

Enfermedades Infecciosas

Prevalencia de anemia infecciosa equina (A.I.E.), en San José del Nus, Antioquia, 1994

RODRÍGUEZ, B.J. ESPECIALISTA EN PATOLOGÍA ANIMAL, U., DE A.
CANO, F.J. MÉDICO VETERINARIO. ZAPATA, M. BACTERIÓLOGA Y LABORATORISTA CLÍNICO

Introducción

La anemia infecciosa equina es una enfermedad causada por un retrovirus. No cuenta para su prevención con una vacuna eficaz que proteja contra las variantes antigénicas del virus; por ello su amplia distribución mundial. Su impacto económico es grande, ya que los équidos afectados disminuyen su capacidad de trabajo en labores agropecuarias y en el transporte de productos⁽³⁾.

Por todo lo anterior y debido a la falta de investigaciones epidemiológicas recientes en nuestro medio, se realizó un estudio cuyo objetivo fue determinar la prevalencia de la anemia infecciosa equina en équidos en condiciones de campo.

Materiales y métodos

Mediante el método aleatorio simple se realizó un muestreo serológico para la anemia infecciosa equina en équidos del corregimiento de San José del Nus; se calculó un tamaño de muestra de 86 animales, a partir de una población de 800 équidos pertenecientes a dicho corregimiento, con un error permitido del 10% y un límite de confianza del 95%. Los animales elegidos fueron de ambos sexos, de las especies mular y caballar, los cuales se dividieron en tres grupos (1 - 5.9 años, 6 - 9.9 años y un ≥ 10 años). No se tomaron asnos por ser su número poco representativo en la población, ni animales menores de 1 año por considerarlos con anticuerpos maternos (2,8).

El procedimiento de los sueros se realizó mediante la prueba de inmunodifusión en gel de agar descrita por Coggins y Norcross, utilizando un kit de anticuerpos contra anemia infecciosa equina (Pitman, Moore, Inc. Mundelein, IL, USA), dotado de un antígeno glicoproteico específico y controles positivos. El gel de agar se preparó al 1% en buffer borato a pH 8.6 (1,6).

Los resultados obtenidos se expresaron mediante promedios de positividad y negatividad para la

técnica y se empleó la prueba X^2 para determinar asociación estadística con las variables edad, sexo y especie.

Resultados

Se realizó un estudio de prevalencia en un total de 100 sueros, de los cuales 4 resultaron con reacción de anticuerpos precipitantes para anemia infecciosa equina, lo que equivale a un 4% de positividad, con un intervalo de confianza ± 0.10 , a un nivel del 95% (0.04 ± 0.10). Se encontró asociación estadística significativa entre la presencia de anticuerpos precipitantes para anemia infecciosa equina y animales con una edad superior a 10 años, no se observó relación entre la positividad a la enfermedad y las variables sexo y especie.

Discusión

La prevalencia de anemia infecciosa equina encontrada en este estudio, en San José del Nus, es baja al compararse con trabajos previos en el departamento de Antioquia y otras regiones del país (4, 5, 6, 7), esto puede deberse a variaciones en los resultados con el paso del tiempo, a diferencias en el sistema de muestreo y tamaño de muestra o a condiciones ecológicas propias de la zona. Teniendo en cuenta que el método de muestreo en esta investigación se llevó a cabo con base en un diseño estadístico, se deduce que los resultados obtenidos corresponden a la situación real de la enfermedad en esta región.

En este trabajo se encontró asociación estadística entre animales con edades superiores a 10 años y positividad para la enfermedad, observación que aunque está en desacuerdo con trabajos anteriores en el país (6), constituye un hallazgo que confirma a la anemia infecciosa equina como una enfermedad esencialmente crónica, la cual necesita para su transmisión largos períodos de convivencia mutua entre las especies susceptibles.

Bibliografía

- 1 Coggings, L. and Norcross, N.L. Immunodiffusion Reaction in Equine Infectious Anemia. En: The Cornell Veterinarian. Vol. 60. No. 2, 1979. p. 330-335.
- 2 Daniel, W.W. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud 3. Ed. México. Limusa, 1993.
- 3 Hincapié, O. et al. Anemia Infecciosa Equina. En: boletín Técnico ICA, No. 30, 1974.
- 4 Instituto Colombiano Agropecuario. División de Ciencias Veterinarias, 1977, 1978, 1979, 1980. Bogotá, ICA, 1980. Informe Anual de Actividades.
- 5 Instituto Colombiano Agropecuario. División de Ciencias Veterinarias. Prevalencia de Anemia Infecciosa Equina en varios departamentos. Bogotá, ICA. 1977, p.94-95. Informe Anual de Actividades 1976.
- 6 Navarrete, S.M., Guzmán, L.M. y Rincón A.A. Prevalencia de Anemia Infecciosa Equina en el Departamento de Córdoba. En: Revista ICA. Vol. 23, No. 3, 1982. p. 133-140.
- 7 Ramírez, J.J. e Hincapié, O. Diagnóstico de Anemia Infecciosa Equina en Colombia por la prueba de Inmunodifusión de Coggings. En: Revista IVA, Vol. 11, No. 2, 1976. p. 173-179.
- 8 Tasjian, R.J. Transmission Clinical Evaluation of Equine Infectious Anemia on herd and their offspring over 13 years period. En: Journal of the American Veterinary Medical Association. Vol. 184. No. 3, 1984, p. 282-288.

Estudio serológico de la parvovirus en un consultorio de la ciudad de Medellín

OSCAR QUIJANO, MÉDICO VETERINARIO. EJERCICIO PARTICULAR.

DAVID BEDOYA, Y JUAN CARLOS BOTERO, ESTUDIANTES DEL PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA. Y HERNANDO CASTAÑO Y SADOH MOLINA, PROFESORES TITULARES DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

Introducción

La parvovirus es uno de los problemas infecciosos que con frecuencia afecta a la población canina en nuestro medio.

Esta entidad clínica, caracterizada por una gastroenteritis hemorrágica y una alta morbimortalidad, es producida por un miembro de la familia *parvoviridae*, que ataca principalmente a los cachorros entre los 6 y las 24 semanas de edad, ya que los perros adultos son generalmente inmunes, bien sea como resultado de la vacunación o por la infección natural (1).

El objetivo del presente estudio fue determinar por la prueba de la inhibición de la hemoaglutinación (HI), los niveles anticuerpos contra la parvovirus en caninos que llegaron a consultar a un centro veterinario de la ciudad de Medellín.

Materiales y Métodos

En este estudio se analizaron sueros provenientes de 29 caninos atendidos en el consultorio de la zona noroccidental de la ciudad de Medellín, en la segunda quincena de septiembre de 1995 y con vacuna contra parvovirus canina, vigente a esa fecha.

Muestra. Se tomaron 5cc de sangre de la vena cefálica, se dejó coagular, se colocó en refrigeración

durante 2 horas, el suero se empacó en viales y se congeló, cuando se completaron las 29 muestras se transportaron al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad de Antioquia, allí se centrifugaron a 2.000 revoluciones por minuto durante 10 minutos y el sobrenadante se inactivó a 56 grados por 30 minutos en baño maría.

Inhibición de la hemoaglutinación. Se tomaron 50 microlitos (ul) de suero inactivado y se mezclaron con 450 ul de PBS con 1% de albúmina sérica bovina dilución (1:10), luego se adicionaron 50 ul de glóbulos rojos de cerdo al 50% se agitó y se incubó a 4 grados durante 18 horas, se centrifugó a 1.000 rpm durante 10 minutos, con el sobrenadante se realizaron diluciones dobles, iniciando en 1:20 y hasta 1:10.240, a cada una de ellas se le adicionaron 8 unidades hemoaglutinantes (U.H.A.), por 50ul de antígeno, posteriormente se colocó a temperatura del laboratorio durante una hora, se adicionó a cada sistema reaccionante 50 ul de glóbulos rojos de cerdo al 1% en P.B.S., a un pH de 7.2, a continuación se incubó dos horas a cuatro grados centígrados, momento en el cual se efectuó la lectura de la prueba. El título de cada suero fue el recíproco de la dilución

más alta donde estaba francamente inhibida la hemoaglutinación, siempre se montaron controles de suero positivo, negativo y de las 8 U.H.A. (2)

Resultados

Por el método de la inhibición de la hemoaglutinación se determinaron los títulos de anticuerpos contra la parvovirus en 29 caninos, los cuales variaron entre 1:20 hasta 1:2560.

Los títulos mayores fueron: 1:2560 (5/29) 17.2%, seguido por: 1:1280 (2/29), 1:640 (3/29), 2:320 (4/29), 1:160(5/29), que corresponden al 6.9, 10.4, 13.7 y 17.2%, respectivamente, lo cual se observa en la tabla 1.

Tabla 1

Títulos de anticuerpos contra la parvovirus canina en un consultorio de la ciudad de Medellín, por la prueba de HI 1995

Título (UI)	Número	Porcentaje
-20	3	10.4
40	4	13.7
80	3	10.4
160	5	17.2
320	4	13.7
640	3	10.4
1280	2	6.9
2560	5	17.2
	29	100

Discusión

En el trabajo realizado por Margollet citado por Rejas et al (3), se consideran animales protegidos contra la parvovirus canina, los que en la prueba

de inhibición de la hemaglutinación, alcanzaron títulos de 1:128 ó mayores (19/29) y desprotegidos los que dieron títulos de 1:80 ó menores (10/29).

Se considera necesario realizar pruebas serológicas en cachorros que llegan a los consultorios con el fin de determinar si la inmunidad materna está por debajo de títulos de 1:10 y en tal caso proceder a la inmunización para impedir la interferencia de los antígenos vacunales (4).

Debido a la carencia de estudios sobre la inmunología de la parvovirus en Colombia, es necesario definir y evaluar un esquema de inmunización seguro para los cachorros provenientes de reproductoras con altos títulos de anticuerpos.

Esta investigación permitió adaptar la técnica de HI en el laboratorio de microbiología, lo cual hace posible la realización de futuros estudios tendientes a esclarecer dudas e inquietudes sobre la parvovirus canina en Antioquia.

Bibliografía

- 1 Pollock, R. and Cpyne, M. Canine Parvovirus. En: *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*. Vol. 23, No. 3, 1993, p-555-567.
- 2 Rejas, L.J. Inmunidad en Parvovirus Canina. I Contribución al estudio de la reacción de Inhibición de la Hemoaglutinación en la parvovirus canina. En: *Anales de la Facultad de Veterinaria de León*. Vol. 34, 1988; p. 29-39.
- 3 Rejas, L.J. et al. Inmunidad en Parvovirus Canina. II Cinética de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación en perros de raza Mastín Español, vacunados contra parvovirus canina. En: *Anales de la Facultad de Veterinaria de León*. Vol. 34, 1988; p. 41-53.
- 4 Mockett, A. and Stahl, M. Comparing how puppies with passive immunity respond to three canine parvovirus vaccines. En: *Veterinary Medicine*. Vol. 90, No. 5, 1995; p. 430-438.

.....

Detección de animales persistentemente infectados con el virus de la diarrea viral bovina mediante el cultivo de células polimorfonucleares*

JAIRO JAIME, DMV, MSc.; LUIS CARLOS VILLAMIL, DMV, PhD.; VÍCTOR VERA, DMV. MSc.;
GLORIA RAMÍREZ, DMV, MSc. PROFESORES DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y DE
ZOOTECNIA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Introducción

El Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB), se ha convertido en uno de los agentes más importantes para la producción pecuaria mundial; los reportes

internacionales señalan que más del 50% de la población bovina es serorreactora a este agente.

La importancia de la DVB, desde el punto de vista científico y económico, radica en el amplio

espectro de enfermedades que están asociadas a su presentación: infecciones Subclínicas, formas agudas y crónicas, inmunosupresión, problemas reproductivos (repetición de servicios, aborto, momificaciones, retardo en el crecimiento), defectos congénitos, inmunotolerancia e infección persistente y la enfermedad de las mucosas.

Dentro de la epidemiología de la enfermedad, uno de los eslabones más importantes y tal vez la llave para el control de la misma lo constituyen los animales persistentemente infectados (PI). Estos bovinos tienen como característica el ser seronegativos o con reactividad mínima al virus; fenómeno adjudicado a que son bovinos que antes de alcanzar la plena madurez del sistema inmune en su estado fetal se infectaron con un virus biotipo no citopático (NCP), haciéndolos inmunotolerantes y con capacidad de eliminar de forma constante virus al medio.

Si bien es clara la presencia viral en nuestro medio y los efectos que éste produce sobre la reproducción y producción de los animales, hasta el momento no se había abordado un estudio que demostrase la presencia de los animales PI, los cuales siempre han sido diagnosticados como libres de la enfermedad por serología.

Metodología

Para detectar los bovinos PI se partió de un estudio serológico longitudinal realizado sobre tres fincas lecheras de la Sabana de Bogotá durante un año, luego del cual se seleccionaron los bovinos que permanecieron seronegativos como sospechosos de ser PI con VDVB. Se hizo sangría de los animales y se procedió a realizar separación del paquete de células poliformonucleares por medio de gradientes en Ficoll-Hypaque; posteriormente las células fueron cultivadas *in vitro* y estimuladas mitogénicamente con Phytohemaglutinina A. Luego de 96 horas de cultivo las células se fijaron y se sometieron a la prueba de inmunoperoxidasa indirecta (IPI) con el objeto de realizar aislamiento viral utilizando conjugados anti VDVB, tanto citopático (CP) como NCP, obtenidos en conejos para la presente investigación.

Resultados

De los 26 animales usados para la detección (14 seronegativos y 9 seropositivos) se logró confirmar, por medio de la prueba de IPI, la presencia viral en todos los bovinos que eran positivos por seroneutralización siendo el grado de asociación entre las dos pruebas perfecta (100%).

En los bovinos seronegativos se hizo manifiesto un alto grado de reconocimiento al virus por los anticuerpos anti CP y NCP, siendo mayor para los primeros. Con el AC anti CP se reconoció como positivo el 82.6% de los seronegativos, mientras que con el anti NCP fue del 56.52% indicando la presencia de animales PI con capas NCP.

También se evidenció la reacción cruzada existente entre los dos biotipos virales demostradas por una coincidencia en el reconocimiento viral del 71% de los casos empleando los dos tipos de anticuerpos. En el grupo de animales seronegativos, 4 de ellos no mostraron reacción que evidenciara la presencia viral y por tanto fueron diagnosticados como libres del VDVB.

Discusión

Mediante esta investigación se logró establecer, utilizando la técnica inmunoperoxidasa en cultivos de células PMN, la presencia de animales persistentemente infectados con el VDVB en hatos lecheros de la Sabana de Bogotá, los cuales, hasta el momento, no se habían diagnosticado, descubriéndose por tanto el eslabón más importante dentro de la epidemiología de la enfermedad; estos bovinos seguramente están diseminando la enfermedad y aseguran que perdure en el ecosistema.

Dentro del gran conjunto de pruebas destinadas al diagnóstico de animales PI con el BDVB, el cultivo de células PMN constituye una importante opción ya que aprovecha el tropismo del VDVB por este tipo celular y adicionalmente al ser posible su proliferación mediante el uso de mitógenos se puede activar la replicación viral *in vitro*, lo cual contribuye a facilitar el diagnóstico, especialmente en aquellos animales en los cuales las pruebas serológicas e inmunoenzimáticas lleven a dudas para declarar a un animal como PI.

* Este trabajo forma parte del proyecto "Estudio prospectivo de limitantes de salud en ganado lechero en las áreas de la meseta de la Sabana de Bogotá y del valle de Ubaté" financiado por Colciencias.

Bibliografía

- Baker, J.C. Bovine viral diarrhea virus: A review. *Journal of American Veterinary Medical Association* Javna. 190(11):1449-1457.
- Bolin, S.R.; Sacks, J.M. & Crowder, S.V. Frequency of association of noncytopathic bovine viral diarrhea virus with mononuclear leukocytes from persistently infected cattle. *American Journal of Veterinary Research*. 48 (10): 1441-1445.
- Parra, J.L. Influencia de la infección por diarrea viral bovina y de la coinfección con VLH, leptospira hardjo e IBR sobre la producción en ganado de leche. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, 1994.
- Potts, B.J.; Sawyer, M. Shekarchi, I.C.; Wisner, T. & Hudleston, D. Peroxidase labeled primary antibody method for detection of pestivirus contamination in cells cultures. *Journal of virological methods*. 26:119-124-1989.

Evaluación del tratamiento de semen bovino con anticuerpos específicos contra la *rinotraqueitis infecciosa bovina* (RIB)

RODAS JD., ARBOLEDA JJ., TRUJILLO LE, HENAO G, OSSA JE,
 PROGRAMA DE REPRODUCCIÓN, FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
 GUTIÉRREZ N., CHAVERRA ID, ZULUAGA FN,
 PROFESORES DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTÉCNICA DE LA UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA.

Introducción

El HVB-1 es un patógeno de los bovinos económicamente importante y asociado con una variedad de síndromes clínicos, entre otros respiratorios pero también infecciones genitales, abortos y encefalitis (1,3). La forma respiratoria solo fue reconocida en los estados Unidos a mediados de la década de los 50, mientras la forma genital había sido conocida en Europa desde mediados del siglo XIX. La vulvovaginitis, la balanopostitis y el aborto son los signos característicos de esta forma de la enfermedad, que se asocia con transmisión venérea, si bien la principal forma de transmisión es la respiratoria (1,7).

Como todos los herpesvirus, el de la RIB produce infecciones latentes, de donde el virus puede reactivarse para ser excretado por diferentes vías; entre otras, el virus se ha aislado de semen, razón por la cual en Colombia la congelación de semen de toros positivos no es legalmente permitida (4).

Una de las preocupaciones mayores de este grupo de investigadores es la conservación del ganado blanco orejinegro (BON) como fuente de material genético adaptado al trópico colombiano, para eventuales programas de mejoramiento de razas foráneas.

Incidentalmente se ha encontrado que la mayoría de toros de la raza BON, de la más alta selección en Antioquia se encuentran infectados con HVB-1 (6); por esta razón hemos propuesto este proyecto de investigación tendiente a caracterizar la relación

virus-semen, y a tratar de curar por medios inmunológicos el semen bovino supuestamente infectado, para tratar de salvar este potencial genético.

Materiales y Métodos

Inmunización de las aves. Cuando se inició este estudio se planteó un protocolo de inmunización en aves que ha sido repetido hasta la fecha en tres oportunidades sin haber obtenido, en ninguna de ellas, los resultados esperados.

El método descrito por Arboleda y Cols (2) para el primer ensayo en la línea Lohman Selected Leghorn fue reproducido en otras dos líneas durante 1995, la Dekalb Gold (aves semipesadas, y la Hy Line W-36 (livianas).

En el primero de estos dos lotes se realizaron 5 inmunizaciones en las semanas de producción 6, 7, 10, 13 y 17 con adyuvante completo de Freund más 10⁶ DI del Herpesvirus Bovino-1 (HVB-1) en un volumen de 1cc (0.5 y 0.5), en la primoinoculación y desafíos con agente solo en las inoculaciones sucesivas. Las pruebas de neutralización en suero sanguíneo se realizaron en las semanas 8, 12 y 18 de postura.

En el segundo de estos lotes, aún en estudio, se han realizado también 5 inoculaciones en las semanas de postura números 14, 15, 17, 18 y 20. En este caso como en el anterior, se repitió el protocolo hasta la cuarta inoculación, pero en vista de la escasa respuesta lograda y de acuerdo con protocolos

descritos recientemente la quinta inoculación se realizó en forma I.M. (pectoral) en dos sitios diferentes con adyuvante completo de Freund. Las pruebas de neutralización en suero sanguíneo para este grupo se realizaron en las semanas 16 y 19 de postura.

Tratamiento del semen. El procedimiento alternativo para el tratamiento de semen infectado era neutralizar el virus con anticuerpos obtenidos de suero sanguíneo bovino y en este sentido era necesario disponer de un buen volumen de suero de un animal con un título de 32 en anticuerpos neutralizantes.

Adicionalmente se hizo necesario determinar la dilución del semen que permitiera detectar efecto citopático típico del agente sin interferencia de la citotoxicidad producida por la muestra y determinar la mínima cantidad de virus detectable en este sistema. Así al comparar la titulación del virus en medio de crecimiento con la misma en semen se podría deducir también la concentración del virus a usar en la prueba piloto de contaminación y posterior tratamiento del semen.

Los ensayos "in vitro" incluyeron:

- φ Titulación del virus en medio de crecimiento.
- φ Titulación del virus en muestras de semen diluido en el extensor tradicional utilizado (citrato-yema-glicerol).
- φ Contaminación del semen con 1, 10, 100, 1.000 y 10.000 DI y tratamiento con 5 y 10% de suero con anticuerpos neutralizantes para observar el máximo título neutralizante del suero en semen infectado.
- φ Adicionalmente se realizará una prueba de contaminación previa a la congelación dividiendo como se propone en el protocolo original la muestra en tres porciones: semen contaminado, semen no contaminado y semen contaminado y tratado para su posterior verificación de resultados por pruebas de aislamiento y PCR (9).

Resultados

En ninguno de los ensayos realizados los sueros de las aves mostraron anticuerpos neutralizantes contra el HVB-1.

En vista de esto y con el fin de verificar la existencia de anticuerpos no neutralizantes procedimos a probar los sueros por una elisa competitiva utilizando el mismo conjugado de la prueba directa, brevemente el ensayo fué el siguiente:

en platos sensibilizados con 100UL/pozo y por duplicado, con un antígeno de HVB-1 preparado a partir de un lisado clarificado por centrifugación de células MDBK infectadas con el virus y de 100 UL/pozo y por duplicado de un lisado de células no infectadas y usadas como control de antígenos; se incubaron por cuadruplicado, previa incubación con blotto/10min, en dos pozos con Ag y dos pozos control, los sueros aviares por 1h en baño maría a 37°C. Luego de los lavados respectivos se agregaron a todos los pozos 100UL de un suero control positivo y nuevamente se incubó por 1h a 37°C al cabo de este tiempo se continuó con la técnica anteriormente descrita, agregando un conjugado anti Ig G y luego de 1h agregando el sustrato respectivo con incubación por 45 min.

La interpretación de la prueba fue a la inversa y se consideró que existían anticuerpos en aquella muestra cuya diferencia entre los promedios de los pozos con y sin antígeno fue inferior a 0.27. Esta prueba tampoco pudo demostrar la presencia de anticuerpos.

La prueba de aislamiento en muestras de semen artificialmente contaminado con HVB-1 mostró sensibilidad para detectar hasta 10 dosis infecciosas de un virus previamente cuantificado con un título de 10^5 . El suero al 10% logró bloquear el efecto citopático cuando se utilizaron 1 y 10DI para contaminar el semen.

Estas mismas dosis infecciosas del virus y porcentajes de suero positivo serán utilizadas en la prueba de congelación de semen pero este experimento aún no ha sido realizado.

Discusión

A pesar de que el modelo de producción de anticuerpos en aves y su transferencia a la yema de huevo ha sido probado con éxito utilizando varios tipos de antígenos (5, 8, 10); los múltiples esfuerzos encaminados a su utilización en este ensayo con HVB-1 resultaron infructuosos.

La primera explicación al fenómeno podría ser la falta de reconocimiento de las proteínas de este virus por parte de las líneas genéticas aviares utilizadas en el experimento debidas a una carencia del complejo mayor de histocompatibilidad adecuado para presentar dichas moléculas, es decir, podría tratarse de una restricción genética. Otras consideraciones que se deben hacer están dirigidas al tipo de adyuvante que debería acompañar las reinoculaciones y a la vía y dosis efectiva que de cada antígeno específico se

debe utilizar en cada caso para producir la respuesta deseada. De forma semejante, el intervalo entre los desafíos y la calidad del antígeno a inocular (purificado o no) podrían ser factores cuya importancia habría que determinar.

Por solo mencionar un caso anecdótico, la única respuesta visible de anticuerpos neutralizantes fue observada usando la dilución 1:4 del suero de una de las aves LSL luego de la segunda inoculación con virus. Esta respuesta se observó también levemente en una de las aves Hy-line W36, pero en ambos casos se notó la absoluta desaparición de los anticuerpos luego de la tercera dosis del virus.

El tratamiento alternativo de muestras de semen por el método de lavado y posterior congelación con suero bovino positivo a HVB-1 de acuerdo a los resultados de los primeros estudios "in vitro" parece tener grandes posibilidades lo cual estimularía la creación de modelos similares para el tratamiento de otros agentes de transmisión venérea tales como: diarrea bovina, lengua azul, leucosis bovina, trichomona, campilobacter y otros (1). No obstante aún tenemos que determinar si durante este tratamiento se estaría alterando la viabilidad, concentración o motilidad espermática a tal punto que pueda interferir con la capacidad fertilizante de dicho semen.

En este mismo sentido es necesario establecer la existencia o no de anticuerpos antiesperma en el suero bovino usado como fuente de anticuerpos anti-HVB-1 antes de recomendar su uso en otros experimentos.

De resultar posible la recuperación para la reproducción de los toros seropositivos estaríamos dando un gran paso no sólo en el control de la infección por esta vía para el HVB-1, sino también en la posibilidad de expansión y restablecimiento del ganado BON y otros ganados criollos para su uso potencial en cruces de ganadería comercial.

Bibliografía

- 1 Arboleda J, Bedoya D, Rodas J. Trabajo de grado. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad de Antioquia. 1991.
- 2 Arboleda J.J. y cols. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. Vol. 8, suplemento. II Encuentro Nacional de Investigadores en Ciencias Pecuarias (Enicip). 1993.
- 3 Fenner F., Bachman P, Gibbs E. et al. Veterinary Virology Orlando: Academic Press, 1987. 660 p.
- 4 Kahrs R. Control de enfermedades de los animales en las Américas, 1977. Washinton, D.C. OPS. Publicación Científica 358, 121-126.
- 5 Kuroki M. et al. Arch Virol 138: 143-148, 1994.
- 6 Rodas JD y cols. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. Vol. 8, Suplemento, II Encuentro Nacional de Investigadores en Ciencias Pecuarias (Enicip), 1993.
- 7 Rodríguez L., Fernández S. Ciencias Veterinarias, 1987; Vol. 9. No. 2-3: 105-109.
- 8 Song C. et al. J. Inmunol 135(5): 3354-3359.
- 9 Vitek S, Nettleton PF, Herring JA, Herring JA, Vet. Microbiol. 42:245-248; 1993.
- 10 Yazawa S, Hosomi O, Takeya A. Inmunolog Invest. 20(7): 569-581, 1991.

Niveles de anticuerpos contra Newcastle en pollos asaderos al momento del sacrificio en la hacienda El Progreso

BERTULFO PIEDRAHÍTA, CAROLINA TRUJILLO, ESTUDIANTES DEL PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA,
UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA. y SADOH MOLINA, PROFESOR TITULAR FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y DE ZOOTECNIA, UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

Introducción

La enfermedad de newcastle es producida por un virus perteneciente a la familia paramixoviridae, género paramixovirus. Este agente puede ser viscerotrópico, neurotrópico, además puede afectar a los humanos (8, 9, 10).

Como las medidas de bioseguridad no son muy eficientes en nuestro medio para la prevención de las enfermedades infectocontagiosas en las aves, es

necesario implementar planes de vacunación y chequeos serológicos periódicos con el fin de evaluar las respuestas a la inmunoprevención. Por lo anterior el objetivo de la presente investigación fue medir por la técnica de inhibición de la hemaglutinación (HI) los títulos de anticuerpos contra la enfermedad de newcastle en un lote de pollos asaderos de la hacienda El Progreso, propiedad de la Universidad de Antioquia.

Metodología

En un lote de 3 mil pollos que habían recibido dos vacunas contra newcastle, cepa B1 y la sota, se determinó tomar 100 muestras de sangre al azar (5) por punción en la cavidad atlanto-occipital (2cc), se dejó coagular, se colocó en refrigeración por 2 horas, luego se realizó una centrifugación a 1.500 revoluciones durante 10 minutos, al finalizar ésta se procedió con el suero para desarrollar la prueba de HI, así:

Con cada suero se realizaron diluciones dobles desde 1:5 hasta 1:160, a cada dilución se le adiciono 10 UHA/50 del virus newcastle, se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos, luego se adicionaron 50 ul de glóbulos rojos de pollo al 0.5%, se homogenizó suavemente y se dejó en reposo durante 45 minutos. El título final del suero fue el recíproco de la dilución más alta donde hubo inhibición completa de la hemaglutinación. Siempre se colocó un control de suero positivo, uno negativo, uno de las 10 UHA y uno de glóbulos rojos (2).

Con los títulos obtenidos se determinó el promedio geométrico de ellos (10).

Resultados

La tabla 1 muestra que los títulos obtenidos por la prueba de HI en las 88 muestras analizadas variaron de 1:5 hasta 1:80, correspondiendo 7/88 a 1:5, 28/88 a 1:10, 14/88 a 1:20, 17/88 a 1:40, 22/88 a 1:80. El promedio geométrico de estos títulos fue de 23.17.

De los 100 sueros recolectados, 12 no fueron procesados debido a que la cantidad fue insuficiente.

Tabla 1

Distribución y porcentaje de los títulos de anticuerpos por HI, contra N.C. en pollos de engorde al momento del sacrificio, Hacienda El Progreso, 1995

Título	Número	Porcentajes
5	7	7.95
10	28	31.81
20	14	15.90
40	17	19.31
80	22	25.00
	88	

Discusión

En el presente trabajo se halló que, al momento del sacrificio en un lote de 3 mil pollos de engorde que recibieron 2 vacunas, Cepa B1 vía ocular y Cepa la Sota en agua a los 11 y 20 días de edad, respectivamente, poseían un promedio geométrico de los títulos de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de newcastle de 23.17.

Viamontes y Jorge M.A., establecieron promedios geométricos iguales o superiores a 8 como protectores (6,9).

Avellaneda, Villegas y King establecieron un promedio de 10 como estándar mínimo de protección (1-7-10). Hincapié y Vásquez consideran promedios geométricos protectores en pollos aquellos mayores o iguales a 15 (3,4).

El promedio geométrico de los títulos (23.17) obtenido en este estudio está por encima de lo reportado anteriormente; lo cual sugiere que el lote de animales llegó protegido al sacrificio. Sin embargo, en la tabla 1 se observa que los títulos individuales variaron de 1:5 hasta 1:80, esto indica que 39.76% de los pollos estaban desprotegidos debido a que los títulos correspondían a 1:5 (7/88) y 1:10 (28/88).

Es importante subrayar que la prueba de inhibición de la hemaglutinación (HI) no limita sus posibilidades a la evaluación del estímulo vacunal sino que puede igualmente detectar anticuerpos que corresponden a la infección natural con cepas circulantes en el campo, lo que contribuye al diagnóstico indirecto de la enfermedad.

En el futuro deben realizarse en esta unidad de producción pruebas serológicas (HI) antes y después de las inmunizaciones contra la enfermedad de newcastle con el fin de determinar los niveles mínimos de protección contra dicha entidad, además se deben medir anticuerpos maternos y de acuerdo a los resultados realizar ajustes racionales y técnicos en los planes de vacunación que se estén ejecutando. Para lo anterior se puede contar con la disponibilidad de la técnica de HI en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Antioquia.

Bibliografía

- 1 Avellaneda, G.; Villegas, P. Control de newcastle en pollos de engorde. En: *Avicultura Profesional*. Vol. 11 (3): 122, 1994
- 2 Beard, C.W. La enfermedad de newcastle, características y medidas de control. En: *V Seminario de Patología Aviar*. Atheus: Giorgia University, 1983. pp. 218-219.
- 3 Entrevista con Hugo Vásquez, Médico Veterinario en Pollo Coa, San Antonio de Prado, agosto 31 de 1995.
- 4 Omar Hincapié, Médico Veterinario laboratorio Laveta. Medellín, agosto 16 de 1995.
- 5 Gaviria B. G. Conceptos básicos sobre tamaño de muestra. Medellín. Universidad de Antioquia, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, 1986, p. 15.
- 6 Jorge, M.A. et al. Levantamiento serológico en frangos en Minas Gerais. Duenca de Gumboro, brônquite infecciosa e duenca de newcastle. En: *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*. Vol. 44(6): 545-546. 1992.
- 7 King, Daniel J. Serological profiles of commercial Broiler Breeder and their progeny 2. Newcastle Disease Virus. En: *Avian Diseases*. Vol. 30(4): 724-727, 1986.
- 8 Ossa, Jorge. Bases de la inmunología aviar. Medellín. Politécnico Colombiano, 1990, 113 p.
- 9 Viamontes, O. et al. Valoración comparativa de los niveles de anticuerpos medidos por las pruebas de HI y Elisa en pollos de engorde vacunados contra la enfermedad de newcastle. En: *Revista Cubana de Ciencia Avícola*. Vol.16(1): 17-24, 1989.
- 10 Villegas, P. Control de la enfermedad de newcastle. En: *VII Seminario Internacional de Patología Aviar*. Atheus: giorgia Universitu, 1990. pp.307-320.

Estandarización de una técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección del HVB-1 en semen

Informe Preliminar

RODAS JD, ZULUAGA FABIO NELSON, OSSA JE, HENAO G, TRUJILLO LE.
PROGRAMA DE REPRODUCCIÓN, LABORATORIO DE VIROLOGÍA,
FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA, AA 1226

Introducción

El HVB-1 causante de la rinotraqueitis infecciosa bovina (RIB), produce una de las infecciones virales más prevalentes del ganado a nivel mundial generalmente acompañada de trastornos respiratorios y reproductivos (1).

Las principales vías de excreción del agente son las mucosas nasal y prepucial o vaginal; por esto último se la considera una de las enfermedades virales de transmisión venérea frecuentemente asociada con metritis o endometritis y abortos (3). Lo anterior ha planteado la necesidad de desarrollar técnicas más sensibles que nos permitan determinar en un momento dado la capacidad de los toros serorreproductores para diseminar por monta natural o inseminación artificial la infección con este agente (4).

El propósito de este trabajo es adoptar una de las tecnologías más recientemente desarrolladas y, ya ampliamente aplicadas en todo el mundo (2, 5, 6, 7) para determinar la excreción del virus a través del semen en toros de nuestra ganadería y de esta forma proveer un método sensible y específico para evaluar

la importancia de esta vía para la diseminación de la infección en Colombia.

Materiales y Métodos

Células y virus. Para medir la sensibilidad de la prueba se utilizó un HVB-1, gentilmente suministrado por el doctor Jorge E. Osorio de la Universidad de Wisconsin, y replicado en células MDBK (riñón bovino) obtenidas desde la American Type Culture Collection (ATCC 22). Cuando el efecto citopatogénico (ECP) fue máximo (100%) las células fueron sometidas a congelación, descongelación y centrifugación para obtener, en el sobrenadante, un virus clarificado a partir del lisado celular. Luego el virus a detectar fue tratado con 20mg/ml de proteinasa K/6 horas a 56°C con el fin de destruir las cápsides virales y exponer el genoma del virus. Adicionalmente se utilizaron, para verificar la especificidad, otros herpesvirus tales como: citomegalovirus humano, herpes simplex y varicela zoster.

Muestras. El virus no purificado fue inicialmente titulado sobre las mismas células MDBK y posteriormente probado por PCR en diluciones decimales decrecientes con el fin de comparar la capacidad de detección de ambas pruebas.

Posteriormente, muestras de semen fresco fueron contaminadas experimentalmente con diluciones decimales seriadas y usadas para verificar la detección del virus en la muestra de interés.

Ante la imposibilidad de amplificar el virus por la inhibición de la PCR debida a algunos de los componentes del semen (Na, K, Cl, etc.), se realizaron diluciones dobles de la muestra en agua destilada estéril desde 1:5 hasta 1:320 inicialmente y luego desde 1:500 hasta 1:6000, con una cantidad constante del inóculo (virus diluido 1:10 en el volumen final de dilución seminal) para encontrar la dilución del semen en la cual dicha inhibición desaparecía y posteriormente se procedió a determinar la máxima dilución viral detectada en la dilución del semen que permitiera la amplificación.

PCR. La técnica utilizada es una modificación de la empleada por Van Engelenburg y Cols (5), brevemente, la PCR fue desarrollada en una mezcla de 50ul de reacción que contenía una concentración final de 100mM de tris-HCl (pH 8.3), 500 mM de KCl, 0.01% de gelatina, 2 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 0.1 uM de cada primer (correspondientes a una secuencia génica que codifica para la glicoproteína C del virus) y 20 U/ml de Taq polimerasa. Adicionalmente se agregaron 25 ul/ mezcla de aceite mineral puro para evitar evaporación de las muestras.

Las mezclas para PCR fueron sometidas inicialmente a un ciclo de 94°C por 5' para la separación de las bandas de ADN. La amplificación fue llevada a cabo mediante 38 ciclos sucesivos en el siguiente orden: 15 ciclos de 95°C/1', 60°C/1' y 72°C/1', seguidos de 23 ciclos de 95°C/1', 60°C/1' y 72°C/1' más un segmento de autoextensión de 4". En cada una de las pruebas se montaron además, un control positivo con HVB-1 sin diluir, un control de reactivos y cuando fue necesario un control de la reacción con molde y cebadores del fago lambda.

Resultados

El título del lote de virus fue de 10⁴ DI 50 y la detección por PCR de la muestra de virus diluida en agua se observó hasta la dilución de 10⁵ del mismo.

Para el aislamiento del virus a partir de muestras

de semen fue necesario diluir la muestra para reducir su toxicidad hasta 1:128, pero reduciendo al mismo tiempo la posibilidad de aislar el virus por lo menos 100 veces; en tanto que las muestras de semen mostraron una inhibición de la detección del virus por la PCR hasta la dilución 1:6000. En esta dilución fue posible determinar la presencia del virus hasta 10⁵ veces diluido.

Cuando se empleó una doble concentración de la taq polimerasa en la mezcla para la reacción de PCR se pudo superar la inhibición observada en la dilución 1:4000 del semen detectándose el virus que estaba hasta 10⁵ veces diluido en la misma, mientras que antes solo era posible amplificar el virus 100 veces disuelto en ella. Los herpesvirus humanos empleados no mostraron ninguna amplificación inespecífica.

Discusión

El aislamiento viral ha sido considerado clásicamente como la prueba de oro para la detección del virus, si bien la muestra de semen presenta diversos factores citotóxicos que impiden, en muchas ocasiones, verificar la presencia de bajas dosis del virus en esta muestra (1, 6, 7).

Como se pudo constatar también existe fuerte inhibición de la reacción de PCR debido probablemente a las altas concentraciones de iones de Na, K y Cl disueltos en el plasma seminal, pero estas dificultades técnicas han venido siendo parcialmente superadas mediante la dilución de la muestra, la alteración de la proporción de Mg, crítica para la enzima, o el incremento en la concentración de la enzima empleada.

Aunque en la actualidad la sensibilidad del PCR aún parece baja si la comparamos con la del aislamiento viral, existen varias ventajas que deben ser consideradas tales como: el menor tiempo requerido por la técnica de PCR para arrojar resultados, la especificidad de la detección, la escasa cantidad de muestra necesaria para la reacción y la posibilidad de detectar virus inactivado o a partir de muestras contaminadas; todas estas razones aunadas serían suficientes argumentos para mantener el interés en dicha prueba como un método alternativo para la detección del virus en este tipo de muestra.

Adicionalmente, de acuerdo con ensayos ya realizados, la hibridación con sondas específicas podría incrementar en 1.000 ó más veces la sensibilidad de la detección por esta técnica. Finalmente, cuando se haya logrado la estandarización, la prueba final será poder detectar la presencia del

virus incluso en pajillas de semen.

El éxito en la consecución de este objetivo posibilitaría la aplicación de esta técnica, no solo como herramienta diagnóstica de problemas reproductivos posiblemente asociados a esta etiología, sino también como prueba de tamizaje para toros utilizados en monta natural o en inseminación artificial, así como de embriones destinados a transferencia. De la misma manera se podría usar como instrumento de investigación para aquellos casos en los cuales se espera poder amplificar el genoma viral de virus neutralizados no detectados por aislamiento.

Bibliografía

- 1 Fenner F, Bachman P, Gibbs E. et al. *Veterinary Virology* Orlando: Academic Press, 1987, 660 p.
- 2 Kibenge FS, Harris LM, McKenna PK, et al. *Am J. Vet. Res.* Vol. 55, No. 9: 1206-1212, 1994.
- 3 Tikoo SK, Campos M. Babiuk La *Advances in virus Research*, Vol. 45: 191-223.
- 4 Van Drunen Littel-Van Den Hurk S, Tikoo S, Liang X L. *Imm and Cell Biol.* 1993; 71: 405-420.
- 5 Van Engelenburg F, Maes R., Van Oirschot; J. Rijsewijk F.; *J. Clin Microbiol* 1993; Vol. 31, No. 12: 3129-3135.
- 6 Van Engelenburg FA, Van Schie FW, Rijsewijk FA, Van Oirschot JT. *J. Clin Microbiol.* Vol. 33, No. 2: 308-312, 1995.
- 7 Vitek S, Nettleton PF, Herring JA, Herring JA, *Vet. Microbiol.* 42: 245-248, 1993.

Adaptación de una prueba de elisa para detección de anticuerpos contra el *herpesvirus bovino-1* (HBV-1) en suero lácteo

RODAS J.D., ZULUAGA FABIO NELSON, OSSA JE, HENAO G., TRUJILLO LE
PROGRAMA DE REPRODUCCIÓN,
FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

Introducción

El HVB-1, causante de la rinotraqueitis infecciosa bobina (RIB), es considerado uno de los problemas infecciosos de mayor repercusión en la ganadería a nivel mundial (8). Su asociación con patologías tales como la neumonía y el aborto han estimulado un interés creciente en el desarrollo de una parte en una vacuna efectiva para el control de su diseminación y de otra en técnicas de diagnóstico a ser utilizadas en programas de erradicación (1, 5, 9).

La prueba de Elisa desarrollada desde finales de los 70's y principios de los 80's ha mostrado sus bondades en innumerables campos del diagnóstico y la investigación en microbiología (4, 10).

En Colombia y particularmente en Antioquia se ha informado acerca de la evidencia serológica de la enfermedad, aunque la importancia clínica es aún hoy motivo de controversia (7, 12). En el presente trabajo se intenta, basados en la estandarización de una técnica previamente descrita, utilizar como ya se ha hecho en otras latitudes (1, 10) muestras de suero lácteo y leche entera e incluso grupos de las mismas para favorecer su uso en estudios seroepidemiológicos de gran envergadura que permitan determinar las zonas de mayor prevalencia para llevar a cabo nuevas búsquedas del virus hasta ahora tan esquivo, para su posterior caracterización bioquímica y patogénica.

Materiales y métodos

Muestras. De acuerdo con la tabla de tamaño muestral para estudios descriptivos, con referencia a una población infinita y tomando como límite de confianza un 95% y un error del 10%, se sugirió un número de 100 parejas de sueros sanguíneos y lácteos concordantes por pruebas de neutralización y elisa (3).

De éstos hasta el momento se han obtenido y evaluado 90, a partir de los hatos lecheros de la hacienda San Pablo, en Santa Elena, de la Universidad Nacional; la hacienda El Progreso, en Barbosa, de la Universidad de Antioquia y diferentes explotaciones del oriente antioqueño, particularmente de la región del Carmen de Viboral.

A los sueros sanguíneos les fueron practicadas inicialmente las pruebas de neutralización viral y elisa (2,6) y a continuación se llevó a cabo una prueba de elisa en suero lácteo siguiendo el protocolo del suero sanguíneo.

Obtención del suero lácteo. Para la obtención de los sueros lácteos se siguió un procedimiento semejante al descrito por Zuluaga y Cols (11): se tomaron 50cc de leche entera de cada animal y se transportaron en refrigeración al laboratorio de virología donde se guardaron a 4°C. Al día siguiente las muestras fueron centrifugadas a 2.000 rpm/10min

y se eliminó el sobrenadante (porción de grasa) de cada uno. Al volumen restante se le adicionó renina en una proporción de 1:1000 (150 ul/15cc). Luego se incubó por 20 min/37°C, se centrifugó nuevamente a 2.000 rpm/10 min, se colectó el suero lácteo y se descartó el sedimento representado básicamente por caseína. El suero lácteo así obtenido fue conservado a -20°C hasta el momento de ser probado por la elisa.

Elisa en suero lácteo. Inicialmente fue llevada a cabo imitando totalmente las condiciones del Elisa con suero sanguíneo; así la dilución usada fue 1:80, pero fue necesario realizar diluciones cada vez menores hasta encontrar alguna concordancia con las pruebas previamente realizadas. Así, finalmente, se llegó a la conclusión de que sería necesario emplear el suero lácteo sin diluir, para reproducir, al menos parcialmente, los resultados obtenidos empleando un punto de corte semejante.

Resultados

De acuerdo con los datos obtenidos, los sueros sanguíneos que presentaron resultados positivos y negativos por neutralización en una dilución 1:8, se clasificaron claramente en dos grupos de densidades ópticas cuando fueron probados por elisa; los valores promedio de cada grupo fueron 0.63 y 0.08 con una desviación estándar de 0.24 y 0.14, respectivamente.

De la misma forma se puede apreciar que para los sueros lácteos usados sin diluir en la prueba de elisa, se reproduce la situación del caso anterior con unos valores promedio de 0.50 y 0.80 y unas desviaciones estándar de 0.23 y 0.12, respectivamente.

La posterior tabulación de los datos utilizando 0.27 como punto de corte para las pruebas de elisa con ambos tipos de muestras; (de acuerdo con el valor previamente establecido para el elisa en suero sanguíneo) muestra una clara concordancia entre las pruebas de neutralización y elisa en suero sanguíneo del 94.4% (85/90) y entre la neutralización y el elisa en suero lácteo del 91.1% (82/90). De otra parte, la concordancia del elisa para ambas muestras fue del 96.6% (87/90), prácticamente igual a la concordancia del elisa en suero lácteo con los resultados concordantes entre la neutralización y el elisa en suero sanguíneo 96.5% (82/85).

Los valores hasta ahora determinados para especificidad en las pruebas de elisa en suero sanguíneo y lácteo con base en la prueba de neutralización son 95 y 93%, respectivamente, y la sensibilidad, que aún es baja motivo del escaso

número de sueros positivos analizados hasta el momento (8/90) es de 88 y 75%, respectivamente.

Adicionalmente, los primeros ensayos utilizando grupos de sueros para tratar de detectar reactividad en alguno de los mismos, han resultado alentadores y permiten pensar en la posibilidad de identificar hasta un solo seropositivo sólido entre un grupo de hasta 5 muestras de sueros lácteos. Finalmente, los pocos intentos de realizar el elisa con leche entera muestran resultados similares a los obtenidos con el suero lácteo, lo cual la haría probablemente una muestra apta en un futuro cercano cuando se cuente con resultados adicionales.

Discusión

Para la detección de la infección con el HVB-1 se han desarrollado una gran variedad de pruebas de elisa, pero las que podríamos considerar de mayor uso en la actualidad son aquellas de tamizaje que permiten evaluar no sólo un gran número de muestras en poco tiempo y a bajo costo, sino también reconocer la mayor cantidad de animales que hayan estado en contacto con el agente en cuestión.

Teniendo en cuenta la anterior consideración, los resultados preliminares de esta investigación sugieren que estamos ad portas de estandarizar una nueva técnica que nos permitirá equiparnos con las posibilidades de los países desarrollados que han decidido tomar la opción de erradicar la RIB y aunque estamos muy lejos de poder sugerir siquiera esta posibilidad es relevante contar previamente con las herramientas necesarias para estudiar el problema y enfrentar cualquier tipo de solución radical.

De paso, al proponer el uso de muestras más fáciles de obtener y menos invasivas y la utilización de muestras grupales estamos estimulando nuevas posibilidades diagnósticas en otras entidades virológicas del campo veterinario con el fin de reducir el costo y favorecer la descripción seroepidemiológica de problemas microbiológicos hasta ahora sin afrontar.

Es necesario reconocer que la detección de Ig G en suero lácteo y leche no podía esperarse que fuera tan evidente como la misma en suero sanguíneo por obvias razones y en este sentido valdría la pena considerar la posibilidad de utilizar ya fuera un conjugado con anti-Ig polivalente o anti-Ig A que muy probablemente favorecería no solo la mejor detección de los serorreacores sino que también permitiría superar el problema técnico de los sueros procedentes de animales con infecciones agudas en las cuales la

Ig M inhibe la detección de la Ig G (negativos/elisa y positivos/neutralización).

De otro lado, como se ha propuesto previamente, los resultados negativos por neutralización y positivos por elisa clasificados como falsos positivos de la prueba estandarizada deberían ser probados nuevamente por la neutralización en diluciones menores a 1:8 para verificar o rectificar el resultado inicial; pues como se sabe el elisa goza de una mayor sensibilidad y los sueros positivos débiles o con anticuerpos no neutralizantes podrían estar escapando a una correcta clasificación por la prueba de base.

Bibliografía

- 1 Ackerman M., Muller H. Bruckner L. et al. Vet. Microbiol. 1990; 23: 365-370.
- 2 Arboleda J. Bedoya D. Rodas J. Trabajo de grado, Facultad de
- 3 Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Antioquia, 1991.
- 3 Betancur J. García L. Manotas R., Montoya F., Sánchez F. Metod. de la Investigación en Ciencias de la Salud. 2da. Ed. Medellín, Imprenta Universidad de Antioquia, 1992. 244p.
- 4 Kramps JA, Quak S. Weerdmeester K. Van Oirschot JT. Vet. Microbiol. 35: 11-21, 1993.
- 5 Fenner F., Bachman P. Gibbs E. et al. Veterinary Virology Orlando: Academic Press, 1987. 660p.
- 6 Rodas JD y cols. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. Vol. 8. Suplemento II Encuentro Nacional de Investigadores en Ciencias Pecuarias -Enicip-, 1993.
- 7 Sossa S., Flórez V., Arango P. Trabajo de grado. Fac. de Med. Vet. y Zoot. U. de Ant. 1982.
- 8 Tikoo SK, Campos M., Babiuk LA. Adv. virus Res. Vol. 45: 191-223.
- 9 Van Drunen Littel-Van Den Hurk S, Tikoo S., Liang X., Babiuk L. Imm. and Cell Biol. 1993; 71:405-420.
- 10 Witte K. Hanneman P. Dopatka H. Giesendorf B., Med. Microbiol. Immunol. 1989; 178: 9-20.
- 11 Zuluaga F., Restrepo G., Heinrich J., Arango L., Gómez G. Trabajo de grado. Fac. de Med. Vet. y Zoot. U. de A. 1970.
- 12 Zúñiga I., Ossa J., Hincapié O. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias 1978; Vol. 1, No. 2: 135-148.

Aislamiento del virus de la *rinotraqueitis infecciosa bovina* de animales para sacrificio en el área metropolitana de Medellín

MARTÍN E. RESTREPO M, JUAN DAVID RODAS G., FABIO NELSON ZULUAGA T., JORGE E. OSSA L.
PROGRAMA DE REPRODUCCIÓN, SECCIÓN DE VIROLOGÍA,
FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

Introducción

El Herpesvirus Bovino 1 (HVB-1), agente etiológico de la rinotraqueitis infecciosa bovina (RIB), pertenece a la familia *herpesviridae* y a la subfamilia *alphaherpesvirinae*, es considerado el más importante entre los herpesvirus bovinos, ya que produce grandes pérdidas económicas a nivel mundial.^{5,7}

Debido a la diversidad de síntomas clínicos asociados a la enfermedad, también se le ha conocido como: rinitis necrótica infecciosa (RNI), Vulvovaginitis Pustular Infecciosa (VPI), Balanopostitis Pustular Infecciosa (BPI) y Exantema coital bovino, confundiendo en ocasiones con otras patologías víricas que producen manifestaciones similares. 3

La infección por el virus de la RIB ha sido reportada en Colombia desde 1972, según se desprende de los reportes del aislamiento del virus varias oportunidades y de la detección de anticuerpos por pruebas serológicas, demostrando además su

amplia distribución en todo el país.^{1,2} Particularmente en el Departamento de Antioquia se han realizado varios estudios que demuestran la evidencia de esta infección. 1,7

Teniendo en cuenta que la Feria de Ganados de Medellín es el más importante centro de movilización y comercialización de ganados en el país y ante la posibilidad de que en el trópico colombiano estén circulando variantes del virus de la RIB, diferentes a las conocidas en otras regiones del mundo, es de gran importancia iniciar investigaciones tendientes a aislar el agente causal de esta enfermedad para determinar sus características.

El presente reporte, por lo tanto, corresponde a los resultados de los intentos de aislamiento del virus de la RIB a partir de muestras de secreciones nasales, vaginales y prepuciales de animales movilizados para el sacrificio en los municipios del valle del Aburrá con el fin de contribuir a la caracterización de la enfermedad en nuestro medio.

Metodología

Se tomaron hisopados nasales, vaginales y prepuciales, en solución de Hank's y se transportaron en refrigeración hasta el laboratorio de virología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia; el contenido de cada vial se sometió a centrifugación a 2.000 rpm/10min; luego se recuperó el sobrenadante y se le adicionó 100ug de streptomina y 100 U.I. de penicilina/cc.

Se inocularon 0.2cc del sobrenadante, en platos de 24 pozos (por duplicado), sobre una monocapa de células MDBK, cultivadas en MEM, a razón de 10^5 cél/pozo. En cada plato se dejaron dos pozos como control de células. Estos platos se incubaron durante 45 minutos con agitación cada 15 minutos a 37°C durante 5-6 días bajo observación diaria en el microscopio invertido de contraste de fase, con el fin de visualizar el efecto citopático como prueba de la presencia del agente viral.¹ El efecto citopático esperado se caracteriza por abalnamiento celular, refringencia, sincitios y desprendimiento de la monocapa del fondo de los pozos.¹⁶

Se realizó, adicionalmente, una prueba de control para observar la susceptibilidad de las células MDBK al virus de la RIB de referencia (cepa Wisconsin).

Además de las muestras analizadas algunas de ellas se reinocularon siguiendo el mismo procedimiento anterior.

Resultados

Se procesaron para el aislamiento 601 muestras tomadas en la Feria de Ganados de Medellín de bovinos de diferentes razas y en edad reproductiva destinados al sacrificio en los mataderos del Valle del Aburrá; estas muestras se discriminaron de la siguiente forma: 331 hisopados nasales, 163 hisopados vaginales y 107 hisopados prepuciales; de estas muestras 331 correspondieron a machos y 270 a hembras. De las 601 muestras se reinocularon 80 muestras.

No se aisló el virus de la RIB de ninguna de las muestras inoculadas, ni de las reinoculadas.

Discusión

Los resultados del presente trabajo, si bien son inesperados, no deberían ser sorprendentes por la historia de la rinotraqueitis infecciosa bovina en Colombia, que ha sido mas una historia de encuestas serológicas que de aislamientos virales y de descripción clínica de la enfermedad en el campo.

Las investigaciones realizadas en Colombia, con

relación a este agente viral, han permitido su aislamiento en varias oportunidades. En 1972 el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), hizo tres aislamientos del virus en el matadero de Villavicencio, Meta, a partir de hisopados vaginales tomados de vacas con antecedentes de aborto, procedentes de los Llanos Orientales⁸.

En 1973 se aisló el virus en un matadero de Santafé de Bogotá, de una vaca en lactancia, procedente de Tenjo, Cundinamarca, y a la cual se le observó vulvovaginitis pustular. El virus aislado se clasificó como cepa de campo 5946 y fue identificado por Villate y Cols del Laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias (LIMV) del Instituto Colombiano Agropecuario, ICA⁴ pero se desconoce si aún se conserva la cepa aislada.

Los resultados de susceptibilidad de las células al virus de referencia realizados durante este estudio son una demostración clara de que el no aislamiento no se debió a falta de susceptibilidad de las células utilizadas ni a deficiencias técnicas en el proceso de aislamiento.

Este estudio es la mayor encuesta virológica realizada para el virus de la RIB en Antioquia; es claro, por el origen de los animales muestreados, que los resultados corresponden a una amplia zona del norte del país. Estos resultados nos hacen volver a viejas conclusiones de los investigadores en esta área¹ En resumen, se cuestiona el resultado de una prevalencia serológica tan amplia y la ausencia de enfermedad. En nuestro grupo de trabajo del laboratorio de virología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia, estamos empeñados precisamente en tratar de resolver este enigma, y para el efecto es necesario continuar la búsqueda del virus a fin de caracterizarlo bioquímica y patológicamente.

Del presente trabajo, si bien no hay una conclusión definitiva, si hay una recomendación, y es la de continuar la búsqueda del virus en otras zonas del país como la Sabana de Bogotá, donde parecen haber algunas evidencias de enfermedad; si bien esto no se ha aclarado científicamente. En términos generales además, podríamos proponer, en principio, que el virus de la RIB no es un problema de la ganadería colombiana, esto sería una conclusión afortunada pero requiere demostración adicional, y es necesario también aclarar el origen de las serologías positivas, que bien podría deberse a una reacción cruzada o eventualmente a la circulación de algunas vacunas que ingresan al país en forma ilegal.

Bibliografía

- 1 Arboleda J.J., Bedoya D.A., Rodas J.D. Universidad de Antioquia, Medellín, 1991.
- 2 Estupiñán J., Ruiz A. Jiménez, J.M. y col. Marzo 1978, p.31.
- 3 Israel, B.A., Herber R., Gao Y. and Letchorth, G. Virology No. 188, 1992, p. 256-264.
- 4 Mariño, O.C., y col. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. Vol. 2, No. 4, Sept. 1980. p-241-248.
- 5 Merchant I.A. y Packer, R.A. Bacteriología y Virología Veterinaria. 3 ed. Zaragoza, España; Acibia, 1980, 763 p.
- 6 Mohanty, S.B. y Dutta S.K. Virología Veterinaria, México, Interamericana, 1983, p-412.
- 7 Ossa J.E. Principios de Virología Médica. Medellín, Universidad de Antioquia, 1987, 116 p.
- 8 Zuluaga, F.N. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. Vol. 2, No. 1, Mayo 1979, p-45-48.

.....

Infección *in vitro* de células del tipo endotelial por el virus de la leucosis bovina (VLB)

ALFONSO BARRETO, BIOL. L. CARLOS VILLAMIL, DMV, PhD; HARVEY CAMPO, BIOL, PhD;
VÍCTOR VERA, DMV, MSC. PROFESORES DEL POSGRADO EN SALUD Y
PRODUCCIÓN ANIMAL DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Introducción

El virus de la leucosis bovina (VLB) es un retrovirus asociado a la leucosis bovina enzoótica. El VLB principalmente infecta linfocitos B, sin embargo últimamente se ha demostrado que los linfocitos T CD8+ y CD4+ (9) y los monocitos (2) también son blancos naturales para el virus. Rovnak y Col. (7) encontraron provirus VLB integrados al genoma de células que dadas sus características corresponden a células endoteliales de vénulas poscapilares. Diferentes sistemas de cultivo celular han mostrado ser de utilidad para la propagación *in vitro* del VLB, principalmente cultivos primarios de linfocitos periféricos de ganado infectado, líneas celulares linfoblastoides y otras líneas celulares de origen bovino y ovino, entre las que sobresale la FLK-VLB. Con estos antecedentes el objetivo general de este trabajo fue presentar un modelo de células endoteliales para el estudio *in vitro* del virus de la leucosis bovina.

Metodología

Inicialmente se obtuvo un cultivo de células endoteliales de aorta bovina siguiendo la metodología descrita en (8). Para ello, se trajeron (juegos) vísceras de la planta de sacrificio de la Universidad Nacional y se aislaron las aortas que fueron lavadas en solución salina de Puck G y en presencia de antibióticos. Las células endoteliales fueron aisladas por medio de un raspado suave con bisturí, resuspendidas en medio (M199) con 20% de suero fetal bovino (SFB) de

crecimiento celular. Los cultivos fueron incubados a 37°C.

Posteriormente, los cultivos fueron enfrentados a linfocitos bovinos aislados de una vaca infectada con VLB y en desarrollo de linfocitos persistente, y a partículas virales libres de células obtenidas de la línea celular FLK-VLB e incubados 24 horas y 90 minutos, respectivamente. La evaluación de la infección se realizó por medio de la producción de antígeno viral (confrontación a sueros positivo y negativo de campo en inmunodifusión doble en gel de agarosa) y de la formación de sincitios (coloración de Giemsa) a partir de las células endoteliales infectadas.

Resultados

Los ensayos de infección se realizaron entre los pasajes tercero y cuarto del cultivo de células endoteliales de aorta bovina, que presentaba una morfología edoquinada típica para este tipo de células.

El antígeno producido a partir de las células endoteliales cocultivadas con los linfocitos infectados se enfrentó a sueros positivo y negativo de campo en la prueba de inmunodifusión doble en gel de agarosa. El antígeno viral debió concentrarse hasta obtener un 0.5% del volumen inicial de sobrenadante celular para que formara la banda de precipitación, mientras que el antígeno producido de la línea celular FLK como control positivo, dio un rendimiento del 1%. Los sincitios formados sobre las células endoteliales

infectadas por cocultivo con linfocitos, presentaban las características típicas previamente descritas (1), salvo que en algunas células los núcleos se encontraban arreglados en forma de anillo alrededor del citoplasma, característica que fue descrita en (3) para el modelo VLTH-1/células endoteliales de vena umbilical humana.

De esta forma se constituyó un modelo celular que puede tener aplicabilidad en el diagnóstico, por medio de la producción de un antígeno viral que a diferencia del obtenido de la línea FLK, esté libre de proteínas del virus de la diarrea viral bovina. De otra forma también puede servir para detectar animales infectados naturalmente a partir de la formación de sincitios después del cocultivo con linfocitos de sangre periférica. Por otro lado, el modelo permitió aislar virus de campo, que posteriormente pudo ser confrontado con las cepas virales de referencia. Además, dada la posible vinculación de este tipo celular en la infección natural, el modelo podrá ayudar a dilucidar la participación de las células endoteliales en los mecanismos de propagación (entrada al organismo, reservorio para la infección de linfocitos y monocitos), o de reducción (baja expresión viral responsable de la constante presencia de anticuerpos (10), de la presentación antigénica a linfocitos T CD8+ (4)) de la infección viral.

Finalmente, durante el desarrollo del trabajo se presentó una alteración morfológica caracterizada por unas proyecciones celulares radiales que generaron células similares a las de origen nervioso. Dicha alteración fue fuertemente incrementada 24 horas después del cocultivo con los linfocitos. Según la bibliografía (5,6) se hipotetiza que esta alteración es el producto de la secreción de proteínas de matriz extracelular.

Bibliografía

- 1 Diglio C.A. & Ferrer, J.F. 1976. Induction of syncytia by the bovine C-type leukemia virus. *Cancer Res.* 36:1056-1067.
- 2 Heeney, J.L., Valli, P.J.S., Jacobs, R.M. & Valli, V.E.O. 1992. Evidence for bovine leukemia virus infection of peripheral blood monocytes and limited antigen expression in bovine lymphoid tissue. *Lab. Invest.* 66:608-617.
- 3 HO, D.D. Rota, T.R. & Hirsch, M.S. 1984. Infection of human endothelial cells by human T-Lymphotropic virus type I. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 81:7588-7590.
- 4 Mager, A., Marengo, R., Mammericky, M. & Letesson, J.J. 1994. T cell proliferation response to bovine leukemia virus (BLV) identification of T cell epitopes on the major core protein (p-24) in BLV-infected cattle with normal haematological values. *J. of Gen. Virol.* 75:2223-2231.
- 5 McGuire, P.G. & Orkin, R.W. 1987. Isolation of rat aortic endothelial cells by primary explant techniques and their phenotypic modulation by defined substrato. *Lab. Invest.* 57:94-105.
- 6 Montesano, R., Orci, L. & Vassalli, P. 1985. Human endothelial cell cultures: Phenotypic modulation by leukocyte interleukins. *J. of Cel. Phis.* 122:424-434.
- 7 Rovnak, J., Casey, J.W., Boyd, A.L. Gonda, M.A. & Cockerell, G.L. 1991. Isolation of bovine leukemia virus infected endothelial cells from cattle with persistent lymphocytosis. *Lab. Invest.* 65:192-202.
- 8 Ryan, U.S. & Maxwell, G. 1986. Isolation, culture, subculture of bovine pulmonary artery endothelial cells: mechanical methods. *J. Tiss. Cult. Meth* 10:3-5.
- 9 Stott, M.J.L., Thormond, M.C., Dunn, S.J. Osburn, B.I. & Stott, J.L. 1991. Integrated bovine leukosis proviral DNA in T helper and T cytotoxic/suppressor lymphocytes. *J. of Gen. Virol.* 72:307-315.
- 10 Zandoment, R.O. Carrera-Zandoment, M. Esteban, E., Donawick, W. & Ferrer, J.F. 1992. Induction and inhibition of bovine leukemia virus expression in naturally infected cells. *Journal of General Virology* 73:1915-1924.

Diagnóstico serológico de la *parvovirus porcina* en granjas del municipio de la Unión, Antioquia

CARLOS A. ARCILA MARÍN, CARLOS O. HENAO; MÉDICOS VETERINARIOS EN EJERCICIO PARTICULAR.
SADOH MOLINA L., PROFESOR TITULAR DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Introducción

En los últimos años los problemas reproductivos en cerdos han causado pérdidas económicas en granjas comerciales de Colombia y principalmente en Antioquia (3). Estas alteraciones se deben particularmente a agentes infecciosos y condiciones

de manejo que la mayoría de los casos no son debidamente diagnosticadas y manejadas de manera inadecuada. Entre los agentes infecciosos a este nivel se encuentra implicado el *parvovirus porcino* (PPV), que en la actualidad se reconoce mundialmente como la principal causa infecciosa de fallas reproductivas

en cerdas (7).

La parvovirus porcina es una enfermedad poco conocida entre los porcicultores por no ser causa aparente de pérdidas económicas (1,5): pero al hacer un estudio retrospectivo en las cerdas que retornan al servicio, reabsorben, presentan fetos momificados, natimortos o abortos, puede verse como se alteran los parámetros reproductivos de la granja (1, 9).

En el municipio de La Unión, hasta donde nosotros conocemos, no se ha realizado un estudio sobre la existencia de parvovirus porcina, lo que hizo necesario realizar este trabajo de investigación el cual estableció la presencia de este agente por pruebas serológicas.

Para el efecto se tomaron 196 muestras de 5cc de sangre a partir de la vena auricular de 142 animales la obtención del suero se llevó a cabo por centrifugación de las muestras a 1.500 rpm/10' en el laboratorio médico de Unisadul del municipio de La Unión.

Los sueros fueron conservados en congelación en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia hasta el momento de la prueba.

Materiales y Métodos

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal, en el cual se determinó la distribución del porcentaje de sueros positivos a la parvovirus.

Inhibición de la hemoaglutinación

Los sueros fueron centrifugados a 1.500 rpm durante 10 minutos decantado e inactivado a 56°C durante 30 minutos. Luego empacaron en alícuotas de 0.5cc y se conservaron en congelación a -20°C hasta el momento del procesamiento. Para evitar inhibidores inespecíficos de la hemoaglutinación y hemaglutininas naturales, fueron tratados con caolín al 25% en una solución buferada clara durante 40 minutos agitando cada cinco minutos y posteriormente el caolín fue separado por centrifugación a 1.500 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se absorbió con eritrocitos de cobayo al 1% y se incubó durante 18 horas a temperatura de 4°C. Luego se centrifugó a 1.500 rpm por 10 minutos y finalmente el sobrenadante se empaca en alícuotas que se guardaron en congelación hasta el momento de la prueba.

En la prueba de HI se usaron placas para microtitulación de 96 pozos de fondo en U. Se realizaron diluciones dobles a partir de 1:200 hasta

1:102.400, a cada una de las cuales se adicionaron cuatro unidades hemoaglutinantes (4 UH) de antígeno (Suvaxyn Parvo 2) y se incubaron a temperatura ambiente durante una hora. Posteriormente fueron agregados los eritrocitos de cobayo al 0.5% a cada pozo y se incubó a 4°C durante 14 a 18 horas. El título fue considerado el recíproco de la dilución más alta donde se inhibió completamente la hemoaglutinación. Las muestras que no presentaron inhibición de la hemoaglutinación en la dilución inicial 1:200 fueron consideradas negativas (9).

Resultados

Se encontraron 112 animales con anticuerpos contra PPV correspondiendo a un 59.25% (112/189) del total de la población muestreada. 102 muestras positivas procedían de hembras (102/166) y 10 de machos (10/23).

Los títulos de anticuerpos variaron entre 1:400 y 1:102.400. El mayor número de reactores positivos se encontró en el rango de 1:1.600 a 1:25.600 correspondiendo a un 74.09% de reactores positivos, siendo el título 1:6.400 (24/112) el más frecuente.

Discusión

El alto porcentaje de sueros positivos encontrados 59.29% (112/189) es acorde con investigaciones anteriores realizadas en Colombia, donde se ha obtenido un 87.8% y un 47% de positividad a PPV en granjas mixtas y mataderos (3, 4, 5, 6).

La presencia de los títulos de anticuerpos contra el PPV es un indicador del contacto natural del virus con la población porcina, por cuanto no se han realizado inmunizaciones previas, además, nos muestra que la infección es endémica en la zona, lo que concuerda con la alta prevalencia de infección en la zona concuerda con la alta prevalencia a nivel mundial (6, 8, 9, 11).

Del número de granjas muestreadas, dos dieron títulos negativos contra PPV lo que puede deberse a su localización geográfica, ya que son piaras bastante aisladas entre sí, hay escaso flujo de animales y buen manejo integrado.

Se observó que a mayor edad y número de partos existe mayor número de animales positivos con títulos altos (1:25.600) lo que concuerda con análisis serológicos de hembras en reproducción (10).

En un futuro próximo se hace necesario realizar otros estudios con el objetivo de aislar y caracterizar patológicamente el agente causal de la PPV en esta

zona de Antioquia, y consecuentemente llevará a cabo un plan de prevención consistente en prácticas de vacunación y manejo integral de los animales destinados a reemplazos reproductivos. Estos planes deben ser realizados en forma individual para cada piara para así establecer parámetros propios y planes puntuales.

Bibliografía

- 1 Gadd, John. Is this the end of parvo. En: Pigs Misset. Enero-Febrero 1990. p-24-25.
- 2 Gaviria B.G. Conceptos básicos sobre tamaño de muestra. Medellín, Universidad de Antioquia, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 1986. 15p.
- 3 González G., Guillermo; Torres T., Miriam. Evidencia Serológica de Infección por Parvovirus en cerdos de sacrificio. En: Revista ICA. Vol. 21, No. 2, 1986. p-80-85.
4. González Guillermo; Torres T., Miryam. Aislamiento de parvovirus porcino (PVP) de piaras afectadas por trastornos reproductivos con evidencia serológica de infección. En: Revista ICA. Vol. 22 No. 2, 1987; p-55-58.
- 5 González G., Guillermo; Torres T., Myriam. Serología de las infecciones por pseudorrabia y parvovirus en piaras de ceba de Antioquia y mixtas del Valle del Cauca. En: Revista ICA. Vol. 22, No. 2, 1987; p.70-74.
- 6 González L., Alfredo; Mejía A., Bernardo. Parvovirus porcino prevalencia serológica en la zona sur del valle del Cauca. P.P. En: I Congreso Nacional de Porcicultura. 1995, Santafé de Bogotá. Memorias ACOMVEC, 1995; p. 16-21.
- 7 Hill, Howard. Interpretation Serological Results in Some Important Swine Diseases. En: Swine Consultant. 1985, p. 1-70.
- 8 Janer C., E.R. Características de la parvovirus porcina. En: Veterinaria, Vol. 108, No. 26, 1990. p.625-629.
- 9 Joo, H.S.; Johnson, R.H. Porcine Parvovirus: A Review. En: The Veterinary Bulletin. Vol. 46, No. 9, 1976; p. 653-660.
- 10 Mengelin, W.L. Característica y control de la parvovirus en la producción porcina. En: II Curso Internacional de Porcicultura, 1993, Medellín. Memorias. Medellín Colveza, 1983. p.1-13.
- 11 Rico G., Silvia; Sierra A., Guillermo. Evidencia serológica del parvovirus porcino en la Hacienda El Progreso. En: I Congreso Nacional de Porcicultura. Memorias Acomvec, Santafé de Bogotá, 1995; p.47-52.

La serología y la inmunohistoquímica como métodos alternativos en el diagnóstico de la leptospirosis*

CÉSAR DÍAZ R., D.V. MSc, UNIVERSIDAD CUNDINAMARCA Y LUIS CARLOS VILLAMIL J., DMV. MSc. PhD
UNIVERSIDAD NACIONAL Y VÍCTOR VERA E INÉS LÓPEZ DE HERRERA, DMV. MSc, UNIVERSIDAD
NACIONAL Y BACTERIOLOGA. MSc. ICA-CEISA

Introducción

La leptospirosis es una entidad infecciosa de amplia distribución en las explotaciones del país, caracterizada por abortos, mortinatos, infertilidad y mastitis clínica y aguda (1,3,4). La transmisión al humano puede ser de tipo directo o indirecto por aguas, alimentos y manipulación de animales infectados con presentación de un síndrome febril que puede llegar a ser mortal (1). En nuestro país se ha diagnosticado la enfermedad por sintomatología y serología basada en la prueba de microaglutinación, la cual no es sensible para detectar casos agudos o crónicos y sólo permite la detección de Igm (1,2).

Metodología

Se desarrollaron y evaluaron las técnicas

serológicas de contrainmunolectroforesis (CIE) y anticuerpos fluorescentes indirectos (AFI) y las técnicas inmunohistoquímicas de inmunoperoxidasa indirecta (IPI) y anticuerpos fluorescentes directos (AFD) para uso diagnóstico. Como prueba de referencia se trabajó la técnica de microaglutinación (MA) para 16 serovares de referencia.

Los serovares trabajados fueron *L. hardjoprajitno*, *pomona*, *canícola*, *icterohaemorrhagiae*, *grippotuphosa*, *autumnalis*, *ballum* y *bratislava*. De cada serovar se elaboraron antisueros en conejo, cada uno de los antisueros y una mezcla de ellos, garantizando un título de 1:6.400, fueron purificados por precipitación y cromatografía de intercambio iónico y marcados con isotiocianato de fluoresceína (ITCF). Los 8 conjugados se purificaron por

* Este trabajo hace parte del estudio prospectivo de limitantes de salud en ganado lechero en las áreas de la meseta de la Sabana de Bogotá y del Valle de Ubaté financiado por Conciencias y el Cindec.

cromatografía de filtración y fueron usados en las técnicas de AFD monovalentes y AFI polivalentes (3). Se trabajó con alícuotas de la mezcla como primer anticuerpo para la prueba de IPI, como segundo anticuerpo se elaboró un conjugado de anti IgG de conejo en cabra, purificado por cromatografía de afinidad (Sepharosa-proteína A) marcado con peroxidasa de rábano para uso en láminas histológicas.

El antígeno de CIE se elaboró a partir de un extracto liposoluble y otro hidrosoluble de leptospiras, el corrido electroforético se realizó con el suero en el lado aniónico y el antígeno en el lado catiónico a una diferencia de 10 V por 90 minutos. Como antígeno para AFI se utilizaron cultivos de leptospira fijados al calor seco y acetona. Como primer anticuerpo se empleó una dilución 1:100 del suero bovino problema y como segundo anticuerpo un conjugado de anti-IgG bovina y obtenido en conejo y marcado con ITCF. Para evaluar las técnicas se colectaron al azar 30 sueros de bovinos de abasto (colectándoles suero) para ser probados por MA, CIE y AFI, además, un riñón para intento de aislamiento (2), testículo y epidídimo u ovario y útero no gestante según el caso. De cada tejido se tomó una muestra para IPI conservada en formalina tamponada y un gramo del mismo para realizar improntas para AFD.

Resultados

Como resultados positivos se tomaron títulos serológicos $\geq 1:100$ para MA, presencia de banda nítida por la técnica de CIE, visualización fluorescente de la morfología de la leptospira por AFI y AFD y coloración café rojiza de los tejidos por la técnica de IPI. De los 30 cultivos de riñón se aislaron dos serovares preclasificados como harjoprajitno y canícola. Los sueros de estos animales fueron reactivos para las pruebas de MA, AFI y CIE y sus tejidos positivos para las pruebas polivalentes de AFI e IPI y para las pruebas monovalentes correspondientes.

La reactividad serológica por la técnica de MA fue del 90% (27/30) siendo las mayores para icterohaemorrhagiae (76.6%), hardjoprajitno (53.3%), serjoe (20.0%) pyrogenes, tarassovi y ballum (10.0%

c/u). La técnica de CIE reportó una sensibilidad del 75% y una especificidad del 54.16% con una concordancia diagnóstica con respecto a MA del 64.58%. La reactividad serológica fue del 74% siendo el mayor reactante hardjoprajitno (67%) seguido por icterohaemorrhagiae (33%), pomona (13.3%) y canicola (6.6%). Para AFI la reactividad fue del 96.7% (29/30), siendo el mayor reactante hardjoprajitno con el 76.7% seguido por icterohaemorrhagiae con el 73.3%. El mayor índice de reactividad para hardjoprajitno estuvo dado por el reconocimiento de cinco animales que presentaron solamente títulos de 1:50 a la prueba de MA.

La técnica de IPI fue la de mayor sensibilidad/especificidad en el estudio con 91.66% y 95.83%, respectivamente. Su concordancia con el aislamiento y la MA fue del 93.75%. Por IPI se detectaron 13 tejidos positivos a leptospira correspondientes a 10 animales (33.33%). La técnica detectó la presencia de leptospira en 9 riñones, un útero, una unión útero-tubal y dos testículos bovinos. La prueba de AFD polivalente mostró una sensibilidad del 83.33% y una especificidad del 91.67% con una concordancia diagnóstica del 87.50% con respecto al aislamiento y la prueba de MA. La técnica detectó la presencia de 8 tejidos positivos a antígenos de leptospira procedentes de 7 animales. Se detectó la presencia en 7 riñones, un útero no grávido y una unión útero tubal.

Bibliografía

- 1 British Veterinary Cattle Association. 1992. Guidelines for the diagnosis and control of *Leptospira hardjo* infection in cattle. Technical notes. U.K.
- 2 Myers Donald. 1987. Manual of laboratory methods for the diagnosis of leptospirosis. Technical Notes No. 30. Pan American Zoonosis Center.
- 3 Raoult D., Bres P. & Berenton G. 1989. Serologic Diagnosis of Leptospirosis comparisson of line-blot and immunofluorescence techniques with the genus specific microscopic agglutination test. J. Infect Dis. 160 (4): 734-755.
- 4 Smith C.R., Ketterer P.J., McGowan M.B. & Corney B.G. 1994. A review of laboratory techniques and their use in the diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection in cattle. Aust Vet J. 71(9): 290-294.

Caracterización electroforética e inmunológica de una cepa de campo del virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina (RIB) y su comparación con cepas de referencia*

DAMARIS MOLANO, MV; LUIS RODRÍGUEZ, MV;
GLORIA RAMÍREZ, MV, MSc; LUIS C. VILLAMIL, MV, PhD; VÍCTOR VERA, MV, MSc

La rinotraqueitis infecciosa bovina (RIB) es una enfermedad altamente contagiosa producida por el herpesvirus bovino-1 que está presente en todo el país y que ocasiona grandes pérdidas económicas.

El presente trabajo pretende establecer la interrelación entre los componentes antigénicos de tres cepas virales del agente causante de la RIB, una de las cuales corresponde a una cepa de campo aislada en el posgrado de producción y salud animal, de un toro persistentemente infectado. Para esto se realizó la caracterización electroforética de las principales proteínas, usando geles de poliacrilamida al 7.5 y 8%. Posteriormente se llevaron a cabo pruebas inmunológicas como el inmunodot y el western blot.

Procedimiento

Purificación viral. La purificación de los virus se realizó a partir de cosechas en células MDBK infectadas. Estos sobrenadantes, al igual que un control negativo de células sin infectar fueron sometidos a precipitación con polietilenglicol, ultrafiltración y clarificación. Posteriormente estas muestras fueron puestas sobre un colchón de tartrato de potasio al 25% y ultracentrifugadas a 90.000 por 2 horas, el sedimento fue ultracentrifugado a 140.000 por 2 horas. De esta forma fue posible obtener una preparación de virus de RIB libre del virus de la diarrea viral bovina y casi de un 100% de contaminantes celulares. Con el fin de determinar la calidad y especificidad de los preparados virales, se produjeron sueros hiperinmunes en conejos contra las tres cepas y contra el sobrenadante de células sin infectar (control negativo), los cuales fueron empleados junto con sueros de campo de bovinos positivos y negativos a RIB en las pruebas inmunológicas.

Resultados

Caracterización electroforética de proteína. En todos los geles corridos se presentó el mismo patrón de migración para las tres cepas estudiadas y fue posible reconocer las principales glicoproteínas virales que coinciden con los reportados en la literatura para las proteínas mayores del HVB-1 observadas en este estudio. Se detectaron las bandas que corresponden a la glicoproteína gI con pesos moleculares de 125K, 74k y 52.7k. La banda correspondiente a la gIII se detectó en este estudio como 96k y la gIV presentó bandas correspondientes a los pesos 146 y 77k.

Pruebas inmunológicas

En la prueba de Western Blot fue posible observar que los sueros de los conejos inoculados con las cepas virales reaccionaron reconociendo las principales proteínas de las diferentes cepas. El suero de campo positivo a RIB reconoció nueve proteínas (entre las que están las seis proteínas de interés para este trabajo) que coinciden con las visualizadas en la infección experimental (145k, 125k, 97k, 77k, 74, 52k), en todos los casos, a pesar de haber diferencias, se reconocieron los mayores componentes antigénicos descritos para el HVB-1.

Conclusiones

En este estudio se demostró que la cepa de campo trabajada presenta características antigénicas y patrón electroforético de proteínas compatibles con la reportada para el HVB-1, siendo estas similares a las obtenidas con las dos cepas de referencia empleadas.

* Este trabajo forma parte del proyecto Estudio prospectivo de limitantes de salud en ganado lechero en las áreas de la meseta de la Sabana de Bogotá y Valle de Ubaté auspiciado por Colciencias.

Se logró la detección de las tres principales glicoproteínas del HVB-1 y se demostró el reconocimiento inmunológico de éstas, por antisueros específicos y suero bovino de campo positivo a RIB, contribuyendo este hecho en la ratificación de la cepa de campo como HVB-1.

Empleando la metodología de colchones de tartrato de potasio al 25% después de ultrafiltración y precipitación con PEG 6.000, fue posible purificar tanto la cepa de campo como las dos cepas de referencia de RIB, de la contaminación con proteínas celulares y virus de DVB, lo cual resulta de gran utilidad para procedimientos en los que se requiera evitar factores y componentes ajenos al virus, mejorándose así la exactitud y confiabilidad de los estudios.

El HVB-1 ha sido considerado como modelo en el estudio de los herpesvirus, por lo que este trabajo podría aportar bases a futuros trabajos relacionados con este u otros herpesvirus.

Es importante conocer más acerca de las características de los virus de la RIB, tanto a nivel de laboratorio como de campo, para establecer los patrones de comportamiento para las cepas que están

interactuando en nuestro medio de forma que se puedan llegar a diseñar inmunógenos cada vez mejores y paneles de monoclonales específicos que puedan ser de ayuda en el diagnóstico y manejo de la enfermedad.

Bibliografía

- 1 Babiuk, L. L'Italien, J.L., Van Drunen Littel Van Den Hurk, S., Zamb, T., Lawman M.J. Hughes G., Gifford, G.A., 1987. Protection of cattle from Bovine Herpesvirus Type-1 (BHV-1) Infection by Immunization with individual Viral Glycoproteins. *Viro*. 159: 57-66.
- 2 Fitzpatrick, D., Babiuk, L., Zamb, T. 1989. Nucleotide sequence of Bovine Herpesvirus Type 1 Glycoprotein gIII, a Structural Model for gIII as a new Member of the Immunoglobulin Superfamily, and Implications for the Homologous Glycoproteins of Other Herpesviruses. *Virol*. 173:46-57.
- 3 Hernández, A. L. 1991. Caracterización de las proteínas antigénicas del virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) y su aplicación en inmunoensayos. Tesis M.Sc. Universidad Nacional de Colombia.
- 4 Van Drunen Littel, Van Den Hurk, S., Van Den Hurk, J. Gilchrist, J. E., Misra, V., Babiuk, L. A. 1984. Interactions of Monoclonal Antibodies and Bovine Herpesvirus-1. (bhv-1) Glycoproteins. Characterization of their Biochemical and Immunological Properties. *Vi*.

Análisis multifactorial del efecto de la aloinmunoterapia bajo apareamientos consanguíneos, no consanguíneos e híbridos, en conejos

MALDONADO JG. FINANCIADO POR COLCIENCIAS, PROYECTO 1115-05-040-91. BOTERO M, PROFESOR FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y DE ZOOTECNIA, Y PROGRAMA DE REPRODUCCIÓN, UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA.

OSSA JE, PROFESOR DE LA FACULTAD DE MEDICINA Y COORDINADOR DEL PROGRAMA DE REPRODUCCIÓN, UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

Introducción

En el programa de reproducción se están adelantando proyectos de investigación en el área de la inmunología de la reproducción en humanos y en animales (1). Uno de los objetivos ha sido buscar un modelo animal doméstico para investigar con profundidad las bases del compromiso del sistema inmune en la reproducción (2), que a su vez permita aplicaciones de dichos conocimientos en la explotación pecuaria (3). Los estudios previos hechos en conejos, mostraron un efecto de la aloinmunoterapia (AIT) en el peso de la camada

al nacer (4) y un efecto aparentemente perjudicial de la AIT al comparar los hallazgos a los 10 días posmonta con los hallazgos al parto (manuscrito en preparación). Sin embargo, en estos experimentos piloto no se controlaron fuentes de variación. Por tanto, el presente estudio se diseñó para evaluar el efecto de la AIT bajo tres condiciones reproductivas: consanguínea, normal e híbrida, con el fin de probar el efecto de la aloinmunoterapia bajo un mayor o menor grado de similitud genética entre los reproductores y de corregir algunas fuentes de variación de los estudios previos.

Metodología

Sesenta conejas vírgenes de la raza nueva zelandia blanco recibieron tres inoculaciones subcutáneas de células mononucleares de cinco donantes (AIT) y se destinaron al azar a tres grupos: veinte apareadas con el padre (consanguíneo), 20 con un macho diferente al padre (normal), y 20 con un macho de otra raza (híbrido). Diez conejas de cada grupo se sacrificaron a los 10 días posmonta para evaluar el número de fetos; y las 10 restantes se evaluaron al momento del parto para medir el tamaño y peso de la camada al nacer. Como controles se evaluaron 10 conejas por grupo experimental, inoculadas con solución salina. Después de la tercera inoculación las montas se hicieron con machos nueva zelandia blanco para los grupos consanguíneos y normal; y machos nueva zelandia negro x rex, para los grupos híbridos. Los donantes se sangraron por punción intracardiaca con jeringa heparinizada; las células se obtuvieron por centrifugación en gradiente de Ficoll-hypaque densidad 1.077 (Hystopaque; Sigma, St Louis MO) y se administraron en dosis individuales (5-12 x 10⁶/ml). Los resultados se evaluaron por análisis multifactorial incluyendo como efectos principales: el tipo de monta (n=3), y el peso al servicio (1-3). El número de nacidos vivos se incluyó como covarianza para el peso al nacer. El éxito gestacional se evaluó por prueba exacta de Fisher.

Resultados

En la tabla 1 se presentan los porcentajes de éxito gestacional, medidos como número de fetos en

conejas evaluadas a los 10 días posmonta o como número de gazapos nacidos totales en conejas evaluadas al momento del parto. A los diez días posmonta el éxito gestacional fue significativamente mayor en el grupo de monta normal tratado con AIT (p<0.05) y una disminución significativa en el grupo normal tratado con AIT (p<0.05). Cuando se unieron los datos de los 10 días y del parto, se encontró un aumento significativo del éxito gestacional en el grupo de monta consanguínea tratado con AIT (p<0.05).

Tabla 1

Porcentajes de gestación en conejas sometidas a tratamiento con aloimmunoterapia

EDAD DE EVALUACIÓN	TRATAMIENTO	% CONSANGUÍNEO	% NORMAL	% HÍBRIDO
10 DÍAS	S. SALINA	70	40 ^a	60
POS Monta	ALOIMMUNOTERAPIA	80	90 ^a	60
30 DÍAS	S. SALINA	30 ^b	100 ^b	40
(PARTO)	ALOIMMUNOTERAPIA	80 ^b	50 ^c	30

a,b,c. Diferencias estadísticas significativas (p<0.05) entre grupos.

Para el tamaño y peso de la camada se encontraron algunas variaciones entre tratamientos y tipo de monta, pero las diferencias entre los grupos no fueron estadísticamente significativas (p>0.05) (véase la tabla 2).

Tabla 2

Medias mínimo-cuadráticas (\pm sem) para el tamaño y peso de la camada en conejas tratadas con aloimmunoterapia^a.

Tipo monta	Tratamiento	Número de fetos	Nacidos totales	Nacidos vivos	Peso de la camada (gr)
Consanguínea	S.Salina	7.9 \pm 0.9	7.4 \pm 1	6.3 \pm 1.5	337 \pm 85
	AIT	8.2 \pm 0.8	7.8 \pm 0.7	5.3 \pm 1	310 \pm 56
Normal	S.Salina	8.2 \pm 1.4	7.5 \pm 1	3.8 \pm 1.4	223 \pm 80
	AIT	7.9 \pm 0.8	8.3 \pm 1	4.7 \pm 1.4	409 \pm 114
Híbrida	S.Salina	10.9 \pm 1.5	7.5 \pm 1	5.9 \pm 1.5	307 \pm 76
	AIT	6.7 \pm 1.3	8.5 \pm 1	8.4 \pm 1.5	463 \pm 23

a. Diferencias estadísticas no significativas (p > 0.05) para todos los parámetros.

Discusión

Nuestro interés en el conejo para el estudio de la inmunología de la reproducción se ha fundamentado en la facilidad de manejo y economía del modelo, en su condición de especie politoca, y en su corto intervalo reproductivo (5). Repetidamente los resultados han mostrado patrones de respuesta inesperados y de difícil interpretación, lo cual atribuimos inicialmente a la falta de control de algunas variables y a factores de confusión como la palpación abdominal para diagnosticar gestación (6). Precisamente, para controlar este factor, se diseñó el presente estudio donde, si bien se observa un efecto benéfico del tratamiento en el grupo normal evaluado a los 10 días posmonta y en el grupo consanguíneo evaluado al momento del parto (véase tabla 2), no surge aún un patrón de respuesta que permita proponer generalizaciones.

Un factor desconocido para los autores al momento de iniciar los estudios en conejos, es la gran variabilidad de los índices de reproducción del conejo. Adicionalmente, podríamos estar enfrentados a idiosincrasias de la especie cunícola, respecto de

otras especies de mamíferos como el hombre y el ratón, en lo que respecta a los mecanismos inmunológicos de la reproducción, las cuales tuvieran algún efecto en nuestras aproximaciones experimentales. Frente a este trasfondo de variación solamente un experimento masivo, es decir, que involucre muchas observaciones, podría alojar alguna conclusión sobre el verdadero efecto de la aloinmunoterapia en la reproducción del conejo.

Bibliografía

- 1 Ossa JE; Cadavid AP, Maldonado JG. En: Inmunología de la reproducción. OSSA JE, Carmona J., Cadavid AP, editores. De. Universidad de Antioquia, 1993.
- 2 Ossa JE, Cadavid AP, Maldonado JG. Medical Hypothesis 1994; 42:193-197.
- 3 Maldonado JG, Ossa JE. En: Inmunología de la reproducción. Ossa JE, Carmona J, Cadavid AP, editores. De. Universidad de Antioquia, 1993.
- 4 Maldonado JG, Hincapié A, Agudelo G. y colaboradores. Rev. Col. Ciencias Pec. 1993; Supl.
- 5 García F. Baselga M, Pla M. An INIA/Ser Ganadera 1983; 18:11-27.
- 6 Maldonado JG. Tesis de Magister. facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Medellín, 1993.

Encuesta serológica para detectar anticuerpos contra el virus de la *inmunodeficiencia felina* en dos albergues del Valle de Aburrá, 1995

LIA ISABEL OROZCO, JAIME H. LONDOÑO Y LEÓN LOZANO: ESTUDIANTES PROGRAMA MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA. GILDARDO ALZATE GÓMEZ, PROFESOR TITULAR DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

Introducción

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida felina (Sida_f), se diagnosticó por primera vez en 1986 en Estados Unidos (2, 3, 4) y desde entonces en muchos otros países a nivel mundial. Aunque su agente etiológico es diferente al del sida humano (es un virus específico de especie), tiene mucha similitud en cuanto su comportamiento en el huésped (7), lo cual lo hace un buen modelo de estudio del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (2, 3).

Por sus características epidemiológicas, principalmente la transmisión por mordeduras (3, 4, 8, 9), este virus puede ser fácilmente transmitido de los gatos importados a los gatos nativos, por lo tanto es posible encontrarnos ante la presencia de un nuevo

virus en el medio.

La inexistencia de una vacuna y de un tratamiento eficaz contra esta enfermedad hace necesario tomar medidas preventivas. Una encuesta serológica mediante la técnica de elisa es el punto de partida para rastrear la presencia del virus, y comenzar un proceso de identificación de animales seropositivos que nos lleven a trazar planes de prevención y control.

Materiales y método

Se analizaron 60 muestras de plasmas de gatos elegidos al azar de los albergues de la Sociedad Protectora de Animales (SPA) y de la Asociación Defensora de Animales (ADAN).

Muestra. De cada animal se tomaron 2cc de sangre de la vena cefálica en tubos de ensayo con anticoagulante (EDTA), se transportaron al laboratorio de microbiología de la facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad de Antioquia, allí se centrifugaron a 1.500 revoluciones por minuto durante 10 minutos, se recuperó el sobrenadante (plasma), se empacó en viales de 0.5cc debidamente identificadas y se guardaron a una temperatura de -20 grados centígrados hasta el momento de su procesamiento.

Técnica de elisa. Para el montaje de esta prueba se utilizó un kit comercial (Snap-Combo FeLV-Ag/FIV-Ac, IDEXX Laboratories, Maine, USA). El

dispositivo snap posee una ventana de resultados con indicadores para anticuerpos al VIF, antígeno al VLF, control positivo y control negativo. La muestra problema era positiva al VIF cuando se formaba un botón color azul al lado izquierdo del dispositivo.

Resultados

En esta investigación se halló una prevalencia total para el VIF de 41.67% (25/60). De los 60 gatos muestreados el 25% (15/60) de los positivos pertenecían al albergue Adán y el 16.67% (10/60%) a la Spa (Tabla 1).

Tabla 1

Distribución porcentual de los gatos positivos y negativos al VIF por la prueba de elisa de acuerdo con el albergue de procedencia. 1995

Albergue	Positivo		Negativo		Total	
	Número	%	Número	%	Número	%
Adán	15	25.00	15	25.00	30	50.0
Spa	10	16.67	20	33.33	30	50.00
Total	25	41.67	35	58.33	60	100.0

En la Tabla 2 se observa que de los animales muestreados el 21,67% (13/60) fueron machos seropositivos y el 20% (12/60) hembras seropositivas al VIF.

Tabla 2

Distribución porcentual de los gatos positivos y negativos al VIF por la prueba de elisa de acuerdo con el sexo. 1995

Sexo	Positivo		Negativo		Total	
	Número	%	Número	%	Número	%
Machos	13	21.67	9	15.00	22	36.67
Hembras	12	20.00	26	43.33	38	63.33
Total	25	41.67	35	58.33	60	100.00

La tabla 3 muestra que el 15% (9/60) de los gatos fueron menores de 5 años y el 26.67% (16/60) mayores de 5 años seropositivos al VIF.

Tabla 3

Distribución porcentual de los gatos positivos y negativos al VIF por la prueba de elisa de acuerdo con el grupo etéreo. 1995

Grupo etéreo	Positivo		Negativo		Total	
	Número	%	Número	%	Número	%
Menor de 5	9	15.00	27	45.00	36	60.00
Mayor de 5	16	26.67	8	13.33	24	40.00
Total	25	41.67	35	58.33	60	100.00

La tabla 4 muestra que el 36.67% (22/60) de los gatos analizados fueron seropositivos al VIF y estaban reproductivamente activos y solo el 5% (3/60) estaban inactivos.

Tabla 4

Distribución porcentual de los gatos positivos y negativos al VIF por la prueba de elisa según el estado reproductivo. 1995

Estado Reproduc	Positivo		Negativo		Total	
	Número	%	Número	%	Número	%
Activo	22	36.67	32	53.33	54	90.00
Inactivo	3	5.00	3	5.00	6	10.00
Total	25	41.67	35	58.33	60	100.00

De acuerdo con la procedencia de los gatos antes de llegar al albergue el 13.33% (8/60) fueron callejeros y el 28.33% (17/60) fueron gatos caseros seropositivos (Tabla 5).

Tabla 5

Distribución porcentual de los gatos positivos y negativos al VIF por la prueba de elisa según su procedencia antes de llegar al albergue. 1995.

Procedencia	Positivo		Negativo		Total	
	Número	%	Número	%	Número	%
Callejero	8	13.33	20	33.33	28	46.67
Casero	17	28.33	15	25.00	32	53.33
Total	25	41.66	35	58.33	60	100.00

Discusión

En el presente estudio se encontró una seropositividad al VIF por la prueba de elisa del 41.67% (25/60) de los gatos muestreados. Estos resultados son relativamente altos comparados con los obtenidos en México 6.6% (2/30), Italia 12.5% (55/439) y en Santafé de Bogotá 9.33% (7/75) (5, 6, 1).

La prevalencia obtenida en este trabajo 41.67%, posiblemente se debió al tipo de población objeto de estudio pues se trata de gatos que viven hacinados y en contacto permanente donde las peleas son frecuentes, facilitándose así la transmisión del virus (3, 4, 7, 9).

De acuerdo a los resultados positivos obtenidos según el sexo (ver Tabla 2) aparentemente es similar al porcentaje de hembras y machos seropositivos al VIF, pero debe tenerse en cuenta que el número de hembras que contribuyó a la muestra es muy superior al de machos, por lo tanto en el presente estudio no se puede afirmar que la enfermedad se presente más en un sexo que en otro, como lo reporta la literatura (3, 7, 9).

Como se observa en la Tabla 3, el 15% (9/60) de los gatos seropositivos fueron animales menores de 5 años y el 26% (16/60) mayores de 5. Esto es similar a lo reportado en otras investigaciones en las que se

afirma que el virus se presenta más en animales mayores que en los jóvenes (1, 3, 7, 9).

En cuanto al estado reproductivo sólo el 5% (3/60) de los gatos estaban castrados, mientras que el 36.67% (22.60) fueron animales enteros, todos ellos positivos al VIF, lo que concuerda con la bibliografía (1, 3, 7, 9), la cual describe que los gatos enteros son más propensos a salir de casa y a pelearse, lo que los convierte en blanco del virus. Debido a esto se recomienda la castración, tanto en machos como en hembras, para disminuir los riesgos de infección.

Respecto a la procedencia anterior al albergue de estos gatos se observa en la Tabla 5 que el 13.33% (8/60) fueron gatos seropositivos callejeros y el 28.33% (16/60) procedían de casas. Esto no concuerda con lo reportado en otros estudios, pues se dice que son más propensos a padecer la enfermedad los gatos con hábitos callejeros (3, 7, 9), sin embargo para este estudio no tiene mucha significancia, pues de cualquier modo todos los gatos que llegan al albergue, dadas las condiciones de hacinamiento, tienen la posibilidad de infectarse de cualquier enfermedad, por tanto no es posible afirmar en este estudio qué tipo de gato introdujo la enfermedad a los albergues.

Considerando el manejo de la población y las características de transmisión del virus (heridas en peleas), es muy factible que la prevalencia en estos albergues se mantenga alta, entonces se debe considerar también la posibilidad de que en la ciudad de Medellín exista una prevalencia significativa, teniendo en cuenta que a los albergues llegan constantemente personas de diferentes partes de la ciudad con el propósito de adoptar gatos de diferentes edades que probablemente pueden estar infectados con el VIF. La facilidad de transmisión de este virus y la poca tradición cultural de tener los gatos encerrados en los hogares, son dos factores definitivos en la epidemiología del virus en nuestro medio.

Es importante analizar que los 25 gatos positivos al VIF, 16 presentaron una serie de signos clínicos como alopecias, dificultad respiratoria, diarreas y otros problemas en piel, además algunos presentaron un estado general deteriorado que aún siendo signos muy inespecíficos, como lo reporta la literatura (4),

son compatibles con la inmunodeficiencia que produce este virus en el organismo del animal. Sin embargo debemos observar que hay animales seropositivos completamente asintomáticos, lo que hace indispensable llevar a cabo pruebas diagnósticas con el fin de tener más certeza sobre el estado inmunológico de los gatos que llegan a consulta.

Debido a la existencia del kit comercial de elisa para detectar reactores positivos o negativos al VIF se considera conveniente realizar futuras investigaciones en poblaciones más grandes con el fin de conocer mejor la seroepidemiología de esta entidad en nuestro medio.

Bibliografía

- 1 Arcila Ricardo; Martínez Herbert. Hallazgos serológicos para el VIF en Santafé de Bogotá. Santafé de Bogotá, 1993. Tesis, médico veterinario de la Universidad de la Salle.
- 2 Bennett, M. et al. Prevalence of antibody to feline immunodeficiency virus in some cat populations. En: *The Veterinary Record*. Vol. 124 (1989); pág. 397-398.
- 3 Courchamp Frank. et al. El sida del gato y su virus. En: *Mundo Científico*. Vol. 14, No. 151 (1994); pág. 926-931.
- 4 Gardner, Stephen A. Current concepts of Feline Immunodeficiency Virus Infection. En: *Veterinary Medicine*. Vol. 86, No. 3, 1991.
- 5 Mondragón, María E. Síndrome de inmunodeficiencia adquirido felino: Hallazgos en el empleo de la prueba de elisa en treinta gatos de la ciudad de México sospechosos de padecer la enfermedad. México, D. F. (1992). Tesis, médico veterinario zootecnista, Universidad Nacional Autónoma de México.
- 6 Peri, Enzo V. et al. Seroepidemiological and clinical survey of feline immunodeficiency virus infection in northern Italy. En: *Veterinary Immunology and Immunopathology*. No. 40 (1994); pág. 285-297.
- 7 Sánchez G. Alba. Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida Felina (SidaF), reporte de un caso clínico. En: *XVII Congreso Nacional de Médicos Veterinarios y Zootecnistas*. Ibagué, 1992.
- 8 Sparger, Ellen E. Current Thoughts on Feline Immunodeficiency Virus Infections. En: *The Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice*. W.B. Saunders Company. Vol. 23 No. 1 (1993); pág. 173-191.
- 9 Thomas Jan and Robinson, Wayne. Infección por el virus de la inmunodeficiencia felina. En: *Waltham Focus*. Vol. 5, No. 2 (1995); pág. 24-30.

Determinación de los niveles de inmunoglobulina (Ig G) contra *Toxoplasma gondii* en una población canina del Departamento de Antioquia

JOSÉ ROBERTO RAMÍREZ OCAMPO. MÉDICO VETERINARIO, INDEPENDIENTE. S LILIAN CAÑAS. PROFESOR TITULAR FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA S SADOH MOLINA. PROFESOR TITULAR FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA.

Introducción

La toxoplasmosis es una patología de distribución mundial, afecta al hombre y a diferentes especies animales domésticos y salvajes, incluyendo mamíferos, aves y algunos reptiles /4, 5, 6).

Aunque el *Toxoplasma gondii* fue descubierto desde hace más de 80 años, sólo recientemente adquiere atención e interés como enfermedad oportunista en pacientes sometidos a tratamientos inmunosupresores, o que sufren el síndrome de inmunodeficiencia adquirida o en personas débiles o mal nutridas (7).

Estudios realizados en 1983 y 1992 muestran que la infestación en la población canina por *Toxoplasma gondii* se ha incrementado en los últimos años (1,8).

El presente trabajo surge de la necesidad de conocer el nivel inmunológico para *Toxoplasma gondii* en una población canina del departamento de Antioquia, ya que son pocos los estudios que se han realizado al respecto y dado que dicha especie favorece y mantiene latente la parasitosis.

Materiales y Métodos

Se realizó un estudio descriptivo en todos los caninos (33) pertenecientes a la policía nacional del Departamento de Antioquia.

Muestra. De cada animal se tomaron cinco centímetros de sangre de la vena cafélica en tubos de ensayo estériles sin anticoagulante, la muestra se dejó reposar dos horas, para lograr una retracción del coágulo, luego se centrifugó a 1.500 revoluciones por minuto durante 10 minutos. Posteriormente se decantaron los sueros, y fueron empacados en viales

y se mantuvieron a -20°C hasta el momento del procesamiento por la técnica inmunofluorescencia indirecta (IFI) en el laboratorio de microbiología y parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Antioquia.

Técnica IFI. Con cada uno de los sueros se realizaron diluciones dobles seriadas desde 1:16 hasta 1:256; cada una de ellas se enfrentó al antígeno (Cepa RH donada por la Facultad de Medicina de la U. de A.) el cual fue recuperado por pases en cavidad peritoneal de ratón y luego fijado en círculos en placas. Luego se incubó a 37°C en cámara húmeda durante 45 minutos y entonces se efectuó un lavado con solución salina buferada de fosfatos (PBS). Posteriormente a cada sistema reaccionante se le adicionó antiinmunoglobulina G canina (Sigma Chemical Company, P.O. Box 145 08, S.T. Louis, MO USA 63178-9916) a una dilución de 1:40 en azul de Evans; luego se incubó a 37°C en cámara húmeda durante 45 minutos, al finalizar se lavó con PBS y agua destilada, se secó y se hizo la lectura en el microscopio de inmunofluorescencia. El título de anticuerpos en el suero fue la dilución más alta donde hubo reacción franca de fluorescente. Siempre se colocó un suero control positivo y negativo a *Toxoplasma*.

Resultados

De las 33 muestras analizadas contra *Toxoplasma gondii* se encontró una prevalencia del 42,5% que corresponde a (14/33) individuos positivos, y un 57,5% correspondiente a (19/33) individuos negativos (Tabla 1).

Tabla 1

Prevalencia de anticuerpos (Ig G) contra *toxoplasma gondii*, mediante la prueba de IFI (1995) en caninos de la policía nacional en el departamento de Antioquia

Resultados	Número	Porcentaje
Negativos	19	57.5
Positivos	14	42.5
Total	33	100.0

Analizando la distribución de los resultados según el sexo, se observó que de los individuos machos, el 37.5% (9/24) fueron seropositivos y en las hembras, el 55.5% (5/9) mostraron seropositividad. Así mismo, del total de machos 15 fueron negativos y del total de hembras 4 fueron negativas con porcentajes del 62.5 y 44.5, respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2

Prevalencia de anticuerpos (Ig G) contra *toxoplasma gondii*, mediante la prueba de IFI (1995) en caninos de la policía nacional en el departamento de Antioquia

Sexo	Positivos		Negativos		Total	
	Número	%	Número	%	Número	%
Hembras	5	55.5	4	44.5	9	100
Machos	9	37.5	15	62.5	24	100
Total	14	42.5	19	57.5	33	100

En cuanto a la edad se observó que el mayor porcentaje de seropositividad 60.0 (3/5), se obtuvo en las edades correspondientes entre 25 y 48 meses, seguidos por las edades entre 49 y 72 meses e individuos mayores de 72 meses, con porcentajes de 53.8 (7/13) y 42.8 (3/10), respectivamente, por último estarían los individuos entre 0 y 24 meses en un 20.0% (1/5) (Tabla 3).

Tabla 3

Distribución porcentual de acuerdo al grupo etáreo de la prevalencia de anticuerpos (Ig G) contra *toxoplasma gondii*, mediante la prueba IFI, 1995, en los caninos de la policía nacional del departamento de Antioquia

Edad Meses	Positivos		Negativos		Total	
	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje
0-24	1	20.0	4	80.0	5	100.0
25-48	3	60.0	2	40.0	5	100.0
49-72	7	53.8	6	46.2	13	100.0
>72	3	42.8	7	57.2	10	100.0
Total	14	42.5	29	57.5	33	100.0

Teniendo en cuenta la raza se observa que el labrador muestra mayor reactividad (60.0%), con tres individuos de cinco en total, seguido por el pastor alemán que presentó una reactividad de 50.0% (9/18), y el pastor belga 40% (2/5). (Tabla 4).

Tabla 4

Distribución porcentual de los animales positivos y negativos a *Toxoplasma gondii*, según la raza en los caninos de la policía nacional del Departamento de Antioquia, determinado por la prueba de IFI, 1995.

Raza	Positivos		Negativos		Total	
	Número	%	Número	%	Número	%
Pastor alemán	9	50.0	9	50.0	18	100.0
Springer			1	100.0	1	100.0
Boxer			1	100.0	1	100.0
Labrador	3	60.0	2	40.0	5	100.0
Pastor belga	2	40.0	3	60.0	5	100.0
San Bernardo			1	100.0	1	100.0
Pastor malinés			2	100.0	2	100.0
Total	14	42.5	29	57.5	33	100.0

La Tabla 5 muestra el comportamiento obtenido por los títulos de anticuerpos que fluctuaron en un intervalo entre 1:16 y 1:512, con predominio de la dilución 1:16, con una frecuencia de 6/14 individuos y un porcentaje del 42.9, seguido por los títulos 1/64 y 1/32 con frecuencias de 4/14 y 2/14, y porcentajes del 28.6 y 14.3, respectivamente.

Tabla 5

Títulos de anticuerpos (Ig G) contra *toxoplasma gondii* en caninos de la policía nacional del Departamento de Antioquia mediante la prueba IFI, 1995

Título (U.I.)	Número	Porcentaje
16	6	42.9
32	2	14.3
64	4	28.6
128	-	-
256	1	7.1
512	1	7.1
Total	14	100.0

Discusión

La prevalencia de 42.5% contra *toxoplasma gondii* hallada en los caninos de la policía nacional, por la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI), señala a ésta como una patología bastante difundida en nuestro medio, cuyos resultados concuerdan con lo obtenido por Pérez y Soto, 1992 (8), al encontrar una reactividad del 66%; igualmente se reportan prevalencias del 42, 51 y 72% en trabajos realizados en Gran Bretaña, Francia y Brasil, respectivamente (2, 3).

Los resultados al agrupar los individuos de la muestra según el sexo, no exhiben marcadas diferencias entre ellos, lo que también coincide con los trabajos anteriormente mencionados (3, 8). Esto puede indicar que ambos sexos son igualmente susceptibles de ser infectados (8).

Trabajos realizados en el matadero municipal de Medellín en 1980 revelaron prevalencias contra *toxoplasma gondii* en bovinos del 24 y 30% (6, 10). Dado que las fuentes de infección del parásito son múltiples y que los caninos tienen como vía principal la carne de presas vivas o cadáveres, ésta podría ser la principal fuente de infección puesto que en alguna época parte de la dieta de estos animales la constituyó el consumo de desperdicios del matadero municipal.

También es importante considerar la ubicación silvestre de las perreras, puesto que aves contaminadas, escarabajos y moscas del estiércol juegan un papel importante como fuentes de infección al actuar como vehículo portador del parásito (2,9).

En el presente trabajo no se encontraron diferencias apreciables en cuanto a los grupos etéreos

mayores de 24 meses, resultados acordes con los presentados por Pérez y Soto (8), esto puede deberse a que con la edad aumenta el grado de exposición al parásito, con lo que puede aumentar la prevalencia a *Toxoplasma gondii*.

Con respecto a la reactividad obtenida en las diferentes razas, tampoco se hallaron diferencias significativas dada la poca representatividad de éstas en la muestra observada. Por lo anterior es importante realizar un estudio en las diferentes razas existentes en Antioquia.

Bibliografía

- 1 Bedoya J.E. et al. Prevalencia de anticuerpos antitoxoplasma en caninos de la ciudad de Medellín. Tesis de grado. Universidad de Antioquia, facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, 1983. 54 p.
- 2 Bourdeau, Par P. La toxoplasmose des carnivores. En: Reweil de Medicine Vétérinaire-Special Helminthoses-Protozooses, Mail/jun, 1993. P. 457-472.
- 3 Ishizuka M., M. Incidencia de la infección por toxoplasma gondii en caninos de Sao Paulo. En: revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Sao Paulo 18(2). 1981. P 161-165.
- 4 Mander, G. et al. Prevalencia de anticuerpos. Toxoplasmosis en personas y animales domésticos y salvajes. En: Veterinaria Argentina VII (61), Buenos Aires, 1990.
- 5 Milón, G. and Luis J. CD: T Cell and immunity to intracellular pathogens. Parasitology today 9(6). 1993. P 196-197.
- 6 Murillo, G. et al. Prevalencia de anticuerpos para toxoplasma gondii en bovinos y porcinos sacrificados en el Matadero Municipal de Medellín. tesis de grado. Universidad de Antioquia. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. 50 p. 1980.
- 7 Ospina, Sigifredo. Toxoplasmosis. En: Clínica y complicaciones de las parasitosis. De: Universidad de Antioquia, enero 1993. P. 591-612.
- 8 Pérez J.J. y Soto, J.L. Prevalencia de anticuerpos contra toxoplasmosis canina en dos criaderos del valle de Aburrá. tesis de grado. Universidad de Antioquia. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. 1992.
- 9 Saituh Y. y Itagaki H. Dung beetles, Onthophagus spp. as potential transport hosts of feline coccidia. En: Nippon-Juigaku. Zasski, 52(2). Abril 1990. p. 293-297.
- 10 Villa, R. et al. Niveles de anticuerpos para toxoplasma gondii por el método de inmunofluorescencia en bovinos y manipuladores de carne del Matadero Municipal de Medellín. tesis de grado. Universidad de Antioquia. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia 64 p. 1980.

Malassezia pachydermatis Infección en caninos

ANA C. MESA A., BACTERIOLOGA:
FRANCISCO J. PEDRAZA O., MÉDICO VETERINARIO

Introducción

La *Malassezia pachydermatis* fue descrita en 1925 por Weidman, como una levadura en forma de botella que generalmente no requiere lípidos para su crecimiento como las otras especies del género.

Esta levadura hace parte de la flora normal de la piel y del canal auditivo externo en caninos y se asocia a trastornos dermatológicos y otitis externa; ocasionalmente se ha aislado a partir de muestras obtenidas de humanos y de otros animales, como microorganismos oportunistas.

El género *Malassezia* está conformado por un grupo de levaduras monopolares que comprende las especies, *furfur*, *pachydermatis* y *sympodialis*. La *Malassezia furfur* hace parte de la flora normal de la pieza y se asocia con desórdenes dermatológicos en el hombre y algunos animales. La *Malassezia sympodiálisis* es la especie menos estudiada y hasta el momento sólo se ha informado en pacientes con sida. Además de la importancia de la *Malassezia*

pachydermatis en medicina veterinaria, el microorganismo adquiere valor principalmente como agente asociado con infección intrahospitalaria, causando fungemia en neonatos humanos que reciben alimentación parenteral o que requieren cateterismo. Este hecho ha generado un cambio en la concepción que se tenía con respecto a que este microorganismo afecta únicamente a los animales. Es importante tener en cuenta algunas condiciones que provocan una alteración del sistema inmunológico, como las terapias con drogas citotóxicas, enfermedades consumptivas y neplasias, las cuales permitirían también la presentación concomitante de infecciones oportunistas, como la ocasionada por la *Malassezia pachydermatis*.

En el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad de Antioquia, el 83.33% en 1994 y el 72.72% en 1995, de los cultivos de secreciones óticas de caninos fueron positivos para *Malassezia spp.*

Características microbiológicas

Malassezia pachydermatis es una levadura polimórfica (aunque la forma de botella ha sido la más descrita) indistinguible morfológicamente al microscopio de luz de otras levaduras del mismo género, razón que amerita la utilización de pruebas bioquímicas, moleculares y/o de microscopía electrónica, para su correcta identificación, esto es además respaldado por el hecho de que aunque la mayoría de cepas reportadas de esta levadura son lipoindependientes, se han reportado cepas que requieren lípidos para su crecimiento, las cuales pueden ser fácilmente confundidas con cepas de *Malassezia furfur*, la cual se describe como levadura lipodependiente (1, 8, 11, 17).

Epidemiología

La *Malassezia pachydermatis* es un habitante normal de los sacos anales, recto, mucosa vaginal, la piel y el canal auditivo externo de los caninos, se ha reportado en otros mamíferos incluyendo el hombre y en algunas aves (5, 10). En general los microorganismos pertenecientes al género *Malassezia* necesitan una fuente de lípidos para su nutrición y factores medioambientales que favorezcan su crecimiento como la humedad y un pH entre cuatro y nueve (13). Aunque la *Malassezia pachydermatis* no requiere ácidos grasos para crecer en medios de cultivo, se evidenció un factor de crecimiento en el cerumen canino, que induce el crecimiento del organismo en el canal auditivo. Se reporta que entre el 50% y el 80% de los caninos con otitis externa son positivos al aislamiento de *Malassezia pachydermatis* (6).

La *Malassezia pachydermatis* en la otitis externa de caninos se asocia con cocos y bacilos como el *Staphylococcus intermedius* y la *Pseudomonas aureuginosa*; los metabolitos de estas bacterias aisladas del canal auditivo, no inhiben el crecimiento de *Malassezia pachydermatis* (2, 14). Poco se sabe del ciclo de vida de la *Malassezia pachydermatis* y del mecanismo de transmisión (8).

Patogenesis y signos clínicos. Es necesario recordar que la piel que recubre el canal auditivo es morfológicamente similar a la piel que recubre el resto del cuerpo y consiste en un epitelio estratificado queratinizado, glándulas sebáceas y glándulas apocrinas modificadas (glándulas ceruminosas); una

combinación de las secreciones sebáceas y ceruminosas junto al epitelio descamado forman la cera normal del oído (14).

La *Malassezia pachydermatis* puede producir lesiones macro y microscópicas al infectar el canal auditivo externo y la piel de los caninos. Los signos clínicos de otitis externa aparecen tres o cuatro días después del crecimiento de numerosas *Malassezias* en el canal auditivo, provocando eritema inflamatorio y secreción de exudados que produce dolor el cual se manifiesta por un movimiento (sacudida) de la cabeza del perro (16). Las lesiones cutáneas pueden aparecer en la cara, en el dorso de la nariz, alrededor de los ojos y los oídos, sobre la piel del abdomen, regiones cervical y axilar, miembros anteriores y cara interna de los muslos, extendiéndose distalmente al área tarsal. En los estados tempranos hay eritema focal moderado y en los estados más desarrollados dermatitis con hiperpigmentación, liquenificación, alopecia, descamación y prurito (9).

El diagnóstico definitivo de otitis y dermatitis por *Malassezia pachydermatis* se realiza por respuesta al tratamiento (que se describe más adelante); sin embargo, por producir un copioso exudado café oscuro de olor dulzón, es difícil hacer el diagnóstico diferencial con otras entidades tales como dermatofitosis, piodermas, hipersensibilidad alimentaria e infestaciones por otodectes, demodex y sarcoptes (2).

Diagnóstico

La *Malassezia pachydermatis* puede diagnosticarse a partir de diferentes tipos de muestras, como escamas con pelos, secreciones de oído y biopsias de piel (5, 9, 13).

Exámenes directos. Realizando un extendido de la muestra (escamas con pelos o secreciones de oído) sobre un portaobjetos, es posible visualizar la levadura utilizando varias coloraciones como el azul de metileno, giemsa, diff quik, wright, blanco de calcoflúor, gram y azul de lactofenol. El hidróxido de potasio (KOH al 19%) también es de gran utilidad (3, 5, 6, 9).

Examen histopatológico. Microscópicamente se observa hiperplasia de la piel, dermatitis perivasculares de tipo principalmente mononuclear, queratinización anormal, displasia folicular y presencia de numerosas

levaduras gemantes en la queratina de la epidermis superficial y del folículo piloso (15).

Algunos autores sugieren que solo un levadura por campo de inmersión podría considerarse flora normal; otros sugieren menos de tres levaduras. Las diferencias en la definición de "normal" pueden variar según el sitio, por ejemplo, en oídos normales el número de levaduras puede aumentar en ambientes húmedos (14).

Cultivo. El medio más utilizado para el aislamiento de la *Malassezia pachydermatis* es el sabouraud dextrosa Agar (SDA) la levadura crece a temperaturas entre 15 y 37°C, pero se ha demostrado que lo hace más rápido a 37°C. El tiempo de desarrollo es muy variable y depende de la temperatura y el medio de cultivo utilizado; se ha reportado crecimiento entre 24 horas y una semana (4, 5, 6, 15).

Las colonias en general son pequeñas, opacas, levantadas, inicialmente de color amarillo pálido y posteriormente café claro. Su textura puede ser seca, friable, aterronada o pastosa (11).

Características bioquímicas. Algunas características bioquímicas fueron similares en varios experimentos, pero en otros variaron. Gabal, por ejemplo, demostró que la *Malassezia pachydermatis* no fermentó ni asimiló glucosa, galactosa, sucrosa, maltosa ni lactosa y asimiló incompleta, débil y lentamente la peptona en comparación con otras levaduras; por el contrario en el experimento de Gordon se demostró asimilación de glucosa por parte del microorganismo. Se han demostrado otras características como la no producción de ureasa, asimilación de glicerol, y no asimilación de nitratos (6, 7, 11).

Otras técnicas. Con el fin de determinar la población de *Malassezia pachydermatis* en la piel de perros sanos y con alteraciones dermatológicas, se han ensayado algunas técnicas cuantitativas como la cinta adhesiva coloreada con Diff-Quick®, el recuento utilizando la técnica de platos de contacto y el frotis con detergente, pero en nuestro medio aún no se aplican (5).

Tratamiento. En los casos de otitis externa canina asociada a esta levadura, el microorganismo muestra sensibilidad al ketoconazole tanto *in vivo* como *in*

vitro (12, 17). En las dermatitis pruriginosas y seborreicas, ha sido efectivo el tratamiento con ketoconazole oral y un shampoo que contenga ketoconazole (15). Existen otros medicamentos que se han utilizado con éxito, tales como la pimáricina al 1%, el natamycin y el miconazole (18). En el caso de los antibióticos poliénicos, se han reportado diferentes respuestas entre las cepas de la *Malassezia pachydermatis* dependiendo de la composición de esteroides en la pared de cada cepa (19).

Conclusiones. Para identificar correctamente la *Malassezia pachydermatis* se requiere aislar el microorganismo y realizar pruebas bioquímicas, debido a que las características morfológicas no son suficientes para diferenciarla de las otras especies.

En las muestras de secreción ótica de caninos que llegan al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad de Antioquia, con el fin de realizar cultivos para hongos, se ha encontrado que la levadura más frecuentemente aislada es la *Malassezia* spp., sin que haya sido posible identificar la especie involucrada, debido a la carencia de reactivos indispensables para la reacción de pruebas bioquímicas. Igualmente importante en el diagnóstico de laboratorio, tanto microbiológico como histopatológico, sería obtener colorantes específicos como el Diff-Quick® recomendado por muchos investigadores para facilitar el diagnóstico. El tratamiento es de suma importancia dado que el manejo de las otitis externas en caninos causa gran dificultad al veterinario clínico, tal vez porque no se tiene en cuenta que las infecciones por bacterias y levaduras en el canal auditivo de los perros solo son factores perpetuantes de la otitis externa, mas no factores etiológicos, siendo estos últimos los que deben ser bien reconocidos con el fin de dar un correcto manejo al problema.

Esta monografía se presenta como un primer paso en la búsqueda del conocimiento de las enfermedades que afectan el oído y la piel de los caninos y pretende motivar la realización de estudios clínicos y epidemiológicos que permitan conocer el comportamiento de la *Malassezia pachydermatis* en nuestro medio, ya que hasta el presente no se ha realizado ninguna investigación sobre este microorganismo.

Bibliografía

- 1 Ajello L. Mukerji. K.G. Handbook of Applied Mycology Humans, Animals and Insects, vol. 2. New York, 1991, p. 781.
- 2 August, J.R. Otitis externa. A disease of multifactorial etiology. En: Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice. Vol. 18. No. 4 (1988); p. 731-741.
- 3 Bevier, D.E. Long-term Management of atopic Disease in the dog. En: Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice. Vol. 20, No. 6, 1990, p. 1487-1505.
- 4 Bond R. Anthony, R.M. Characterization of markedly lipid-dependent *Malassezia pachydermatis* Isolates from healthy dogs. En: Journal of applied Bacteriology. Vol. 78, No. 5, 1995; p. 537-542.
- 5 ——— Collin, N.S. and Lloyd, D.H. Use of contact plates for the quantitative culture of *Malassezia pachydermatis* from canine skin. En: Journal of small animal practice. Vol. 35, No. 2, 1994; p. 68-72.
- 6 Gabal, M.A. Preliminary studies on the Mechanism of infection and characterization of *malassezia pachydermatis* in association with canine otitis externa. En: Mycopathology. Vol. 104. No. 2, 1988; p. 93-98.
- 7 Gordon M.A. *Malassezia Pityrosporum pachydermatis* (Weldman) Dodge 1935. En: Sabouraudia, Vol. 17, 1979; p. 305-309.
- 8 Gueho E. Et al. Association of *Malassezia pachydermatis* with Systemic Infections of humans. En: Journal of Clinical Microbiology, Vol. 25, No. 9, 1987; p. 1789-1790.
- 9 Kiss G. Et al. Incidence of *Malassezia pachydermatis* yeast III. *Malassezia dermatitis* in dogs. En: Magyar Allatorvosok Lapja. Vol. 48, No. 9, 1993; p. 548-553.
- 10 Kwon Chung K.J. and Bennett, J.E. Medical Mycology. Malvern, Pennsylvania: Lea & Febiger. Ed., 1992, p. 170-182.
- 11 Michelsen. P. A. Et. Al. Clinical and Microbiological Features of Infection with *Malassezia pachydermatis* in High Risk Infants. En: The Journal of Infectious Diseases. Vol. 157, No. 6, 1988; p. 1163-1168.
- 12 Pedersen. K. Seborrheic dermatitis in 10 dogs caused by *Malassezia pachydermatis*. An overlooked problem. En: Dansk Veterinaertidsskrift, Vol. 75, No. 12, 1992; p. 513-520.
- 13 Plant, J.D.; Rosenkrantz, W.S. and Griffin, C.E. Factors associated with and prevalence of high *Malassezia pachydermatis* numbers on dog skin. En: Journal of American Veterinary Medical Association. Vol. 201, No. 6, 1992; p. 879-882.
- 14 Rosychuck, Rod A. W. Management of otitis externa. En: Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice. Vol. 20, No. 6, 1990; p. 1487-1505.
- 15 Scott, D.W. and Miller, W.H. Epidermal Dysplasia and *Malassezia pachydermatis* infection in West Highland White Terriers. En: Veterinary Dermatology. Vol. 1, 1989; p. 25-36.
- 16 Uchida, Y. Et al. Otitis externa induced with *Malassezia pachydermatis* in dogs and the efficacy of primaricin. En: Journal of Veterinary Medical Science. Vol. 54, No. 4, 1992; p. 611-614.
- 17 ——— Nakade, T. And Kitazawa, K. In vitro activity of five antifungal agents against *Malassezia pachydermatis*. Vol. 52, No. 4; 1990; p. 851-853.
- 18 ———, et al. Efficacy of a pimaricin suspension for treating otitis externa associated with *M. Pachydermatis*. En: Journal of small animal practice. Vol. 35, No. 10; 1994; p. 521-523.
- 19 ———, et al. Sterol composition in polyene antibiotic-sensitive and resistant strains of *Malassezia pachydermatis*. En: Veterinary Research Communication. Vol. 18, No. 3, 1994; p. 183-187.