.; Hemachudha, T.; Sakulramrungs, R.; Deesomchok, U. Anticardiolipin antibodies in patients with rabies vaccination induced neurological complications and other neurological diseases. *Journal of the Neurological Sciences* 1990; 96,2-3: 143-51
3. Diaz, A.M.; Dellepiane, N.; Palomo, L.F. Antirabies vaccine from the brain of the suckling rat: antigen composition and immunogenic capacity. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana* 1989; 107: 185-95
4. Fuenzalida, E.; Palacios, R. Rabies vaccine prepared from the brains of infected suckling mice. *Boletín del Instituto Bacteriológico de Chile* 1955; 8: 3-10
5. Gispén, R.; Schmittman, G.J.P.; Saathof, B. Rabies vaccine derived from suckling rabbit brain. *Archiv fuer die Gesamte Virusforschung* 1965; 15: 366-76
6. Hemachudha, T.; Phanuphak, P.; Johnson, R.; Griffin, D.; Ratanavongsiri, J.; Siriprasomsup, W. Neurologic complications of Semple-type rabies vaccine: clinical immunologic studies. *Neurology* 1987; 37: 550-6
7. Karakujumcan, M.K.; Pariz, B.M.; Solov'ev, V.D. Suckling rat brain vaccine. *Laboratory Techniques in Rabies*, 3rd edn., Kaplan, M.M.; Koprowski, H. (ed.), W.H.O. Monograph Series No 23, Geneva, 1973 p 213-5
8. Kuwert, E. Versuche zur Antigenität Schutzkraft und Encephalitogenität der Hempt vaccine sowie Betrachtungen zur Tollwutschutzimpfung. *Deutschland Arch Hyg (Berlin)*, 1967; 151: 130-45
9. Larghi, O.P.; Varela Diaz, V.M.; Soto, E.; Imas, B.; Cuba Caparo, A.; Fuenzalida, E. Laboratory investigations on neuroparalytic accidents associated with SMB rabies vaccine III. Preservation of vaccine potency after elimination of murine brain myelin centrifugation. *Annals Institut Pasteur (Paris)*, 1976; 12B: 567-72
10. Postma, T.; Stroes, J.A.P. Lipid screening in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta* 1968; 22: 569-78
11. Segre, L. Antirabies vaccine for human use from suckling rat brain (letter). *Medicina (Buenos Aires)* 1984; 44: 220-1
12. Seligmann, E.B. The NIH test for potency. *Laboratory Techniques in Rabies*, 3rd edn., Kaplan, M.M.; Koprowski, H. (ed.), W.H.O. Monograph Series No 23, Geneva, 1973 p 229-86
13. Seligmann, E.B. Semple-Type Vaccine. *Laboratory Techniques in Rabies*, 3rd edn., Kaplan, M.M.; Koprowski, H. (ed.), W.H.O. Monograph Series No 23, Geneva, 1973 p 197
14. Svet-moldavskij, G.L. An allergen-free antirabies vaccine. *Bulletin of the World Health Organization* 1965; 32: 47-58
15. Swaddiwuthipong, W.; Weniger, B.G.; Wattanasri, S.; Warrell, M.J. A high rate of neurological complications following Semple anti-rabies vaccine. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1988; 82: 472-5
16. Ubol, S.; Hemachudha, T.; Whitaker, J.N.; Griffin, D.E. Antibody to peptides of human myelin basic protein in post-rabies vaccine encephalomyelitis sera. *Journal of Neuroimmunology* 1990; 26: 107-11
17. Wolman, M. *Pathology of the nervous system*. Vol 1, Ed. Mc. Graw-Hill, Inc. New York (U.S.A), 1968; p 758-763.

ALGUNOS ASPECTOS DE LA DISPLASIA DEL CODO DE LOS CANINOS

E.J. Durante, M.C. Brusa

Servicio Central de Cirugía, Facultad de Ciencias Veterinarias,
Universidad Nacional de La Plata. Buenos Aires, Argentina

RESUMEN: Se realiza una revisión sobre algunos aspectos de la Displasia del Codo (DC) en caninos. Las cuatro patologías identificadas en esta enfermedad son: Incongruencia Articular (IA), Proceso Coronoides Fragmentado (PCF), Proceso Anconeus No unido (PAN) y Osteocondrosis Disecante (OCD). Aunque cada una de ellas presenta características propias, el diagnóstico individual se ve a menudo dificultado por distintas causas, entre ellas, la posibilidad de presentación simultánea, etiología y signos clínicos comunes y en ocasiones, la falta de imágenes radiológicas específicas para cada patología. Los aspectos particulares de esas enfermedades son tratados individualmente, mientras que las características que comparten son discutidas bajo el término amplio de displasia de codo (DC). Se ha establecido que la DC es una anomalía del proceso de osificación endocondral. Aunque su patogénesis permanece confusa, se han incriminado a traumatismos y enfermedades metabólicas como agentes causales. Usualmente, luego del tratamiento persiste algún grado de claudicación. El pronóstico varía de reservado a desfavorable, de acuerdo a la posibilidad de demorar el desarrollo de la enfermedad articular crónica.

PALABRAS CLAVE: Codo, Displasia, Osteoartrosis, canino

ASPECTS OF ELBOW DYSPLASIA IN DOGS

ABSTRACT: A review of the aetiology, clinical signs, diagnosis, prognosis and treatment of Elbow Dysplasia (ED) in dogs is made. The four pathologies incriminated in this condition are: Articular Incongruity (AI), Fragmented Coronoid Process (FCP), Ununited Anconeus Process (UAP) and Osteochondrosis Dissecans (OCD). Although each pathology has proper features, the individual diagnosis is sometimes difficult due to - among others - the following facts: frequent simultaneous occurrence, common aetiology, common clinical signs and complicated radiological diagnosis. Particular aspects of these diseases are dealt with individually, while the characteristics that share, are discussed under the umbrella term "elbow dysplasia". It has been stated that ED is an abnormality of the process of endochondral ossification, although the pathogenesis remains unclear. Trauma and metabolic diseases have also been mentioned. Usually some form of lameness persists after treatment. The prognosis varies from guarded to unfavorable, according to the possibility of slowing the development of chronic degenerative joint disease.

KEY WORDS: Elbow, Dysplasia, Osteoarthritis, Canine.

INTRODUCCIÓN

La articulación húmero-radio-cubital constituye una de las más complejas del organismo debido a que está formada por superficies articulares irregulares de tres huesos diferentes. El desarrollo anormal de la epífisis distal del húmero y de las correspondientes proximales del radio y del cúbito, durante el crecimiento, conducen a la presentación de una variedad de cambios articulares que comprometen seriamente la congruencia entre los componentes de la articulación (Grupo Internacional de Trabajo sobre el Codo, IWEG).

Las patologías que afectan a la articulación húmero-radio-cubital de los caninos revisten tal importancia -debido a su incidencia y a la invalidez que causan- que han merecido amplia investigación y seguimiento, especialmente por el IWEG, el cual desde 1989 se ha dedicado a esclarecer todos los aspectos de estas enfermedades y a monitorear reproductores de distintas razas por medio de la formulación de criterios de evaluación y control, hoy aceptados internacionalmente por profesionales e instituciones tales como la Federación Cínológica Internacional y la World Small Animal Veterinary Association (WSAVA).

Estas alteraciones afectan en todos los casos los codos de caninos en crecimiento, principalmente como consecuencia de disturbios localizados en los centros de osificación, anomalías en el desarrollo de uno o más de los huesos que conforman la articulación, o a una combinación de ambos, resultando una incongruencia articular. El conjunto de signos clínicos comunes a todas las patologías que así se originan ha recibido el nombre de Displasia del Codo (DC). Este término fue acuñado por el IWEG (IWEG 1996) y adoptado por otros autores (Bedford, P.G.C. 1994; Padgett, G.A. et al. 1995).

Las siguientes condiciones son identificadas como causantes de Displasia del Codo (IWEG 1996; Bedford, P.G.C. 1994; Padgett, G.A. et al. 1995; Sjöström, L. et al 1995).

Osteocondrosis dissecans (OCD)
Proceso Ancóneo No Unido (PAN)
Proceso Coronoide Fragmentado (PCF)
Incongruencia Articular (IA)

Se propuso que, desde el punto de vista práctico, el término displasia es apropiado, aunque sería más correcto denominarla "artrosis de codo" (Carpenter, L.G. et al 1993). A su vez, osteocondrosis se refiere a la alteración del proceso de osificación endocondral que termina en la separación de una porción de cartílago articular, antes denominado osteocondritis disecante.

Las razas caninas grandes son las afectadas con mayor frecuencia, entre ellas: Bernese, Rottweiler, Labrador y Golden Retrievers, Pastor Alemán, Bullmastiff, Collie, San Bernardo, Chow-Chow, Keeshandler, Mastín de los Pirineos, Viejo Pastor Inglés, Aierdale Terrier y Newfoundland (Padgett, G.A. et al 1995).

En las dos primeras la incidencia de la displasia de codo es tan grande que preocupa a los criadores más que la displasia de la cadera. El importante crecimiento en la cantidad de ejemplares de las razas Rottweiler y Labrador que en los últimos años se ha producido en nuestro país, hace que el veterinario deba asumir con la misma preocupación la responsabilidad de ampliar y ahondar los conocimientos en todo lo referente a esta enfermedad. Ésta ha sido descrita también en algunos Terriers y en la raza Pomerania (Lewis, D.D. et al 1989).

Estudios realizados en Pastores Alemanes (Corley, E.A. 1966), Rottweilers y Berneses (Swenson, L et al 1997) han demostrado que, al igual que otras displasias, la del codo canino es una afección hereditaria de carácter poligénico. La patología puede presentarse inicialmente como una osteocondrosis que causa el engrosamiento del cartílago en un área de la superficie articular, dando lugar a la aparición de Osteocondritis Disecante (OCD), mientras que cuando la alteración se produce en los núcleos de osificación da origen al Proceso Coronoide Fragmentado (PCF), Proceso Ancóneo no unido (PAN) e Incongruencia Articular (IA) (IEWG 1996).

El Proceso Coronoide Fragmentado (PCF) fue descrito por primera vez en 1974 por Olsson y Tirgari (Tobias, T.A. et al 1994). En una serie de 90 perros se reportó la siguiente distribución por razas: Labrador, Rottweiler, Pastor Alemán, Bernese, Bullmastiff, Chow-Chow y algunos mestizos (Bouck, G.R. et al 1995). Otras razas informadas son Beagle, Shetland y Pomerania (Lewis, D.D. et al 1989). Los machos son más afectados que las hembras.

Esta condición, que en un principio puede no ser detectada radiológicamente en las posiciones comunes, complica significativamente la evolución del proceso osteoartítico postoperatorio de aquellos animales tratados quirúrgicamente por PAN cuando éste cursa simultáneamente con PCF (Roy, R.G. et al. 1994). A menudo el diagnóstico radiológico de PCF se basa en la detección de alteraciones articulares secundarias características (Miyabayashi, T. et al 1995; Henry JR, 1984).

La artrotomía del codo seguida de la extirpación del proceso coronoide (con o sin curetaje) constituye el tratamiento más adecuado (Huibregtse, B A. et al 1994; Suess Jr, et al 1994).

El término Proceso Ancóneo No unido (PAN) fue aplicado por primera vez a esta condición en 1959 cuando Cawley y Archibald documentaron la aparición de once casos en Ovejeros Alemanes (Cross et al 1997)

El Proceso Ancóneo No unido (PAN) es primariamente un problema del desarrollo, que afecta al núcleo de osificación propio de esta apófisis y que se observa en las razas no condrodistróficas de crecimiento rápido, con el Pastor Alemán sufriendo la mayor incidencia (Roy, R.G. et al 1994). También ha sido descrita en San Bernardo, Gran Danés, Labrador, Irish Wolfhound, Pointer, Bloodhound, Gigante de los Pirineos, Weinmaraner, Basset Hound, Bulldog francés y Dachshund (Sjöström, L. et al 1995).

Se presenta a menudo simultáneamente con otras patologías articulares, por lo que los pacientes con diagnóstico de PAN deben ser escrutinados meticulosamente para posibilitar su detección (Roy, R.G. et al 1994). El tratamiento de elección consiste en la fijación temprana del proceso ancóneo o en su defecto su extirpación, con el objeto de minimizar la progresión de la enfermedad articular degenerativa (Sjöström, L. et al 1995).

La Osteocondrosis del Codo (OCD) ha sido definida por Guthrie y Pidduck, 1990, como una enfermedad multifactorial de alta heredabilidad (Bedford, P.G.C. 1994). Labradores, Bouviers, Rottweilers y Pastores Alemanes se ubican bien alto en la lista de incidencias (IEWG 1996), aunque puede ser observada ocasionalmente en cualquier raza pesada y aún en mestizos.

Afecta primordialmente al cóndilo medial del húmero. Esta afección puede ser tratada en forma médica o quirúrgica, sin que existan marcadas diferencias en cuanto a los resultados y posterior evolución de la enfermedad articular cuando se aplica una u otra modalidad (Bouck, G.R. et al 1995; Bennett et al 1981).

En síntesis, a pesar de que las 3 alteraciones ocasionan signos clínicos comunes, cada una presenta particularidades individuales y distintivas para su identificación. La instauración del tratamiento de elección en forma temprana ayudará a contener el proceso de evolución de la enfermedad articular degenerativa.

La Incongruencia Articular (IA), puede ser el resultado de lesiones de origen hereditario, como patella cubiti, o traumático como los cierres prematuros de los cartílagos de crecimiento del radio o del cúbito (Autefage, A. et al 1993). Diferentes tratamientos quirúrgicos estarán indicados en cada caso.

ETIOLOGÍA

En los animales jóvenes las artropatías que no están relacionadas con trauma primario o infección se deben a disturbios del crecimiento de las superficies articulares (Dammrich, 1979; Walde, I.; Tellhelm, B. 1991)

Se considera que la DC se genera en una alteración de la osificación endocondral, aunque la etiopatogenia no está completamente entendida y puede ser causada por traumas, como así también por factores metabólicos y genéticos (Bouck, G.R. et al 1995).

La articulación del codo está integrada por los cóndilos del húmero, los cuales se desarrollan por dos núcleos de osificación diferentes que se fusionan posteriormente a la diáfisis. Por otra parte, el radio que colabora con su epífisis proximal y núcleo correspondiente presenta otro centro en distal y entre ambos determinan el desarrollo axial del hueso. Por último, el cúbito crece longitudinalmente a partir de la epífisis distal y adquiere su conformación articular por acción del cartílago de conjunción proximal, completando de esta manera la estructura ósea del codo.

Cualquier alteración en el ritmo de crecimiento de dichos centros, ya sea individual o en conjunto, conducirá a la aparición de una incongruencia a nivel de las superficies articulares del codo (Slatter, D 1993). Esta condición se manifiesta en 4 formas distintas de patología articular denominadas: Osteocondrosis Disecante (OCD) generalmente del cóndilo humeral medial; Proceso Coronóide Fragmentado (PCF); Proceso Ancóneo No unido (PAN) e Incongruencia Articular (IA) (Langley-Hobbs, S.J. y Carmichael, S. 1996). Todas ellas están agrupadas, por el denominador común de su signología clínica, bajo el término "Displasia de Codo" (DC) (IEWG 1996). No se puede afirmar aún que las cuatro entidades compartan la misma etiología o hasta qué grado existe superposición de factores causales. El componente genético de todas estas patologías (IEWG 1996) ha sido confirmado, aunque la incidencia sobre cada una de las razas sugiere que la heredabilidad podría ser específica para cada entidad clínica.

La sobrealimentación con dietas de alto contenido en Ca y episodios traumáticos son factores que juegan un rol preponderante en la osificación endocondral y por tal motivo fueron incriminados en la producción de DC. El tamaño y radio inadecuados de la escotadura cubital, que no permite alojar adecuadamente a la tróclea del húmero, fue propuesto como etiología común que induce PCF, OCD y PAN (Sjöström, L. et al 1995).

Los machos son afectados en un 75% más que las hembras (Lewis, D. D. et al 1989).

Proceso Coronoide Fragmentado

El PCF es una enfermedad común del codo de los perros de razas grandes. La OCD y PCF deben ser considerados juntos ya que es sumamente difícil diferenciarlos clínicamente y a menudo ocurren en forma simultánea (Walde, I. y Tellhelm, B. 1991). Aunque incompletamente establecida, la etiología propuesta incluye a la osteocondrosis, la sobrecarga local o a un debilitamiento generalizado del cartílago y hueso en combinación con sobrecarga mecánica (Macpherson, G.C. et al 1992).

Esta resulta en retención de cartílago debido a una alteración del proceso normal de osificación endocondral. El proceso coronoide medial es susceptible de fragmentarse debido a que se halla formado enteramente por cartílago, el cual completa su osificación en forma tardía en relación a las demás superficies articulares del codo.

Los condrocitos situados en las capas más profundas no sobreviven como consecuencia de la falta de difusión de nutrientes esenciales para mantener la vitalidad celular, ya que estas sustancias son incapaces de atravesar el cartílago engrosado. Ello se traduce en fisuras y resquebrajamientos del cartílago hialino que involucran al hueso subcondral.

Esta afección es la causa más frecuente de artrosis del codo de los Rottweilers (74.9%) (Weinstein, M.J. et al 1995).

El PCF también ocurre en asociación con el cierre prematuro de la fisis distal del radio (Lewis, D.D. et al 1989). Wind y Packard sugirieron que el crecimiento asincrónico del radio y el cúbito causan incongruencia del codo con subluxación húmero radial que a su vez agrega un estrés anormal sobre el proceso coronoide en desarrollo, provocando seguidamente su fragmentación.

El proceso coronoide que forma la extremidad distal de la escotadura semilunar del cúbito presenta una porción lateral y una medial. Esta última, más voluminosa y prominente, articula principalmente con el radio mientras que la porción lateral lo hace con el húmero. La articulación de la apófisis coronoide medial con el húmero asume gran importancia en la absorción de estrés en el codo cuando el espacio articular húmero radial está incrementado, ej.: por acortamiento del radio en el cierre epifisiario prematuro distal. Esta situación coloca a dichas superficies articulares en un contacto muy estrecho con el consiguiente aumento en la carga, transmitida por la tróclea del

húmero al proceso coronoide medial, y la posibilidad de producir fisuras o fracturas del cartílago y/o hueso subcondral.

La mayor frecuencia de lesión asienta sobre la porción medial debido a que ésta es más grande. También deben considerarse las fuerzas adicionales que actúan sobre el proceso coronoide medial por acción del ligamento anular (Macpherson, G.C. et al 1992).

La baja prevalencia de artrosis del codo en hembras Rottweilers, en comparación con los machos, está de acuerdo con estudios anteriores (Swenson, L. et al 1997). Lo opuesto ocurre en el Bernese. La diferencia de prevalencia relacionada con el sexo puede ser explicada por el efecto directo de los genes sobre los cromosomas sexuales o sobre las características sexuales secundarias (velocidad de crecimiento, hormonas sexuales, patrones de comportamiento).

En Rottweilers se produciría una penetrancia incompleta de genes en las hembras; esto significa que hembras que son fenotípicamente normales tienen una mayor ocurrencia de esos genes que la que presentan los machos fenotípicamente normales. Esta contribución genética escondida que realizan las hembras a su descendencia resulta en una incidencia hereditaria mayor a través de las madres que de los padres (Swenson, L. et al 1997).

Osteocondrosis Disecante

El proceso de osteocondrosis comienza con una alteración del desarrollo del cartílago articular (zona de hipertrofia) que conduce a un incremento longitudinal de la placa de crecimiento y del espesor del cartílago mismo. Este se torna así más susceptible a la fricción, originándose -luego de un tiempo- un área de tamaño variable donde se desprende o diseca del hueso subcondral, formando un "flap" que permanece parcialmente unido o completamente separado de la superficie, flotando libremente en el espacio articular.

Proceso Ancóneo No unido

La patogénesis genera controversias, habiéndose incriminado entre otros a los siguientes factores: anomalías hereditarias del desarrollo, alteraciones metabólicas, nutricionales y de la hormona del crecimiento. Los traumatismos son considerados causales. Sin embargo, tradicionalmente se ha descrito al PAN como una falla del 4to centro de osificación del cúbito para unirse con la metáfisis (Ljunggren, G. et al 1966; Van Sickle, D.C. 1966).

Se ha propuesto también como etiología al crecimiento incongruente del radio y cúbito. Si el radio crece longitudinalmente más que el cúbito, su cabeza ejerce presión hacia proximal sobre la tróclea del húmero y al transmitirse esta fuerza al proceso ancóneo, impide su fusión. Los resultados de este estudio fueron confirmados en 15 de 18 articulaciones (Sjöström, L. et al 1995).

Incongruencia articular

La articulación húmero-radio-cubital pierde su armonía anatómica como resultado de diversas alteraciones en el crecimiento de los huesos que la componen, ej.: defectos de acortamiento del radio, del cúbito o ambos; falta de correspondencia en el contorno de la escotadura semilunar respecto de la tróclea humeral, además del cierre prematuro de las líneas de crecimiento como resultado de traumatismos directos (deformidades angulares) (Foto N°I). Consecuentemente se producen cargas anormales sobre distintas áreas de las superficies articulares, con fricción indebida de los cartílagos que conlleva al desarrollo de la enfermedad articular degenerativa. La incongruencia de la articulación del codo contribuiría a la patogénesis del PAN y PCF.



Foto N° I. Severa incongruencia articular

SIGNOS CLÍNICOS

La signología clínica más significativa se superpone en las cuatro entidades descritas, motivo por el cual puede ser analizada en conjunto. El cuadro clínico aparece tempranamente, entre los 4 y 7 meses de edad, haciéndose manifiesto por una claudicación en principio intermitente y moderada, luego persistente y severa, inflamación, efusión, disminución del

rango de movimientos, a nivel de la articulación húmero-radio-cubital y afectando en forma bilateral al 50% de los pacientes (IEWG 1996; Sjöström, L. et al 1995; Bedford, P.G. C. 1994; Carpenter, L.G. et al 1993). Cuando ambos miembros están comprometidos la claudicación puede ser errática. Inicialmente imperceptible o solamente evidente después del ejercicio. Algunos propietarios describen rigidez en la marcha, especialmente por la mañana, luego de realizar actividad física intensa (Walde, I. y Tellhelm, B. 1991). En contraste, hay perros que muestran signos más severos luego de períodos de inactividad (Sjöström, L. et al 1995).

Durante la marcha se observa rotación interna del codo y supinación del carpo al tiempo de la extensión o fase de avance (Walde, I. y Tellhelm, B. 1991). El examen clínico revela dolor en la flexión y extensión extremas, a veces crepitación, efusión articular evidente entre el epicóndilo lateral y el proceso ancóneo. En casos de larga evolución la inspección revela una moderada atrofia de los músculos del brazo.

CONSIDERACIONES DIAGNÓSTICAS

El diagnóstico de DC ofrece en algunos casos dificultades importantes debido, entre otras, a las siguientes causas:



Foto N° II. Cambios articulares degenerativos como resultado de la no unión del proceso ancóneo.

- presencia de signos clínicos y radiológicos compartidos.
- superposición de estructuras óseas en las proyecciones radiográficas comunes del codo.
- la radiolucidez del cartílago hialino no permite la observación precoz de la osteocondrosis.
- simultaneidad de 2 o más patologías en la misma articulación.

Todos los animales de las razas susceptibles

que padecen de claudicación insidiosa de los miembros anteriores, conjuntamente con algunos de los signos ya mencionados y evidenciados durante el examen físico, deben ser sometidos a un detallado examen radiológico. Los cambios tempranos incluyen efusión articular; ruptura, erosión o pérdida del cartilago en la escotadura semilunar; remodelación de la apófisis ancónea; engrosamiento capsular y producción de osteofitos periarticulares (Fox, S.M. et al 1996). El diagnóstico radiológico de PCF se complica debido a la dificultad de visualizar el proceso coronoide en las tomas radiográficas convencionales (Huibregtse, B.A. 1994).

La falta, en muchas oportunidades, de una observación radiológica franca de la lesión le confiere desde el punto de vista diagnóstico un valor superlativo a las imágenes producidas por los cambios osteoarticulares secundarios asociados a la patología coronoide. La presencia de osteofitos en el borde proximal del proceso ancóneo, deformación de la silueta circular de la tróclea humeral, escalonamiento entre la apófisis coronoide lateral y la superficie articular de la cabeza del radio, y los cambios degenerativos propios de osteoartritis constituyen el principal basamento para el diagnóstico presuntivo (Weinstein, M.J. et al 1995; Carpenter, L.G. et al 1993; Boccia, F.O., Ortega, C.F. 1991).

En algunos casos la naturaleza exacta y la extensión de la lesión solo puede ser establecida por medio de una artrotomía (Swenson, L. et al 1997).

La artrotomía exploratoria del codo ha sido indicada en animales jóvenes con claudicación persistente del miembro anterior, evidencia radiográfica de osteoartritis y efusión articular, en un esfuerzo por establecer lo más tempranamente posible el tratamiento del problema (Huibregtse, B.A. et al 1994).

De este modo se intenta evitar el desarrollo de cambios articulares severos. La posibilidad de acceder al estudio por medio de la tomografía axial computarizada permite aumentar la precisión y precocidad en el diagnóstico de la enfermedad.

Similar dificultad ofrece el diagnóstico de OCD, en cuyo caso, el signo radiológico por excelencia es la aparición de un área de osteólisis subcondral a nivel del cóndilo medial del húmero (Boccia, F.O., Ortega, C.F. 1991). En ocasiones se visualizará el desprendimiento y los cambios osteoartrosicos propio de los estados crónicos.

En cuanto al PAN, es el que conlleva menos complicaciones para su reconocimiento, pudiendo ser rápidamente diagnosticado por medio de una placa radiográfica en incidencia medio lateral del codo en flexión (Swenson, L. et al 1997) (Foto N° II).

TRATAMIENTO

El tratamiento de la DC dependerá de la o las patologías presentes en cada caso. Reviste fundamental importancia que el mismo se inicie en cuanto se evidencien signos clínicos y sea confirmado el diagnóstico definitivo. De esta forma, se previenen o minimizan los cambios osteoartrosicos que tendrán influencia directa en el grado de recuperación de la función articular.

El tratamiento puede ser conservador o quirúrgico. El primero está indicado solamente en aquellos casos que presentan ciertas características (Slatter, D. 1993):

Animales muy jóvenes (menores de 4 a 5 meses) en los que la fusión del proceso ancóneo todavía no se ha concretado, pero donde éste se observa bien alineado y estabilizado por tejido fibroso.

Animales mayores de 5 meses, con claudicación muy ligera y con un cuadro radiológico de cambios osteoartrosicos incipientes, sin evidencia de fragmentación coronoide, OCD, ni PAN.

Animales en los que, incidentalmente, se diagnostica PAN o PCF asintomáticos.

A estos pacientes se les inmoviliza el miembro, preferentemente con un yeso acrílico, para lograr una estabilización efectiva de la articulación del codo por medio de una estructura liviana y fuerte. Es mandatorio restringir el ejercicio totalmente. Al mismo tiempo debe iniciarse un programa de reducción del peso corporal para aquellos animales excedidos en kilaje.

Ocasionalmente, es necesario controlar el dolor, pudiéndose utilizar en estos casos aspirina (15 mg/kg), piroxican (0,3 mg/kg), meloxican (0,2 mg/kg).

La utilización de sustancias denominadas condroprotectoras, entre las cuales se encuentran principalmente los glucosaminoglicanos, tienen como objetivo terapéutico a la enfermedad articular, no teniendo acción específica sobre las patologías de base que nos ocupa. Se ha indicado la administración de Pentosan polisulfato en dosis de 3 mg/kg, una vez por semana durante 4 semanas (Bouck, G.R. et al 1995).

La natación constituye un excelente método para devolver gradualmente al animal a la actividad física, combinándola con paseos "a la correa".

Los pacientes que no se ajusten a los criterios expuestos, deberán ser sometidos a tratamiento quirúrgico, quedando reservada la elección de las diferentes técnicas a cada caso en particular.

El PAN ha sido tratado por medio de la fijación, extirpación u osteotomía cubital proximal (Fox, S.M. et al 1996; Sjöström, L. et al 1995; Weinstein, M. J. et al. 1995; Autefage, A. et al 1993). La fijación del proceso ancóneo se realiza con un tornillo colocado con un efecto "lag" (compresión interfragmentaria) entre el cúbito proximal y el proceso ancóneo, fijándolo de esta manera en posición anatómica. Esta técnica devuelve la estabilidad lateral a la articulación previniendo o, por lo menos, minimizando futuros cambios articulares degenerativos. La fusión ocurre entre las 6 y 10 semanas (Slatter, D. 1993).

La remoción quirúrgica del proceso ancóneo desunido constituye el tratamiento tradicionalmente empleado pero, a diferencia del anterior, condena a la articulación a la inestabilidad permanente que conduce finalmente a la enfermedad articular degenerativa crónica (Roy, R.G. et al 1994). Es un procedimiento quirúrgico más simple que el anterior ya que solamente implica el abordaje lateral de la articulación y la extracción del proceso ancóneo, previa sección de sus casi siempre presentes inserciones fibrosas.

La osteotomía cubital proximal es la técnica más sencilla y a la vez menos experimentada hasta el momento. Se basa en el principio de que el desplazamiento proximal de la extremidad superior del cúbito por acción del músculo tríceps -después de practicada la osteotomía- permite la neutralización de la fuerza que tiende a mantener al proceso ancóneo separado del hueso principal, favoreciendo así su fusión al mismo (Weinstein, M.J. et al 1995).

El tratamiento de elección para pacientes con PCF consiste en su extirpación, abordando al mismo, ya sea, a través de una osteotomía del epicóndilo medial; por miotomía longitudinal del músculo flexor carpo radial; por separación de los músculos teres y flexor carpo radial con incisión del ligamento colateral medial; o más recientemente por medio de cirugía artroscópica (IEWG 1996; Bardet, J.F. 1997).

En cuanto a la OCD de la articulación húmero radio cubital, al igual que sucede con esta entidad en otras articulaciones, se corrige con la extracción quirúrgica del "flap" cartilaginoso y "foragin" (perforaciones) del cráter de la lesión (IEWG 1996).

El tratamiento de la incongruencia articular (IA) depende de la patología subyacente que le da origen. Cuando ocurre malformación de la escotadura semilunar no existe más que el tratamiento sintomático de la misma, al que se suma aquel correspondiente al PCF y o PAN que pueden aparecer como resultado de aquella. Las IA debidas al asincronismo del crecimiento radio cubital son tratadas con los pro-

cedimientos de osteotomía/ ostectomía cubital, transversa u oblicua por abordaje caudal. Un clavo de Steinmann insertado desde el olécranon cruza el sitio de la osteotomía y es anclado en la porción distal del cúbito, asegurándose así la correcta alineación del eje axial del hueso (Wind A.P. 1986).

En situaciones extremas la degeneración articular progresa a tal punto que solamente un procedimiento de salvataje posibilita la restauración de la función del miembro afectado. En la actualidad el único procedimiento accesible de este tipo para la articulación del codo es la artrodesis.

PRONÓSTICO

El pronóstico de una función articular normal en animales con DC debe ser reservado ya que se pueden esperar cambios osteoartríticos progresivos después de cualquier forma de tratamiento (IEWG 1996).

El PCF y OCD ofrecen un pronóstico reservado ya que la claudicación persiste frecuentemente y en la mayoría de los casos progresa la enfermedad degenerativa. El tratamiento quirúrgico de PCF instituido tempranamente en la vida del paciente no mejora el pronóstico, si se lo relaciona con la cirugía hecha en fase avanzada de la enfermedad articular (Tobias, T.A. et al 1994).

Contrariamente se ha sugerido que el tiempo en el que se realiza el tratamiento quirúrgico del PAN afectaría significativamente el resultado a largo plazo. En dos series de animales operados antes del año de edad, la mayoría recuperó la función articular sin signos de dolor (Alexander, J.W. 1983). No obstante se ha afirmado que ninguna forma de tratamiento asegura la recuperación completa de la función articular, aunque parecería que la intervención temprana proporciona el mejor pronóstico en relación a la disminución de la velocidad de desarrollo de la osteoartritis (Cross, A.R. y Chambers, J.N. 1997).

El pronóstico de IA estará también relacionado con la severidad de los cambios de las superficies articulares de los huesos que conforman la articulación, la posibilidad de corregirlos quirúrgicamente y el momento en que se realice el tratamiento. En cualquier caso el pronóstico oscila entre reservado y desfavorable (IEWG 1996).

DISCUSIÓN

Las enfermedades descritas como IA, PCF, PAN y OCD constituyen las causas más frecuentes de artritis tempranas de la articula-

ción húmero radio cubital de los caninos (Read, R.A. et al 1996).

Read R.A. et al, 1996, han reportado que de una serie de 55 cachorros Rottweiler el 36% mostraron signos clínicos de displasia de codo durante los primeros 12 meses de vida, con una incidencia de 7% a los 3 meses, 16% a los 6 meses, permaneciendo estable en 15% al año de edad. En cachorros de hasta 6 meses los signos clínicos prevalentes fueron claudicación con dolor articular en extensión y flexión. En los animales de un año se agregaron engrosamiento articular y reducción del rango de movimientos de la articulación. Estos signos fueron bilaterales en el 36% de los animales estudiados.

Hernry W.B. 1984, en su serie de 21 perros observó engrosamiento articular debido a factores tales como osteofitosis, fibrosis periarticular y efusión sinovial moderada; crepitación; atrofia de los músculos supraespinoso e infraespinoso y dolor variable a la palpación de la articulación sin constituir un signo clínico prominente (Henry Jr, W.B. 1984).

Cross A.R. 1997, establece que el signo clínico primario del PAN es una claudicación de apoyo, gradual y progresiva, a la cual se agrega secundariamente aquellos comunes a la DC.

El IEWG recomienda un sistema de clasificación de la DC basada en el grado de osteofitosis presente en la articulación.

- Grado 0 = sin evidencia de osteofitos
- Grado 1 = osteofitos < de 2 mm
- Grado 2 = osteofitos de 2 a 5 mm
- Grado 3 = osteofitos > de 5 mm

Este método de evaluación de la DC permite correlacionar satisfactoriamente el cuadro radiológico con los signos clínicos de la enfermedad, estableciendo en el mismo estudio que la presencia de grados 2 y 3 en cachorros de 1 año de edad son indicativos de DC (Read, R.A. et al 1996).

La fragmentación del proceso coronoide medial como causa de claudicación de los miembros anteriores es la que ofrece más dificultades diagnósticas. Inicialmente se observan en las tomas radiográficas simples solo cambios sutiles, por lo que aquellos del proceso coronoide afectado pueden no ser visualizados. Consecuentemente, el diagnóstico definitivo puede llegar a demorarse hasta que los cambios osteoartroticos sean más significativos (Huibregtse, B.A. et al 1994). Los escasos cambios radiológicos iniciales, junto con la inespecificidad de los signos clínicos, determinan que en ocasiones sea necesaria la artrotomía exploratoria para posibilitar el diagnóstico definitivo.

Las posiciones recomendadas para obtener una buena imagen radiológica, que permi-

ta un diagnóstico precoz del proceso coronoide, son las caudomedial y craneolateral con una oblicuidad de 15°. La superposición moderada de la epífisis proximal del radio y la del cúbito, aseguran una proyección aceptable del proceso coronoide medial en la placa radiográfica. Cuando no se observa este efecto la radiografía debe ser repetida (Miyabayashi, T. et al 1995).

A medida que progresa la degeneración articular la imagen radiológica muestra osteofitos en la superficie craneal de la epífisis del radio, en el proceso coronoide medial y en los epicóndilos del húmero. Es importante puntualizar que estas alteraciones no son patognomónicas de PCF.

El diagnóstico radiológico de OCD ofrece similares dificultades cuando la lesión cartilaginosa no está bien delineada. Por esta razón y porque a menudo PCF y OCD cursan simultáneamente, se ha sugerido que sean consideradas en conjunto (Macpherson, G.C. et al 1992).

Nap 1995 opina que algunas de las lesiones observadas radiológicamente como semejantes a las de OCD del cóndilo humeral medial son en realidad erosiones causadas por el contacto repetido con el proceso coronoide fragmentado del mismo lado (IEWG 1996).

En contrapartida, PAN no presenta dificultades para su diagnóstico radiológico ya que éste se basa en la presencia de una línea radiolúcida que separa el proceso ancóneo de la epífisis cubital proximal. Aunque usualmente esta patología es lo suficientemente obvia como para no ofrecer complicaciones desde el punto de vista de su identificación, en ocasiones la línea de separación puede aparecer marcadamente atenuada, sin que esto signifique una fusión en progreso, sino por la presencia de fuertes bandas de tejido conectivo que mantienen al proceso ancóneo en posición. Esta enfermedad se debe diagnosticar solamente a partir del quinto mes de vida, momento en el que se produce la sinostosis entre ambas estructuras (Slatter, D. 1993).

La evidencia radiológica se obtiene por medio de una toma medio lateral con el codo en flexión, para lograr separar la imagen del proceso ancóneo de aquella del epicóndilo del húmero, de otro modo superpuestas (Slatter, D. 1993).

Los codos con PAN deben ser cuidadosamente evaluados para reconocer patologías concurrentes que puedan afectar la recuperación.

Se ha postulado que el diagnóstico de IA se basa en la demostración de una o más de las siguientes alteraciones radiológicas:

Forma anormal de la escotadura semilunar.

Espacios articulares incrementados, irregulares o asimétricos.

Disrupción de la armonía de la superficie articular de la escotadura y aquella correspondiente del radio (escalón radio-cubital).

Osteofitosis de la superficie dorsal del proceso ancóneo.

Contorno irregular del proceso coronoide.

La diferenciación preoperatoria entre OCD y PCF no es esencial ya que el abordaje medial de la articulación requerido para corregir ambas patologías es el mismo (Carpenter, L.G. et al 1993). En aquellos pacientes en los que la patología coronoide no es detectada y que padecen simultáneamente de PAN, la degeneración articular progresiva causada por el primero enmascarará el resultado del tratamiento quirúrgico del segundo.

Debido al bajo porcentaje de casos en los que las radiografías permiten la identificación de la patología, el tratamiento quirúrgico se inicia bajo la forma de una artrotomía exploratoria (Lewis, D.D. et al 1989). Hasta que puedan ser cotejados adecuadamente, los tratamientos médico y quirúrgico pueden ser ofrecidos con igual grado de efectividad para perros que presenten renquera atribuida a PCF (Huibregtse, B.A. et al 1994).

Un punto fundamental al evaluar la conveniencia de indicar un tratamiento quirúrgico intrarticular es considerar si, tanto la diéresis necesaria para el abordaje como el procedimiento operatorio en sí, garantizan o aseguran una estabilidad articular posoperatoria adecuada. La falta de observancia de esta condición puede hacer malograr los resultados del tratamiento quirúrgico, por lo que al tiempo de decidir la terapéutica del caso se debe tener muy presente este hecho.

Tobias et al 1994, comparó las ventajas y desventajas de los 2 abordajes más comúnmente utilizados: la incisión del ligamento colateral medial y la osteotomía del epicóndilo humeral medial. La primera es relativamente fácil de realizar, mientras que la segunda requiere incisiones precisas y la colocación de implantes metálicos, aunque - por otra parte - ofrece mayor exposición de la articulación medial y mejora la estabilidad postoperatoria (Tobias, T.A. et al 1994; Suess Jr, R.P. et al 1994). No obstante, los autores prefieren el abordaje vía ligamento colateral medial y cápsula articular ya que ofrece una menor incidencia de complicaciones que necesiten ser corregidas por reoperación.

Henry 1984, argumentó que el abordaje por desmotomía tiene peor recuperación postoperatoria en aquellos pacientes en los que al no ser inmovilizado el codo por un período de tiempo adecuado, se produce la dehiscencia del ligamento. Este hecho es debido principalmente al tiempo prolongado que requieren para su cicatrización y en la dificultad de obtener estabi-

lidad articular -por medio de suturas- en estructuras que, como éstas, están formadas por bandas de colágeno orientadas longitudinalmente. En contraste, el abordaje por osteotomía ofrece una excelente estabilidad, sin necesidad de inmovilización prolongada, ya que es reparada internamente por medio de fijación compresiva (Henry, W. et al 1979; Suess Jr, R.P. et al 1994).

El número absoluto de complicaciones intra o postoperatorias no difiere significativamente entre ambos abordajes, pero sí la naturaleza de las mismas. Aproximadamente el 70% de las ocurridas en los osteotomizados estuvieron relacionadas con el reemplazo o la recolocación de los implantes, mientras que ninguno de los pacientes con desmotomía colateral medial necesitaron de cirugía adicional (desmotomía n=0; osteotomía n=5 p 0,05). En aquellos casos en los que se requiere una exploración completa de la articulación se puede realizar el abordaje de la articulación por osteotomía del olécranon y elevación del grupo muscular tríceps, utilizando para su osteosíntesis, doble clavija y figura de ocho con alambre (banda de tensión).

Olsson realizó la osteotomía cubital proximal para el tratamiento de PAN en razas de perros no condrodistróficos, reportando la fusión exitosa del proceso ancóneo. Los resultados tempranos son alentadores, pero son necesarios seguimientos a largo plazo y determinar los factores para la selección de casos antes que este método de terapia pueda ser recomendado universalmente.

La excisión del proceso ancóneo elimina el dolor pero no impide la progresión de la osteoartritis. La edad al tiempo de la cirugía puede afectar significativamente la recuperación clínica postquirúrgica de los perros a los que se les practica la excisión de la apófisis ancónea. Todos los perros de este estudio se operaron antes del año de edad; 5 de 7 no mostraron claudicación en la evaluación posterior. Resultados similares obtuvo Parrisius en 10 de 16 codos operados. Los registros de controles clínicos referidos a los resultados de cirugías en perros intervenidos quirúrgicamente después del año de edad muestran una pobre recuperación. La osteoartritis progresó en todos los casos después de la excisión de la apófisis ancónea. Resultados similares registró en 7 de 7 perros examinados por Guthrie, 30 de 35 codos por Parrisius y 14 de 23 codos por Grondalen.

La osteotomía cubital proximal aparece como un tratamiento promisorio en algunos perros, pero el registro de la casuística es escaso, el seguimiento limitado y los resultados inconsistentes. La osteotomía extrarticular no

causa daño alguno a las estructuras de la articulación, lo que reduce los cambios degenerativos secundarios a los procedimientos intrarticulares (Sjöström, L. et al 1995). La extirpación del proceso ancóneo es el método más común de tratamiento y da buenos resultados cuando se practica tempranamente. Sin embargo esto causa inestabilidad de la articulación del codo que conduce a una progresiva osteoartritis (Roy, R.G. et al 1994).

La fijación con un tornillo de efecto 'lag', colocado desde la apófisis ancónea es técnicamente difícil, puesto que taladrar un orificio puede ser extremadamente difícil en una apófisis pequeña que además tiene un gran componente cartilaginoso.

Cuando la apófisis es de mayor tamaño, la técnica de fijación con tornillo colocado desde el olécranon hacia la apófisis ancónea, descrita por Fox, se realiza fácilmente y no requiere equipo sofisticado. El autor prefiere un tornillo de hueso esponjoso de 4 mm en lugar de uno de cortical de 3,5 mm. Esta preferencia se basa en dos motivos. Primero el tornillo de esponjosa tiene un diámetro externo mayor con una rosca más profunda y un ángulo de ataque que aparentemente permite un mejor anclaje en el proceso ancóneo. Segundo, cuando se taladra el agujero en el olécranon se corre el riesgo potencial de que la rosca del tornillo cortical se trabe o ajuste en las paredes y no se consiga la compresión del fragmento distal (Fox, S.M. et al 1996).

El grado de osteoartritis observado radiológicamente fue valorado por Grondalen, en forma previa y posterior a los tratamientos, de acuerdo a la siguiente escala:

1= Osteofitos escasamente observados a lo largo de la superficie proximal del proceso ancóneo.

2= Osteofitos visibles en diferentes localizaciones.

3= Osteoartrosis severa con grandes osteofitos.

Según los resultados de este estudio, en todos los casos hubo progresión de los cambios osteoartroticos (Huibregtse, B.A. et al 1994.).

Bouck et al 1995, realizaron un estudio de la eficacia de un tratamiento médico comparado con el quirúrgico tradicional.

Los perros asignados al tratamiento médico recibieron Pentosan polisulfato 3 mg/kg una vez por semana durante 4 semanas. El ejercicio fue restringido a caminatas con correa y/o natación por seis semanas al tiempo de aparición de claudicación aguda (Bouck, G.R. et al 1995). El grupo restante fue tratado por medio de una artrotomía medial (capsulotomía) y desmotomía colateral parcial, con vendaje liviano de soporte por 5-7 semanas y ejercicio restringido por 3 semanas.

Excepto por la formación de un seroma moderado no se vieron complicaciones en ninguno de los otros perros sometidos a cirugía. Tampoco fueron vistas reacciones adversas a las drogas utilizadas en el tratamiento médico. La conclusión de este estudio es que finalmente la reingenera mejoró en 7 de 10 perros tratados quirúrgicamente y en 5 de 9 tratados médicamente. El grado de dolor articular disminuyó al final del estudio en 10 de 15 articulaciones tratadas quirúrgicamente y en igual número de las tratadas médicamente. El resultado de este estudio sugiere que el tratamiento médico con Pentosan polisulfato es una alternativa válida a la cirugía en el manejo de la enfermedad degenerativa del codo por PCF u OCD (Bouck, G.R. et al 1995).

La evaluación a largo plazo del manejo quirúrgico de la fragmentación del proceso coronarioide señala que los mejores resultados se obtienen con la extirpación temprana (Tobias, T.A. et al 1994).

De 19 codos monitoreados por un período promedio de 19,5 meses luego de la excisión quirúrgica, 15 tuvieron resultados considerados como excelentes o buenos, demorando aproximadamente 3 a 5 semanas para recuperar el apoyo completo del miembro. Así mismo se obtuvo un 58% de flexión normal y un 84% de extensión normal (Sinibaldi, K.R.; Arnoczky, S.P. 1975).

El rango de motilidad disminuida, mayor osteoartrosis y osteofitosis periarticular se observó en otra serie, en la que el 70% mejoró clínicamente pero solo el 50% dejó de claudicar (Guthrie, S. 1989).

En resumen, la DC afecta numerosas razas caninas provocando enfermedad articular degenerativa progresiva. Las entidades patológicas que la componen se tratan específicamente, con resultados variables a largo plazo en relación a la recuperación del miembro afectado. Existen dudas sobre las ventajas del tratamiento quirúrgico respecto del médico.

CONCLUSIÓN

La displasia de codo (DC) afecta a numerosas razas caninas provocando enfermedad articular degenerativa. Aunque aún permanecen en discusión aspectos de la etiología, tales como los genéticos, metabólicos y traumáticos, ha sido fehacientemente establecido que la enfermedad se origina a partir de una anomalía del proceso de osificación endocondral, en uno o más de los huesos que componen la articulación, siendo su carácter hereditario y poligénico.

Clínicamente la DC se manifiesta, en forma temprana, con la aparición de una claudicación de tipo insidiosa, efusión articular, dolor a la ejecución de movimientos pasivos forzados y, posteriormente, atrofia muscular. A menudo, los signos clínicos son imperceptibles, manifestándose luego del ejercicio intenso o después de períodos de descanso. Debido a la alta incidencia, observada en determinadas razas, la DC debe ser considerada prioritariamente durante el diagnóstico diferencial de cualquier claudicación que tenga origen en la articulación húmero radio cubital.

El diagnóstico definitivo se ve dificultado, con frecuencia, como consecuencia de la ausencia de imágenes radiológicas inequívocas o de características específicas para cada una de las patologías que originan DC, razón por la cual la tomografía y la artroscopía han cobrado en este aspecto un rol significativo. La imposibilidad de acceder rutinariamente a dichos estudios convierte a la artrotomía exploratoria en el procedimiento indicado para confirmar el diagnóstico.

Se han intentado tratamientos médicos y quirúrgicos para cada una de las afecciones que componen la DC, siendo los resultados inconsistentes para determinar su eficacia en forma

contundente. Los tratamientos quirúrgicos, específicos para cada patología, deberán practicarse antes que sean evidentes las imágenes radiológicas de enfermedad articular degenerativa. En los casos de PCF la extracción quirúrgica temprana constituye el método de elección. En PAN la fijación de la apófisis anónea, utilizando un tornillo con efecto "lag", devuelve la estabilidad articular, aunque se ha visto que esto no es suficiente para detener el proceso de degeneración articular a largo plazo. La osteotomía cubital proximal puede ofrecer los mejores resultados cuando se aplica en casos especialmente indicados. El tratamiento para la OCD no difiere de aquel recomendado cuando la afección involucra otras articulaciones, consistiendo básicamente, en la extracción del "flap" cartilaginoso. La IA presenta numerosas dificultades al tiempo de determinar su posible corrección, dada la complejidad de cambios que asientan en las superficies articulares comprometidas.

El pronóstico de DC depende en principio de la severidad de los cambios presentes al momento de efectuar el tratamiento, variando de reservado a malo en referencia a la duración y recuperación del funcionamiento normal del miembro afectado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alexander, J.W. en Slatter D.H. Textbook of small animal surgery. Philadelphia. Saunders Co. 2322-3. 1983
2. Autefage, A.; Asimus, E. Mathon, D. Les troubles de croissance de l'avant-bras chez le chien: conséquences sur l'articulation du coude. *Revue Med Vet* 1993; 144:12 953-65
3. Bardet, J.F. Arthroscopy of the elbow in dogs. Part I: The normal arthroscopy anatomy using the craniolateral portal. *V.C.O.T.* 1997; 10:1-5.
4. Bardet, J.F. Arthroscopy of the elbow in dogs. Part II: The cranial portals in the diagnosis and treatment of the lesions of the coronoid process. *V.C.O.T.* 1997; 10:60-6.
5. Bedford, P.G. BSAVA News. Control of hereditary elbow disease in pedigree dogs. *Journal Small Animal Practice* 1994; 35:2 119-22
6. Bennett, D.; Duff, S.R.I.; Kene, R.O.; Blee, R. Osteochondritis dissecans and fragmentation of the coronoid process in the elbow joint of the dog. *Veterinary Record* 1981; 109:329-36.
7. Boccia, F., Ortega, C. Estudio semiológico del miembro anterior del perro. Su aplicación en el diagnóstico de enfermedades ortopédicas. San Marcos 59-70. 1991.
8. Bouck, G.R., Miller, C.W. Taves, L. A comparison of surgical and medical treatment of fragmented coronoid process and osteochondritis dissecans of the canine elbow. *V C O T* 1995; 8:177-83
9. Carpenter, L.G.; Schwarz, P.D.; Lowry, J.E.; Park, D.R.; Stein, D.F. Comparison of radiologic imaging techniques for diagnosis of fragmented medial coronoid process of the cubital joint in dogs. *JAVMA* 1993; 203:178-83
10. Corley, E.A. Elbow dysplasia in the German Shepherd dog. Dissertation Colorado State University. Fort Collins. Co. 1966.
11. Cross, A.R. Chambers, J.N. Ununited anconeal process of the canine elbow. *Continuing Education* 1997; 3:349-360.
12. Fox, S.M.; Burbidge, H.M.; Bray, J.C. Guerin, S.R. 1996. Ununited anconeal process: lag-screw fixation. *JAAHA* vol 32:52-6
13. Guthrie, S. Some radiographic and clinical aspect of ununited anconeal process in the dog. *Vet Rec* 1989; 124:661-2.
14. Haan, J.J.; Roe, S.C.; Lewis, D.D.; Remberg, W.C.; Kerwin, S.C. Bechuk, T.N. Elbow arthrodesis in twelve dogs. *V C O T* 1996; 9:115-8
15. Henry W.; Wadsworth P.; Mehlhaff C. Medial approach to elbow joint with osteotomy of medial epicondyle. *Vet. Surg* 1979; 8:49
16. Henry Jr, W.B. Radiographic diagnosis and surgical management of fragmented medial coronoid process in dogs. *JAVMA* 1984; 184:799-805.
17. Huijbregtse, B.A.; Johnson, A.L.; Muhlbauer, M.C. Pijanowski, G.J. The effect of treatment of fragmented coronoid process on the development of osteoarthritis of the elbow. *JAAHA* 1994; 30:190-5.
18. IWEG Abstracts of the 7th annual meeting of the international elbow working group, Constance, Germany *V C O T* 1996; 9:58-71
19. Langley-hobbs, S.J.; Carmichael, S. Management of a caudolateral radial head luxation in a five-month-old shih tzu. *V C O T* 1996; 9:186-9.
20. Lewis, D.D.; Parker, R.B.; Hager, D.A. Fragmented medial coronoid process of the canine elbow. *Continuing Education* 1989; 11,3:703-14.
21. Ljunggren G.; Cawley A.J.; Archibald J. Elbow dysplasia in the dog. *JAVMA* 1966; 148:887-91
22. Macpherson, G.C.; Lewis, D.D.; Johnson, K.A.; Allen, G.S. Yovich, J.C. Fragmented coronoid process associated with premature distal radial physeal closure in four dogs. *V C O T* 1992; 5:93-9
23. Mahoney, P.N.; Lamb, C.R. Articular, periarticular and juxtaarticular calcified bodies in the dog and cat: A radiologic review. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 1996; 37:3-19
24. Miyabayashi, T.; Takyguchi, M.; Schrader, S.C.; Biller, D. S. Radiographic anatomy of the medial coronoid process of dogs. *JAAHA* 1995; 31:125-32.
25. Padgett, G.A.; Mostosky, U.V.; Probst, C.W.; Thomas, M.W. Krecke, C.F. The inheritance of osteochondritis dissecans and fragmented coronoid process of the elbow joint in Labrador Retrievers. *JAAHA* 1995; 31:327-30.
26. Read, R.A.; Armstrong, S.J.; Black, A.P.; Macpherson, G.C.; Syovich, J.C. Davey, T. Relationship between physical signs of elbow dysplasia and radiographic score in growing Rottweilers. *JAVMA* 1996; 209,8:1427-30.
27. Roy, R.G.; Wallace, L.; Johnston, G. A retrospective long-term evaluation of ununited anconeal process excision on the canine elbow 1994; 7:94-97.
28. Sinibaldi, K.R.; Arnoczky, S.P. Surgical removal of the ununited anconeal process in the dog. *JAAHA* 1975; 11:192-8.
29. Sjöström, L.; Kasström, H.; Källberg, M. Ununited anconeal process in the dog. Pathogenesis and treatment by osteotomy of the ulna. *VCOT* 1995; 8:170-6
30. Slatter, D. Textbook of small animal surgery. 2^o ed W.B. Saunders Co 1966-1980 Philadelphia. 1993.
31. Suess Jr, R.P.; Trotter, E.J.; Konieczynski, D.; Todhunter, R.J.; Bartel, D.L. Flanders, J.A. Exposure and postoperative stability of three medial surgical approaches to the canine elbow. *Veterinary Surgery* 1994; 23:87-93
32. Swenson, L.; Audel, L. Hedhammar, A. Prevalence and inheritance of and selection for elbow arthrosis in Bernese Mountain dogs and Rottweiler in Sweden and benefit: cost analysis of a screening and control program. *JAVMA* 1997; 210,2:215-21.
33. Tobias, T.A.; Miyabayashi, T.; Olmstead, M.L.; Edrick, L.A. Surgical removal of fragmented medial coronoid process in the dog: Comparative effects of surgical approach and age at time of surgery. *JAAHA* 1994; 30:360-8.
34. Van Sickle D. The relationship of ossification to canine elbow dysplasia. *Anim Hosp* 1966; 2:24-31
35. Walde, I.; Tellhelm, B. Fragmented medial coronoid process of the ulna (FCP) and osteochondritis dissecans (OCD) of the canine elbow and hock joint. A review of literature, diagnosis and therapy. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift.* 1991; 78:414-21
36. Weinstein, M.J.; Mongil, C.M.; Smith, G.K. Orthopedic conditions of the Rottweiler-Part I. *Continuing Education* 1995; 17,6:813-28.
37. Wind A.P. Elbow incongruity and developmental elbow diseases in the dog: part I; part II. *Jour Am Anim Hosp Assoc* 1986; 22:711-30

DETERMINACIONES HORMONALES

M.C.Gobello¹, O.A.Brown², J.R.Rondero²

¹Cátedra. de Clínica Médica de Pequeños animales. Facultad de Ciencias Veterinarias
²INIBIOLP- Cátedra de Histología B. Facultad de Ciencias Médicas

RESUMEN: Los inmunoensayos (IE) se definen como un conjunto de técnicas analíticas que usan anticuerpos para la determinación selectiva de ciertos componentes de interés presentes en muestras biológicas. Estos ensayos son altamente selectivos, de bajos límites de detección, relativamente económicos y fáciles de realizar. Por estas razones, los IE constituyen los métodos de elección para múltiples aplicaciones endocrinológicas, tanto en medicina humana como veterinaria. En este trabajo se exponen los principios generales de las determinaciones hormonales, así como también se explican algunos de los IE disponibles para las determinaciones hormonales en los caninos domésticos. Por último, se incluye una breve discusión sobre la situación actual y la relevancia de los IE caninos en la endocrinología clínica veterinaria.

PALABRAS CLAVE: inmunoensayo, hormona, perro.

HORMONAL DETERMINATIONS

ABSTRACT: Immunoassays (IA) are defined as analytical techniques which use antibodies for selective determinations of sample components. The main advantages of IA are that they are highly selective, relatively inexpensive, easy to perform and that they have low limits of detection. All these characteristics make IA the methods of choice for human and veterinary endocrinological applications. General principles of hormonal determinations and some of the available canine IA are described. The relevance and present state of canine IA in endocrinological clinical practice are also briefly discussed.

KEY WORDS: immunoassay, hormone, dog

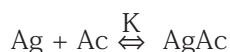
INTRODUCCIÓN

Los inmunoensayos (IE) constituyen uno de los métodos más poderosos y ampliamente usados en la química clínica. Un IE se define como una técnica analítica que usa anticuerpos (Ac), para la determinación selectiva de compuestos presentes en muestras biológicas. Las principales ventajas de los IE consisten en que son altamente selectivos, tienen bajos límites de detección y en que pueden ser adaptados para la determinación de muchos compuestos de interés clínico (Hage, 1993). Por su alta selectividad los IE pueden ser usados en muestras complejas, como orina o sangre, con poca o ninguna preparación de la muestra. Estos métodos son, también, relativamente económicos y una vez puestos a punto fáciles de realizar. Todas estas características hacen que los IE sean los métodos de elección para múltiples aplicaciones endocrinológicas, tanto en medicina humana como veterinaria.

Este trabajo intenta dar a conocer los principios generales de las distintas metodologías utilizadas para las determinaciones hormonales, así como también mencionar algunos de los IE disponibles en la actualidad para ser usados en los caninos domésticos.

PRINCIPIO Y CLASIFICACIÓN

El principio de todas estas pruebas consiste en la combinación de proteínas de alta sensibilidad y especificidad (Ac) con los ligandos (antígenos [Ag]) a dosar según la siguiente ecuación:



Siendo Ag el antígeno o ligando a dosar, Ac el anticuerpo específico que reacciona con el antígeno, AgAc el complejo antígeno anticuerpo generado y K la constante de equilibrio de la reacción.

Los IE se pueden clasificar de acuerdo a:

1) El tipo de marca (sustancia que se incorpora a una molécula a fin de poder identificarla) en:

-Radioinmunomarcados: los dos más frecuentemente usados son el radioinmunoensayo (RIE) de competición y los ensayos inmunoradiométricos (IRMA) que utilizan isótopos radioactivos.

-Enzimáticos: en este caso la marca es una enzima. Ejemplos de estos ensayos son el enzoinmunoensayo de competición (EIA), el ensayo inmunoabsorbido a enzimas o enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), el inmunotest-enzimomonitorado (EMIT) y los test inmunoenzimométricos (IEMA)

-De fluorescencia: basados en marcas fluorescentes, por ejemplo el fluoroinmunoensayo (FIA) y el inmunofluorométrico (IFMA).

2) La concentración de sus reactivos en:

-IE de competición: en los cuales los Ac son usados en una concentración limitada con un antígeno (Ag) marcado.

-Inmunométricos: en los cuales los Ac están marcados y en exceso (Bianchi y Marpes, 1982; Eduards, 1990).

Se pueden explicar los IE tomando como modelo de descripción el RIE, diciendo que la sustancia por valorar (ligando) compite cuantitativamente por la unión a un reactivo específico (Ac) con la misma sustancia marcada con un isótopo radioactivo (Ag*).

Si se hace reaccionar el Ac con el compuesto marcado (Ag*) y parte de éste se une al Ac, formando el complejo AcAg*, parte del Ag* queda libre (Fig. N° I).

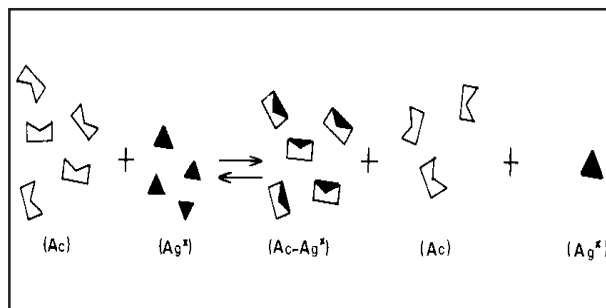


Figura N°I: Principios del radioinmunoanálisis. Unión inicial.

En un nuevo sistema en el que se encuentra el Ag marcado (Ag*) y el compuesto por valorar (Ag), se producirá una competencia entre el Ag y el Ag* por los sitios de unión específicos del Ac los cuales son bivalentes. Por consiguiente aumentará el número de moléculas marcadas libres (Fig. N° II).

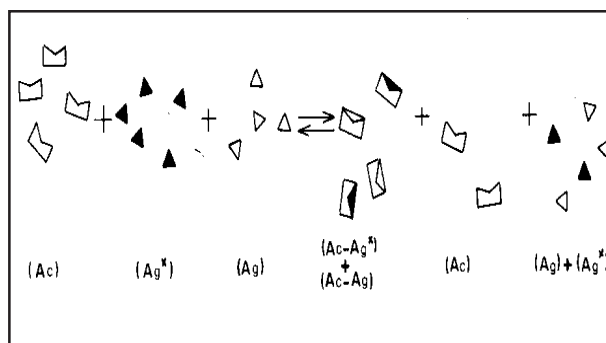


Figura N°II: Unión competitiva, dosis 1.

A medida que aumenta la concentración de la sustancia por valorar, la concentración de Ag* no unido al Ac se incrementa (Fig. N° III).

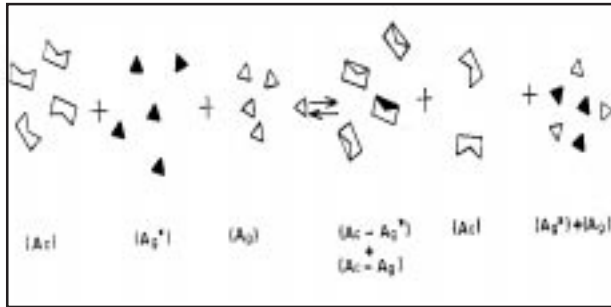


Figura N°III: Unión competitiva, dosis 2.

Si las cantidades del ligando marcado y Ac son fijas y limitadas y hay cantidades crecientes de ligando sin marcar, la cantidad relativa de compuesto marcado que está unido al Ac disminuye cuando la concentración del compuesto sin marcar presente en la reacción aumenta. Si se separan cuantitativamente el compuesto unido al Ac del compuesto libre, se pueden determinar sus respectivas actividades aparentes (radioactividad) expresadas en cuentas por minuto (cpm). Estos resultados pueden analizarse de distintas formas de ajustes matemáticos (curvas dosis-respuesta). El cociente de las fracciones unida al Ac (B) versus la fracción libre de Ag* (F) permite la construcción de dichas curvas estándar donde B/F (actividad del marcador unido en relación al libre) o %B (total de la actividad del marcador) o cualquier otro índice de partición entre lo unido y lo libre se grafica en el eje de las ordenadas y la concentración del ligando no unido en el de las abscisas. El desplazamiento de la actividad del trazador producida por una cantidad desconocida de ligando no marcado de la muestra a medir, se interpola en la curva estándar y de esta manera puede ser evaluada su concentración (Travis, 1979).

El principio básico del desplazamiento debido a la dosis del marcador unido se explica en la figura 4 y se aplica a todo IE de competición. En cada tubo (A, B, C, D) el número de moléculas de marcador es constante y está en exceso en relación al número también constante pero limitado de sitios de unión por tubo. En ausencia de ligando no marcado la unión de la radioactividad es máxima y se la llama unión máxima (B₀), la situación hipotética de %B=50 es graficada como A en la curva. El %B en ausencia de ligando no marcado se lo llama % B₀ o alternativamente B₀. En B se agregan 4 moléculas de ligando no marcado al sistema, entonces B/F en equilibrio es 0,6 o 3/5. Con la adi-

ción de 4 moléculas más (C) del ligando no marcado implica que el 50% del ligando presente está marcado y, consecuentemente el 50% de los sitios de unión disponibles serán ocupados por el ligando marcado. En esta situación, B/F = es igual al 0,33 o 2/6. La adición de 24 moléculas de ligando no marcado en D significa que 1 de 4 moléculas de ligando está marcada y por eso, B/F es 0,14 o 1/7. Solamente 1 de 4 sitios de unión está ocupado por el trazador.

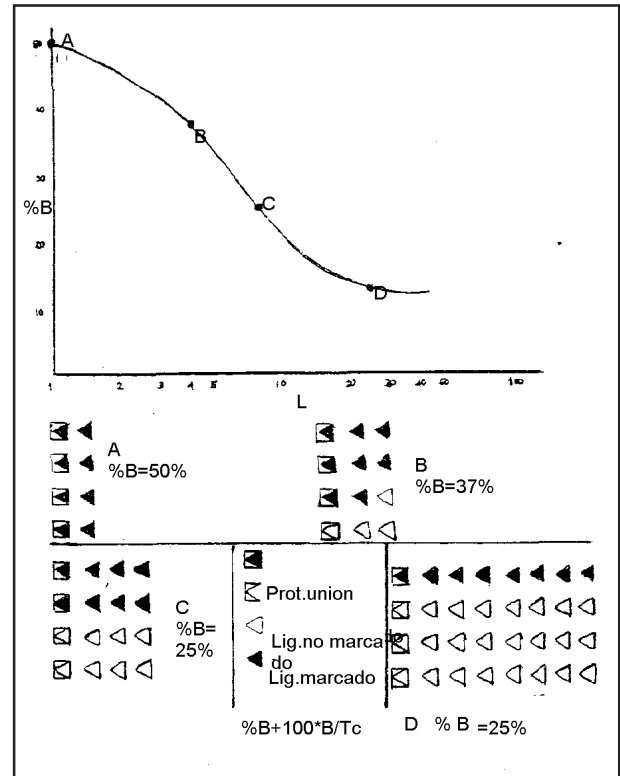


Figura N°IV: Principio del desplazamiento dependiente de la dosis del marcador unido.

En la literatura los datos son frecuentemente graficados en algunas de las tres formas de la Figura V, las cuales son todas aceptables (Figura N° V).

En A y B la ordenada puede ser calculada como B/F, %B (del total), %B/B₀, o B/T, siendo T el número de cuentas totales por minuto (cpm) de cada tubo, todas producen curvas que son inversamente proporcionales a la cantidad del ligando no marcado agregado. La graficación logit en C resulta en una línea recta que requiere "papel logit-log".

La transformación es la siguiente :

$$\text{Logit} (B/ B_0) = \log \frac{B/ B_0}{1 - B/ B_0}$$

resultando ser engorrosa para un cálculo manual sin la ayuda de computadoras. En una graficación lineal se obtiene una buena aproximación de la función logit cuando B/B₀ se gra-

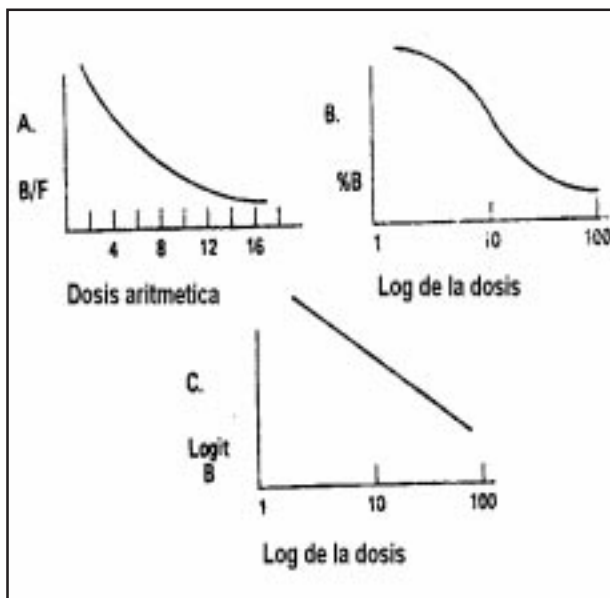


Figura N°V: Gráficos de datos.

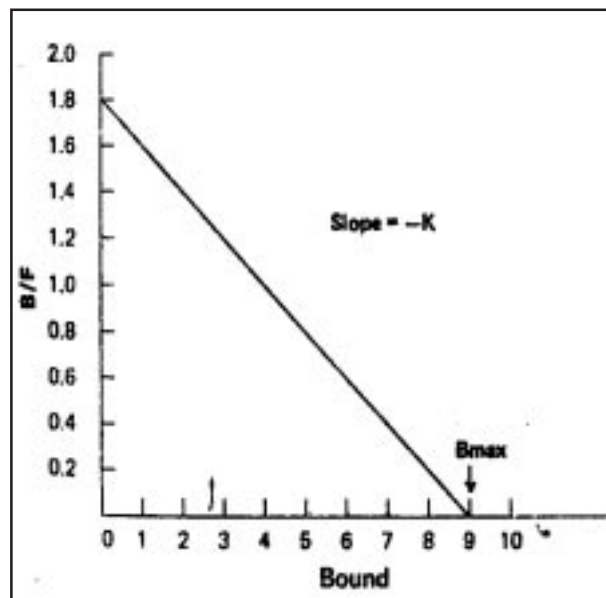


Figura N°VI: Gráfico de Scatchard. Slope: pendiente K Bound: unión

fica en la ordenada de un papel logit y el logaritmo de la dosis en la abscisa. Esto produce una línea recta con una pendiente negativa que brinda una mayor cantidad de puntos en la región útil de la curva (Travis, 1979).

Los siguientes índices de unión son los más comúnmente usados:

$$B/F = \frac{\text{cpm de la fracción unida luego de la separación}}{\text{cpm de la fracción no unida (F) luego de la separación}}$$

$$B/T = \frac{\text{cpm unidas}}{\text{cpm totales originalmente pipeteadas en cada tubo}}$$

$$\% B \text{ (del total)} = B/T * 100$$

$$\% B_0 \text{ (de } B_0) = B/B_0 * 100$$

Alternativamente, las cpm unidas sin más modificaciones pueden ser graficadas vs la dosis cuando un radioisótopo se usa como marca.

En un ensayo teórico ideal, donde una sola especie de sitio de unión está disponible el cual une un ligando, un gráfico aritmético de B/F vs la concentración de B produce una línea recta simple llamada gráfico de Scatchard (Fig.N°VI).

Por definición la pendiente de este gráfico constituye la constante de afinidad K y su intercepción en la ordenada la máxima capacidad de unión (o concentración de sitios de unión) (Travis, 1979).

REACTIVOS

Se necesitan 3 reactivos específicos para realizar un IE. Para el caso del RIE es un Ag marcado, el Ag en concentración conocida (es-

tándar de referencia) y un Ac específico capaz de reaccionar contra dicho Ag. También es necesario tener un método de separación entre la fracción unida al Ac y el Ag libre marcado.

Anticuerpo específico: Muchas de las hormonas peptídicas son satisfactoriamente inmunogénicas en una variedad de animales experimentales cuando la hormona se administra en una emulsión con el adyuvante de Freund. En lo referente a la generación de Ac, parece haber poca ventaja en inmunizar con Ag de alta pureza. Sin embargo, el Ag marcado, debe ser altamente purificado para evitar la interacción de contaminantes marcados con Ac no específicos.

A los péptidos de bajo peso molecular o las sustancias no peptídicas que no son antigénicas por si mismas (haptenos) se las une a proteínas de mayor peso molecular. Se puede emplear una variedad de métodos para unir las pequeñas moléculas a transportadores inmunogénicos. Como la presencia de otras reacciones inmunológicas no interfiere con la reacción entre el Ag marcado y su Ac específico, la inmunización con varios Ag no relacionados puede realizarse simultáneamente. La concentración, sensibilidad y especificidad de los Ac dirigidos a los distintos Ag parecen no estar relacionadas. Como la posibilidad de obtener un antisuero satisfactorio aumenta con el número de animales inmunizados, la inmunización con múltiples Ag es ventajosa ya que reduce el número de animales para inmunizar y sangrar por un factor igual al número de Ag usados simultáneamente (Yallow, 1992). La concentración de Ac usualmente aumenta en las repetidas inmunizaciones, alcanzando una meseta después de 3 a 5 dosis de Ag. En ocasiones las concentra-

ciones de Ac pueden caer después de repetidas y regulares inmunizaciones. En estas ocasiones los animales deben tener un período libre de inmunizaciones de 3 a 6 meses, después del cual, la reinmunización resulta usualmente en una aumentada respuesta de Ac.

La producción de un antisuero satisfactorio resulta ser un arte impreciso más que una ciencia. No obstante haber numerosos trabajos que describen procedimientos especializados para la inmunización, no existe un acuerdo general con respecto a cuales son las especies animales más apropiadas o la técnica óptima para producir el mejor Ac para cada una de las diversas sustancias para las cuales se ha descrito un RIE. Una de las variables más importantes es la cantidad de Ag a inocular, ya que si es insuficiente se produce una desensibilización y si es muy alta se produce una parálisis inmunológica. Lamentablemente, la cantidad a inocular sigue siendo todavía una cuestión empírica.

Hay considerable interés en usar los Ac monoclonales para los RIE. Este método permite la producción de grandes cantidades de Ac monoespecífico. No obstante, la sensibilidad obtenida con el uso de tal Ac es generalmente menor que aquella obtenida por la propia selección entre Ac heterólogos producidos con la inmunización tradicional. La razón de esta diferencia es que la selección de Ac monoclonales generalmente produce reacciones que tienen constantes de equilibrio (K) intermedia entre aquellas con alta y con baja K (Yallow, 1992). Cuando se usa el antisuero ordinario heterólogo, éste está diluido suficientemente, de manera que sólo los sitios de unión del Ac con las más altas K, y por lo tanto la más alta sensibilidad, son capaces de unirse al Ag. Si no se requiere una máxima sensibilidad, el uso de Ac monoclonales puede ser ventajosa, ya que poseen mayor selectividad que los Ac heterólogos.

Antígeno marcado: Por su histórica predominancia como los marcadores de elección en los IE, los trazadores radiomarcados se toman como ejemplo. De todas maneras los conceptos básicos son válidos para cualquier tipo de marca usada. El primer paso en un IE es la preparación de un ligando altamente purificado que pueda ser radiomarcado sin pérdida de su capacidad de unión. El ligando radiomarcado en un RIE se denomina trazador.

Ciertas moléculas excepcionales como la tiroxina y la triiodotironina tiene I nativo en su estructura molecular y por lo tanto pueden incorporar radionúclidos de yodo emisores de rayos gamma (^{125}I o ^{131}I) sin alteración de su estructura molecular primaria. No obstante, las moléculas orgánicas normalmente presentes en los fluidos biológicos no tienen elementos en su

composición que puedan ser sustituidos por isótopos emisores radiactivos. Los radionúclidos emisores de rayos beta tales como el ^{14}C y el ^3H pueden ser usados para marcar estas moléculas pero las limitaciones de detección del contador de centelleo líquido les quita valor.

Aunque los radionúclidos emisores gamma, tales como ^{125}I o ^{131}I , tiene una vida media relativamente corta ($T^{1/2} = 60$ y $8,1$ días respectivamente) son los isótopos de elección para usar en los IE. Esto se debe a su relativamente alta energía de emisión gamma que permite la unión al ligando con alta actividad específica y menor error de conteo. El ^{125}I tiene mayor vida media que el ^{131}I y es más conveniente para los ensayos clínicos y para el almacenamiento, que el ^{131}I de más corta vida. El ^{125}I y el ^{131}I son normalmente usados para marcar polipéptidos. El ^{125}I , tiene menor energía que el ^{131}I pero es el radionúclido más usado en radioiodinaciones. Los ligandos marcados con ^{125}I son técnicamente más convenientes que los marcados con emisores beta, por lo tanto es deseable que las sustancias no proteicas en muy bajas concentraciones como los esteroides, también sean marcados con emisores gamma. Algunas moléculas como los estrógenos contienen parte de la molécula a la cual puede ser directamente incorporado el ^{125}I sin manipulaciones químicas complicadas. Desafortunadamente como un átomo de I ejerce un efecto estérico grande en el esteroide, la incorporación del mismo distorsiona significativamente la molécula y altera su encaje geométrico con el sitio de unión al Ac, por lo que la inmunoreactividad es afectada. Es posible usar una molécula espaciadora para separar los sitios antigénicos del esteroide de la porción marcada. Más comúnmente, se utiliza la iodinación de conjugados proteicos, que pueden ser marcados con ^{125}I como cualquier otra proteína. En este caso, el radioyodo es incorporado en los residuos tirosil de la proteína conjugada (albúmina) y no en el mismo esteroide. Resulta de principal importancia que la inmunoreactividad entre marcadores y Ag no marcados por los sitios de unión al Ac sea semejante. Un método útil para iodinar moléculas no proteicas es conjugarlas con derivados de ésteres de metiltirosina, ya que dicho éster puede incorporar I por las técnicas convencionales. Ejemplos de hormonas que han sido satisfactoriamente iodinadas son los esteroides: estrógenos, testosterona y cortisol (Travis, 1979). También se pueden usar hormonas tritiadas con la ventaja que la vida media del tritio es de 12 años y produce menores efectos estéricos.

El método más común para iodinar los ligandos es el método de Hunter, Greenwood, y Glover de la oxidación con metabisulfito de so-

dio y cloramina T. Otros métodos que han demostrado utilidad son el de la lactoperoxidasa (oxidación enzimática) y el de la iodación en fase sólida con Iodógeno. Este último basado en la generación de la especie iodo electrofílico (I⁺) a partir del NaI usando iodógeno como reactivo (Poskus, 1989).

Seguido a la reacción de iodación se requiere la separación de los compuestos iodados que no reaccionaron y de los compuestos dañados. Esto es usualmente llevado a cabo por filtración molecular en la resina Sephadex, DEAE celulosa, o cromatografía en celulosa. Después de la purificación, la fracción marcada que va a ser usada como trazador debe ser analizada por la presencia de material dañado, el cual puede interferir como unión no específica (UNE), y entonces aumentar el blanco del ensayo. Un alto blanco (UNE) reduce la confiabilidad, sensibilidad y precisión del ensayo. La estabilidad del ligando marcado es un importante factor en un IE. Las moléculas marcadas muestran estabilidad variable. Los polipéptidos pueden ser particularmente vulnerables al daño perdiendo su inmunoreactividad en diferente medida en la iodación. La prolactina, por ejemplo, sufre un daño tal por la radiación que puede ser usada hasta 2 o 3 semanas luego de la iodación. Típicamente la unión específica disminuye mientras que la no específica del material dañado aumenta con el tiempo de almacenamiento, resultando en una pérdida de sensibilidad y precisión. A veces la repurificación de los trazadores y la separación de los componentes dañados pueden prolongar la vida del ensayo. El conocimiento de la estabilidad de los trazadores y de las condiciones óptimas de almacenamiento son necesarias para el satisfactorio uso de esta metodología.

MÉTODOS DE SEPARACIÓN DE LA FRACCIÓN LIBRE DE LA UNIDA

El clásico método inmunológico para separar la fracción unida al Ac del Ag libre consistía en la precipitación espontánea de los complejos Ag-Ac. No obstante, con el uso generalizado de los RIE de alta sensibilidad se requiere que la concentración molar de los reactivos sea tan baja que la precipitación espontánea no se produce y los complejos Ag-Ac permanecen solubles. Se han usado una amplia variedad de métodos para la separación:

precipitación de complejo Ac-Ag con un segundo Ac dirigido contra el complejo (Método del doble Ac) o bien con proteína A (compuesto en suspensión que se une a la porción Fc de las inmunoglobulinas),

uso de solventes orgánicos o la precipitación salina para precipitar los complejos,

adsorción de complejos al material de fase sólida y

adsorción del Ag libre a material de fase sólida tal como celulosa, carbón activado, silicatos, o resinas de intercambio iónico (Poskus, 1989).

El método del doble Ac es el de elección en el desarrollo de nuevos procedimientos del RIE. No obstante, el costo del segundo Ac puede convertirlo en excesivamente caro cuando miles de muestras deben ser analizadas. El método acuoso de polietilenglicol para la precipitación de los complejos puede ser usado luego de que un ensayo haya sido validado con la metodología del doble Ac.

La adsorción o la formación de complejos Ac-Ag en una fase sólida es un método generalmente aplicado en los kits comerciales ya que brinda una alta sensibilidad, precisión y reproducibilidad; no obstante, presenta la limitación de su costo.

Para procedimientos rutinarios, generalmente se prefieren un método de adsorción del Ag libre al material de fase sólida, que es por otro lado el menos costoso. Ciertos principios comunes se aplican a todas las técnicas de adsorción de Ag. Una masa dada de adsorbente es usualmente más efectiva si el área total de superficie se aumenta, es decir, si las partículas adsorbentes se hacen más pequeñas. Entonces, cantidades en trazas tanto de Ac como de Ag libre pueden ser adsorbidas a materiales como celulosa, carbón activado o silicatos, a no ser que la concentración de proteínas plasmáticas u otra proteína en la mezcla de incubación sea suficientemente alta para saturar los sitios de unión a la gama globulina. Generalmente, los métodos de adsorción del Ag son más satisfactorios para los pequeños Ag, aquellos con peso molecular de 30.000 o menor. La mayor afinidad del adsorbente para sustancias de bajo peso molecular en presencia de proteínas plasmáticas permite su casi total adsorción incluso en la presencia de plasma virtualmente no diluido o de altas concentraciones de otras proteínas (Yallow, 1992).

El hecho de que un gran número de métodos de separación de Ac unidos a la hormona marcada hayan sido empleados es una consecuencia de la variedad de propiedades químicas de la gran cantidad de sustancias para las cuales se usa el RIE.

EQUIPOS DE DETECCIÓN

Por tratarse del equipo más frecuentemente empleado se reproduce un esquema de un contador de emisión gamma (Fig.Nº VII).

Para medir las radiaciones gamma se usan cristales de NaI envenenados con trazas

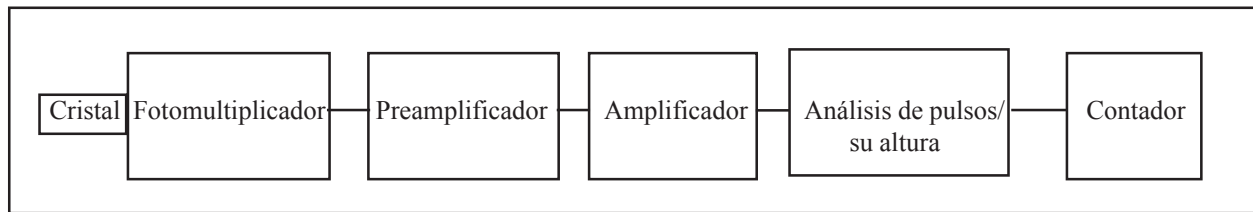


Figura N°VII: Esquema de un contador de radiaciones gamma

de Tl. Este le da la capacidad de centellar (emisión de fotones) a la temperatura ambiente cada vez que la radiación interacciona con él. Son cristales cilíndricos de 2,5 a 16,5 cm de diámetro y de 5 a 4,5 cm de espesor. Todas sus caras, menos una, están recubiertas por una capa de MgO, que actúa como reflejante, y otra, encima de la anterior, de aluminio. La cara libre se halla íntimamente adosada a un tubo fotomultiplicador. Dentro del cristal se produce una radiación lumínica llamada centelleo. Esta, en última instancia, sale del cristal por la cara unida al tubo fotomultiplicador. Esos centelleos se cuantifican al incidir sobre un fotocátodo que forma parte del tubo fotomultiplicador. Este posee unas placas denominadas dinodos, cada uno de estos presenta una diferencia de potencial determinada. Cuando incide un fotón gamma, en el fotocátodo salta un electrón (fotoelectrón) que penetra dentro del campo eléctrico del tubo fotomultiplicador. Por cada electrón que incide en el dinodo salta un número de electrones sucesivamente en el resto de los dinodos. El número de electrones que se liberaron en el ánodo será proporcional a la diferencia de potencial total, en la cual la base será el número de electrones arrancados del primer dinodo y el exponente, el número de dinodos. En este caso se transforma un efecto de la radiación gamma en un pulso eléctrico de determinada altura.

Estos pulsos son proporcionales a la energía que incide en el cristal, es decir que a mayor energía mayor altura del pulso. Esta proporcionalidad ocurre realmente si la energía gamma que incide, penetra, interacciona y deja toda su energía dentro del cristal. En este caso se ha producido una absorción total. Puede suceder que se escape la energía dentro del cristal, entonces ocurre una absorción parcial, y el pulso obtenido, no será tan alto como en el caso anterior. Ampliando este concepto se tendrá que: a mayor energía habrá mayor altura del pulso y por lo tanto mayor absorción total. La altura del pulso está condicionada por una determinada tensión: a mayor tensión en el tubo fotomultiplicador, mayor energía de los electrones y mayor altura del pulso. El flujo de electrones incidentes en el tubo fotomultiplicador también depende del tipo y masa de nuclido.

Para seleccionar la altura del pulso que interesa detectar se emplea un colimador lla-

mado discriminador de altura de pulso. Este es un aparato electrónico que permite discriminar alturas de pulso para seleccionar solo el nuclido que se desea detectar. Solo cuentan aquellos pulsos que terminen dentro de la ventana y no los que lo hagan fuera de ella. Esto se produce en el módulo análisis de pulsos. Cada pulso representa una desintegración atómica del radioisótopo emisor gamma específico (Iovine y Selva, 1985).

CONTROL DE CALIDAD DEL RIE

Todo estudio cuantitativo debe reunir una serie de requisitos que indican la confiabilidad que merecen sus resultados y la posibilidad de practicarlo. Algunos parámetros básicos que hacen al estudio de la calidad de un ensayo son:

-Exactitud: es la mayor proximidad con la que un método analítico se aproxima al verdadero valor de la muestra. Esto puede llevarse a cabo por procedimientos de recuperación después del añadido de cantidades conocidas de la sustancia investigada. Se puede expresar como el porcentaje de la cantidad de la sustancia añadida que se logre cuantificar. Para muchas hormonas se dispone además de patrones internacionales cuya concentración se acepta como verdadera.

-Precisión: es la reproducibilidad de las mediciones sobre una misma muestra. Un ensayo puede ser exacto pero no preciso.

-Varianza inter-ensayo (precisión): variación de múltiples determinaciones de la misma muestra en distintos ensayos.

-Varianza intra-ensayo: variación en las múltiples determinaciones de la misma corrida de muestras en el mismo ensayo.

-Coeficiente de variación (CV): es un índice muy útil de precisión interensayo, un buen CV se encuentra entre 5-10%.

$$CV = \frac{SD}{x} * 100$$

Donde SD es el desvío standard y x la media.

-Variación interoperario: consiste en el CV obtenido de múltiples ensayos realizados por distintos operadores.

-Especificidad: es la determinación de una sustancia con exclusión de otras. Las muestras

biológicas son complejas cualitativa y cuantitativamente en relación a sus componentes. Si bien interesa cuantificar uno de estos componentes el resto puede interferir. Dicha interferencia puede ser inespecífica y se llama efecto matriz (tonicidad, temperatura, sustancias extrañas) o específica debida a la heterogeneidad de los Ag, del antisuero o al hecho de que distintos Ag comparten grupos inmunológicos. La reactividad cruzada se puede determinar efectuando distintas curvas con la sustancia en estudio y aquellas otras sospechosas de compartir propiedades antigénicas. La falta de paralelismo de las curvas indica que las sustancias no son inmunológicamente similares. Para eliminar la inmunidad cruzada se debe disponer del antisuero con mayor afinidad por la molécula a medir.

-Sensibilidad: es la menor cantidad de Ag que puede ser detectada con certeza estadística. Puede ser apreciada en función de la pendiente de la curva, cuanto mayor sea esta mayor será la sensibilidad. Para aumentar la sensibilidad se puede aumentar la dilución del antisuero; la dilución aconsejable es aquella que fija un 50% del trazador en ausencia del Ag no marcado.

-Reproducibilidad: los resultados serán reproducibles dependiendo de la capacidad técnica del grupo de trabajo. Una vez obtenidas las condiciones óptimas de trabajo se las debe mantener constantes para todos los ensayos.

-Practicabilidad: es la facilidad de realización de un análisis (Libertum, 1980).

La adhesión a rígidos estándares de control de calidad es un requisito para la satisfactoria realización de los IE. Ciertas pautas deben ser conocidas y seguidas:

-Actividad específica (A.S.) del trazador: la cantidad total de actividad relativa a la masa debe ser conocida para cada ensayo. En conjunción con esto, la inclusión de un blanco o no específico (UNE) en cada ensayo ayudará a monitorear la estabilidad y el decaimiento del ligando marcado.

-%B₀ (del total): es el porcentaje de las cuentas totales (T) encontradas en ausencia de ligando no marcado.

$$\% B_0 = \frac{B_0}{T} * 100$$

-50% B/ B₀: es la cantidad conocida de ligando no marcado (estándar) que produce un valor de B igual al 50% B₀, es decir permite la unión del 50% del trazador al Ac (Travis, 1979; Bianchi y Marpes, 1982).

ENSAYOS INMUNORADIOMÉTRICOS

Como alternativa para los ensayos de saturación de equilibrio donde se produce una competición entre el ligando marcado y el no marcado por un limitado número de sitios de unión, quedando algo del ligando "desconocido" sin reaccionar (no unido), existe otra técnica en la cual todo el Ag desconocido reacciona con un exceso de Ac marcado (Figura N° VIII).

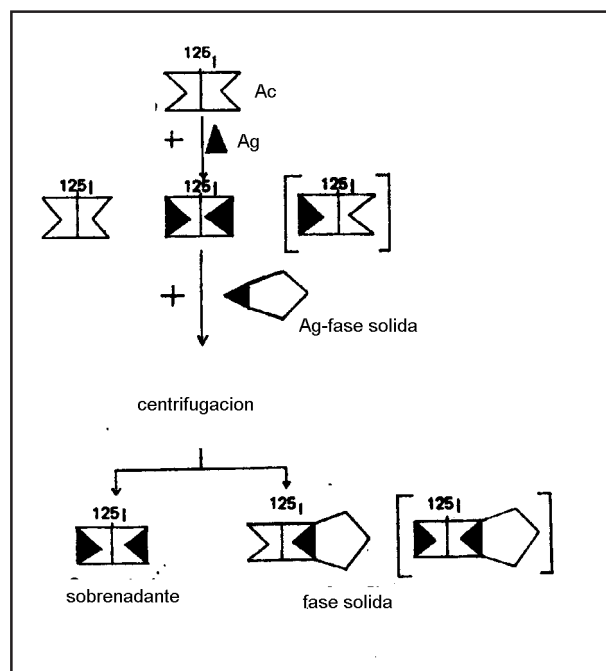


Figura N°VIII: Método inmunoradiométrico

Esta última técnica se llama inmunométrica. En teoría como todo el Ag desconocido ha formado complejos con el Ac marcado, el Ag es directamente detectable con este método, por eso se obtiene mayor sensibilidad que con los métodos convencionales de equilibrio (Hage, 1993).

INMUNOENSAYOS ENZIMÁTICOS

Probablemente el desarrollo más significativo en IE en los últimos años ha sido la sustitución de los radioisótopos por enzimas. En diferentes variaciones de esta técnica tanto el Ag, el Ac primario, o incluso el segundo Ac pueden ser marcados enzimáticamente. En los enzimo-inmunoensayos (EIE) homogéneos, no es necesaria una separación física de la fracción unida de la libre. También el Ag marcado con la enzima y el Ag no marcado (analito) compiten por un número limitado de sitios de unión al Ac. El marcador enzimático puede estar inactivo o contrariamente tornarse activo cuando se une al Ac. El cambio en la actividad enzimá-

tica, evidenciado por la adición de un sustrato cromogénico y expresado en variaciones de absorbancia a una determinada longitud de onda (Å Abs), es función del marcador enzimático unido. En la figura 9 se gráfica un ejemplo de un EIE homogéneo donde la molécula marcada enzimáticamente se une al Ac específico, apareciendo su actividad enzimática (Tijssen, 1985) (Figura N° IX).

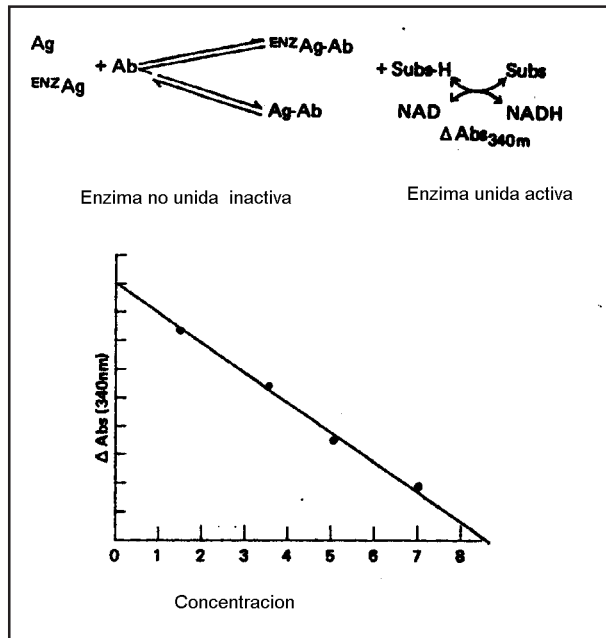


Figura N°IX: Enzimoimmunoensayo homogéneo

Una segunda categoría de los EIE esta representada por el ELISA, donde los inmunoreactantes están inmovilizados en soportes de fase sólida y tanto el Ag, el Ac primario, el segundo Ac pueden estar marcados con la enzima (Nieto y Carbonetto, 1989).

Los EIE tienen la ventaja de poder ser realizados en forma inmediata en un laboratorio convencional químico, ya que no requieren personal especialmente entrenado, precauciones del manejo de radioactivos ni equipos caros de detección. No obstante, los EIE no tienen la misma aplicabilidad para medir moléculas grandes como la de las hormonas polipeptídicas. Uno de los principales problemas potenciales es el impedimento estérico en los sitios de unión a la enzima cuando moléculas grandes se unen a las enzimas. La sensibilidad de los EIE puede no ser suficiente para medir concentraciones extremadamente bajas en las cuales algunas hormonas polipeptídicas circulan; además la medición de la actividad enzimática está sujeta a factores medioambientales (pH, temperatura, etc) en adición a la interferencia de estos a la reacción Ag-Ac (Tijssen, 1985).

FLUOROINMUNOENSAYO

El fluoroinmunoensayo (FIA) emplea los mismos principios comunes descritos, usando un marcador fluorescente sobre la molécula marcadora (Ag, Ac, o segundo Ac). Los ensayos pueden ser competitivos o no y después de la separación de la fracción unida de la libre la cuantificación se realiza con técnicas fluorométricas. Se incluyen también en esta categoría los ensayos inmunofluorométricos (IFMA) y los IE basados en la polarización fluorescente (Hage, 1993).

DETERMINACIONES HORMONALES EN CANINOS DOMÉSTICOS

En este apartado se describen brevemente algunos de los IE disponibles, en la actualidad, para las determinaciones hormonales en los caninos domésticos:

-Ensayo inmunoenzimométrico para prolactina canina:

Aunque la prolactina canina (cPrl) puede medirse por RIE (Graff et al, 1977; De Coster et al, 1983), comercialmente la determinación que se ofrece es un ensayo inmunoenzimométrico (EIEM) (Fig. N° X).

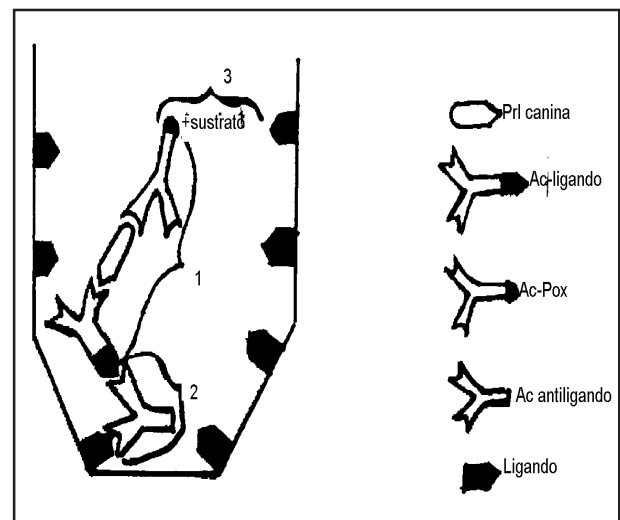


Figura N°X: Etapas de EIEM de prolactina canina

En este procedimiento se incubaba la muestra, en microplacas, con cantidades saturantes de dos Ac anti cPrl; uno de ellos está unido a un ligando de bajo peso molecular; el segundo Ac está conjugado a la peroxidasa de rábano

rústico. Una vez completada la primera fase de incubación, virtualmente toda la cPrl de la muestra está unida a ambos Ac lo que la asocia a una molécula de peroxidasa y a una de ligando. En la segunda fase de incubación se agrega un Ac antiligando. Como los pocillos de la microplaca están recubiertos con ligando, el Ac antiligando, actuando como puente, se une por una valencia al ligando asociado a la cPrl y por su otro sitio de unión al ligando unido a la pared del pocillo. Esto da como resultado final que todo el complejo peroxidasa- cPrl quede unido a la pared del pocillo. Lavando se eliminan los reactivos en exceso, procediéndose luego a agregar un sustrato incoloro de la peroxidasa (3,3',5,5' tetrametilbenzidamina, TMB) que será transformado por la enzima en un compuesto coloreado. La intensidad del color desarrollado será proporcional a la cantidad de peroxidasa unida a la pared del pocillo, la cual a su vez es proporcional a la cantidad de cPrl existente en la muestra a evaluar.

Los valores de cPrl hallados con este EIEM se encuentran entre 0,5 y 80 ng/ml con una media de 17,9 ng/ml, datos concordantes con los de algunos RIE citados en la bibliografía (De Coster et al, 1983; Graf, 1978; Hoppen et al, 1993, Knight et al, 1976 y 1977; Reimers et al, 1978).

-Radioinmunoensayo para tiroxina canina:

Para la determinación de tiroxina canina (cT_4) se usa RIE de fase sólida con ^{125}I . La $c^{125}I T_4$ compite por un tiempo fijo con la cT_4 de la muestra por los sitios del Ac unidos a la pared del tubo, en presencia de agentes bloqueantes para las proteínas de unión para la hormona tiroidea. Por último, los tubos son decantados y llevados al contador gamma. La concentración de cT_4 se lee interpolando en la curva de calibración.

Nuestros valores de referencia con este kit varían entre 0,8 y 2,9 $\mu g/dl$, los cuales resultan coincidentes con aquellos mencionados en la bibliografía (Belshow et al, 1979; Gaschen et al, 1993; Kaufman et al, 1985, Reimers et al, 1991)

-Radioinmunoensayo para progesterona canina:

Para la determinación de progesterona (P_4) se usa también un RIE de fase sólida con ^{125}I . De igual manera que para la cT_4 , la $^{125}I P_4$ compite con la de la muestra por el Ac, el que está inmovilizado a la pared de un tubo de polipropileno. La simple decantación del sobrenadante es suficiente para finalizar la reacción de competencia y aislar la fracción unida al Ac de la P_4 marcada. Los tubos son llevados, entonces, al contador gamma y se procede de igual manera a la descripta para la cT_4 .

El rango de valores de nuestro laboratorio con este RIE se extiende de 0,2 a 80 ng/ml, dependiendo, en el caso de las hembras, del momento de ciclo estral en que se encuentren (Concannon et al, 1989; Feldman y Nelson; 1996, Kubasic, 1984, Olson et al, 1984).

DISCUSIÓN SOBRE LAS DETERMINACIONES HORMONALES EN LA ENDOCRINOLOGÍA CLÍNICA CANINA

Lamentablemente en nuestro medio, no hay una aplicación rutinaria de los IE en la endocrinología clínica canina. Esto podría explicarse por la ausencia de laboratorios, suficientemente equipados, dispuestos a poner a punto estas técnicas para pequeños animales. Esta situación obliga a aquellos veterinarios desearios de arribar al diagnóstico definitivo de determinadas endocrinopatías a recurrir a laboratorios de medicina humana, los que no siempre proveen resultados aceptables debido a las diferencias moleculares y de rangos hormonales entre las distintas especies.

Las determinaciones hormonales, sin diferir en su costo de otros estudios complementarios, permiten al profesional identificar el origen primario de múltiples signos clínicos, los que sin su aplicación son insuficientemente tratados sintomáticamente. Por último, el hecho de contar con valores hormonales evita la realización de pruebas terapéuticas que suelen conducir a diagnósticos erróneos o bien provocar efectos indeseables.

BIBLIOGRAFÍA

1. Belshaw; Rijnberk, B.E.; Rijnberk, A. Radioimmunoassay of plasma T4 and T3 in the diagnosis of primary hypothyroidism in dogs. *J Am Animal Hosp Assoc* 1979; 15:17-23
2. Bianchi, R.A.; Marpes, S. Aspectos estadísticos de los ensayos diagnósticos in vitro. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 1982; 16,1:45-80
3. Concannon, P.W.; Lein, D.H. Hormonal and Clinical Correlates of Ovarian Cycles, Ovulation, Pseudopregnancy, and Pregnancy in dogs. En: Kirk, R.W. (ed). *Current Veterinary Therapy X*. W.B. Saunders, Philadelphia. (USA). 1989; p.1269-1282
4. De Coster, R; Beckers, J.F. Beerens, D. A homologous radioimmunoassay for canine prolactin: Plasma levels during the reproductive cycle. *Acta Endocrinol* 1983; 109:473-8
5. Eduards, R. Radioimmunoassay. En: Hutton, J.C.; Siddle, K. (eds.): *Peptide hormone Secretion*. Oxford University Press. Oxford. (England) 1990; p. 71-95
6. Feldman, E.C.; Nelson, R.W. *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction* 2nd. ed. W.B. Saunders, Philadelphia (USA) 1996
7. Gaschen, F; Thomposon, J; Beale, K. Recognition of triiodothyronine-containing epitopes in canine thyroglobulin by circulating thyroglobulin autoantibodies. *Am J Vet Res* 1993;54,2:244-7
8. Graf, K. J.; Friedeich, E; Mattes, S; Hasan, S.H. Homologous Radioimmunoassay for canine prolactin and its application in various physiological states. *J Endocr* 1977;75:93-103.
9. Graf, K.J. Serum oestrogens, progesterone, prolactin concentrations in cyclic, pregnant and lactating beagle dogs. *J Reprod Fert* 1978; 52:9-14
10. Hage, D.S. Immunoassays. *Analytical Chemistry*. 1993; 65,12:420-4
11. Hoppen, H.O.; Grumau, B.; Hayer, M. Prolactin in canine reproduction: normal values under various conditions. *Proceedings. Advances in Veterinary Endocrinology*. Berlin. 18.9. 1993
12. Iovine, E; Selva, A.A. *El Laboratorio en la Clínica*. 3ra ed. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires 1985
13. Kaufman, J. Olson, Pn.; Reimers, T.j.; Allen T.A. Serum concentrations of T4, T3, TSH and PRL in dogs before and after TRH administration. *J Vet Res* 1985; 46,2:486-92
14. Knight, P.J.; Gronow, M; Hamilton, J.M. Purification of canine prolactin by preparative isotachoresis. *J Endocrinol* 1976; 69:127-32
15. Knight, P.J.; Hamilton, J.M.; Scanes, C.G. Homologous radioimmunoassay for canine prolactin. *Acta Endocrinol* 1977; 85:736-43
16. Knight, P.J.; Hamilton, J.M. Serum prolactin during pregnancy and lactation in the beagle bitch. *Vet Rec* 1977; 101:202-3
17. Kubasic, N.P. Evaluation of a direct solid phase radioimmunoassay of progesterone. *Clin Chem* 1984; 30:284-6
18. Libertun, C. *Radioinmunoanálisis*. Libreros ed. Buenos Aires 1980
19. Nieto, A. Carbonetto, C.H. *Enzimoinmunoensayo*. En: Margni, R.A. *Inmunología e inmunoquímica* 4ta ed. Panamericana. Buenos Aires. 1989 p 571-86
20. Olson, P.N.; Bowen, R.A.; Behrendt, M.D. Concentrations of progesterone and luteinizing hormone in the serum of diestrous bitches before and after hysterectomy. *Am J Vet Res* 1984; 45:149-53
21. Poskus, E. *Radioinmunoensayo*. En: Margni, R.A. *Inmunología e inmunoquímica* 4ta ed. Panamericana. Buenos Aires. 1989 p 587-614
22. Reimers, Y.J.; Lawler, D.f.; Sutarioa, P.M., Correa, M.T. Effects of age, sex and body size on serum concentration of thyroid and adrenocortical hormones in dogs. *Am J Vet Res* 1991; 51,3:1489-91
23. Reimers, T.J; Phemister, R.D; Niswender, G.D. Radioimmunological measurement of FSH and Prolactin in the dog. *Biol Reprod* 1978; 19:673-9
24. Tijssen, P. *Practice and Theory of Enzymoimmunoassays*. Burdon, R.H., Knippenberg, P.H. (Ed). Elsevier Science Publishers. Amsterdam 1985
25. Travis, J.C. *Fundamentals of RIA*. Scientific Newsletters Inc. California (USA) 1979
26. Yalow, R.S. *Radioimmunoassay of hormones*. En: Wilson, J.D.; Foster, D.W. (eds). *Williams Textbook of Endocrinology*. 8th ed. W.B. Saunders, Philadelphia. (USA) 1992 p 23-131

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE LÍQUIDO SINOVIAL. NUEVOS ASPECTOS RELACIONADOS A LOS PROTEOGLICANOS Y GLICOSAMINOGLICANOS

G. E. Lasta

Jefe de trabajos prácticos Cátedra de Semiología y Propedéutica
Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata

RESUMEN: El propósito de este trabajo es mostrar la bibliografía obtenida sobre los diferentes análisis del Líquido Sinovial, los tratamientos referidos a las distintas patologías articulares y las clasificaciones del fluido articular basadas en los aspectos físicos, químicos y bacteriológicos. Se describe los Glicosaminoglicanos y Enzimas debido a que tienen mucha importancia tanto en el aspecto normal como el patológico. Como conclusión se sugieren las recomendaciones sobre las futuras investigaciones y los lineamientos generales que se debería seguir cuando se analiza el LS.

PALABRAS CLAVE: Líquido Sinovial. Análisis. Clasificación. Enzimas. Glicosaminoglicanos.

BIBLIOGRAPHIC REVISION OF SYNOVIAL FLUID. NEW ASPECTS RELATED WITH PROTEOGLYCANS AND GLYCOSAMINOGLYCANS

ABSTRACT: The purpose of this work is to show the bibliography obtained about different analysis of Synovial Fluid, treatments referred to the different articular pathologies and the classification of the Synovial Fluid, based on the physic, chemist and bacteriological aspects. Glycosaminoglycans and enzymes are described because of the importance on both normal and pathological aspects. As a conclusion we suggest the recommendations about future investigations and general lines we should follow when the analysis of Synovial Fluid is done.

KEY WORDS: Synovial Fluid. Analysis. Classification. Enzymes. Glycosaminoglycans

INTRODUCCIÓN

El Líquido Sinovial (LS) o Fluido Articular es un dializado del plasma sanguíneo, modificado por las células del tipo B de la membrana sinovial, principalmente por la adición de ácido hialurónico y glucosamina, sintetizados por los sinoviocitos, que son células de revestimiento (Coppo et al., 1988; Feldman, 1984; Perman, 1980). El término "sinovia" (del griego: *syn*, junto y *ovum*, huevo) deriva del hecho de que el movimiento articular ocurre entre dos partes que se juntan en un medio que se asemeja a la clara del huevo. El que introdujo este término fue Paracelso en el siglo XVI (Jennings, 1989). Los primeros investigadores propusieron que el LS era producido por: a) glándulas de la membrana sinovial; b) por desintegración de la membrana sinovial y trasudación; c) por destrucción del cartílago articular debido al intenso uso; d) por secreción glandular y trasudación de los capilares sanguíneos y linfáticos (Perman, 1980). Se puede decir que no hay un conocimiento exacto de la forma de producción del LS, pero actualmente se acepta que se realiza mediante el procedimiento del filtrado plasmático. Presenta un color normalmente claro o pálido paja, y en ocasiones puede tener un suave color amarillento; es de consistencia viscosa, asemejándose a la clara del huevo y es inodoro (Lasta et al., 1995; Van Pelt y Conner, 1963); presenta un aspecto límpido y transparente (Klein e Iglesias, 1985; Perman, 1980). Su composición es muy similar al suero, con una particularidad muy especial: contiene gran cantidad de mucina. Esta es una glucoproteína ácida, constituyente de la porción polisacárida del ácido hialurónico. La mucina produce una excepcional elevación de la presión coloidosmótica y de los niveles de calcio iónico, debido a un alto poder de combinación con este ion. (Coles, 1968; Klein e Iglesias, 1985; Perman, 1980). Proporciona, además, una membrana elástica e hidrodinámica para la lubricación de la articulación e interviene en el intercambio de agua y metabolitos entre la red vascular y la cavidad articular (Feldman, 1984). Esta es una propiedad muy especial de la mucina.

Cuando el plasma difunde a través del tegumento articular (membrana), los elementos no electrólitos pasan con facilidad en los dos sentidos, en tanto que los electrólitos están presentes según la teoría del Equilibrio Donnan o Equilibrio de las Membranas (Feldman, 1984). El LS posee menor cantidad de proteínas que el plasma y además no contiene fibrinógeno, por lo tanto no coagula espontáneamente (Perman, 1980; Rosenberger, 1981). Es de naturaleza tixotrópica, la cual está dada por el ácido hialurónico (Wyn-Jones, 1992).

lurónico (Wyn-Jones, 1992).

Posee las siguientes funciones: proveer elementos nutricios; producir la depuración de los desechos celulares; realizar una amortiguación entre las caras articulares y lubricar las superficies articulares (Coffman 1980; Lumsden et al, 1996; Rejno, 1976). Algunos autores sostienen que la lubricación de la articulación es "Hidrodinámica" con una muy baja fricción debido a la película de líquido viscoso que separa las caras articulares (Coffman, 1980). Esta función específica del LS fue objeto de muchos estudios, discusiones y controversias que dieron origen a diversas teorías. Charnley, en 1959, dice que la Lubricación Hidrodinámica es imposible en las articulaciones de los animales debido a que se produce una oscilación muy lenta y además un detenimiento en cada movimiento de reversión. Dintefas, en 1963, mostró que el Ácido Hialurónico podría ser despolimerizado, pero sin perder la lubricación del cartílago. Mac Cutchen, en 1966, demostró que la propiedad lubricante del LS se basaba en que las moléculas eran grandes y sugirió que la reacción entre las grandes moléculas y la superficie articular era similar a la denominada Lubricación Límite. Este mismo autor, en 1978, dijo que la lubricación articular era una acción complementaria entre el "Lagrimeo Sinovial" y la "Lubricación Límite" (Perman, 1980). Estas funciones están relacionadas íntimamente a la membrana sinovial, la cual regula el volumen del LS y su composición macromolecular (Coffman, 1980; Perman, 1980). La Membrana Sinovial posee tres tipos de células, las cuales fueron descritas por diferentes autores (Barland 1962; Cutlip 1973; Rejno 1976). Las células del tipo "A" son las más numerosas y tienen muchas prolongaciones citoplasmáticas; poseen, también, aparato de Golgi y grandes mitocondrias. Se le atribuyen funciones fibroblásticas o macrofágicas. Las células del tipo "B" son alargadas u ovoides y contienen un retículo endoplásmico rugoso muy prominente. Se consideran células secretoras. El tercer tipo celular sería un intermedio entre la "A" y la "B", teniendo características estructurales de ambas células (Jennings, 1989).

Otra estructura que está en íntimo contacto con el LS es el cartílago que recubre las superficies articulares, el cual no posee inervación ni vasos linfáticos y además es avascular, (no posee vasos sanguíneos), por consiguiente, el LS cumple la función de nutrirlo (Perman, 1980); es la única estructura del cuerpo que tiene un tipo celular puro. Está constituido por tejido conectivo blando, poroso y muy especializado, compuesto por condrocitos, colágeno, proteoglicanos y agua. Los condrocitos son las únicas células que pueden crecer y funcionar

sin riego sanguíneo; estos son los responsables de la producción y el mantenimiento de la matriz del cartílago articular. Dado que son células muy diferenciadas, no es probable que sufran metaplasia o neoplasia. De forma teleológica pueden trabajar más que reproducirse, sin embargo pueden presentar cierta capacidad de formar clones de células hijas en respuesta al crecimiento, la remodelación y la lesión (Jennings, 1989). En un principio se creía que el cartílago articular era un tejido braditrófico, con una actividad metabólica muy baja. Actualmente se sabe que posee una notable e intensa complejidad metabólica.

Las propiedades biofísicas del cartílago articular parecen estar dadas por la acción conjunta entre el colágeno y los proteoglicanos; estos se unen entre sí y con la capacidad hidrófila que poseen producen que la matriz del cartílago articular se comporte como un gel (Wyn-Jones, 1992).

NUEVOS CONCEPTOS

Los Proteoglicanos (PG) y más específicamente los Glicosaminoglicanos (GAG) Sulfatados han tomado gran relevancia dado que son utilizados como medida de la actividad metabólica del cartílago articular y también como terapia en procesos en los que están comprometidas las estructuras del mismo. Debido a esto se hará una breve descripción de dichos elementos. Los proteoglicanos están constituidos, aproximadamente, por: a) polisacáridos : 95 % y b) proteínas: 5 % (Blanco, 1989; Saxne y Heinegard, 1992; Simunek y Muir, 1972). La unión de estos elementos se realiza por un enlace glicosídico entre la cadena polisacárida y el hidroxilo de un resto de serina o el N de un resto de asparagina de la proteína. Esta se denomina Proteína Central o «Core Protein». Más de 100 cadenas de GAG pueden unirse a una proteína. Muchos de estos PG pueden unirse por un extremo de la cadena polipeptídica a un tallo de ácido hialurónico. La asociación entre éste y la proteína del PG se hace mediante la Proteína de Enlace o Link Protein. Los enormes compuestos moleculares que resultan, cuyo peso molecular alcanza varios millones de Daltons, pueden observarse en el Microscopio Electrónico como un reticulado tridimensional (Gráfico N°1).

Dentro de los polisacáridos (se denominan también mucopolisacáridos) encontramos a los Glicosaminoglicanos, los cuales son polímeros lineales compuestos por unidades repetitivas de disacáridos. Estos son: A) Ácido Hialurónico (AH); B) Condroitínsulfato; C) Dermatínsulfato; D) Keratínsulfato; y E) Heparina; excepto ésta última, todos los demás se

hallan en el espacio extracelular (Stryer, 1985).

A) Ácido hialurónico: es el GAG de mayor peso molecular (100.000 a varios millones de daltons). Forma soluciones muy viscosas (geles) con propiedades lubricantes. Se lo encuentra en la sustancia intercelular del tejido conjuntivo, especialmente en el cartílago, humor vítreo y líquido sinovial. Este GAG se encuentra como hialuronato a consecuencia del pH fisiológico (Carroza et al., 1997). Hay que destacar que el AH que se encuentra en el LS está producido por los sinoviocitos (asociado a una proteína) y el que se halla en la matriz del cartílago articular está producido por los condrocitos.

B) Condroitínsulfato: en los mamíferos se hallan los tipos A, B y C, encontrándose en el cartílago articular los A y C y más específicamente el primero. Es muy similar al ácido hialurónico, con la diferencia que tiene N-acetil-D-galactosamina en lugar de N-acetil-D glucosamina. Tiene un peso molecular de 10.000 a 50.000 daltons; se encuentra especialmente en los huesos y el cartílago.

C) Dermatínsulfato: presenta el ácido L-idurónico en lugar del ácido glucurónico como lo tiene el condroitínsulfato. Este compuesto era llamado condroitínsulfato B. Se lo encuentra en el tejido conectivo y la piel.

D) Keratínsulfato: no posee ácido urónico, como los demás. Está formado por galactosa y glucosamina acetilada. Se lo encuentra principalmente en la córnea y en el cartílago.

E) Heparina: tiene un peso molecular que oscila entre 8.000 y 20.000 daltons. Tiene acción anticoagulante tanto *in vitro* como *in vivo*, razón por la cual se usa en medicina humana y veterinaria. Otra acción que tiene la heparina es la de acelerar el aclaramiento del plasma, favoreciendo la desaparición de los quilomicrones de la sangre circulante (Blanco, 1989).

Los Glicosaminoglicanos son sintetizados y polimerizados a partir de los ribosomas de los condrocitos. Otra teoría indicaría que serían sintetizados en el aparato de Golgi. Las proteínas son sintetizadas en los ribosomas y se unen a los GAG en el aparato de Golgi formando los proteoglicanos. Las cadenas de GAG tienen un área superficial que se carga en forma negativa y, en consecuencia, produce que los proteoglicanos se repelan entre sí y además produce la atracción de moléculas de agua polarizada provocando este fenómeno la propiedad de rigidez fisicoquímica y permeabilidad cartilaginosa. La matriz cartilaginosa no tendría fuerza tensil si solamente estuviera constituida por PG y agua. Por eso, para reunir las propiedades y características propias, estas grandes moléculas proteicas están encerradas en una red de fibras de colágeno dispuestas como arcos a través de las distintas capas del cartílago. La combinación

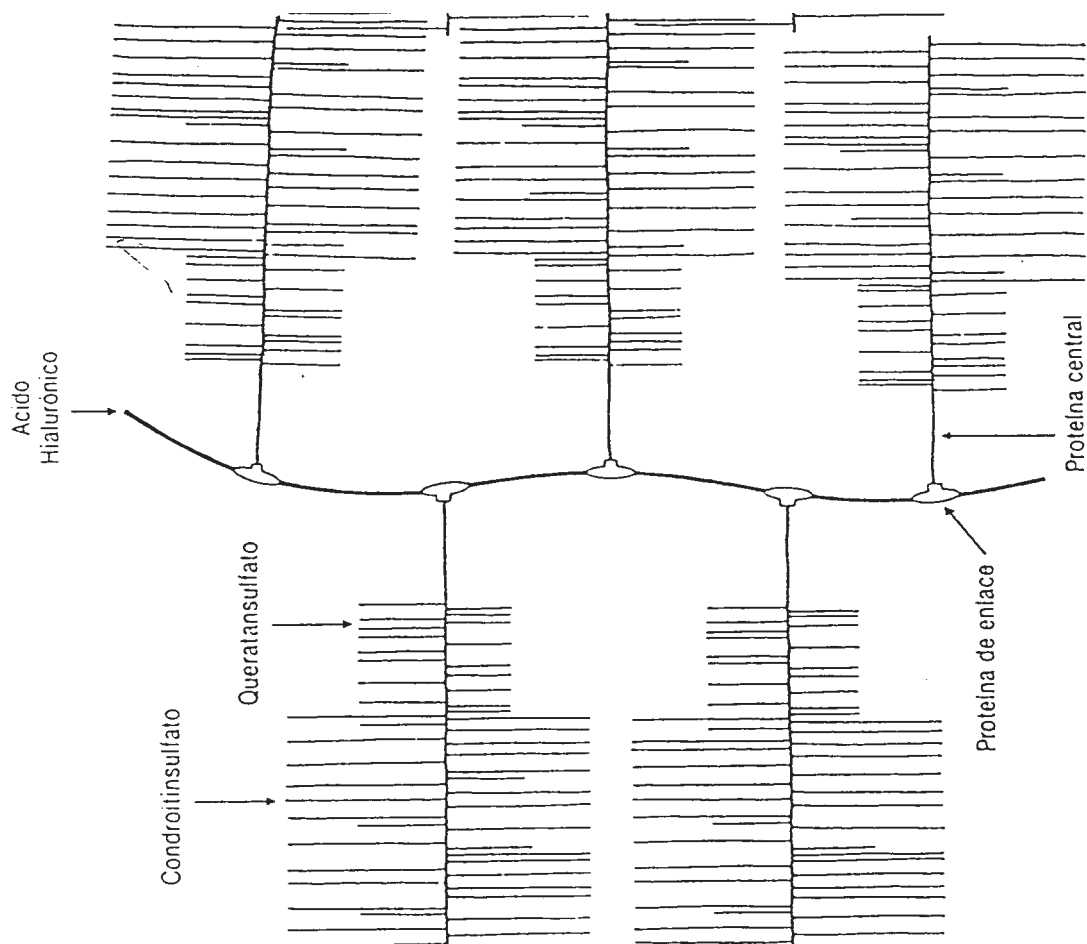


Gráfico N°1. Representación gráfica de la estructura de un proteoglicano

de las fibras de colágeno, las moléculas de PG y el agua, proporcionan al cartílago la capacidad para resistir a las fuerzas compresivas, su propiedad tensil y su elasticidad (Wyn-Jones, 1992). También el tamaño de los complejos de PG y el porcentaje de agua (hasta 80%) determinan la capacidad viscoelástica del cartílago articular. La disminución de los complejos y la pérdida de agua conduce a una disminución del retroceso elástico y a un aumento de la fragilidad (Jennings, 1989). Según algunos autores la hidrofilia de los PG es tan intensa que resiste a la total desecación en condiciones de extrema baja humedad.

En algunas patologías articulares, estos compuestos (proteoglicanos), están aumentados en el LS, como por ejemplo en la Osteoartritis Experimental Inducida en el perro (rodilla), en el carpo del caballo con Enfermedad Articular Crónica y en el hombre (rodilla) con Osteoartritis Traumática. Posiblemente esto se deba como resultado del incremento de la actividad catabólica y anabólica. Este proceso produce, también, el aumento de los Glicosaminoglicanos Sulfatados (Keratán Sulfato y Condroitín Sulfato), los cuales pueden ser medidos por

varios métodos (Carrol, 1987; Thonar et al., 1985).

Los Proteoglicanos de otros tejidos tienen estructura diferente, sugiriendo que esta clase de moléculas, extraordinariamente grandes, tienen distintas funciones, todavía desconocidas (Stryer, 1985).

Es muy importante destacar en este punto, la presencia en el LS de enzimas que degradan el colágeno y los glucosaminoglicanos, entre las que encontramos las hidrolasas como por ejemplo la beta-acetilglucosaminasa, beta-glucuronidasa, beta-galactosidasa, hialuronidasa, amilasa y una endoproteasa procedente de los leucocitos (Heinegard et al., 1985; Perman, 1980; Todhunter et al., 1995). Se pueden mencionar, también, las metaloproteasas, que son proteasas neutras, entre las cuales encontramos a la colagenasa, gelatinasa y estromelisin, segregadas por los condrocitos en forma inactiva y por varios y complicados mecanismos (producidos, también, por los condrocitos) son activadas y reguladas (Lohmander et al., 1993). Estas enzimas se producen en forma de "pool" o conjunto en la matriz del cartílago articular normal y sano, permaneciendo la mayoría como

complejos inactivos y una muy pequeña cantidad es activada. Las sustancias que producen la activación de estos complejos son el plasminógeno, la plasmina y la kaliceína entre otros. Lohmander et al (1993) expresan que la Colagenasa y el Estromelisin están significativamente elevados en el LS de la articulación de la rodilla del hombre que padece de Osteoartritis y que la concentración de la segunda enzima (estromelisin) es un parámetro para distinguir articulaciones con Osteoartritis de otras que no tengan degradación del cartílago. Otro autor, Coffman (1980), expresa que las enzimas, en general, aumentan en un estado inflamatorio de la articulación, pero es más significativo el aumento cuando la artritis es séptica. Coincidiendo con el autor anterior, Wyn-Jones (1992) expresa que las enzimas están normalmente en un nivel bajo en el LS y la membrana, pero cuando se instaura la artritis se produce un importante aumento de las mismas; en el cartílago, los propios condrocitos comienzan a segregar enzimas que producen la degradación de la matriz del cartílago. Debido a este fenómeno, parecería que el inicio de la degradación podría ser de origen endógeno. Cuando se produce una sinovitis, las células de la membrana sinovial, y específicamente las del tipo "A" comienzan a formar lisosomas y liberar enzimas exógenas hacia el LS. Estas, incluida la hialuronidasa, producen el aumento de la inflamación; cuando las proteasas han aumentado la permeabilidad de las capas superficiales del cartílago, también, es atacada la matriz. Los productos de la degradación enzimática promueven más inflamación y más producción de enzimas y el proceso se repite constantemente, autopropagándose cada vez con mayor intensidad. Otras enzimas que se pueden mencionar son las citoquinas, entre las que encontramos a la Interleuquina y el Factor Tumoral de Necrosis producidas por los condrocitos, sinoviocitos y células de la inflamación. Tienen efectos directos e indirectos sobre los propios condrocitos y la matriz cartilaginosa. Su vida media es corta y están relacionadas preferentemente con los procesos inflamatorios. Tienen participación importante en la estimulación de la síntesis de proteinasas a partir de los condrocitos. Otra citoquina que puede encontrarse en la articulación artrítica es el Interferón, el cual estimula la producción de Interleuquina. Los autores Rorvik y Grondahl, 1995, expresan que hasta el presente el rol de las Citoquinas en la Osteoartritis no está bien definida, por consiguiente, tener como parámetro la medida del nivel en el LS para emitir un diagnóstico y un pronóstico es incierto. Es importante aclarar que tanto las enzimas como sus activadores se hallan normalmente en el suero y en el LS, pero significativamente en menor cantidad en este último.

ANÁLISIS

El análisis del Fluido Articular integra uno de los Métodos Complementarios de Exploración utilizado, frecuentemente, para determinar la presencia de procesos inflamatorios y/o degenerativos, que se originan primariamente en la membrana sinovial o en el cartílago articular. En Medicina Humana es un método muy usado como elemento para el diagnóstico de artropatías (Klein e Iglesias, 1985; Rossi y Carbajal, 1977). Diversos investigadores, especialistas en el tema, destacan la importancia de este líquido, y sostienen que así como la orina refleja los procesos patológicos del riñón, el LS lo hace con las patologías que afectan las articulaciones. Otros autores lo consideran un método muy eficaz de diagnóstico, pero realizado conjuntamente con el Examen Clínico y con otros Métodos Complementarios de Exploración como por ejemplo las radiografías. (Coppo et al., 1988; Van Pelt y Riley, 1969). Desde el punto de vista del diagnóstico se pueden realizar los siguientes exámenes:

- 1) examen físico
- 2) examen químico
- 3) examen microbiológico
- 4) examen inmunológico
- 5) examen citológico
- 6) examen de elementos inorgánicos

1) Examen físico: se pueden determinar los siguientes parámetros:

- a) Turbidez y Color (Coffman, 1980; Feldman, 1984; Perman, 1980; Van Pelt y Conner, 1963).
- b) Índice de Refracción (Feldman, 1984).
- c) Densidad (Feldman, 1984).
- d) Viscosidad (Dukes y Swenson, 1977; Feldman, 1984; Lasta et al., 1995; Lumsden et al., 1996; Perman, 1980; Van Pelt y Conner, 1963).
- e) Volumen (Ekman et al., 1981; Geborek et al., 1988; Rorvik, 1995; Van Pelt y Conner, 1963).
- f) Presencia de Fibrina (Feldman, 1984; Lasta et al., 1995).
- g) pH (Perman, 1980).

2) Examen Químico: se realizan las siguientes determinaciones:

- a) Enzimas: LDH (Rejno, 1976; Van Pelt, 1969), GOT (Coppo et al., 1988; Perman, 1980), Fosfatasa Alcalina (Coles, 1968; Perman, 1980), Fosfatasa Ácida, Catapsina, Lisozima (Timoney, 1976), Proteasas (Lohmander et al., 1993), Lipasa, Lactoferrina, Citoquinas (Ray et al., 1996), Metaloproteasas, Aspartato Aminotrans-

ferasa (Wyn-Jones, 1992), etc.

b) Concentración de Proteínas Totales (Akins y Boening, 1995; Rossi y Carbajal, 1977).

c) Determinación de Glucosa y Mucopolisacáridos (Coles, 1968; Van Pelt y Conner, 1963).

d) Determinación del Coágulo de Mucina (Coffman, 1980; Lasta et al., 1995; Rossi y Carbajal, 1977; Van Pelt y Conner, 1963).

e) Determinación de Albúminas y Globulinas (Coffman, 1980; Perman, 1980).

f) Determinación de Proteoaminoglicanos y Glicosaminoglicanos. (Dahlberg et al., 1992; Farndale et al., 1986; Fuller et al., 1996; Lohmander et al., 1992; Platt y Bayliss, 1995; Ray et al., 1996; Rorvik y Grondahl, 1995; Todhunter et al., 1997).

g) Determinación de Urea (Perman, 1980; Rossi y Carbajal, 1977).

h) Determinación de Ácido Hialurónico (Hardigham y Muir, 1972; Rossi y Carbajal, 1977).

i) Ionograma (Carroza et al., 1997).

j) Prostaglandinas (Tamanini et al., 1981).

3) Examen Microbiológico o Bacteriológico:

Se realizan cultivos e identificación de gérmenes aeróbicos y anaeróbicos (Blood et al., 1988; Hopkins et al., 1973; Leitch, 1979; Mc Chesney et al., 1974; Stashak, 1987; Tarabuso et al., 1996; Vatistas et al., 1993; Woods y Ross, 1976); Mycoplasma (Barile et al., 1991; Bennet y Jasper, 1978; Rosendal et al., 1979; Wright-George et al., 1976); Brucelas (Bracewell y Corbel, 1980; Rosenberger, 1981) y también Virus (Ettinger, 1992).

4) Examen Inmunológico:

Se realiza la investigación de las Inmunoglobulinas (Perman, 1980), Complemento, Factor Reumatoideo (Feldman, 1984; Rossi y Carbajal, 1977).

5) Examen Citológico: se realiza el estudio de los elementos formes:

a) Conteo Total de Células: Eritrocitos y Leucocitos (Coffman, 1980; Feldman, 1984; Klein e Iglesias Elizondo, 1985; Palmer, 1968; Perman, 1980; Rossi y Carbajal, 1977;).

b) Conteo Diferencial: realización del Frotis Coloreado (Coppo et al., 1988; Feldman, 1984; Rosenberger, 1979; Van Pelt, 1969).

c) Investigación de Células Epiteliales (Perman, 1980).

6) Examen de Elementos Inorgánicos:

Se realizan investigaciones de cristales, como por ejemplo Urato monosódico, colesterol, corticoides, hidroxapatita, etc. Se examinan con contraste de fase o luz polarizada

(Perman, 1980; Rossi y Carbajal, 1977).

En determinados casos se puede realizar la obtención de sangre para la investigación de, por ejemplo, glucemia (Perman, 1980; Van Pelt y Conner, 1963) o la determinación de pruebas de aglutinación para Brucelosis o la cuantificación de proteoglicanos o gluicosaminoglicanos (Todhunter et al., 1997). Cuando la articulación presenta una artritis séptica, algunos autores recomiendan realizar, también, un hemograma para determinar la presencia de leucocitosis con neutrofilia (Rosenberger, 1981). Asimismo es muy aconsejable realizar una Artroscopía para determinar el estado de la articulación (Mc Lwraith y Fessler, 1978; Zamos et al., 1993); otro método complementario de exploración que se puede realizar, conjuntamente con el análisis del LS, es una radiografía (Ray et al., 1996; Rosenberger, 1981).

Los exámenes descritos anteriormente se realizan en animales, como por ejemplo los Bovinos, Ovinos, Felinos, Suinos, Conejos, Equinos y Caninos, siendo de utilidad diagnóstica, prácticamente, en estas dos últimas especies. También, como se mencionó anteriormente, se realizan en el hombre, prácticamente, las mismas determinaciones (Barile et al., 1991; Klein e Iglesias Elizondo, 1985; Poole et al., 1994; Rossi y Carbajal, 1977). Algunos investigadores opinan que el análisis del fluido articular, en el ser humano, es imprescindible para hacer el diagnóstico de artritis aguda por microcristales (gota y pseudogota) y de artritis bacteriana (Rossi y Carbajal, 1977).

La recolección del LS se puede hacer mediante una punción articular, denominada artrocentesis (Lasta et al., 1995; Perman, 1980). Previamente se debe realizar un Método de Sujeción o de Contención adecuado para cada especie. En ocasiones es necesario administrar un tranquilizante y/o la aplicación de anestésicos locales. Las articulaciones pueden ser: carpo, menudillo, húmero-radio-cubital, escapulo-humeral, tarso, babilla, (fémoro-tibio-rotuliana), coxo-femoral, etc. En el hombre se pueden elegir las mismas articulaciones. En los casos en que puede seleccionarse la articulación para la artrocentesis, es preferible que sean las de gran tamaño, como por ejemplo, rodilla, codo, hombro o coxo-femoral. Debe trabajarse con suma asepsia en la zona que será punzada, realizando una depilación de la misma y desinfectando con antisépticos apropiados. Se pueden utilizar jeringas de 5, 10, 15 o 20 ml y agujas 50/8, 50/12, 40/8, 40/12, 30/8, 30/10 o de mayor calibre según la necesidad operativa (Coles, 1968). En todos los casos deben ser descartables y de uso individual para cada articulación y animal. Es importante realizar la punción de la cavidad articular con sumo cuidado para

evitar la contaminación de la misma y además, tratando de no producir la ruptura de los vasos sanguíneos; en caso de producirse la contaminación del LS con sangre se debe desechar, debido a que puede dar datos erróneos de los distintos componentes, tanto celulares como químicos. Las muestras de LS pueden tomarse con o sin anticoagulante. Si la muestra se obtiene con anticoagulante, se puede utilizar el Ácido Etilen Diamino Tetra Acético de Sodio (EDTA disódico) (Palmer, 1968). Las determinaciones que se pueden hacer utilizando este producto son: enzimas como LDH, GOT y exámenes citológicos y si se le agrega Fluoruro de Sodio al EDTA se puede determinar la Glucosa. Usando este último producto en la sangre se determina, también, la glucemia. Motiva el uso de anticoagulantes para la determinación de GOT, LDH, Glucosa y elementos formes (citología) el hecho de que los líquidos patológicos pueden contener fibrinógeno y al coagularse impedirían la realización de estas pruebas. En ciertos casos (Inmunología y/o Microbiología) se puede utilizar la Heparina como anticoagulante (Perman, 1980). Las muestras sin EDTA son para el estudio de los caracteres físicos: aspecto, color, viscosidad, coágulo de fibrina, grado de polimerización de los mucopolisacáridos (coágulo de mucina y descenso de la gota), y para la investigación de proteínas y enzimas (Rossi y Carbajal, 1977).

A pesar de la disponibilidad de gran cantidad de pruebas, como las que se han desarrollado y que se utilizan para evaluar el LS y debido a los diferentes factores que pueden influir los parámetros enunciados, como por ejemplo la articulación de la que se tomó la muestra, métodos de obtención, actividad del animal, manejo y almacenamiento de las muestras, etc., es aconsejable no realizar una sola muestra, pues carece de valor, salvo que las alteraciones sean muy evidentes. Por eso, para controlar el curso de la enfermedad o si el tratamiento es efectivo, se deben practicar muestreos de tipo seriado y en ocasiones confrontarlos con los valores hallados en sangre (Wyn-Jones, 1992).

CLASIFICACIÓN

Con los resultados de los diferentes exámenes que se practicaron en el Líquido Sinovial, conjuntamente con otros Métodos Complementarios de Exploración (radiografías, biopsias) se puede emitir un Diagnóstico con respecto a la patología que afecta la cavidad articular y también al Líquido Sinovial; es importante, también, realizar el pronóstico. En base a los datos recogidos se pueden hacer clasificaciones de la mayoría de los Líquidos Sinoviales Anormales

teniendo en cuenta la apariencia macroscópica (color-turbidez-viscosidad), el coágulo de mucina y de fibrina, la citología, el cultivo bacteriológico, etc. Una primera clasificación, propuesta por Feldman (1984), queda de la siguiente manera:

- 1) No Inflamatorio.
- 2) Inflamatorio no Séptico.
- 3) Inflamatorio Séptico.

En el tipo 1, No Inflamatorio, que se puede encontrar en Artritis Traumáticas, Osteocondritis Disecante del Perro, Displasia de Cadera Canina y Osteoartritis Degenerativa, se presenta con las siguientes características:

Turbidez	Generalmente claro
Color:	Incoloro a rosado
Viscosidad:	Normal
Prueba de la Mucina:	Buena
Coágulo de Fibrina	Ausente
Conteo de Glóbulos Blancos:	Normal o Levemente Aumentado
Conteo Diferencial:	Normal o Leve Aumento de Mononucleares
Cultivo:	Negativo

El Tipo 2, Inflamatorio No Séptico, se puede asociar con la Poliartritis Lúpica, Artritis Reumatoidea y la Poliartritis no Séptica por cualquier otra causa. Las características del Líquido Sinovial son las que siguen:

Turbidez:	Frecuentemente Turbio
Color:	Amarillo o Rosado
Viscosidad:	Frecuentemente Disminuida
Prueba de la Mucina:	Buena o Pobre
Coágulo de Fibrina:	Ocasionalmente Presente
Conteo de Glóbulos Blancos:	Moderado a Marcado Aumento
Conteo Diferencial:	Neutrofilia
Cultivo:	Negativo

El Tipo 3, Inflamatorio Séptico, se lo puede encontrar en Artritis Sépticas o Bacterianas de cualquier tipo. Las características del Fluido Sinovial son las siguientes:

Turbidez:	Marcadamente Turbio.
Color:	Gris, Blanco, Rosa o Amarillo
Viscosidad:	Muy Disminuida
Prueba de la Mucina:	Pobre o Muy Pobre
Coágulo de Fibrina:	Frecuentemente Presente
Conteo de Glóbulos Blancos:	Marcadamente Aumentado
Conteo Diferencial:	Respuesta Neutrofilica (80%)
Cultivo:	Positivo

Otra clasificación que se puede realizar del LS es la que propuso Perman (1980) y es la siguiente:

Tipo I: Normal.(Tabla 3)

Tipo II : Inflamatorio No Purulento:

A) : Enfermedad Articular Degenerativa

B) : Enfermedad Articular Traumática

C) : Enfermedad Articular Neoplásica

Tipo III : Inflamatorio Purulento:

A) : No Infeccioso:

1: Inmunológico

2: Idiopático

3: Inducido por Cristales

4: Hemartrosis Crónica

5: Neoplásico

B) : Infeccioso:

1: Bacterias

2: Mycoplasmas

3: Virus

4: Hongos

5: Protozoarios

TIPO I: Líquido Sinovial Normal. En la tabla 3 se detallan los parámetros y características normales de los distintos componentes del mismo.

TIPO II

A) Enfermedad Articular Degenerativa: Es una entidad crónica caracterizada por degeneración del cartílago articular, asociado con cambios secundarios en la membrana articular y el hueso. En este tipo de patología se puede agrupar a la Osteocondrosis Disecante, Espondilitis Anquilosante del Perro, Artritis Traumática del Equino, Mucopolisacaridosis e Hidrartrosis del Tarso.

B) Enfermedad Articular Traumática: En su forma aguda, se encuentra en el Líquido Sinovial restos de sangre proveniente del daño de las estructuras vasculares. Debido a esto, el fluido articular tiende a coagularse por la pre-

sencia de fibrina. En caso de ser crónica, la coloración del líquido sinovial toma distintas tonalidades debido a la degradación de las estructuras de la hemoglobina; en este caso se ve rojizo, ámbar suave o levemente pálido. El volumen puede estar aumentado y el número de leucocitos, generalmente, es normal.

C) Enfermedad Articular Neoplásica: Puede ocurrir como Entidad Primaria o Metástasis Secundaria. Dentro de las Neoplasias Primarias encontramos el Sinovioma y el Sarcoma de los Componentes de las Estructuras Articulares. La hemorragia es característica del tejido neoplásico en crecimiento dentro de la cavidad articular; el líquido sinovial se asemeja al que se observa en la Enfermedad Articular Traumática.

TIPO III

A) Líquido Sinovial Purulento No-Infeccioso : la característica distintiva de la Artritis Purulenta es el aumento de los neutrófilos (neutrofilia). Se observa, también, que la cantidad de leucocitos es mayor a 5000 células por milímetro cúbico (leucocitosis). Varias enfermedades infecciosas de la cavidad articular pueden progresar a la etapa Inmunológica sin haber una base de Artritis Inmuno-mediada. Las infecciones por Mycoplasma han sido propuestas como modelo de Artritis Reumatoidea del hombre. En el perro la inflamación articular ocurre frecuentemente como infección bacteriana crónica.

El LS en la Poliartritis Inmuno-mediada es brumoso a turbio con incremento celular (leucocitosis) especialmente los neutrófilos; a veces se observa material floculento. La viscosidad está normal o disminuida; el coágulo de mucina puede ser bueno o pobre. No está bien claro la causa que produce la disminución de la calidad del coágulo de mucina en la Artritis Inmuno-mediada. El nivel de glucosa, proteínas y enzimas están alterados en relación a la calidad y cantidad de exudado inflamatorio. La poliartritis inducida por Cristales no es bien conocida en los animales.

Tabla N° 1. Clasificación del líquido sinovial anormal en el hombre. Rossi y Carbajal (1977).

	Normal	No Inflamatorio	Inflamatorio	Séptico	Hemorrágico
Volumen	< 3,5	> 3,5	> 3,5	> 3,5	> 3,5
Aspecto	Claro Incoloro	Claro Pajizo	Amarillo Turbio	Amarillo Turbio	Xantocrómico
Viscosidad	Buena	Buena	Baja	Baja	Variable
Coágulo de Fibrina	Ausente	Generalmente Ausente	Presente	Presente	Gen. Ausente
Coágulo de Mucina	Buena	Buena	Regular-malo	Malo	Variable
Cél. Blancas	0-200	200-500	2.000-100.000	20.000-200.000	200-10.000
% Neutrófilos	< 25	<25	> 50	> 75	< 50
Diferencial de Glucosa	< 10 mg	< 10 mg	> 25 mg	> 25 mg	< 25 mg
Cultivo	Negativo	Negativo	Negativo	Generalmente Positivo	Negativo

Tabla N°2. Valores normales de líquido sinovial en el hombre

Componentes	Promedio	Rango
Volumen en rodilla	1,1 ml	0,13- 3,5
Viscosidad a 25 °C	235,0	5,7- 1160,0
Globulina	0,05 g/100m	
Proteínas Totales	3 grs%	2,5-3,5 grs%
pH	7,4	7,2-7,4
Peso Específico	1,04	
Recuento de Blancos	150/ mm	30-750
Recuento Diferencial		
Granulocitos Neutrófilos	6,5 %	0-25
Linfocitos	24,6 %	0-78
Monocitos	47,9 %	0-71
Clasmatocitos	10,1 %	0-26
Cél. de Revestimiento	4,3 %	0-12
Sólidos Totales	3,41 g/100ml	2,4 - 4,83
Nitrógeno Total	0,88 g/100ml	0,71-1,16
Nitrógeno no Proteico	32,0 mg/100ml	22,0 - 43,0
Albúmina y Globulina	1,72 g/100ml	1,07-2,13
Mucina Nitrógeno	0,004 mg/ml	0,068-0,135
Mucina Glucosamina	0,074 g/100ml	0,012-0,132
Azúcar (Glucosa)	95,0 mg/100	68,0-132,0
Ácido Úrico	3,6 mg/100ml	3,3- 4,7
Ácido Láctico	21,0 mg/100ml	13,0-28,0
Cenizas	0,88 %	0,79-1,10
Cloruro de Sodio	554,0 mg/100ml	409,0-663,0
Calcio	9,7 mg/100ml	8,3-10,7
CO ₂ Total	57,0 vol. %	43,1-68,1
Ácido Hialurónico	300mg% (79)	
Albúmina	1,02 g/100ml	

B) Líquido Sinovial Purulento Infeccioso: en este caso pueden encontrarse bacterias, mycoplasmas, hongos o virus, los cuales pueden propagarse por sangre hasta la cavidad articular. La propagación puede hacerse durante la etapa aguda asociada con septicemia y provenir de una Onfaloflebitis, Endocarditis, etc. El proceso infeccioso puede abarcar varias articulaciones (poliartritis). La naturaleza del microorganismo actuante determina el tipo de exudado presente en la articulación. Hay una marcada leucocitosis que va desde 15.000 hasta 180.000 por milímetro cúbico y se observa un aumento del volumen con disminución de la viscosidad. Los microorganismos que se encuentran presentes en la efusión sinovial pueden ser: *Actinobacillus equuli*, *Escherichia coli*, *Mycoplasma* sp., *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus* hemolítico, *Corynebacterium pyogenes* (asociado, a veces, con *Escherichia coli*), *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Streptococcus equisimilis*, etc. La poliartritis inducida por *Mycoplasma* se produce en la mayoría de los animales. Para realizar un buen diagnóstico se deben efectuar cultivos bacterianos para poder identificar el microorganismo actuante.

La siguiente clasificación fue hecha por Coppo et al., (1988) en un trabajo realizado sobre 77 Equinos y quedó conformada de la siguiente manera:

A) LS Normal (Tabla N°3).

B) Tipo I, II, III. Se tuvo en cuenta las similitudes de los datos Semiológicos-radiográficos y los cambios encontrados en el LS.

Tipo I: El LS proviene de artritis traumáticas agudas, serosas y hemorrágicas. Hay un aumento de volumen y se aprecia un color amarillo o anaranjado-rojizo; el aspecto es turbio y se registra disminución de la viscosidad y del descenso de la gota (prueba para estimar los mucopolisacáridos). Se observa aumento de las proteínas, globulinas y de las enzimas.

Tipo II: El fluido articular se obtuvo de Artritis Séptica aguda o crónica y de origen endógeno o exógeno. El LS tenía un color anaranjado y de aspecto turbio; hay disminución de la glucosa, viscosidad, mucina y descenso de la gota. Se observó presencia de fibrina y al igual que el tipo anterior, hubo un aumento de las proteínas totales, de las globulinas y de las enzimas (estos dos últimos muy marcados).

Tipo III: Las patologías de donde se extrajo el LS fueron procesos degenerativos crónicos: artrosis, osteoartritis, hidrartrosis, osteocondrosis, etc. El color se presentó desde amarillo hasta anaranjado y a veces hubo flóculos. Las proteínas totales aumentaron discretamente al igual que la fosfatasa alcalina y LDH. La viscosidad y la mucina se mantuvieron estables.

En el hombre se hizo una clasificación del LS Anormal basada en un trabajo realizado por Rossi y Carbajal (1977) Tabla N°1.

Con los datos recogidos de los distintos autores (Klein e Iglesias Elizondo, 1985; Levinson y Mac Fate, 1972 y Rossi y Carbajal, 1977) se agruparon valores normales del Líquido Sinovial en el Hombre, los cuales se representan en la Tabla N°2.

TRATAMIENTOS

En base a los estudios que se han realizado y a los resultados obtenidos de los mismos se puede instaurar un tratamiento (Mateo Soria et al., 1992; Reid Hanson, 1996; Zamos et al., 1993). Este, durante los últimos años, y aplicado erróneamente como una terapia adecuada, consistió en la aplicación de gran cantidad de sustancias que generalmente eran peligrosas y cuyos destinatarios fueron los equinos de deporte y los caninos. En la mayoría de los casos no se realizaban las pruebas y no se practicaban los métodos de exploración para hacer un diagnóstico previo. La aplicación de estas sustancias dio como resultado la aparición de trastornos, como la degeneración del cartílago hasta la osteocondritis disecante. Los

Tabla N°3. Valores normales y principales características del líquido sinovial en las diferentes especies.

	PERRO	CABALLO	VACA	CERDO
VOLUMEN	0,01-1 ml	3,3-15,8 ml	4 - 30 ml	4 (1,3 - 9,2) ml
COLOR	Incoloro Amarillento Levemente Traspas- rente	Incoloro Amarillento Levemente Traspas- rente	Incoloro Amarillento Levemente Traspas- rente	Incoloro Levemente Traspas- rente
VISCOSIDAD		Relativa: 4,4 - 21,6 5 a 7 cm 7,2-15,2 Centipoise	5 a 8 cm	Relativa 3,72 (2,84 - 4,15)
MUCINA	Bueno (Coágulo) 0,3 - 0,5 g/dl	Bueno (Coágulo)	140 - 600 mg/dl Bueno (Coágulo) 0,3 - 0,5 g/dl	Bueno (Coágulo)
FIBRINA	No contiene	No contiene	No contiene	No contiene
GLÓBULOS BLANCOS (mm ³)	500	500	450	220
PROTEÍNAS TOTALES	1,8 - 4,8 g/dl	< 2 g/dl	0,9 g/dl (76) 5,4 mEq/l (11)	3,9 g/dl
DENSIDAD	1,010 - 1,015	1,010 - 1,015	1,008 - 1,015	1,010 - 1,018
PH	7 - 7,8		7,3 - 7,4	7 - 7,2
CONSISTENCIA	Gelatinoso Viscoso	Gelatinoso Viscoso	Gelatinoso Viscoso	Gelatinoso Viscoso
GLÓBULOS ROJOS (mm ³)	0 - 320	500-1	196 (0 - 1540)	
FOSFATASA ALCALINA		0,53 - 0,93 U. Sigma/ml		
FOSFATASA ÁCIDA		0,09 (0 - 0,27) U. Sigma/ml		0,41 0,0,7 U. Sigma/ml
LDH	88 (50-109) U/L	44 (0-94) U. LDH/ml	10-25 U/L	515 0,38 U. LDH/ml
CALCIO			3,2 mEq/l	
MAGNESIO			3,3 mEq/l	
FOSFATOS			4 mEq/l	
CLORUROS			105 mEq/l	
BICARBONATO			27 mEq/l	
SODIO			130 mEq/l	
PUNTO DE CONGELACIÓN			-0,509-0,556 °C	
ALDOLASA		9 - 12 U. Sibley Lehringer/ml		
GOT		8 - 60 U. Sigma Fran- kel/ml	4 - 18 U/L	
GPT		0 - 23 U. Sigma Fran- kel/ml		
CONTEO DIFERENCIAL				
Linfocitos	44 - 48 %	33 - 57%	45 - 50 %	
Neutrófilos	3 - 5 %	0 - 8 %	6 - 10 %	
Monocitos	40 - 55 %	31 - 55 %	38 - 40 %	
Plasmocitos	5 - 6 %	3 - 5 %	5 - 7 %	
Eosinófilos	1 %	1 %	1 %	
RELACIÓN			1,21±0,02	
ALBÚMINA-GLOBULINA				
GLUCOSA		0,70 - 0,75 g/l	0,72 - 0,85 g/l	
RELACIÓN GLUCEMIA GLU- COSA			1,3 - 1	
GLUCEMIA		0,85 - 0,95 g/l	0,78 - 0,85 g/l	
RELACIÓN GLUCEMIA GLU- COSA			1,3 - 1	
GLUCEMIA		0,85 - 0,95 g/l	0,78 - 0,85 g/l	
ÁCIDO HIALURÓNICO		136±77 mg/dl	200±57 mg/dl	
DESCENSO DE LA GOTA		13,9 ± 4,9 cm	20 - 30 cm	
ÁCIDO ÚRICO		10,1 ± 3,8 mg/dl		

Tomado de: Carroza et al., 1997; Coffman, 1980; Coppo et al., 1988; Feldman, 1984; Lasta et al., 1995; Palmer, 1968; Perman, 1980; Rejno, 1976; Rosenberger, 1981; Rossi et al., 1977; Stryer, 1985; Van Pelt et al., 1963; Wyn-Jones, 1992.

diversos tratamientos que se pueden instaurar en las artropatías necesitan un diagnóstico previo muy exacto, por consiguiente el análisis del LS adquiere una gran importancia. Si a esto se le agrega la inocuidad de la artrocentesis y que a veces se debe drenar LS o inyectar líquidos para realizar un lavado, sería suficiente motivo la implementación de exámenes del fluido articular conjuntamente con los Métodos Generales de Exploración (Maniobras Semiológicas) y otros Métodos Complementarios de Exploración como por ejemplo las radiografías (Rosenberger, 1981), artroscopías (Coppo et al., 1988) y ecografías.

La mayoría de los colegas coinciden en que el reposo es una forma invalorable de tratamiento, pues al interrumpir las agresiones a la articulación, produce que se realicen los procesos reparativos naturales. También es opinión generalizada, que el excesivo reposo es contraproducente, pues puede derivar en una mala nutrición del cartílago y en una laxitud de la cápsula y de los ligamentos (Wyn-Jones, 1992).

Los tratamientos actuales con medicamentos pueden consistir en la aplicación de estos en forma intraarticular, por vía intramuscular o por boca. Los primeros tratamientos se realizaron mediante la infiltración de Corticoides (Dexametasona, Triamcinolona, etc.) los cuales tienen mala reputación, debido al uso abusivo que se hizo de ellos; no se tenía en cuenta los efectos secundarios y adversos que se presentan cuando no se tienen las precauciones necesarias. Se aplican en forma intraarticular para el tratamiento precoz de las injurias articulares, reduciendo los signos inflamatorios. Producen una serie de cambios a nivel celular y enzimático los cuales se evidencian en el LS, disminuyendo su volumen y aumentando su viscosidad. También mejora la concentración y polimerización del ácido hialurónico. Sin embargo, estos efectos son de corta duración; en caso de tratamientos prolongados, se manifiestan los signos adversos que derivan en una sustancial depresión en la formación de proteoglicanos y proteínas. En resumen, están indicados en los tratamientos precoces sin daño en la superficie articular y seguido de un período de reposo de 3 o 4 semanas (Toutain et al., 1985; Van Pelt y Riley, 1969; Wyn-Jones, 1992).

Otras drogas utilizadas son las DANES, Drogas Antiinflamatorias No Esteroides, las cuales producen un efecto antiinflamatorio, reduciendo la síntesis de prostaglandinas. Estas últimas producen los signos de la inflamación por aumento de la sensibilidad de los receptores nerviosos e inhibición de la enzima cicloxigenasa, de la kinina y la SALL (Sustancia de la Anafilaxia de Liberación Lenta). Como efecto no deseado, que pueden presentar estas

drogas, se puede mencionar que podrían interferir la producción de glicosaminoglicanos. Es por esto que algunos clínicos utilizan un tratamiento combinado con GAG (Reid Hanson, 1996) (Ver párrafo más adelante). En los equinos se utiliza la fenilbutazona (FBZ). Según el autor de este párrafo (Wyn-Jones), ésta es una droga que usada en caballos adultos y a dosis estándar, prácticamente carece de efectos secundarios y produce una muy buena analgesia. En los potrillos podrían aparecer efectos no deseados. Se puede concluir que la FBZ es una droga útil con ciertas limitaciones.

Otro tratamiento puede ser la aplicación de antibióticos cuando se presenta una artritis de carácter séptica. En este caso los medicamentos a utilizar son variados, como por ejemplo la Penicilina, Cloramfenicol, Neomicina, Ampicilina, Tetraciclina, Oxitetraciclina, Gentamicina, Cefalosporina y Sulfas, a veces asociada con el Trimetoprima. En este tipo de patología articular todos los autores coinciden en que se debería realizar un antibiograma, previo a cualquier medicación (Burrows, 1968; Van Pelt, 1971; Verschooten et al., 1974).

Hace algunos años se empezó a utilizar sustancias que son parte constitutiva del cartílago articular como son los proteoglicanos y más específicamente los glicosaminoglicanos polisulfatados (GAG). Estas drogas son similares a las producidas en forma natural, por consiguiente pueden unirse con la matriz cartilaginosa en los lugares en que ha habido destrucción de la misma. Su mecanismo de acción es, en principio, inhibir las enzimas lisosomales catabólicas, disminuyendo el proceso degenerativo y bloquear los mediadores de la inflamación, reduciendo el dolor y la tumefacción. Otras acciones que tienen es la de estimular la producción de ácido hialurónico, mejorando, de esta manera, la lubricación articular; aumentar el metabolismo de los condrocitos y mejorar la resistencia y elasticidad del cartílago. Cuando el proceso es activo, estas drogas están contraindicadas, debiendo aplicar primero una medicación antiinflamatoria (Wyn-Jones, 1992). Otro autor (Reid Hanson, 1996) recomienda utilizar un antiinflamatorio no esteroide primero y después combinar dos GAG como son la Glucosamina y el Condroitín Sulfato para potenciar sus acciones.

Como se hizo mención anteriormente, en Medicina Veterinaria las especies que son tratadas y que realmente importan son el equino y el canino. Algunas experiencias personales de colegas son vertidas en esta revisión bibliográfica. En caninos y felinos los GAG se han utilizado en la falta de desarrollo del cartílago, por ejemplo en las orejas cuando se caen después de la cirugía, en casos de Artrosis de Columna,

Displasia de Cadera (articulación coxo-femoral) y en ocasiones se pueden utilizar como tratamiento conjunto para una fractura. El resultado en todos los casos fue aceptable; se usó un producto, el cual tiene como base la droga D Glucosamina. Como experiencia personal con perros con Displasia de Cadera, en la poca casuística tratada, se pudo comprobar que hubo un mejoramiento, tanto en la parte locomotriz como en la articular.

Con respecto a los equinos (la mayoría está referido a SPC), algunos de los tratamientos que se utilizan pueden ser los siguientes: Glicosaminoglicanos Sulfatados al 12 %; hay productos que pueden aplicarse en forma intramuscular y/o intraarticular. En ciertos casos la terapia que se pone en práctica es combinando ambas vías de administración. Estas pueden utilizarse en casos de patologías no infecciosas, tendinosas, como coadyuvante en fracturas, en postoperatorios de cirugías osteoarticulares, condroprotectores, etc. De acuerdo a los colegas consultados, la aplicación de estos productos dependerá, habiendo hecho una placa previamente, del resultado de la misma; el animal puede presentar una radiografía normal y tener dolor a la palpación (sinovitis), y/o claudicación, o la placa demostrar una anomalía como por ejemplo una fisura o fractura de las partes óseas. De acuerdo a la patología que está presente se instaurará la terapia adecuada. En todos los casos el animal debe reducir su entrenamiento.

Otra vía de aplicación de estas drogas es la oral. En determinados casos terapéuticos se pueden combinar la vía oral con la intramuscular.

Otra terapia es la utilización del Ácido Hialurónico (AH) o su sal el Hialuronato de Sodio, el cual se puede administrar en forma intraarticular; aunque debe aclararse que no se sabe exactamente como actúa. Los clínicos recomiendan el uso de AH de bajo peso molecular, el cual no produce inflamación por aplicación, no así el de alto peso molecular. El grado de polimerización de este ácido le da la característica viscosidad al LS. Con respecto al efecto lubricante, se sabe por trabajos experimentales, que dicha propiedad la aporta la fracción proteica que tienen los grandes complejos de proteoglicanos. Una teoría indicaría que el AH podría producir la lubricación de las partes blandas de la articulación. La aplicación de esta droga mejora los movimientos articulares por reducción del dolor. Esto es, como efecto inmediato. A largo plazo produce una unión de los proteoglicanos de la superficie del cartílago, restituyéndola en parte. Produce, también, la inactivación de los proteoglicanos que se han derramado en la articulación y una estimulación

de la producción de ácido hialurónico por parte de los sinoviocitos. Su aplicación está indicada, entre otras, en las sinovitis no infecciosas, tendinitis, bursitis, etc.

Otra forma terapéutica, es el lavaje de la articulación conjuntamente con un drenaje previo de la misma. Se realiza para eliminar restos de cartílago, sangre, detritus y las enzimas sinoviales. Debe practicarse con dos agujas, una de cada lado de la articulación. Es muy importante trabajar, en estos casos, con suma asepsia. El procedimiento se puede hacer con solución fisiológica adicionada con un antibiótico (rifamicina) o una solución polielectrolítica bufferada de pH similar al LS, como por ejemplo Ringer Lactato o Dimetilsulfóxido (DMSO). También se puede utilizar una solución antiséptica iodada, si no hay daño articular grave. La cantidad a usar dependerá de la articulación y del proceso articular, pero en general es entre 2 a 3 litros. Está indicado especialmente en las artritis sépticas. Para verificar los resultados deberán hacerse análisis seriados del LS (Stashak, 1987; Wyn-Jones, 1992).

Es opinión de la mayoría de los especialistas en Equinos de Deporte que estos tratamientos, en general, son paliativos, pues para ser curativos se debería dar, al animal, el reposo correspondiente; pero, también, hacen la aclaración con respecto a los tratamientos alternativos que se pueden poner en práctica. Por ejemplo si a un SPC se le realiza una intervención quirúrgica, que puede costar aproximadamente 1.500 dólares y estar inactivo durante 6 meses, abonando una pensión de 800 dólares mensuales, el propietario o cuidador podrá hacer un análisis sobre la situación que se presenta y decidir al respecto. Esto es, realizar la cirugía o el tratamiento. En la mayoría de los casos se deciden por este último.

RECOMENDACIONES

Se ha tratado de mostrar las diferentes Técnicas y Métodos Complementarios de Exploración para el análisis del Líquido Sinovial y las estructuras que están en contacto directo, como son el cartílago articular y la membrana sinovial. Se han vertido definiciones, clasificaciones y tratamientos, que no pretenden ser únicos valores, debido a que se pueden consultar otros autores, diferentes a los propuestos para esta revisión bibliográfica.

Las recomendaciones pueden estribar en profundizar las investigaciones sobre las enzimas, los proteoglicanos y los glicosaminoglicanos y todos los compuestos intermedios que se producen en los procesos inflamatorios, infecciosos y/o degenerativos de una articulación y que aparecen en el LS. Pueden ser, en princi-

pio, los elementos que contribuyan a dilucidar los problemas que se presentan en las artritis, artrosis, etc. No se deben dejar de lado los análisis corrientes del LS, los cuales pueden realizarse en forma sencilla y rutinaria. Es opinión del autor, que se debe resaltar la importancia que tiene realizar primero una muy buena revisión semiológica del animal y especialmente de la articulación, poniendo en práctica los Métodos Generales de Exploración, como son la Inspección directa, la Inspección Indirecta (Artroscopía) y también otros Métodos Complementarios de Exploración, tales como las radiografías, biopsias y últimamente un método que se ha puesto en práctica que es la ultrasonografía (Ecografías).

BIBLIOGRAFÍA

1. Akens, M. K.; Boening, K. J. Synovial Fluid Analysis in the Fetlock Joint and the Talocrural Joint before and after Arthroscopy. *Pferdeheilkunde* 1995; 11:191-7
2. Barile, M. F.; Yoshida, H.; Roth, H. Rheumatoid Arthritis: New Findings on the Failure to Isolate or Detect Mycoplasmas by Multiple Cultivation or Serologic Procedures and a Review of the Literature. *The Reviews of Infectious Diseases* 1991; 13:571-82
3. Bennett, R. H.; Jasper, D. E. *Mycoplasma Alkalescens*-Induced Arthritis in Dairy Calves. *JAVMA* 1978; 172:484-8
4. Blanco, A. Química Biológica. El Ateneo. Buenos Aires 1989 p 85-89
5. Blood, D. C.; Radostits, O. M.; Henderson, J. A.; Arundel, J.H.; Gay, C.C. Medicina Veterinaria. Sexta Edición. Interamericana. México DF.(México) 1988 p 458-562
6. Bracewell, C. D.; Corbel, M.J. An Association between Arthritis and Persistent Serological Reactions to *Brucella abortus* in Cattle from Apparently Brucellosis-Free Herds. *Veterinary Record* 1979; 106:99-101
7. Burrows, G. E. *Corynebacterium equi* Infection in two Foals. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1968; 152:119-24
8. Carrol, G. J. Spectrophotometric Measurement of Proteoglycans in Osteoarthritic Synovial Fluid. *Annals of Rheumatic Diseases*. 1987; 46:375-9
9. Carrozza, J.S.W.; Noia, M.A.; Frigoli, A.E.; Miguel, M.; Gonzalez, G.; Anconitani, M.; Cura, S. Constantes Bio-fisicoquímicas del Líquido Sinovial de Bovinos. Parte I: Ionograma y Proteínas Totales. Envío para su publicación. 1997
10. Coffman, J. Synovial Fluid. *Equine Practice. Clinical Chemistry and Pathophysiology of Horses* 1980; 75:1403-6
11. Coles, E. H. Patología y Diagnóstico Veterinarios. Primera Edición. Editorial Interamericana. México DF (México) 1968 p 213-7
12. Coppo, J. A.; Sandoval, G. L.; Perez, O. A. de ; Scorza, S.H.; Gapel, E.R. Análisis de Líquido Sinovial para la Tipificación de Artropatías del Equino. *Revista de Medicina Veterinaria (Buenos Aires)* 1988; 69:77-87
13. Dahlberg, L.; Ryd, L.; Heinegard, D.; Lohmander, L. S. Proteoglycan Fragments in Joint Fluid. *Acta Orthop Scand* 1992; 63:417-23
14. Dukes, H. H.; Swenson, M.J. Fisiología de los Animales Domésticos. Cuarta Edición. Editorial Aguilar. Madrid. (España) 1977 p 932-4
15. Ekman, L.; Nilsson, G.; Persson, L.; Lumsden, J.H. Volume of the Sinovia in Certain Joint Cavities in the Horse. *Acta Veterinaria Scandinavica* 1981; 22:23-31
16. Ettinger, S. J. Tratado de Medicina Interna Veterinaria. Tercera Edición. Editorial Intermédica. Buenos Aires (Argentina) 1992 p 2484-99
17. Farndale, R. W.; Buttle, D. J.; Barrett, A. J. Improved Quantitation and Discrimination of Sulphated Glycosaminoglycans by Use of Dimethylmethylene blue. *Biochimica et Biophysica Acta* 1986; 883:173-7
18. Feldman, B. F. Examen de Laboratorio del Líquido Sinovial. *Cursillo de Actualización de Citología Clínica en Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires*. 1984
19. Fuller, C. J.; Barr, A. R. S.; Dieppe, P. A.; Sharif, M. Variation of an Epitope of Keratan Sulphate and Total Glycosaminoglycan in Normal Equine Joints. *Equine Veterinary Journal. Equine Vet* 1996; 28:490-3
20. Geborek, P.; Saxne, T.; Heinegard, D.; Wollheim, A. Measurement of Synovial Fluid Volume Using Albumin Dilution upon Intraarticular Saline Injection. *The Journal of Rheumatology* 1988; 15: 91-4
21. Hardigham, T. E.; Muir, H. The Specific Interaction of Hyaluronic Acid with Cartilage Proteoglycans. *Biochim and Biophys Acta* 1972; 279:401-5
22. Heinegard, D.; Inerot, S.; Wieslander, J.; Lindblad, G. A Method for the Quantification of Cartilage Proteoglycan Structures Liberated to the Synovial Fluid During Developing degenerative Joint Disease. *Scand J Clin Lab Invest* 1985; 45:421-7
23. Hopkins, J. B.; Stephenson, E. H.; Storz, J.; Pierson, R. E. Conjunctivitis Associated with Chlamydial Polyarthritis in Lambs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1973; 163:1157-60
24. Jennings Jr. P. B. Texto de Cirugía de los Grandes Animales. Volumen II. Primera Edición. Editorial Salvat. Barcelona. (España) 1989 p 610-8
25. Klein, C. E.; Iglesias Elizondo, O. A. Examen del Líquido Sinovial. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 1985; XIX:237-48
26. Lasta, G. E.; Tarabuso, R. E.; Andreatta, J. N. Estudio de Líquido Sinovial de Bovinos y Equinos. Primera Parte. *Clínica y Producción Veterinaria*. 1995; 24:2-9
27. Leitch, M. Diagnosis and Treatment of Septic Arthritis in the Horse. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1979; 175:701-4
28. Levinson, S. A.; Mac Fate, R. P. Diagnóstico Clínico de Laboratorio. Tercera Edición. Editorial El Ateneo. Buenos Aires. (Argentina). 1972
29. Lohmander, S. L.; Lark, M. W.; Dahlberg, L.; Malakovits, L. A.; Roos, H. Cartilage Matrix Metabolism in Osteoarthritis: Markers in Synovial Fluid, Serum and Urine. *Clin. Biochem.* 1992; 25: 167-74
30. Lohmander, S. L.; Hoerrner, L. A.; Lark, M. W. Metalloproteinases, Tissue Inhibitor, and Proteoglycan Fragments in Knee Synovial Fluid in Human Osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*. 1993; 36:181-9
31. Lumsden, J. M.; Caron, J. P.; Steffe, J. F.; Briggs, J. L.; Arnoczky, S. P. Apparent Viscosity of the Synovial Fluid from Mid-carpal, Tibiotarsal, and Distal Interphalangeal Joints of Horses. *AJVR*. 1996; 57:879-83
32. Mateo Soria, L.; Nolla Sole, J. M.; Rozadilla Sacanell, A.; Valverde Garcia, J.; Roig Scofet, D. Infectious Arthritis in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1992; 51:402-3
33. Mc Chesney, A. E.; Becerra, V.; England, J. J. Chlamidial Polyarthritis in Foal. *JAVMA* 1974; 165:259-61

34. Mci Lwraith, W.; Fessler, J. Arthroscopy in the Diagnosis of Joint Disease. JAVMA 1978; 172:263-7
35. Palmer, D. G. Total Leukocyte Enumeration in Pathologic Synovial Fluids. The American Journal of Clinical Pathology 1968; 49:812-4
36. Perman, V. Synovial Fluid. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. Tercera Edición. Capítulo 19. 1980 p 749-83
37. Platt, D.; Bayliss, M. T. Proteoglycan Metabolism of Equine Articular Cartilage and its Modulation by Insulin-Like Growth Factors. J Vet Pharmacol Therap 1995; 18:141-9
38. Poole, A. R.; Ionescu, M.; Swan, A.; Dieppe, P. A. Changes in Cartilage Metabolism in Arthritis Are Reflected by Altered Serum and Synovial Fluid Levels of the Cartilage Proteoglycan Aggrecan. Implications for Pathogenesis. J. Clin. Invest. 1994; 94:25-33
39. Ray, Ch. S.; Poole, A. R.; Mci Lwraith, C. W. Use of Synovial Fluid and Serum Markers in Articular Disease. Joint Disease in the Horse. Chapter 11. Edit. W. B. Saunders Company. Philadelphia. (USA) 1996 p 203-16
40. Reid Hanson, R. Oral Glycosaminoglycans in Treatment of Degenerative Joint Disease in Horses. Equine Practice 1996; 18:18-22
41. Rejno, S. Viscosity of Equine Synovial Fluid. Acta Vet Scandin 1976; 17:169-77
42. Rejno, S. LDH and LDH Isoenzymes of Synovial Fluid in the Horse. Acta Vet Scandin 1976; 17:178-89
43. Rorvik, A. M. Methods and Errors in Measurements of Synovial Fluid Volume in Stifles with Low Volume and High Viscosity Synovial Fluid. An Experimental Study in Goats. Acta Vet Scand 1995; 36:213-22
44. Rorvik, A. M.; Grondahl, A. M. Markers of Osteoarthritis: A Review of the Literature. Veterinary Surgery 1995; 24:255-62
45. Rosenberger, G. Exploración Clínica de los Bovinos. Primera Edición en Español. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires. (Argentina) 1981 p 377-80
46. Rosendal, S.; Erno, H.; Wyand, D. S. *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* as a Cause of Polyarthrititis in Goats. Journal of American Veterinary Medical Association 1979; 15:378-80
47. Rossi, M. A.; Carbajal, B.. Sistemática para el Estudio del Líquido Sinovial (LS). Revista de la Asociación Bioquímica Argentina. 1977; XLI, 230/231:125-30
48. Saxne, T.; Heinegard, D. Synovial Fluid Analysis of Two Groups of Proteoglycans Epitopes Distinguishes Early and Late Cartilage Lesions. Arthritis and Rheumatism. 1992; 35:385-90
49. Simunek, Z.; Muir, H. Proteoglycans of the Knee-Joint Cartilages of Young Normal and Lame Pigs Biochem J 1972; 130:181-7
50. Stashak, T. Adams Lameness in Horses. Editorial Lea y Febiger. Philadelphia. (USA) 1987 p 423-32
51. Stryer, L. Bioquímica. Segunda Edición. Editorial Reverte S.A. Barcelona (España) 1985 p 161-85
52. Tamanini, C.; Seren, E.; Pezzoli, G.; Guidetti, M. Concentración de las Prostaglandinas E1 y E2 en el Líquido Sinovial de Caballos Afectados de Artropatías. Gaceta Veterinaria. 1981; XLIII, 360:392
53. Tarabuso, R. E.; Andreatta, J. N.; Lasta, G. E. Estudio de Líquido Sinovial en Artropatías de Equinos y Bovinos. Parte II. Clínica y Producción Veterinaria. 1996; 26:14-7
54. Thonar, E. J. M.; Lenz, M. E.; Klynworth, G. K.; Caterson, B.; Pachman, L. M.; Glickman, P.; Katz, R.; Huff, J.; Kuettner, K. E. Quantification of Keratan Sulfate in Blood as a Marker of Cartilage Catabolism. Arthritis and Rheumatism. 1985; 28:1367-76
55. Timoney, J. F. Erysipelas Arthritis in Swine: Lysosomal Enzyme Levels in Synovial Fluids. American Journal of Veterinary Research, of The American Veterinary Medical Association 1976; 37:295-7
56. Todhunter, R. J.; Fubini, S. L.; Freeman, K. P.; Lust, G. Concentrations of Keratan Sulfate in Plasma and Synovial Fluid from Clinically Normal Horses and With Joint Disease. Journal of the American Veterinary Medical Association 1997; 210:369
57. Todhunter, R. J.; Yeh, L. A.; Sheldon, A.; Grianzio, L.; Walker, S. L.; Burton-wurster N.; Lust, G. Effects of Stromelysin Activity on Proteoglycan Degradation of Canine Articular Cartilage Explants. Am J Vet Res 1995; 56:1241-7
58. Toutain, P. L.; Alvinerie, M.; Fayolle, P.; Ruckebusch, Y. Bovine Plasma and Synovial Fluid Kinetics of Methylprednisolone and Methylprednisolone Acetate After Intra-articular Administration of Methylprednisolone Acetate. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 1985; 236:794-802
59. Van Pelt, R. W.; Conner, G. H. (Synovial Fluid from the Normal Bovine Tarsus. I. Cellular Constituents, Volume and Gross Appearance. American Journal of Veterinary Research 1963; 24:112-1
60. Van Pelt, R. W.; Conner, G. H. Synovial Fluid from the Normal Bovine Tarsus. II. Relative Viscosity and Quality of Mucopolysaccharide. American Journal of Veterinary Research 1963; 24:537-44
61. Van Pelt, R. W.; Conner, G. H. Synovial Fluid from the Normal Bovine Tarsus. III. Blood, Plasma and Synovial Fluid Sugars. American Journal of Veterinary Research. 1963; 24:735-42
62. Van Pelt, R. W. Inflammation of the Tarsal Synovial Sheet (Thoroughpin) in Horses. JAVMA 1969; 155:1481-8
63. Van Pelt, R. W.; Riley, W. F. Clinicopathologic Findings and Therapy in Septic Arthritis in Foals. Journal of the American Veterinary Medical Association. 1969; 55:1467-79
64. Van Pelt, R. W. Synovial Effusion Changes in Idiopathic Septic Arthritis in Calves. JAVMA 1970; 156:84-92
65. Van Pelt, R. W. Monarticular Idiopathic Septic Arthritis in Horses. JAVMA 1971; 158: 1658-73
66. Vatistas, N. J.; Wilson, W. D.; Pascoe, J. R.; Madigan, J.; De Carlo, M. Septic Arthritis in Foals: Bacterial Isolates, Antimicrobial Susceptibility, and Factors Influencing Survival. Proceedings of the 39th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners. San Antonio. Texas (USA) 1993 p 259
67. Verschooten, F.; De Moor, A.; Steenhaut, M.; Desmet, P.; Wouters, L.; De Ley, G. Surgical and Conservative Treatment of Infectious Arthritis in Cattle. JAVMA 1974; 165:271-5

G.E.Lasta

68. Wright-George, J.; Corbeil, L. B.; Duncan, J. R.; Fabricant, J. A. Rheumatoid-Like Arthritis in Calves. *The Cornell Veterinarian*. 1976; 66:111-7
69. Woods, R. D.; Ross, R. F. Streptococcosis of Swine. *The Veterinary Bulletin*. 46 : 397.
70. Wyn-jones, G. 1992. *Enfermedades Ortopédicas de los Equinos*. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires (Argentina) 1976 p 225-34
71. Zamos, D. T.; Honnas, C. M.; Watkins, J. P. Arthroscopic Treatment of Septic Arthritis/Physitis of the Femoropatellar Joint in a Foal: a Case report. *Journal Equine Veterinary Science* 1993; 13: 341-4

Area de Divulgación Científica

Maestría en Tecnología e Higiene de los Alimentos

En 1999 se pondrá en marcha en la Universidad Nacional de La Plata una Maestría en «**Tecnología e Higiene de los Alimentos**». La Facultad de Ciencias Veterinarias de la U.N.L.P. participará de esta actividad educativa junto de otras Unidades Académicas de esta Universidad.

Podrán cursar este postgrado aquellos profesionales de Unidades Académicas del país o del extranjero. Su duración será de dos (2) años. En este período se dictarán cursos de nivelación y de promoción. La Maestría se completará con la presentación de un trabajo final de tesis.

Los alumnos avanzarán en la Maestría en base a la obtención de créditos acumulados según las materias que cursen y aprueben. En este sentido se trabajará con una curricula flexible lo que significa que cada alumno con un docente, que actuará como su director, seleccionará las materias de su interés y se capacitará en las mismas durante el postgrado. El único requisito al respecto es que se deberá alcanzar un mínimo de 55 créditos.

A fin de garantizar la mejor formación, y atento a las capacidades disponibles, se ha fijado el número de alumnos en 15, los que serán seleccionados por sus antecedentes. Las materias de la Maestría se cursarán en distintas Unidades Académicas de la U.N.L.P., con realización de prácticas especiales y pasantías en diferentes empresas. Este postgrado es arancelado y su costo es de \$ 500 por mes (diez cuotas y una matrícula).

Para obtener mayor información dirigirse a la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Plata, Secretaría de Postgrado, calle 60 y 118, (CP 1900) La Plata. Telefax: 54-21-257980; correo electrónico: ppgarcia@fcv.medvet.unlp.edu.ar

INSTRUCCIONES A LOS AUTORES

La revista ANALECTA VETERINARIA es una publicación semestral de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Está destinada a la difusión de trabajos científicos en el campo de las Ciencias Veterinarias, generados en esta Unidad Académica y en otras instituciones. Asimismo, reflejará las actividades académicas de postgrado y de extensión que se desarrollan en esta Casa de Estudio. El idioma oficial es el Español aunque se aceptarán trabajos en Inglés que seguirán el mismo esquema más abajo detallado.

ANALECTA VETERINARIA seguirá los "Requerimientos uniformes" para la presentación de manuscritos en revistas biomédicas según la quinta edición de 1997 (International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirement for manuscript submitted to biomedical Journals. N Engl J Med 1997; 336:309-15). Una traducción de estos requerimientos pueden ser recuperados en INTERNET en la dirección electrónica:

<http://www.medvet.unlp.edu.ar/publicaciones>.

ANALECTA VETERINARIA puede ser recuperada gratuitamente en INTERNET en formato pdf (Adobe Acrobat Reader®) que permite su impresión tal como aparece en la copia final incluyendo gráficos y tablas. La misma se encuentra en la dirección electrónica <http://www.medvet.unlp.edu.ar/publicaciones>. La Revista constará de las siguientes secciones:

I.-Trabajos de investigación, II.-Artículos de revisión, III.-Comunicaciones breves IV-Información institucional y V. Cartas al editor.

Normas Generales de Redacción

Los manuscritos deberán ser enviados para su publicación al Comité editorial en Idioma Español o Inglés. Deberán enviarse por triplicado en hoja tamaño A4 (210 x 297 mm), numeradas correlativamente y escritas a doble espacio, simple faz, con un margen de 4 cm a la izquierda y no menor de 2 cm en el derecho. Deberá enviarse además una copia en disquete (MS-Word 6.0® o Word Perfect 6.0®).

Las fotografías en blanco y negro podrán ser incluidas en número no mayor a 3 por artículo. Otras inclusiones de fotografías en blanco y negro o en color estarán a cargo de los autores. La Versión Electrónica de la Revista podrá contener fotografías color sin costo para los autores. La inclusión de fotografías color en el material impreso deberá ser solicitado expresamente al Editor. El material enviado estará listo para su reproducción, podrán enviarse fotografías o gráficos en formato TIF, CRD o BMP.

Las unidades de medida se expresarán siguiendo las normas del Sistema Internacional de Unidades. El material enviado será analizado para su publicación por el Comité Editorial, el que lo someterá a consideraciones del referato externo. El

Comité Editorial informará al autor del trabajo de las correcciones y/o recomendaciones sugeridas por el evaluador y determinará en función de ello la aceptación o rechazo del mismo. Se deja constancia que el hecho de recibir un trabajo no conlleva la obligación de su publicación por parte de ANALECTA VETERINARIA. Una vez aceptado el trabajo se enviará a los autores la "prueba de galera" para su corrección, la que deberá ser devuelta en un plazo no mayor de 15 días, la falta de respuesta luego del plazo estipulado se entenderá como una aceptación de la misma. El envío de un trabajo a ANALECTA VETERINARIA deberá realizarse con el consentimiento de todos los autores. En todos los casos se tomará como fecha de remisión la del timbre postal correspondiente.

La falta de cumplimiento de cualquiera de las normas implica la devolución del trabajo para su adecuación. La Facultad no se hace solidaria con las opiniones vertidas en los trabajos, siendo los autores los únicos responsables. Tampoco se hace responsable ni respalda la publicidad incluida en la revista.

Normas Particulares de Redacción:

1.Trabajos de Investigación:

No deberán exceder de 30 páginas, incluyendo 25 citas bibliográficas. Deberán ser inéditos y estarán organizados de la siguiente manera.

a)Título: será breve, preciso y reflejará el contenido del trabajo. A renglón seguido se indicará el nombre y apellido (s) del autor (ambos en minúscula), acompañados de sus grados académicos más importantes, separando los autores por una coma. A renglón seguido se señalará el nombre de la institución, cátedra o laboratorio a la que pertenece, así como su dirección postal, número de fax, y dirección electrónica si la posee. Cuando haya más de un autor que pertenezca a diferentes instituciones, cátedras o laboratorios, las mismas serán identificadas con un número arábigo superíndice, después de la última inicial. Agregar un título resumido de un máximo de 40 caracteres (considerar espacios y símbolos como caracteres).

b)Resumen: será redactado en castellano y en inglés (abstract) incluyendo además en este último caso el título en idioma inglés. El resumen deberá sintetizar los objetivos principales del trabajo, la metodología empleada, los resultados más sobresalientes y las conclusiones que se hayan obtenido. No superará en español las 200 palabras y las 400 en inglés.

c)Palabras clave: al finalizar el resumen y el "abstract" en renglón aparte, deberán consignarse palabras clave, cinco como máximo, colocándolas bajo el título Palabras clave o "Key Words" según corresponda.

d) Introducción: se señalarán los antecedentes sobre el tema, citando la bibliografía más relevante y especificando claramente los objetivos y el fundamento del trabajo.

e) Materiales y Métodos: toda técnica nueva deberá detallarse para facilitar su comprensión. Se evitará pormenorizar sobre métodos ya experimentados, citándose los materiales utilizados en la realización del trabajo. En los casos en que el diseño experimental requiera una evaluación estadística, se indicará el método empleado.

f) Resultados: se presentarán en forma clara, ordenada y breve.

g) Discusión: incluirá la evaluación y la comparación de los resultados obtenidos con los de otros autores, indicando las referencias bibliográficas correspondientes. Las conclusiones deberán sustentarse en los resultados hallados, evitando todo concepto vago o condicional.

h) Agradecimientos: colaboraciones, ayuda técnica, apoyo financiero, etc. deberán especificarse en agradecimientos. Estas personas deberán conceder su permiso para ser nombradas.

i) Bibliografía: deberá escribirse en hoja aparte ordenada según aparece en el texto y numerada correlativamente con números arábigos, contendrá todas las citas mencionadas en el texto teniendo en cuenta el siguiente formato:

Autores: Apellido, seguido por las iniciales de los autores separados del siguiente autor por coma. Título: completo del trabajo en el idioma en que fue publicado. Nombre de la revista o publicación donde aparece el artículo abreviada de acuerdo al "US National Library of Medicine (NLM)" que usa el *Index Medicus* (<http://www.nlm.nih.gov>). En forma seguida el año de publicación; en forma continuada el número de volumen de la revista, seguido de coma y el número de la revista (si lo posee), dos puntos, seguido del número de páginas de inicio y terminación del trabajo. Ej.

1. Rodríguez-Vivas RI, Domínguez-Alpizar JL. Grupos entomológicos de importancia veterinaria en Yucatán, México. Rev Biomed 1998; 9 (1):26-37

En el texto del trabajo hacer referencia mediante números arábigos entre paréntesis.

Si se tratase de trabajos publicados en libros:

Apellido y nombres en forma similar al indicado para revistas periódicas. A continuación el nombre del libro, edición, editorial, ciudad, país entre paréntesis, seguidas del año de publicación y páginas consultadas. Ej.

1. Plonat H. Elementos de Análisis Clínico Veterinario, Ed. Acribia. Zaragoza (España), 1984; p.45-75.

Las tablas se presentarán en hojas separadas y con títulos completos ubicados sobre el margen superior y numerados con números arábigos, deberá incluirse además el título en inglés. Los gráficos se presentarán también en hojas separadas pero con títulos explicativos ubicados al pie de los mismos y numerados consecutivamente con números romanos debiéndose incluir además el título en inglés. Las ta-

blas, gráficos o fotos se adjuntarán al final del manuscrito debiéndose indicar en el texto la posición correspondiente "insertar" tabla N° o gráfico N° o foto N°. Las fotografías deberán remitirse con la numeración en el reverso escrito con lápiz (o pegar una etiqueta de papel) de acuerdo a su secuencia en el texto, así como también indicarse el título y el autor del trabajo y cuál es la parte superior de la misma. El tamaño deberá ser de 9 por 13 cm, pudiendo reducirse en la publicación por lo que se sugiere la buena calidad del detalle que se quiera resaltar. Cada foto deberá ser acompañada de una breve reseña explicativa de la misma en español y en inglés.

II. Artículos de Revisión

Versarán sobre temas relevantes incluyendo una revisión bibliográfica adecuada y sus autores deberán tener idoneidad en los mismos. Estos artículos incluirán las siguientes secciones: título, título en inglés, resumen, "abstract", texto, agradecimientos, bibliografía y la extensión de estos trabajos no excederán las cincuenta páginas y sesenta citas bibliográficas.

El autor no deberá solamente realizar una recopilación bibliográfica exhaustiva, sino que además deberá hacer una discusión crítica sobre el tema considerado, destacando la trascendencia actual y futura y los puntos sobre los que existan diferencias de opinión.

III. Comunicaciones breves

Esta sección estará destinada a la comunicación de hallazgos preliminares en trabajos de investigación en marcha y a la descripción de nuevas técnicas (de laboratorio, quirúrgicas, de producción), hallazgos clínicos exóticos o poco frecuentes, etc. Su organización deberá seguir el lineamiento general indicado en el Ítem I. No deberán exceder las dos páginas incluyendo no más de 10 citas bibliográficas.

IV. Información Institucional

Esta sección será destinada a difundir todas aquellas actividades o informaciones de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata que tengan una relación directa con los objetivos dispuestos para la presente publicación.

V. Cartas al editor

En esta sección se incluirán actualizaciones breves y comentarios sobre artículos ya publicados. Las cartas (hasta 1000 palabras de texto) deberán ser en formato carta y no se dividirán en secciones. Las cartas comenzarán con una introducción breve sobre la relación del tema. Incluir desarrollo de métodos; referencias, en no más de cinco; y figuras o ilustraciones, en no más de dos.

Correspondencia

Toda correspondencia dirigida a esta revista deberá realizarse a la siguiente dirección:

Sr. DIRECTOR. ANALECTA VETERINARIA
CC 296 (1900) La Plata. ARGENTINA
TEL/FAX: 0221-4257980

Desde el exterior: +54-221-4257980

E-mail: analecta@fcv.medvet.unlp.edu.ar