

Revista Canaria de las Ciencias Veterinarias

Número 8. Año 2012-2013

ISSN 1696-1978

www.iusa.eu



Mari Carmen Pieltáin

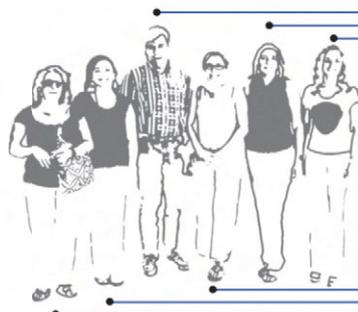
Doctora en Veterinaria

Funcionaria del Gobierno de Canarias

Profesora del Máster de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria



Comité editorial



Director
Antonio J. Fernández Rodríguez
Otilia Ferrer Quintana
Esther San Juan Velásquez
Soraya Déniz Suárez
M^a del Carmen Muñoz Ojeda
Begoña Acosta Hernández

Edita:

Servicio de publicaciones de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

Colaboradores:

Sres/as. Doctores/as:

- Pedro Saavedra Santana
- José Pestano Brito
- Miguel Batista Arteaga
- María Aguirre Sanceledonio
- Antonio López Guerra
- Anselmo Gracia Molina
- Anastasio Arguello Henríquez
- Antonio Ruiz Reyes
- Luis Domínguez Boada
- Domingo Navarro Bosch
- Antonio Espinosa de los Monteros y Zayas
- Fernando González Valle
- Fernando Real Valcárcel
- Francisco Rodríguez Guisado
- Rafael Ginés Ruiz
- Pedro Herráez Thomas
- Inmaculada Morales Fariñas
- José Raduán Jaber
- Jorge F. González Pérez
- Juan Fco. Loro Ferrer
- Juan Manuel Afonso López
- Octavio Pérez Luzardo
- Rafael Millán de Larriva
- J. M. Molina Caballero
- Manuel Zumbado Peña
- Óscar González Díaz
- J. Bismarck Póveda Guerrero
- Santiago Torres Curbelo
- Maite Tejedor Junco
- J. Pablo Zaera Polo
- María J. Zamorano Serrano
- Bonifacio Díaz Chico
- Pilar Fresen Cansino
- Pastora Flores Mengual
- Ana Sofía Ramírez Corbera
- Fernando Cabrera
- Nelson González Romano
- Carmen Hernández Cruz
- Enrique Rodríguez Grau-Brassas
- Luis Felipe López Jurado
- Marisol Izquierdo López
- Carmen Nieves Hernández Flores
- Ricardo Chirino Godoy
- Antonio Ángel Sosa González
- Eligia Rodríguez Ponce
- Fernando Cabrera Martín
- Francisco Doreste Caballero
- Javier Cabrera Oliva
- José Ignacio Rodríguez Castañón
- José Luis Rodríguez Navarro
- José Manuel Vilar Guereño
- Juan A. Corbera Sánchez
- Juan Carlos Díaz Chico
- Juan Carlos Penedo Padrón
- Juan Manuel León Lloret
- Juan Manuel Martín González
- María Casteo González
- María del Pino Palacios Díaz
- Miguel A. Rivero Santana
- Pablo Lupiola Gómez
- Pedro Ortega Rodríguez
- Pilar Fernández Valerón
- Myriam Rodríguez Ventura
- Natividad del Carmen Ramírez Olivares
- Manuel Arbelo Hernández
- Marisa Andrada Borzollino
- Eva Sierra Pulpillo
- Josué Díaz-Delgado

Diseño cubierta:

Juan Carlos Rodríguez Acosta

Impresión: Servicio de Reprografía, Encuadernación y Autoedición de la ULPGC

Depósito legal: G.C. 756-2013

ISSN: 1696 - 1978

4 Editorial

Fernández, A.

Director del IUSA

Artículos científicos

5

El agua potable en Gran Canaria: características de la red de suministro y vigilancia de la salud

Raposo, A.; Pérez, E.; Herrera, M.; Millán, R.; Sanjuán, E.; Carrascosa, C.

9

Ensayo de inmunoprotección frente a la coccidiosis caprina producida por *Eimeria ninakohlyakimovae* mediante la utilización de oocistos irradiados

Muñoz, M.C.; Molina, J.M.; Hermosilla, C.; Taubert, A.; Andrada, M.; Lara, P.C.; Bordón, E.; Pérez, D.; López, A. M.; Matos, L.; Guedes, A. C.; Falcón S.; Falcón, Y.; Martín, S.; Ruiz, A.

17

Actividad in vitro de la planta endémica canaria *Ruta pinnata* frente al coccidio de caprino. *Eimeria ninakohlyakimovae*

López, A.M.; Muñoz, M.C.; Molina, J.M.; Hermosilla, C.; Taubert, A.; Pérez, D.; Matos, L.; Guedes, A.C.; Martín, S.; Ruiz, A.

Artículos científicos

- 24** **Aplicación de la citometría de flujo al estudio de las células IgM positivas de doradas (*Sparus aurata*) vacunadas frente *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida***
Grasso, V.; Janeiro de Assunção, P.; Padilla, D.; El Aamri, F.; Román, L.; Real, F. y Acosta, F.
- 29** **Refrigeración y congelación seminal en la especie canina: ¿métodos independientes o adicionales?**
Batista, M.; Santana, M.; Álamo, D.; Cabrera, F.; González, F.; Gracia, A.
- 35** **Reconstrucción tridimensional de la columna cervical en dos potros neonatos**
Carrascosa, C.; Fernández, T.; Suárez, F.; Suárez-Bonnet, A.; Riskallal, C.; Rivero, M.A.; Raduan Jaber, J.
- 39** **Hepatitis Reactivas no Específicas en Delfines Mulares (*Tursiops truncatus*) varados en las Islas Canarias: Estudio Patológico e Inmunohistoquímico**
Jaber, J. R.; Pérez, C.; Carrascosa, C.; Peña, S.; Monzón, M.; Suárez-Bonnet, A.; Díaz, B.; Zafra, R.; Herráez, P.; Fernández, T.; Fernández, A.

Casos clínicos

- 47** **Torsión de lóbulo pulmonar: Revisión de la bibliografía a propósito de un caso clínico**
Suárez-Bonnet, A.; Quesada-Canales, O.; Aguirre-Sanceledonio, M.; Arbelo, M.; Vega, G.; Medina, N.; Andrada, M.

Comunicaciones cortas

- 52** **Expresión inmunohistoquímica de COX-2 en neoplasias caninas y felinas. Utilidad terapéutica**
Suárez-Bonnet, A.; Herráez, P.; Espinosa de los Monteros, A.
- 53** **Inmunotipificación de linfomas. Herramienta diagnóstica de valor pronóstico**
Suárez-Bonnet, A.; Espinosa de los Monteros, A.; Herráez, P.

Artículos de revisión

- 55** **Paralelismo entre la artritis reumatoide humana y las artritis por micoplasmas en las especies animales**
Ramírez, A. S.; Rosales, R. S.; Suárez-Pérez, A.; Poveda, C. G.; Vega-Orellana, O.; Mederos Iriarte, L. E.; Poveda, J. B.
- 60** **Fiebre Q**
Fleitas, J. L.; Rosales, R. S.; Suárez-Pérez, A.; Poveda, C. G.; Vega-Orellana, O.; Mederos-Iriarte, L. E.; Ramírez, A. S.
- 68** **Pioderma Canina**
Ortega, D.; Acosta, B.; Ferrer, O.
- 79** **Importancia de los controles veterinarios en fronteras como garantes de la sanidad animal y la salud pública en Europa**

Editorial

“Amigos para siempre”, nos volveremos a encontrar

La tristeza nos invade cuando alguien a quien queremos, de verdad, deja de estar entre nosotros. Y nos vuelve a acongojar, cuando la recordamos por cualquier razón personal o profesional. Se crea un hueco, incluso doloroso por momentos, porque nos falta alguien de los nuestros, del equipo, de la familia. Así, tan simple, es como siento, que cualquier persona allegada definiría el profundo espacio vacío que ha dejado Mari Carmen Pieltáin.

Mari Carmen, “puro nervio, pura vida”, siempre estuvo para lo que necesitáramos desde la Universidad, desde la Facultad de Veterinaria, desde el Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria (IUSA). Ella era una universitaria más, que hizo su doctorado y se doctoró en muchas “cosas profesionales y de la vida misma”. Ella fue la primera profesora doctora del Máster SASA (Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria) perteneciente a la administración autonómica (Dirección



General de Ganadería del Gobierno de Canarias). Coordinadora y responsable de una parte fundamental de este Máster, al que ha dejado huérfano, como también huérfano ha dejado a tantos y tantas veterinarios y veterinarias a los que cuidaba y protegía como a sus propios hijos.

Ella quedará en nuestro recuerdo y en nuestros corazones como un referente “moral” como una profesional noble y honesta, siempre de frente, inteligente y eficaz, con un corazón que superaba en proporciones a su propia anatomía. Su espíritu quedará en muchos sitios, pero nosotros (**“amigos para siempre”**), además, la dejaremos inmortalizada en nuestro Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria y en nuestra Revista de las Ciencias Veterinarias. Desde lo más profundo de nuestros corazones, con toda nuestra tristeza, te dedicamos estas palabras, en nombre de todos los que te quisieron y te siguen queriendo. **Nos volveremos a encontrar.**



El agua potable en Gran Canaria: características de la red de suministro y vigilancia de la salud

Raposo, A.(1); Pérez, E.(1); Herrera, M.(2); Millán, R.(1); Sanjuán, E.(1); Carrascosa, C.(1)

(1) Departamento de Patología Animal, Producción Animal, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria - Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Trasmontaña s/n. 35413 Arucas. Las Palmas.

(2) Servicio Canario de Salud.

Drinking water in Gran Canaria: characteristics of the supply network and health surveillance

RESUMEN: el agua potable es un bien público indispensable y en este trabajo se relaciona su calidad y seguridad en la isla de Gran Canaria, de acuerdo con la legislación vigente. El Anexo I del RD 140/2003, de 7 de febrero, que establece los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano, especifica los valores paramétricos que el agua considerada como apta debe cumplir.

Se describe la red de distribución de agua en la isla y se realiza también el análisis de los parámetros microbiológicos y físico-químicos del agua potable durante los años de 2008, 2009 y 2010.

Los resultados muestran la calidad y seguridad del agua potable en Gran Canaria, observándose breves incumplimientos en algunos parámetros legales en determinados semestres a lo largo del estudio.

Palabras clave: Gran Canaria, agua potable, calidad, seguridad, físico-química, microbiológica.

SUMMARY: Drinking water is an indispensable public good and this work relates to their quality and safety on the Island of Gran Canaria, in accordance with the current legislation. The Annex I of Royal Decree 140/2003, of February 7, by which health criteria for the quality of water intended for human consumption are established, specifies the parametric values to be met by the water considered as suitable.

The water distribution network on the island is described and analysis of microbiological and physicochemical parameters in drinking water during the year 2008, 2009 and 2010 are also performed.

The results show the quality and safety of drinking water in Gran Canaria, brief failures are observed in some legal parameters in certain semesters throughout the study.

Key words: Gran Canaria, drinking water, quality, safety, physicochemical, microbiological.

Introducción

El agua potable es un bien público objeto de las Directivas 2000/60/CE (1) y 98/83/CE (2).

Gran Canaria es una isla española del archipiélago Canario, situada en el Océano Atlántico, con una población de 838.000 habitantes (460/km²) y un consumo de agua potable de 140 litros por habitante y día (frente a otros países industrializados en los que sube a 300 litros) (3).

No hay ríos en la isla, lo que hace que la captación de agua sea muy dispersa en varios puntos a lo largo de la isla. En Gran Canaria hay 36 gestores

del agua inscritos en el SINAC (Sistema de Información Nacional de Aguas de Consumo).

La gestión del agua en una isla como Gran Canaria presenta una gran complejidad, que generalmente implica incluir diversas unidades como los municipios, servicios públicos locales, laboratorios de ensayo y de la administración de salud pública. Debido a esto, la vigilancia sanitaria del agua tiene un papel muy importante.

En este trabajo se describe el sistema de abastecimiento de agua potable en Gran Canaria y las características de la red de abastecimiento y vigilancia de la salud, así como los

resultados microbiológicos y físico-químicos de 3 años consecutivos.

Los datos han sido recogidos por el Departamento de Salud de Gran Canaria, como resultados de los análisis realizados en el marco de la vigilancia de la salud del agua potable. Estos análisis tienen como objetivo proporcionar información periódica sobre los criterios sanitarios de la calidad del agua para consumo humano, así como llevar a cabo el seguimiento de ciertos parámetros de control cuando se considere necesario, bien porque la historia analítica del área de distribución o suministro de red lo indica, o porque se considera

una situación de nueva detección de fallos o alertas.

Material y Métodos

En el desarrollo de este trabajo fueron consultadas las autoridades de salud locales y gestores del agua. Se realizaron visitas a las instalaciones de suministro de agua potable y un estudio sobre el abastecimiento.

El control de calidad se llevó a cabo por el administrador que proporcionaba la monitorización de agua potable y por la autoridad sanitaria que fue responsable de la vigilancia de la salud y el control del agua en el grifo del consumidor como punto de muestreo.

Los parámetros microbiológicos y físico-químicos analizados en los cuatro tipos de análisis realizados (S, S1, S2 y S3) en los años de 2008 y 2009, se describen en tabla 1. La frecuencia del ensayo dependía del volumen de agua tratada por día.

El control de estos parámetros se realizó durante los años 2008 y 2009, con un número de muestras que osciló para el primer y segundo semestre, respectivamente, entre 158 y 173 en 2008 y entre 181 y 205 en 2009.

En la tabla 2 se muestra el análisis periódico de distribución en los 21 municipios de la isla.

Durante el primer semestre del año 2010 se recogieron 171 muestras, y otras 142 en el segundo, con el fin de analizar los siguientes parámetros (según RD 140/2003, transposición de la normativa española de UE de agua potable) (4):

Microbiológicos: colonias a y, coli-formes, *E. coli* y *C. perfringens*.

Físico-químicos: olor, sabor, color, turbidez, conductividad, pH, cloro residual libre, amoníaco, nitratos, nitritos, índice de Langelier, fluoruros, cloruros, sodio, hierro total, aluminio, boro y manganeso.

Resultados y Discusión

Se verificó que la red de distribución de la captación de aguas constaba de 185 pozos, 20 plantas de desalinización

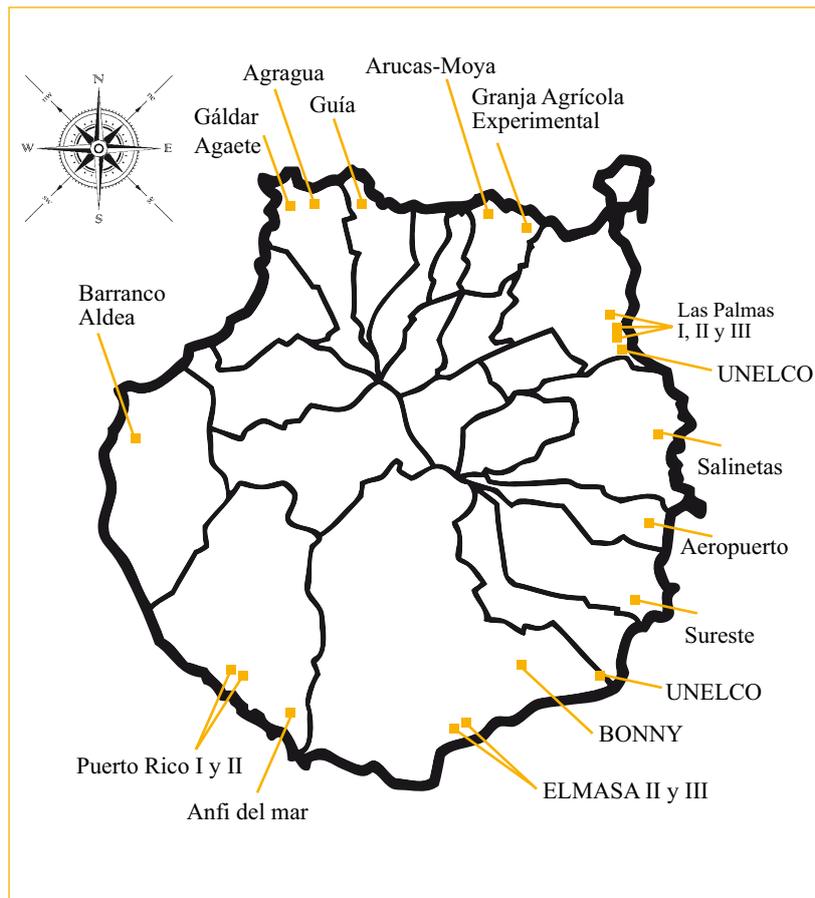
Tabla 1. Parámetros analizados según el tipo de análisis.

Tipo de Análisis	Parámetros Analizados
S	Olor, sabor, color, turbidez, conductividad, pH, amoníaco, nitratos, cloro residual libre, flúor, bacterias coliformes, <i>E. coli</i> , aerobios a 22 °C y 36°C, <i>C. perfringens</i>
S1	S + Índice de Langelier, boro y hierro
S2	S + Índice de Langelier, boro, hierro y manganeso
S3	S + Índice de Langelier, boro, hierro y aluminio

Tabla 2. Análisis periódico de distribución.

Tipo de Análisis	Año	
	2008	2009
S	6	2
S1	12	9
S2	1	8
S3	2	2

Figura 1. Plantas de desalinización en Gran Canaria.



de agua de mar (Figura 1) y acuíferos subterráneos. La red de distribución de agua suministra al 98% de la población de Gran Canaria.

Las Figuras 2 y 3 referentes a los años de 2008 y 2009 sugieren que los parámetros más comunes que no cumplen los criterios fueron el índice

de Langelier (índice para calcular el carácter incrustante o agresivo del agua) y el cloro libre residual. Sin embargo, en general, y de acuerdo con la legislación vigente, los parámetros microbiológicos y físico-químicos restantes, muestran una buena calidad y seguridad del agua.

En las figuras 4 y 5 (correspondientes al año 2010) se muestra que los principales incumplimientos fue-

ron detectados en los valores recogidos para:

- Cloro libre residual.
- Índice de Langelier (debe estar comprendido entre -0,5 y 0,5).
- Aerobios totales (> 100 UFC / ml).
- Hierro.
- Sodio.
- Flúor y manganeso (de una manera muy esporádica).

Figura 2. Porcentaje de muestras insatisfactorias de parámetros físico-químicos en 2008/2009.

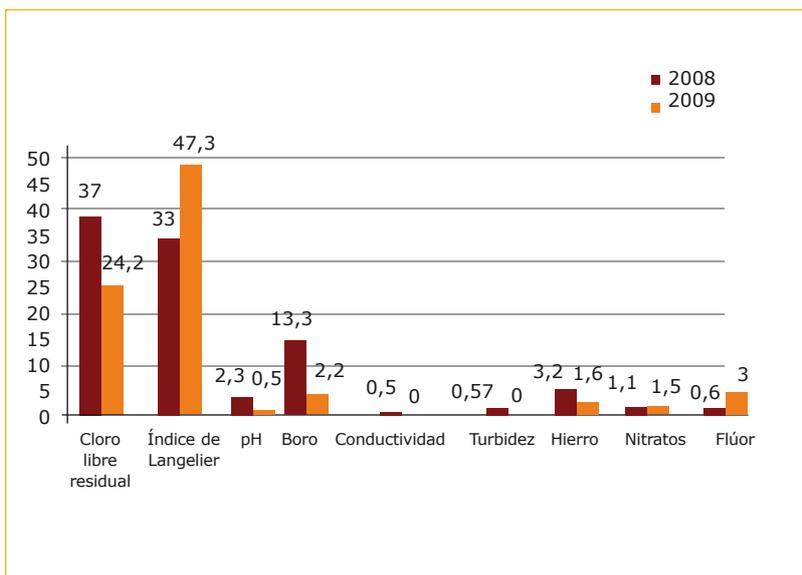
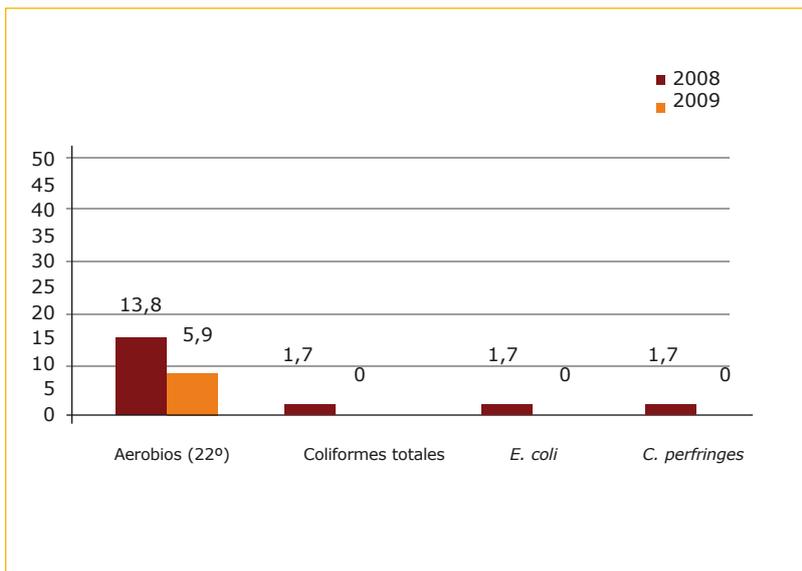


Figura 3. Porcentaje de muestras insatisfactorias para los parámetros microbiológicos en 2008/2009.



Se verifica también que en el segundo semestre de 2010 los resultados obtenidos fueron menos favorables que aquellos demostrados en el primer semestre del mismo año.

Conclusiones

La isla de Gran Canaria cuenta con una amplia red de distribución de agua, suministrando a casi la totalidad de sus habitantes, siendo la calidad / seguridad de su agua potable muy aceptable, como se muestra en los resultados obtenidos en los parámetros físico-químicos y microbiológicos del presente estudio.

La mayoría de los análisis realizados demostraron valores de acuerdo con la legislación vigente. Sin embargo, es posible afirmar que en el primer semestre de 2010 se obtuvieron mejores resultados que en el segundo semestre de ese mismo año. En la comparación entre 2008 y 2009, también es factible decir que en el segundo año los resultados obtenidos fueron mejores que los obtenidos en 2008.

Bibliografía

- 1.- Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de octubre de 2000, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.
- 2.- Directiva 98/83/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 3 de noviembre de 1998, relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano.
- 3.- Cifras INE. Boletín Informativo del Instituto Nacional de Estadística (2008). Estadísticas e indicadores del agua. Disponible en <http://www.ine.es/revistas/cifraine/0108.pdf>. (Accedido 28 Nov. 2012).
- 4.- Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano.

Figura 4. Porcentaje de muestras insatisfactorias (parámetros físico-químicos) en 2010.

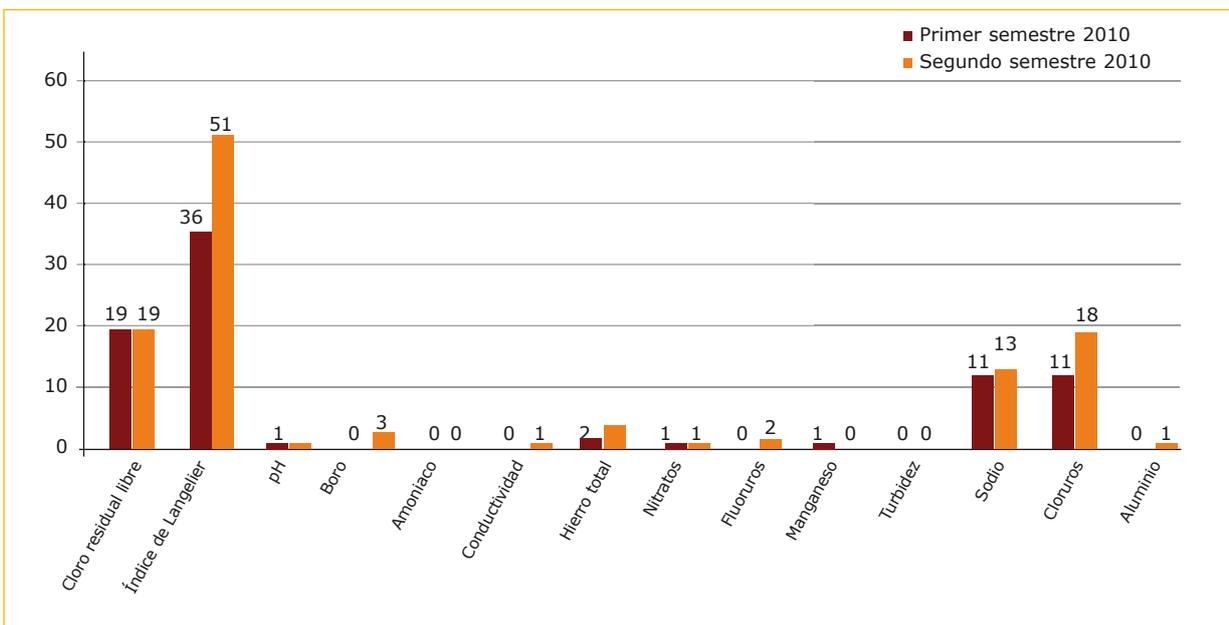
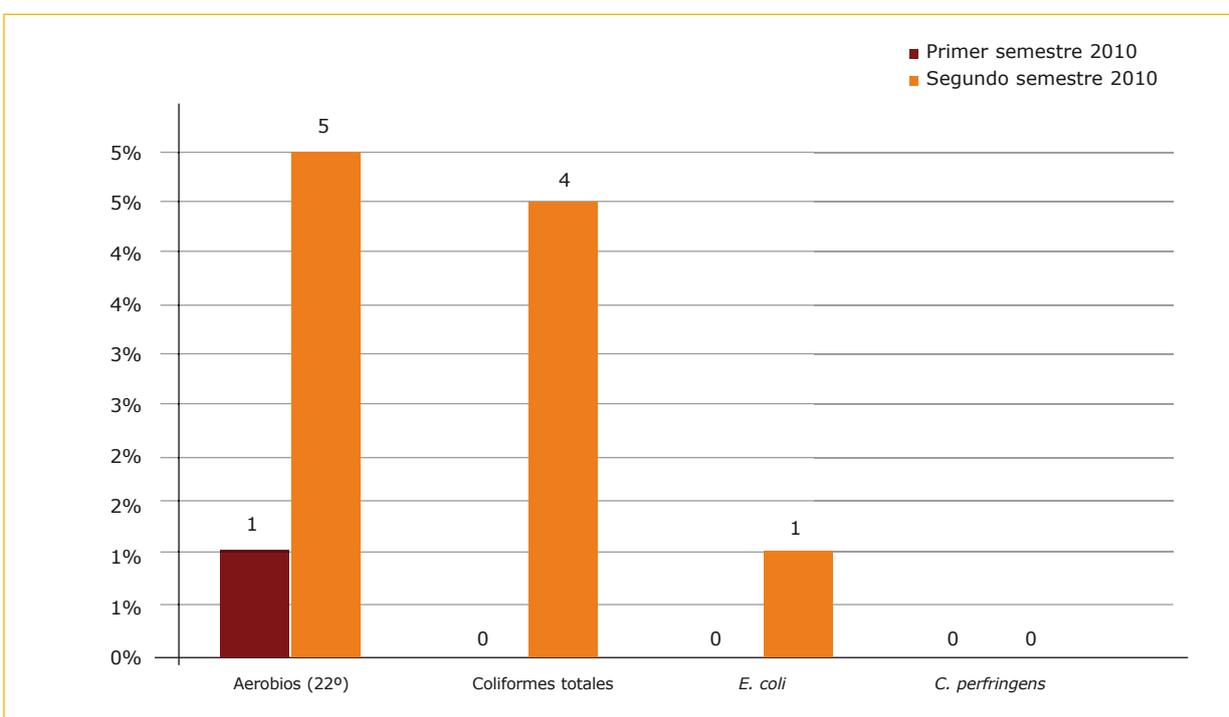


Figura 5. Porcentaje de muestras insatisfactorias (parámetros microbiológicos) en 2010.



Ensayo de inmunoprotección frente a la coccidiosis caprina producida por *Eimeria ninakohlyakimovae* mediante la utilización de ooquistes irradiados

Muñoz, M.C. (1); Molina, J.M. (1); Hermosilla, C. (2); Taubert, A. (2); Andrada, M. (3); Lara, P.C. (4), Bordón, E. (4), Pérez, D. (1); López, A.M. (1); Matos, L. (1); Guedes, A.C. (1); Falcón S. (1); Falcón, Y. (1); Martín, S. (1); Ruiz, A. (1*)

(1) Departamento de Patología Animal, Producción Animal, Bromatología y Tecnología de los alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Gran Canaria, España

(2) Institute of Parasitology, Justus Liebig University Giessen, Giessen, Germany

(3) Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, Facultad de Veterinaria, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Gran Canaria, España

(4) Departamento de Oncología Radioterápica, Hospital Universitario de Gran Canaria "Dr. Negrín", España

RESUMEN: La coccidiosis constituye una de las parasitosis más frecuentes y más ampliamente distribuidas en los sistemas de producción caprinos y su control se basa en el uso de prácticas de manejo en combinación con tratamientos anticoccidióticos o anticoccidiostáticos, siendo estos medicamentos, en su mayoría, los prescritos para otras especies hospedadoras (bovinos, ovinos, aves de corral o incluso conejos). Hasta el momento no se ha realizado ningún estudio para abordar el control inmunológico de las infecciones caprinas causadas por las distintas especies de *Eimeria*. En el presente estudio se llevó a cabo una prueba de inmunoprotección mediante el empleo de ooquistes de *Eimeria ninakohlyakimovae* irradiados (X-Rad, 20 kilorrad) en cabritos infectados experimentalmente con esta misma especie de *Eimeria*. Para ello, un total de 18 cabritos se dividieron en cuatro grupos: animales infectados a las 5 semanas de edad con ooquistes irradiados y re infectados 3 semanas más tarde (grupo 1), animales infectados a las 5 semanas de edad con ooquistes no irradiados y re infectados 3 semanas más tarde (grupo 2), animales primoinfectados a las 8 semanas de edad (control de la reinfección, grupo 3) y animales no infectados (grupo control, grupo 4). En todos los casos las inoculaciones se realizaron vía oral con 2×10^5 ooquistes esporulados de *E. ninakohlyakimovae* (cepa GC), irradiados o no irradiados. Los cabritos sensibilizados con ooquistes irradiados (grupo 1) eliminaron por heces una cantidad de ooquistes significativamente menor (95,3%) y mostraron un menor grado de coccidiosis clínica que los cabritos infectados con los ooquistes no irradiados (grupo 2). Estos resultados demuestran, por primera vez, que la atenuación de los ooquistes de *Eimeria* mediante irradiación podría ser utilizada como estrategia inmunoprolifáctica de control frente a la coccidiosis en el ganado caprino.

SUMMARY: The control of goat coccidiosis, one of the most important parasitic diseases in goat production systems, traditionally relies on the use of management practices combined with anticoccidial treatments. As for anthelmintics, most of the drugs used to control goat coccidiosis are prescribed for other host species (bovines, sheep, poultry or even rabbits) and, additionally, no effort has been made to address the immunological control of caprine infections caused by *Eimeria sp.* so far. In the present study we conducted a preliminary vaccination trial applying attenuated oocysts in goat kids experimentally infected with *Eimeria ninakohlyakimovae*. For attenuation, sporulated oocysts of *E. ninakohlyakimovae* were subjected to irradiation (X-Rad, 20 kilorrad). A total of 18 goat kids were divided into the following four groups: animals infected with irradiated oocysts at week 5 of age and challenged 3 weeks later (group 1), animals infected with non-irradiated oocysts at week 5 of age and challenged 3 weeks later (group 2), animals primary-infected with non-irradiated oocysts at week 8 of age (control of challenge infection, group 3) and non-infected control animals (group 4). For oral infections, 2×10^5 sporulated oocysts of *E. ninakohlyakimovae* (GC strain) were used per animal. Goat kids infected with irradiated oocysts (group 1) shed significantly less oocysts in the faeces (95.3%) and showed a lower degree of clinical coccidiosis than kids infected with non-irradiated oocysts (group 2). These results demonstrate for the first time that attenuation of *Eimeria* oocysts may be used as an immunoprophylactic strategy to control coccidiosis in goats.

Correspondencia

Antonio Ruiz Reyes (Unidad de Parasitología). Tf.: 928 451113; Fax: 928 454341; Email: aruiz@dpat.ulpgc.es

Introducción

La coccidiosis caprina, producida por las diferentes especies del género *Eimeria*, es una de las enfermedades parasitarias más frecuente y ampliamente extendida. Ha sido descrita en un gran número de regiones y países de Europa, África, Asia y América, constituyendo en todos los casos una importante limitación para la producción caprina (1, 7, 18, 25). Pero es sobre todo en las áreas rurales semiáridas que dependen económicamente de la producción caprina, como las Islas Canarias (España) u otras zonas de África u Oriente Medio con condiciones climáticas análogas, donde la coccidiosis caprina afecta con más severidad a la salud animal y a la rentabilidad de la industria caprina (25).

De entre las especies del género *Eimeria* que con más frecuencia afectan al ganado caprino, *E. ninakohlyakimovae* se considera como la de mayor patogenicidad (11). Independientemente de cual sea el sistema de producción, la mayoría de los animales se infectan durante los primeros meses de vida, pudiendo en algunas áreas verse afectados más del 96% de los cabritos en edades comprendidas entre las 4 y 10 semanas de vida, aunque el desarrollo clínico de la enfermedad está influenciado por diferentes factores, como los sistemas de producción intensivos, el estado inmune de los animales, la edad y las condiciones climáticas (25).

Un gran número de compuestos, combinados con medidas de manejo, han sido utilizados para el control y profilaxis de la coccidiosis tanto para corderos (8, 10, 14) como terneros (12, 21, 22) o aves de corral (9), pero el uso extensivo de drogas anticoccidíicas ha provocado la aparición de cepas resistentes de *Eimeria* (23). Este hecho ha llevado a la realización de ensayos de inmunización frente a la coccidiosis mediante el empleo de distintos tipos de vacunas. Diversos estudios se han llevado a cabo con distintas cepas de *Eimeria* en aves, utilizando tanto vacunas atenuadas

mediante pases en huevos embrionados (Livacox®), como cepas preoces (Paracox®) o cepas de baja patogenicidad seleccionadas de infecciones naturales (NobilisCox ATM1®). Otros estudios se han basado en el empleo de vacunas recombinantes (5, 20). Por otra parte, diversas investigaciones han demostrado que la irradiación gamma puede ser utilizada para atenuar varias especies de coccidios aviarios, como *Eimeria acervulina*, *E. tenella*, o *E. maxima*, y prevenir la reproducción asexual del parásito y la formación de ooquistes (17). Hasta el momento no se ha realizado ningún estudio similar que aborde el control inmunológico de las infecciones caprinas causadas por *Eimeria spp.* En el presente trabajo se ha investigado el efecto inmunoprotector frente a la coccidiosis experimental en cabritos utilizando ooquistes irradiados de *Eimeria ninakohlyakimovae*.

Material y métodos

Parásitos y atenuación de los ooquistes

La cepa GC de *E. ninakohlyakimovae* utilizada en este estudio fue aislada por primera vez en el año 2006 en la isla de Gran Canaria a partir de heces de un grupo de cabras infectadas de forma natural y desde entonces se ha mantenido por pases sucesivos en cabritos (24). Para la producción de ooquistes, los cabritos fueron infectados vía oral a la edad de 4 semanas con 2×10^5 ooquistes esporulados de *E. ninakohlyakimovae*. Los ooquistes excretados fueron aislados de las heces a partir de los 14 días p. i., según el método descrito por Hermosilla et al. (13), y se llevaron hasta la fase de esporulación tras incubación en solución de dicromato potásico al 2% p/v a temperatura ambiente durante al menos una semana. Los ooquistes esporulados fueron recogidos y almacenados a 4 °C hasta su utilización.

Para la atenuación, los ooquistes esporulados de *E. ninakohlyakimovae* fueron sometidos a una irradiación

total de 20 kilorads con una intensidad de 6 mV x-rays, a una velocidad de 50 cGy/min durante 15 minutos. La irradiación se realizó en frascos de cultivos de 25 cm² (Nunc) sobre un volumen total de solución de ooquistes de 20 ml utilizando como fuente de irradiación X el acelerador lineal Mevatron (Siemens, Germany).

Animales y diseño experimental

Un total de 18 cabritos de raza Majorera fueron adquiridos en una granja local cuando tenían entre 1 y 5 días de vida; inmediatamente fueron tratados con Vecoxan® (Laboratorios Jansen) y Halocur® (Intervet) y se analizaron para descartar cualquier infección parasitaria. Una vez comprobado que estaban libres de parásitos fueron ubicados en jaulas metabólicas previamente esterilizadas, en las que se mantuvieron hasta el final de la experiencia. Durante todo el proceso los cabritos fueron alimentados con leche de sustitución Bacilactol® (Capisa) y pienso de arranque comercial (Capisa). También dispusieron de heno esterilizado y agua ad libitum.

Los animales se dividieron en los siguientes cuatro grupos experimentales:

- Grupo 1 (n=5): animales infectados a las 5 semanas de edad con ooquistes irradiados y re infectados 3 semanas más tarde con ooquistes no irradiados.
- Grupo 2 (n=5): animales infectados a las 5 semanas de edad con ooquistes no irradiados y re infectados 3 semanas más tarde con este mismo tipo de ooquistes.
- Grupo 3 (n=4): animales primoinfectados con ooquistes no irradiados a las 8 semanas de edad (control de reinfección).
- Grupo 4 (n=4): animales no infectados (grupo control).

La dosis infectante tanto en las primoinfecciones como en las reinfecciones fue de 2×10^5 ooquistes esporulados de *E. ninakohlyakimovae* (cepa GC), irradiados o no irradiados. Todas las

infecciones se realizaron por vía oral mediante sonda gastroruminal. El peso de los animales se controló semanalmente, y con la misma periodicidad se tomaron muestras de sangre por punción yugular para los análisis biopatológicos. Para el estudio parasitológico se tomaron muestras fecales directamente del recto a partir del día 14 post-infección, y el sacrificio de los animales se realizó a los 21 días post-infección (semana 11 de vida). Durante todo el estudio se examinó la evolución clínica de los animales. La intensidad de los signos clínicos se estableció teniendo en cuenta la consistencia de las heces y las características de la diarrea, desde heces normales a fluidas, diarrea acuosa o sanguinolenta.

Análisis parasitológico y biopatológico

La carga de ooquistes en heces (OPG: ooquistes por gramo de heces) fue determinada utilizando la técnica de MacMaster modificada (2). Para la determinación del recuento total de leucocitos y concentración de hemoglobina, las muestras se recogieron en tubos VetCollect® de IDEXX e inmediatamente fueron procesadas utilizando el analizador hematológico LaserCyte (IDEXX). El hematocrito se determinó mediante centrifugación utilizando tubos capilares estándares y centrífuga de microhematocrito. El recuento diferencial de leucocitos se realizó sobre frotis de sangre teñidos con la tinción panóptica (Diff-Quick) contando un total de 200 leucocitos por frotis.

Para el análisis estadístico, los recuentos fecales de ooquistes se transformaron en Log (OPG + 1) para obtener distribuciones normales según el test de Normalidad de Kolmogorov-Smirnov. La normalización de los datos no fue necesaria para analizar la evolución del peso corporal ni para los parámetros hematológicos. La evolución del peso corporal se expresó como tasa de crecimiento (\ln peso 1 - \ln peso 2/ $t \cdot 100$), donde “t”

es el tiempo (en días) entre los puntos de muestreo 1 y 2. Las comparaciones se realizaron mediante análisis factorial de la varianza ANOVA y el test de Comparación Múltiple de Turkey, más la prueba “t” de Student. Todos los análisis se realizaron mediante el programa informático SigmaStat 2.03, considerándose significativas las diferencias entre las distintas comparaciones para valores $P < 0,05$.

Resultados

Clínicos

Durante la primoinfección, los cabritos infectados con ooquistes irradiados mostraron signos clínicos moderados, mientras que los infectados con ooquistes no atenuados desarrollaron unos signos clínicos mucho más severos, aunque con importantes diferencias individuales (Tabla 1A). Después de la reinfección, tanto los animales infectados con ooquistes irradiados como con ooquistes no irradiados presentaron signos clínicos leves, mientras que el grupo control de reinfección mostró signos clínicos de moderados a severos. Dentro de este grupo, un animal murió en el curso de

la infección (Tabla 1B). A pesar de los signos clínicos observados, sólo se detectó un ligero incremento en el peso corporal de los controles no infectados cuando se comparó con los animales primo- y reinfectados (Fig. 1).

Parasitológicos

Durante la infección primaria, los cabritos infectados con ooquistes irradiados eliminaron una cantidad de ooquistes significativamente menor que aquéllos infectados con ooquistes no irradiados (Fig. 2A). La mayor eliminación de ooquistes se pudo observar a los 16 dpi en el grupo de animales infectado con ooquistes no atenuados, permaneciendo los valores elevados hasta los 20 dpi. En los cabritos infectados con ooquistes irradiados el pico máximo se observó a los 17 dpi, descendiendo a valores mínimos a los 19 dpi. Los recuentos fecales de ooquistes fueron negativos en los animales del grupo control no infectado.

Durante la reinfección, los valores de OPG fueron significativamente menores en los cabritos infectados, tanto con ooquistes irradiados como con ooquistes no irradiados, cuando se comparó con los animales del grupo

Figura 1. Evolución del peso corporal en animales no inmunizados y no infectados (G4, controles de infección), no inmunizados e infectados (G3, control de reinfección), inmunizados con ooquistes irradiados de *Eimeria ninakohlyakimovae* y reinfectados (G1, X-irradiados) e inmunizados con ooquistes no atenuados (G2 - no atenuados) y reinfectados. Se representan las medias \pm SEM.

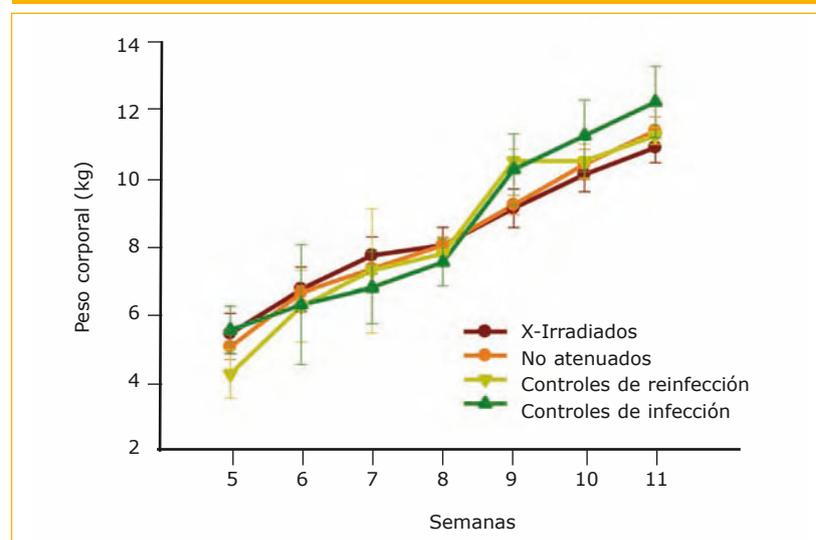


Figura 2. Recuentos de ooquistes por gramo de heces (OPG) durante la fase de primoinfección (A) y reinfección (B) en cabritos no inmunizados e infectados (G3, control de reinfección), inmunizados con ooquistes irradiados de *Eimeria ninakohl-yakimovae* y reinfectedos (G1, X-irradiados) e inmunizados con ooquistes no atenuados (G2, no atenuados) y reinfectedos. Los datos se expresan como valores transformados del log (OPG + 1) y se representan las medias ± SEM.

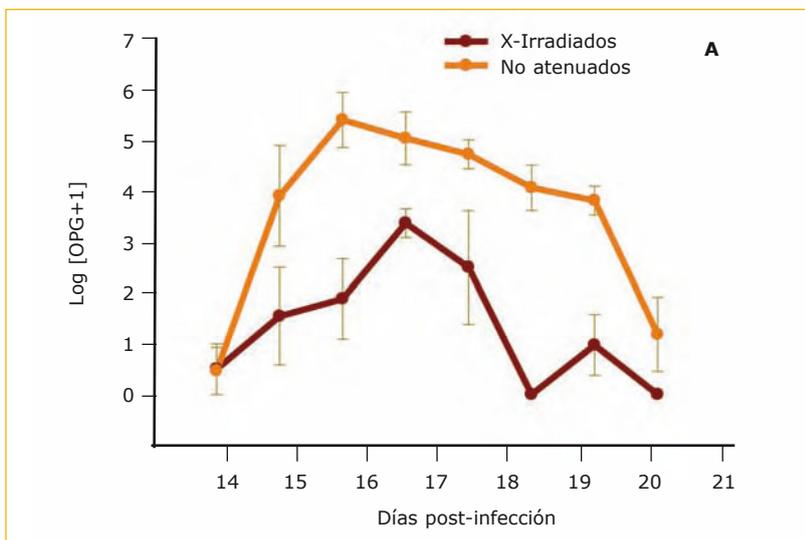
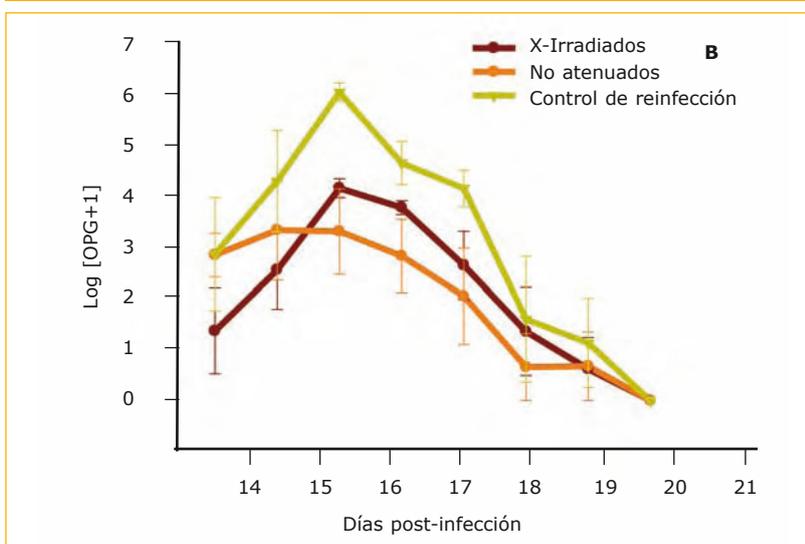


Figura 2b.



control de reinfección (Fig. 2B). Las diferencias fueron particularmente importantes en los días 16 y 17 post-infección. En todos los grupos los recuentos fecales de ooquistes comenzaron a descender a partir de los 16 dpi y fueron negativos a los 21 dpi.

En general, los cabritos infectados con ooquistes irradiados eliminaron por heces 95,3% menos ooquistes que los infectados con ooquistes no atenuados

durante la infección primaria. Durante la reinfección se produjo una reducción del total de ooquistes eliminado del 87,7% y del 60,5% en los animales sensibilizados con ooquistes irradiados y no atenuados, respectivamente.

Biopatológicos

Los análisis hematológicos no mostraron importantes cambios en la serie

roja (Tabla 2), sólo una ligera disminución en los valores de hematocrito y hemoglobina en los grupos 1 (infectados con ooquistes irradiados) y 2 (infectados con ooquistes no irradiados) durante la primoinfección, pudiéndose comprobar que durante la reinfección estos valores tendieron a la normalización en ambos grupos. En el grupo 3 (grupo control de reinfección) se observó un incremento en los valores de hematocrito y hemoglobina a partir de los 8 dpi, con valores máximos a los 16 dpi, coincidiendo con la fase clínica de la enfermedad.

En la serie blanca, las principales diferencias se observaron en los recuentos de neutrófilos en los grupos 1 y 2 durante la primoinfección. Durante esta fase, los neutrófilos de los cabritos del grupo 1 apenas sufrieron modificaciones y durante la reinfección los valores se incrementaron ligeramente, mientras que en el grupo 2 los neutrófilos tendieron a disminuir a partir de la primera semana post-infección y durante la reinfección los valores permanecieron sin cambios considerables. Los neutrófilos periféricos también tendieron a disminuir en las semanas subsiguientes a la infección en los animales del grupo 3.

La concentración de proteínas plasmáticas permaneció sin modificaciones considerables durante la experiencia. En general los cambios hematológicos fueron ligeros o moderados, motivo por el cual las diferencias entre semanas y grupos no llegaron a ser significativas.

Discusión

En este estudio se pone en evidencia que la inmunización con ooquistes irradiados de *E. ninakohl-yakimovae* podría ser una alternativa para el control de la coccidiosis caprina. El protocolo de inmunización seguido evitó que los animales sensibilizados con ooquistes irradiados padecieran coccidiosis clínica severa durante la primoinfección, al tiempo que desarrolló una respuesta inmune protectora que,

en términos globales, redujo la producción de ooquistes en un 90%. Hasta el momento no hay datos bibliográficos disponibles sobre ensayos de inmunoprotección frente a la eimeriosis en rumiantes utilizando ooquistes irradiados, pero el grado de protección alcanzado en el presente estudio es equiparable al descrito en ensayos similares realizado con pollos frente a *Eimeria tenella* (15) o *Eimeria maxima* (16), en este último caso utilizando irradiación gamma. Los resultados son incluso comparables con el nivel de inmunoprotección inducido por vacunas recombinantes recientemente ensayadas en pollos frente a la coccidiosis por *Eimeria tenella* (19) u otras especie de *Eimeria* (6) y próximos a los obtenidos en experiencias realizadas con vacunas comerciales como Paracox® (3). En algunos ensayos de inmunización de pollos con ooquistes atenuados por irradiación se observaron importantes diferencias en base a las características del inóculo (grado de atenuación de los ooquistes y dosis infectantes) (15), por lo que no se descarta que los beneficios inmunoprotectores obtenidos en este estudio puedan ser implementados modificando la estrategia de inmunización. Este tipo de actuación sería necesaria para que el proceso de inmunización derive en una mejora de los diferentes parámetros productivos.

Los beneficios clínicos y parasitológicos de la inmunoprotección sí fueron más contundentes. Los cabritos sensibilizados con ooquistes irradiados no sólo presentaron menores manifestaciones clínicas y menores recuentos de ooquistes durante la fase de primoinfección, en relación con los infectados con ooquistes no atenuados, sino que, además, el inóculo utilizado fue suficiente como para desarrollar una respuesta inmunoprotectora adquirida y reducir la severidad de los signos clínicos y la eliminación de ooquistes durante la reinfección, en porcentajes incluso superiores a los conseguidos durante la infección con ooquistes no irradiados (87,7% vs 60,5%). En concordancia con lo encontrado en el pre-

Tabla 1. Intensidad y características de la diarrea durante la primo-infección (A) y reinfección (B) en cabritos infectados con *Eimeria ninakohlyakimovae*.

(A) PRIMO-INFECCIÓN									
		Días post-infección							
		14	15	16	17	18	19	20	21
G1- irradiados									
	C1								
	C2								
	C3								
	C21								
	C22								
G2 - no atenuados									
	C4								
	C5								
	C7								
	C23								
	C24								
G3, G4 - controles									
	C8								
	C9								
	C25								
	C26								
	C31								
	C32								
	C33								
	C34								

(B) REINFECCIÓN									
		Días post-reinfección							
		14	15	16	17	18	19	20	21
G1 - irradiados									
	C1								♠
	C2								♠
	C3								♠
	C21								♠
	C22								♠
G2 - no atenuados									
	C4								♠
	C5								♠
	C7								♠
	C23								♠
	C24								♠
G3 - controles RI									
	C8								♠
	C9								♠
	C25								♠
	C26			♠					
G4 - controles									
	C31								♠
	C32								♠
	C33								♠
	C34								♠

Se detallan los datos individuales de cabritos (C) primo-infectados en el día 0 con 2×10^5 ooquistes esporulados atenuados mediante irradiación-X (G1 - irradiados) y con ooquistes no atenuados (G2 - no atenuados). Se utilizaron cinco animales como controles de infección (G4 - controles). En la reinfección, estos mismos grupos de animales se inocularon con 2×10^5 ooquistes esporulados no atenuados. La flecha (♠) señala el día de la muerte o sacrificio y la correspondiente necropsia de los animales. La evaluación de la diarrea se determinó utilizando el siguiente criterio:

-  Heces normales, sin manchas
-  Manchas diarreicas secas
-  Manchas diarreicas húmedas
-  Diarrea en extremidades
-  Diarrea fluida, acuosa o sanguinolenta

sente estudio, el nivel de inmunoprotección alcanzado en pollos inmunizados con ooquistes irradiados también se correlacionó con una mejora de la clínica y una disminución de los recuentos de ooquistes (3). En algunos estudios sí se logró asociar la inmunoprotección con un beneficio en los parámetros productivos (3, 15, 16).

Los cambios hematológicos resultaron en general ligeros en todos los animales infectados independientemente de si fueron inmunizados o no, por lo que no fue posible establecer una correlación entre el grado de inmunoprotección y la normalización de los parámetros hematológicos. En este sentido, los valores de hematocrito

Tabla 2. Parámetros hematológicos durante la primo-infección y reinfección en cabritos infectados con *Eimeria ninakohlyakimovae*.

		HTO	HB	WBC	BAN	NEU	LIN	EOS	MONO	PT
		%	g/dl	cel/ μ l	g/dl					
Primo infección										
G1	0 dpi	27	9,0	12234	103	4857	6124	332	819	5,3
	8 dpi	25	8,0	9730	65	4198	5232	32	203	5,0
	16 dpi	24	7,9	9358	15	4666	3916	83	679	5,9
G2	0 dpi	26	8,5	16708	140	8187	7526	316	538	5,2
	8 dpi	28	8,8	10572	151	3359	6018	208	836	5,2
	16 dpi	25	8,2	7488	136	3153	4157	55	259	5,4
G4	0 dpi	20	7,4	17540	0	6927	10438	55	121	5,9
	8 dpi	26	7,5	19520	0	9091	9107	304	1018	6,4
	16 dpi	25	8,6	18765	177	10867	7158	89	474	6,35
Reinfección										
G1	0 dpri	24	8,0	9138	27	4131	4353	250	375	5,7
	8 dpri	28	9,3	11660	661	6105	4467	207	750	5,7
	16 dpri	26	8,9	7008	59	3299	3517	43	87	5,5
	23 dpri	28	9,1	16182	258	9074	5864	186	760	5,7
G2	0 dpri	25	8,3	9916	112	4143	5336	88	238	5,4
	8 dpri	29	9,6	11396	201	5155	5523	314	255	5,4
	16 dpri	29	9,5	10656	139	4008	3420	360	442	5,5
	23 dpri	29	9,7	11832	44	5220	5364	72	1084	5,4
G3	0 dpi	23	8,0	14095	346	9049	3555	260	787	5,4
	8 dpi	29	9,5	10640	0	5164	5399	890	72	5,5
	16 dpi	35	11,0	11680	114	5862	4855	29	718	5,3
	23 dpi	27	8,6	10265	0	3690	5125	110	1275	5,6
G4	0 dpi	36	10,9	14513	0	5410	8853	113	136	5,2
	8 dpi	32	9,6	13013	0	4492	8257	263	0	5,2
	16 dpi	31	9,7	13680	0	3726	9686	131	136	5
	23 dpi	32	9,7	12940	0	2847	9780	312	0	5,2

Se detallan las medias de los animales infectados con ooquistes esporulados atenuados mediante irradiación-X (G1 - irradiados) y con ooquistes no atenuados (G2 - no atenuados). Se utilizaron tres animales como controles de infección (G3 - controles). En la reinfección, estos mismos grupos de animales se inocularon con 2×10^5 ooquistes esporulados no atenuados.

y hemoglobina sólo mostraron una ligera disminución en los grupos G1 (infectados con ooquistes irradiados) y G2 (infectados con ooquistes no atenuados) durante la primoinfección, pudiéndose deber, como indican Bangoura y Dauschies (2) a ligeras pérdidas de sangre vía intestinal que se producen como consecuencia de la infección aguda. Igualmente, según describen estos mismos autores, en el grupo G3 (grupo control de reinfección) observamos un incremento en los valores de hematocrito y hemoglobina a partir de los 8 dpi, alcanzado valores máximos a los 16 dpi, coincidiendo con la fase clínica de la enfermedad, pudiéndose deber esta

hemoconcentración a la pérdida de fluidos a través del intestino. En la serie blanca, durante la primoinfección, los neutrófilos disminuyeron de forma considerable en los grupos 2 y 3, posiblemente debido al paso de los neutrófilos desde la sangre hasta la mucosa intestinal, hacia donde se movilizan en respuesta a diversos factores quimiotácticos producidos por los tejidos inflamados (4); por el contrario, durante la fase de primoinfección del grupo G1 (cabritos inmunizados con ooquistes irradiados) los neutrófilos apenas sufrieron modificaciones, posiblemente por el escaso daño que el parásito produjo en estos animales.

En base a los resultados obtenidos

en el presente estudio no es posible establecer con certeza los mecanismos inmunológicos responsables de la inmunoprotección inducida frente a *E. ninakohlyakimovae* mediante la inmunización con ooquistes irradiados. La hipótesis más probable sería que los ooquistes atenuados siguieran manteniendo la facultad de exquistarse *in vivo* y que los esporozoítos resultantes invadieran las células endoteliales sin desarrollar, debido a su atenuación, ni igual número de esquizontes maduros, ni esquizontes del mismo tamaño que en el caso de infecciones con ooquistes no atenuados, pero que sí fueran capaces de estimular una respuesta inmune protectora. Esta posibilidad explicaría la menor intensidad de los signos clínicos observada en el grupo de animales inmunizado con ooquistes irradiados y el elevado grado de protección conseguido. La hipótesis de que durante la primera merogonia pueden ya desencadenarse los mecanismos para el desarrollo de una respuesta inmune adquirida concordaría con observaciones realizadas por nuestro grupo (datos no publicados) según las cuales el número de esquizontes inmaduros encontrado en el periodo prepatente (7 dpi, merogonia I) es significativamente menor en animales reinfectados que en primoinfectados. Este planteamiento está en consonancia con datos publicados por Jenkins et al. (15), según los cuales la inmunización de pollos con ooquistes irradiados de *E. tenella* desarrolla una protección que no requiere del desarrollo de una primera generación de esquizontes durante la infección primaria.

En principio no sería descartable que debido a la irradiación los ooquistes no hubieran tenido la aptitud de exquistarse y que el menor número de ooquistes que sí lograron hacerlo pudiera haber sido suficiente para desarrollar una respuesta inmune protectora en ausencia de signos clínicos severos. Sin embargo, esta posibilidad contrasta con la apariencia microscópica normal que presentaban la totalidad de los ooquistes que se sometieron a

irradiación. Además, el diseño del protocolo de atenuación se realizó de tal forma que todos los ooquistes recibieran igual dosis de irradiación. Para este fin los ooquistes se dispusieron en la botella de cultivo de manera que formarían una fina película en el fondo, que fue donde se concentró el haz de rayos X. Esta posibilidad también se ha descartado en trabajos similares al realizado en el presente estudio (15), en los que demostró que la exquistación de ooquistes expuestos a 10, 15, 20 y 30 kilorads de irradiación-X no determinó diferencias en la liberación de esporozoítos móviles. Este mismo grupo de investigación también demostró que la exposición a 15 o 25 kilorads de irradiación-gamma tiene un mínimo efecto sobre los antígenos estructurales de los ooquistes irradiados (17).

El presente trabajo constituye la primera evidencia de inmunoprotección realizada en rumiantes frente a la coccidiosis producida por *Eimeria spp.* utilizando ooquistes irradiados. El grado de inmunoprotección conseguido en términos de reducción de los recuentos fecales de ooquistes y la menor severidad del cuadro clínico abren la posibilidad de la utilización de este tipo de inmunizaciones en el control de la coccidiosis caprina y en rumiantes en general. No obstante, como requisito previo, serían necesarios estudios adicionales que clarificaran los mecanismos intrínsecos subyacentes al proceso de inmunoprotección así como el ensayo de nuevos protocolos que aumentarían la rentabilidad de la inmunización en términos productivos.

Agradecimientos

El presente trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología de España (MEC, proyecto nº AGL2007-63415) y los Fondos FEDER, así como por la Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información (ACII-SI) (Ref. SolSubC200801000244).

Bibliografía

- 1.- Balicka-Ramisz A (1999) Studies on coccidiosis in goats in Poland. *Vet Parasitol* 81:347-349.
- 2.- Bangoura B, Dauschies A (2007) Parasitological and clinical parameters of experimental *Eimeria zuernii* infection in calves and influence on weight gain and haemogram. *Parasitol Res* 100:1331-1340.
- 3.- Crouch CF, Andrews SJ, Ward RG, Francis MJ (2003) Protective efficacy of a live attenuated anti-coccidial vaccine administered to 1-day-old chickens. *Avian Pathol* 32:297-304.
- 4.- Chtanova T, Shaeffer M, Han S, van Dooren GG, Nollmann M, Herzmark P, Chan SW, Satija J, Camfield D, Aaron H, Striepen B, Robey EA (2008) Dynamics of neutrophil migration in lymph nodes during infection. *Immunity* 29:467-496.
- 5.- Ding X, Lillehoj HS, Dalloul RA, Min W, Sato T, Yasuda A, Lillehoj EP (2005) In ovo vaccination with the *Eimeria tenella* EtMIC2 gene induces protective immunity against coccidiosis. *Vaccine* 23:3733-3740.
- 6.- Ding J, Qian W, Liu Q, Liu Q (2012) Multi-epitope recombinant vaccine induces immunoprotection against mixed infection of *Eimeria spp.* *Parasitol Res* 110:2297-2306.
- 7.- Faizal ACM, Rajapakse RPVJ (2001) Prevalence of coccidia and gastrointestinal nematode infections in cross bred goats in the dry areas of Sri Lanka. *Small Rumin Res* 40:233-238.
- 8.- Foreyt WJ, Gates NL, Wescott RB (1979) Effects of lasalocid and monensin against experimentally induced coccidiosis in confinement-reared lambs from weaning to market weight. *Am J Vet Res* 40:97-100.
- 9.- Gerhold RW, Fuller AL, Lollis L, Parr C, McDougald LR (2011) The efficacy of anticoccidial products against *Eimeria spp.* in northern bobwhites. *Avian Dis* 55:59-64.
- 10.-Gjerde B, Helle O (1991) Chemoprophylaxis of coccidiosis in lambs with a single oral dose of toltrazuril. *Vet Parasitol* 38:97-107.
- 11.-Harper CK, Penzhorn BL (1999) Occurrence and diversity of coccidia in indigenous, Saanen and crossbred goats in South Africa. *Vet Parasitol* 82:1-9.
- 12.-Hasbullah, Itahana H, Uchida T, Inamoto T, Nakai Y, Ogimoto K (1996) Medication of feedlot calves infected with *Eimeria spp.* by a combination of sulfamonomethoxine and ormetoprim. *J Vet Med Sci* 58:169-70.
- 13.-Hermosilla C, Barbisch B, Heise A, Kowalik S, Zahner H (2002) Development of *Eimeria bovis* in vitro: suitability of several bovine, human and porcine endothelial cell lines, bovine fetal gastrointestinal, Madin-Darby bovine kidney (MDBK) and African green monkey kidney (VERO) cells. *Parasitol Res* 88:301-307.
- 14.-Horton GM, Stockdale PH (1981) Lasalocid and monensin in finishing diets for early weaned lambs with naturally occurring coccidiosis. *Am J Vet Res* 42:433-436.
- 15.-Jenkins MC, Augustine PC, Danforth HD, Barta JR (1991) X-irradiation of *Eimeria tenella* oocysts provides direct evidence that sporozoite invasion and early schizont development induce a protective immune response(s). *Infect Immun* 59: 4042-4048.
- 16.-Jenkins MC, Chute MB, Danforth HD (1997) Protection against coccidiosis in outbred chickens elicited by gamma-irradiated *Eimeria maxima*. *Avian Dis* 41:702-708.
- 17.-Jenkins MC, Chute MB, Danforth HD, Lillehoj HS (1995) Gamma-irradiated and nonirradiated *Eimeria tenella* sporozoites exhibit differential uracil

- uptake and expression of a 7- to 10-kDa metabolic antigen. *Exp Parasitol* 80:645-653.
- 18.-Koudela B, Boková A (1998) Coccidiosis in goats in the Czech Republic. *Vet Parasitol* 76:261-267.
- 19.-Li J, Zheng J, Gong P, Zhang X (2012) Efficacy of *Eimeria tenella* rhomboid-like protein as a subunit vaccine in protective immunity against homologous challenge. *Parasitol Res* 110:1139-1145.
- 20.-Ma D, Ma C, Pan L, Li G, Yang J, Hong J, Cai H, Ren X (2011) Vaccination of chickens with DNA vaccine encoding *Eimeria acervulina* 3-1E and chicken IL-15 offers protection against homologous challenge. *Exp Parasitol* 127:208-214.
- 21.-McMeniman NP, Elliott R (1995) Control of coccidia in young calves using lasalocid. *Aust Vet J* 72:7-9.
- 22.-Mundt HC, Bangoura B, Mengel H, Keidel J, Dausgschies A (2005) Control of clinical coccidiosis of calves due to *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* with toltrazuril under field conditions. *Parasitol Res* 97 Suppl 1:S134-42.
- 23.-Peek HW, Landman WJ (2005) Resistance to anticoccidial drugs of Dutch avian *Eimeria* spp. field isolates originating from 1996, 1999 and 2001. *Avian Pathol* 32:391-401
- 24.-Ruiz A, Behrendt JH, Zahner H, Hermosilla C, Pérez D, Matos L, Muñoz MC, Molina JM, Taubert A (2010) Development of *Eimeria ninakohlyakimovae* in vitro in primary and permanent cell lines. *Vet Parasitol* 173:2-10.
- 25.-Ruiz A, González JF, Rodríguez E, Martín S, Hernández YI, Almeida R, Molina JM, (2006) Influence of climatic and management factors on *Eimeria* infections in goats from semi-arid zones. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 53:399-402.

Actividad *in vitro* de la planta endémica canaria *Ruta pinnata* frente al coccidio caprino *Eimeria ninakohlyakimovae*

López, A.M. (1); Muñoz, M.C. (1); Molina, J.M. (1); Hermosilla, C. (2); Taubert, A. (2); Pérez, D. (1); Matos, L. (1); Guedes, A.C. (1); Martín, S. (1); Ruiz, A. (1*)

(1) Departamento de Patología Animal, Producción Animal, Bromatología y Tecnología de los alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Gran Canaria, España

(2) Institute of Parasitology, Justus Liebig University Giessen, Giessen, Germany

RESUMEN: La coccidiosis parasitaria causada por *Eimeria ninakohlyakimovae* constituye una de las enfermedades parasitarias que origina mayores pérdidas económicas en la producción caprina, muchas veces asociada a las altas tasas de mortalidad en animales jóvenes. La utilización continua de antisépticos y anticoccidiósicos para el control y tratamiento de la coccidiosis ha dado lugar tanto a la aparición de resistencias, fenómeno creciente y global. Este hecho, junto a la demanda de nuevos productos efectivos, de bajo costo y carentes de toxicidad, hace necesario el estudio y descubrimiento de nuevos agentes anticoccidiósicos. El presente trabajo tuvo como objetivo la valoración del efecto anticoccidiósico de extractos de la planta endémica canaria *Ruta pinnata* frente a *Eimeria ninakohlyakimovae*. Con este propósito se realizaron dos ensayos, el test de inhibición de la esporulación de ooquistes y el test de viabilidad de esporozoítos. En el test de inhibición de la esporulación, los ooquistes fueron tratados con diferentes concentraciones de extractos (diluidos en DMSO). Como control positivo se utilizó formaldehído al 10% y como negativo las correspondientes diluciones de DMSO. Para la realización del test de viabilidad de esporozoítos, éstos fueron incubados durante 3 horas con diferentes concentraciones de extracto de *Ruta pinnata* diluidos en DMSO. Tras este periodo de exposición, se evaluó la viabilidad de los esporozoítos, previamente teñidos con Sytox Orange, mediante fluorescencia. Como control negativo se usaron las correspondientes diluciones de DMSO y como control positivo una solución de esporozoítos inactivados por calor. La inhibición de la esporulación de los extractos de *Ruta pinnata* tras 30 minutos de incubación fue sólo moderada, pero a las 24 horas la inhibición fue similar a la obtenida en el control positivo. También se observó un efecto de los extractos frente a la viabilidad de los esporozoítos a concentraciones mayores de 1 mg/ml, siendo similar la mortalidad a la obtenida en el control positivo tras la inactivación con calor para concentraciones superiores a 5 mg/ml. Estos resultados abren la posibilidad de que *Ruta pinnata* pueda ser utilizada como anticoccidiósico para reducir la carga parasitaria del medio, así como en el tratamiento de afecciones producidas por este tipo de parásitos, no descartándose que esta actividad pueda ser trasladable a otros parásitos animales o humanos.

SUMMARY: Coccidiosis caused by the protozoan parasite *Eimeria ninakohlyakimovae* causes major economic losses in goat production, often associated with high mortality rates in young animals. Continuous and indiscriminate use of antiseptics and anticoccidials for the control and treatment of coccidiosis has resulted in the development of resistance, a growing global phenomenon. This fact, together with the demand for new drugs which are effective, economic and free of toxicity emphasize the necessity of investigation and discovery of new anticoccidial agents. This study aimed to evaluate the anticoccidial effects of extracts derived from the Canarian endemic plant *Ruta pinnata* against *E. ninakohlyakimovae*. For this purpose, an assay for the evaluation of sporulation rates of oocysts treated with different concentrations of plant extracts (diluted in DMSO) was employed. Different dilutions of formalin and DMSO were used as positive and negative controls, respectively. The anticoccidial activity was further examined testing the viability of the sporozoites after 3 h incubation with different concentration of plant extracts, using DMSO as negative and heat inactivated sporozoites as positive controls, respectively. The viability of the sporozoites was tested by fluorescence microscopy after Sytox Orange staining. The inhibition of oocyst sporulation of the plant extracts of *Ruta pinnata* after 30 min incubation was moderate, but a longer 24 h incubation induced an inhibition similar to that of positive control. Concentrations higher than 1 mg/ml of the plant extracts also affected the viability of the sporozoites, with mortality rates being similar to those found for heat inactivated sporozoites at concentrations higher than 5 mg/ml. These results suggest *Ruta pinnata* as a potential anticoccidial drug candidate for reduction of parasite environmental load and treatment of the disease caused by coccidian parasites. Potential effects of this plant against other animal or human parasites remain to be elucidated.

Introducción

Los coccidios del género *Eimeria* son parásitos que se desarrollan fundamentalmente en las células epiteliales de aparato digestivo, siendo la principal acción patógena del parásito la destrucción de dichas células. Algunas especies como *Eimeria ninakohlyakimovae* (*E. ninakohlyakimovae*) también incluyen en su desarrollo endógeno la multiplicación asexual en células endoteliales (28) del intestino, todo lo cual provoca diarreas y deshidratación, y en ocasiones la muerte, principalmente en animales jóvenes. En general, el daño producido por la coccidiosis se traduce en cuantiosas pérdidas económicas en la producción ganadera (11). *E. ninakohlyakimovae*, considerada una de las especies de *Eimeria* más patógenas para el caprino (8), presenta una distribución mundial, siendo la tercera especie más frecuentemente encontrada en los caprinos canarios (30% aproximadamente) después de *E. arloingi* e *E. alijevi* (26).

Existen diversos factores que influyen en la distribución y presencia de *Eimeria spp.* en los sistemas de producción caprina, entre ellos: 1) el régimen de explotación (intensivo/extensivo), 2) las condiciones climáticas, 3) la edad de los animales y 4) el manejo, incluyendo las prácticas higiénico-sanitarias (7, 10, 16, 26). El conocimiento de todos estos factores, en combinación con la profilaxis terapéutica, ha sido tradicionalmente la base para el diseño de estrategias de control eficaces. Entre los anticoccidiósicos y anticoccidiostáticos más comúnmente utilizados en rumiantes destacan las sulfonamidas (31), derivados del acetonitrilo de benceno como el tortrazuril (22) o el diclazuril (27, 33) o el decoquinato (35).

El empleo de fármacos comerciales en el control de la coccidiosis en rumiantes, al igual que ocurre en otras parasitosis, presenta algunas limitaciones, como el elevado coste de los pro-

ductos disponibles en el mercado, los residuos de dichos fármacos en leche o carne y, sobre todo, la creciente aparición de resistencias (23). Todo lo anterior ha incentivado la búsqueda de nuevas alternativas, como el empleo de plantas medicinales que, por tratarse de un recurso más sostenible, está experimentando un especial resurgimiento. La mayoría de los trabajos de investigación realizados hasta el momento se han enfocado al estudio de la actividad antihelmíntica de diferentes plantas frente a nematodos gastrointestinales, como *Annosa squamosa* (30) o *Ziziphus nummularia* y *Acacia nilotica* (3). En cambio, los estudios realizados con parásitos pertenecientes al *Phylum Apicomplexa* no son tan numerosos. Éstos han sido dirigidos principalmente a la realización de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad frente a *Plasmodium* (1, 2). Otros estudios se han centrado en la búsqueda de plantas con actividad anticoccidiósica, especialmente ensayos *in vivo* con especies de coccidios que parasitan a aves. Así, extractos procedentes de *Artemisia annua* y el aceite esencial del orégano usado como suplemento en la dieta de broilers infectados experimentalmente con *Eimeria tenella* disminuyeron los recuentos de ooquistes por gramo de heces de los animales (9, 12).

El Archipiélago Canario constituye, por su localización geográfica, uno de los enclaves de mayor diversidad florística y riqueza en especies autóctonas del país (4, 5). En un importante número de plantas de esta flora autóctona la sabiduría tradicional ha atribuido propiedades medicinales, entre las cuales se encuentra *Ruta pinnata*, de la familia de las Rutaceae, también conocida como ruda salvaje. En general el uso de las rutáceas en medicina está extendido por todo el mundo, especialmente en el área del mediterráneo. Un ejemplo de esto es un ensayo realizado a partir de extractos obtenidos por la cocción de *Ruta graveolens* en el Norte de Italia, en el cual se comprobó

una alta actividad frente a nematodos de rumiantes, ectoparásitos del perro productores de sarna o eliminando moscas en granjas de porcino. (13). Otros estudios realizados en Canadá han demostrado el empleo de *R. graveolens* en la práctica etnoveterinaria, concretamente en el tratamiento de endoparásitos de cerdos, gatos y perros, como *Giardia* y *Toxoplasma* (18). El objetivo del presente estudio ha sido la evaluación *in vitro* del efecto anticoccidiósico de extractos metanólicos procedentes de *Ruta pinnata* frente al coccidio caprino *Eimeria ninakohlyakimovae*.

Material y métodos

Obtención del material vegetal y preparación de los extractos

El material vegetal de partida fueron frutos maduros de la planta endémica canaria *Ruta pinnata*. Inmediatamente después de su recogida, las muestras vegetales fueron enviadas al Instituto Universitario de Bioorgánica Antonio Padrón (Universidad de La Laguna), donde se realizó la preparación del extracto. Tras su secado y homogeneización, el material vegetal se sometió a un proceso de extracción usando metanol como disolvente. La extracción se realizó en columna hasta agotamiento utilizando un equipo Soxhlet, para lo cual se emplearon 1,5 litros de disolvente por cada 70 g de fruto seco y homogenizado.

El extracto obtenido fue utilizado a diferentes concentraciones en los ensayos *in vitro*, diluidos con DMSO 99% p/v (Sigma-Aldrich) a concentraciones que no afectasen a la viabilidad de los parásitos. El DMSO que se utilizó para disolver el extracto tuvo una concentración final máxima del 3% v/v.

Animales donantes

Como animales donantes de parásitos se usaron cabritos de raza Majora de

Correspondencia

Antonio Ruiz Reyes (Unidad de Parasitología). Tf.: 928 451113; Fax: 928 454341; Email: aruiz@dpat.ulpgc.es

1 a 3 días de edad. Los cabritos fueron criados en condiciones de esterilidad en boxes previamente desinfectados y alimentados mediante lactancia artificial, agua, pienso para cabritos y heno estéril. A las 4 semanas de vida los animales se infectaron oralmente con 2×10^5 ooquistes esporulados de la cepa GC de *Eimeria ninakohlyakimovae* aislada inicialmente en la isla de Gran Canaria.

Obtención de los parásitos

Para la obtención de ooquistes de *E. ninakohlyakimovae* se recogieron las heces de los animales infectados desde el día 14 post-infección durante aproximadamente una semana. Para la concentración de los ooquistes se usó un método de flotación en solución concentrada de azúcar (1,5 g/l) mezclando al 50% la solución de azúcar con una solución de heces previamente filtrada a través de varios filtros con poro decreciente para disminuir al máximo la cantidad de detritus. Los ooquistes obtenidos tras la flotación se volvieron a concentrar por centrifugación en tubos de 50 ml a 3.000 r.p.m. durante 10 minutos.

Parte de los ooquistes no esporulados se destinaron a la realización de los ensayos de inhibición de la esporulación, para lo cual se transfirieron a botellas de cultivo y se mantuvieron a 4°C hasta el comienzo del ensayo, que nunca excedió los 3 días desde su recogida. El resto de ooquistes no esporulados se incubaron a temperatura ambiente (TA) en una solución de dicromato potásico al 2% durante una semana con aireación forzada para favorecer la esporulación. Los ooquistes esporulados se usaron para la obtención de esporozoítos con los cuales realizar el ensayo de viabilidad de esporozoítos. Para la purificación de los ooquistes esporulados se utilizaron gradientes de Percoll y la exquistación tuvo lugar en dos fases. En una primera fase los ooquistes se suspendieron en L-cisteína HCl estéril 0,02 M y NaHCO_3 0,02M y se incubaron a 37°C y 5% CO_2 durante

20 horas. A continuación los ooquistes se mezclaron en solución balanceada de Hank's con 0,4 % de tripsina (Sigma, Aldrich) y 8% de bilis bovina filtrada obtenida de muestras de matadero, y se incubaron a 37°C, 5% CO_2 durante un máximo de 4 horas. Los esporozoítos libres se lavaron 3 veces con medio RPMI centrifugando a 1500 x g durante 20 minutos.

Ensayo de inhibición de la esporulación

Este test determina la capacidad del extracto muestreado para inhibir el proceso de esporulación de los ooquistes. Para la realización del ensayo se incubaron en tubos Eppendorf a TA 5.000 ooquistes no esporulados con diferentes concentraciones de extracto. En cada tubo se dispensaron 20 μl de solución con los ooquistes, 30 μl de dH_2O , 50 μl de dicromato potásico al 10% y 100 μl de cada dilución de extracto. Los periodos de incubación seleccionados fueron 30 minutos, 4 horas y 24 horas. Después de que transcurriese el tiempo seleccionado, los ooquistes se lavaron con dH_2O mediante centrifugación (1.500 x g, 5 mi). Tras el último lavado, los ooquistes se dispensaron en una placa de 24 pocillos en una solución de dicromato potásico al 2% (C.F.). Como control negativo se usó el DMSO a diferentes concentraciones, atendiendo a las diluciones de los extractos, y como control positivo se emplearon diluciones seriadas de formaldehído al 4%. La lectura de los resultados se realizó después de incubar las placas a TA durante 48 horas. Se realizaron triplicados de cada condición y el ensayo se repitió en dos días diferentes; para todas las condiciones se contaron al menos 100 ooquistes, diferenciando entre esporulados y no esporulados.

Ensayo de viabilidad de esporozoítos

Este ensayo permite determinar si un extracto vegetal es capaz de producir daños irreversibles que conduz-

can a la muerte de los esporozoítos. Para realizar este ensayo se dispensaron 5.000 esporozoítos diluidos en medio RPMI (Sigma) en placas de 96 pocillos con diferentes concentraciones de extracto metanólico de *Ruta pinnata* y las correspondientes diluciones del control negativo (DMSO). Como control positivo se usaron esporozoítos inactivados por calor a 60°C durante 30 minutos. Tras 3 horas de incubación se retiraron cuidadosamente 100 μl de sobrenadante y los esporozoítos se tiñeron añadiendo 100 μl de Sytox Orange (Invitrogen) diluido en medio RPMI a concentración 5 μM , resultando una concentración final de Sytox Orange de 2,5 μM . Tras 15 mi de incubación adicional, se procedió a la lectura de los resultados utilizando un microscopio de fluorescencia (Olympus, Eclipse 80i) usando una longitud de onda de excitación de 510-560 nm y 575-590 nm de emisión. Se realizaron triplicados de cada condición y el ensayo se repitió en dos días diferentes; para todas las condiciones se contaron al menos 100 esporozoítos, diferenciando entre viables (no teñidos) y no viables (teñidos).

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se agruparon todas las repeticiones para cada uno de los correspondientes ensayos y se estimaron las diferencias mediante el test no paramétrico Chi-cuadrado. El efecto de las diferentes concentraciones de extracto se comparó con los correspondientes controles DMSO y se consideraron significativas las diferencias para $P < 0,05$. En todos los análisis se utilizó el programa estadístico Sigmatat 3.1 bajo entorno Windows.

Resultados y discusión

En el presente trabajo se ha evaluado la actividad anticoccidiósica *in vitro* de extractos metanólicos de la planta endémica canaria *Ruta pinnata* y, en su conjunto, los resultados obtenidos demuestran que los extractos vegetales

poseen una importante actividad frente al coccidio de caprino *Eimeria ninakohlyakimovae*, inhibiendo la esporulación de los ooquistes y disminuyendo la viabilidad de los esporozoítos.

El grado de inhibición de la esporulación varió en función del tiempo de exposición de los ooquistes no esporulados con los extractos de *Ruta pinnata*. Tal y como puede observarse en la Fig. 1A, a los 30 minutos de incubación la mayoría de los ooquistes habían esporulado (80-90%) en los controles negativos y en la mayoría de las concentraciones del extracto de *Ruta pinnata* ensayadas, con excepción de la concentración de 3 mg/ml, en la que sí se apreció una reducción significativa ($P < 0,01$) del porcentaje de esporulación. Tras 4 horas de incubación, el porcentaje de ooquistes esporulados disminuyó de forma significativa ($P < 0,001$) a concentraciones de extracto de 1,5 y 3 mg/ml y ligeramente, pero sin significación estadística, para las concentraciones C3 y C4 (Fig. 1B). Por último, después de 24 horas de exposición de los ooquistes no esporulados a los extractos de la planta el efecto inhibitorio se observó a concentraciones finales de extracto por encima de 0,75 mg/ml ($P < 0,001$), presentando la concentración de 3 mg/ml del extracto una actividad similar a la del control positivo (formaldehído 2% en este caso) (Fig. 1C).

La importancia de este hallazgo radica en la capacidad del extracto metanólico de *Ruta pinnata* para detener la evolución de los ooquistes, y por tanto, abortar el ciclo exógeno del parásito. Los ooquistes de *E. ninakohlyakimovae*, como ocurre con el resto de especies del género *Eimeria*, son eliminados al medio por las heces de los animales infectados en forma no esporulada y al cabo de 48 horas sufren un proceso de reproducción asexual (esporogonia) que los convierten en elementos infectantes (19). Los extractos de *Ruta pinnata* reducirían de esta forma las posibilidades de contagio de nuevos hospedadores, con un efecto similar al

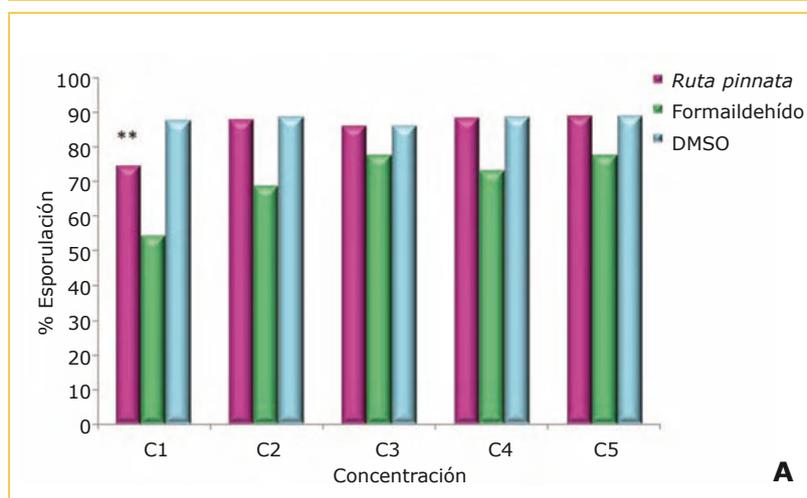
Tabla 1. Concentraciones finales de un extracto metanólico de *Ruta pinnata*, control positivo (formaldehído) y control negativo (DMSO) utilizadas en los ensayos de inhibición de la esporulación de ooquistes.

Concentraciones	<i>Ruta pinnata</i> (mg/ml)	Control negativo DMSO (%)	Control positivo Formaldehído (%)
C1	3	3	2
C2	1,5	1,5	1
C3	0,75	0,75	0,5
C4	0,18	0,18	0,1
C5	0,02	0,02	0,01

Tabla 2. Concentraciones finales de extracto metanólico de *Ruta pinnata* y control negativo (DMSO) utilizadas en los ensayos de viabilidad de esporozoítos.

Concentraciones	<i>Ruta pinnata</i> (mg/ml)	Control negativo DMSO (%)
C1	10	0,6
C2	5	0,3
C3	2,5	0,15
C4	1,25	0,03
C5	0,625	0,006
C6	0,5	0,0075
C7	0,025	0,0015

Figura 1A. Ensayo de inhibición de la esporulación de ooquistes de *Eimeria ninakohlyakimovae*. Se evaluó el efecto anticoccidiósico del extracto metanólico de *Ruta pinnata* a diferentes concentraciones tras 30 mi (Fig. 1A), 4 h (Fig. 1B) y 24 h (Fig. 1C) de incubación. Como control negativo se empleó DMSO y como control positivo formaldehído (formol). El porcentaje de esporulación se determinó tras lavar y posteriormente incubar los ooquistes a TA durante 48 h. Nivel de significación estadística al comparar los extractos con el control negativo: $P < 0,01$ (**) y $P < 0,001$ (**).



que presentan ciertos antisépticos que se usan para la desinfección de los corrales, algunos de los cuales han sido evaluados *in vitro* frente a ooquistes de *E. tenella* (14). Recientemente se ha estudiado también el efecto antiséptico *in vitro* de determinados aceites esen-

ciales de origen vegetal en base a su capacidad de destrucción de ooquistes de *Eimeria spp.* aviaries, siendo los aceites de artemisa, té, tomillo y clavo los más efectivos (24). También del Cacho et al. (9), al evaluar extractos procedentes de *Artemisia annua*,

encontraron una gran inhibición en el desarrollo y esporulación de los ooquistes de *E. tenella* debido a una alteración de la pared de los mismos. En cambio, Saratsi et al. (29) no lograron inhibir la esporulación de ooquistes *in vitro* de especies de *Eimeria* ovinas más allá de un 10,7% empleando diferentes extractos de la planta forrajera conocida como esparceta o pipirigallo (*Onobrychis viciifolia*).

El efecto de los extractos de *Ruta pinnata* sobre la viabilidad de los esporozoítos de *E. ninakohlyakimovae* fue dosis dependiente tal y como puede apreciarse en la Fig. 2. A concentraciones de 5 y 10 mg/ml los extractos produjeron la muerte del 100% de los esporozoítos, con efecto similar a la inactivación por calor ($P < 0,001$). A diluciones más altas del extracto siguió observándose el mismo efecto, siendo significativas las diferencias en todos los casos ($P < 0,001$); la menor concentración que produjo una inhibición significativa de la viabilidad de los esporozoítos (30%) fue de 0,1 mg/ml (Fig. 2). El interés científico de la actividad de los extractos de *Ruta pinnata* frente a los esporozoítos radica en el potencial de la planta como anticoccidiósico o anticoccidiostático, ya que los esporozoítos constituyen el estado evolutivo del parásito que en primera instancia infecta las células del hospedador, las células endoteliales de los vasos linfáticos del ileon distal en el caso de *E. ninakohlyakimovae* (34). Hasta el momento no se han publicado estudios donde se evalúe la actividad anticoccidiósica *in vitro* de material de origen vegetal frente a esporozoítos de *Eimeria spp.* de rumiantes, aunque sí se han realizado algunos ensayos *in vitro* en aves. Así, se ha demostrado que la curcumina presenta un marcado efecto inhibitorio *in vitro* frente a esporozoítos de *E. tenella* induciendo cambios morfológicos y reduciendo su viabilidad e infectividad (17). Del mismo modo, Burst et al. (6) han observado que la viabilidad de los esporozoítos de *E. tenella* es inhibida por el efecto del carvacrol, la curcumi-

Figura 1B

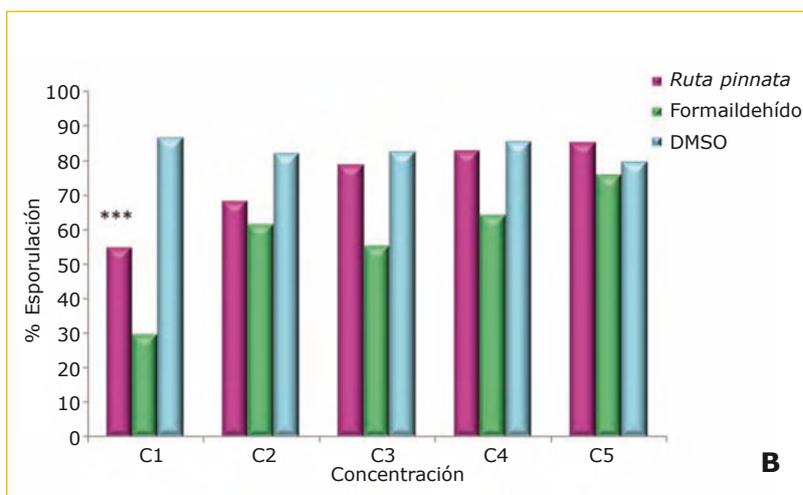
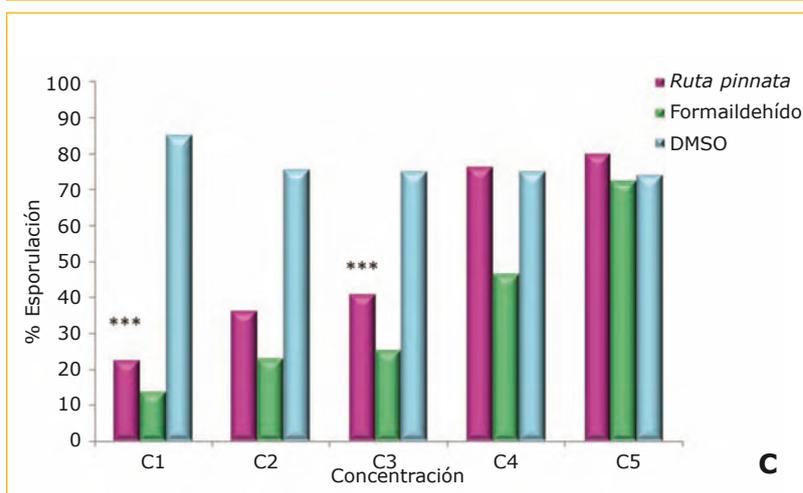


Figura 1C

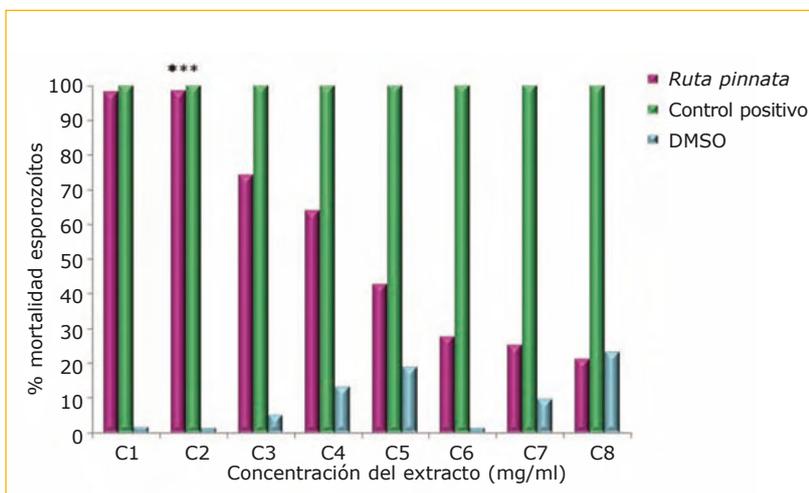


na y extractos de *Echinacea purpurea*, por lo que podrían ser utilizados como aditivos anticoccidiósicos en el pienso o en el agua de bebida en el control de la coccidiosis aviar.

El mecanismo de acción de los extractos de *Ruta pinnata* frente a los esporozoítos de *E. ninakohlyakimovae* no es posible determinarlo en base a ensayos realizados en el presente estudio. Este mecanismo no necesariamente tendría que ser el mismo que el responsable de la inhibición de la esporulación de *E. ninakohlyakimovae*. En cualquier caso, resulta evidente que, a igual concentración, el esporozoíto es más susceptible que el ooquiste, al tratarse este último de un elemento de

resistencia. Este hecho podría justificar la ausencia de efecto inhibitorio de la esporulación de ooquistes de origen ovino descrito previamente por Saratsi et al. (29) al utilizar forraje de *Onobrychis viciifolia* a pesar de que estos mismos autores pudieron constatar un importante efecto anticoccidiósico *in vivo* utilizando extractos de esta misma planta. También en ganado caprino se han realizado algunos estudios *in vivo* para evaluar la actividad anticoccidiósica de extractos vegetales. Así, se ha demostrado que extractos de *Aloe ferox*, *Elephantorrhiza elephantina* y *Leonotis leonurus* presentan un efecto antiparasitario en infecciones mixtas por helmintos y coccidios

Figura 2. Ensayo de esporozoítos de *Eimeria ninakohlyakimovae*. Se evaluó el efecto anticoccidiósico del extracto metanólico de *Ruta pinnata* a diferentes concentraciones tras 30 mi (de incubación). Como control negativo se empleó DMSO y como control positivo esporozoítos inactivados por calor. La viabilidad de los esporozoítos se determinó mediante tinción vital con Sytox Orange y observación en microscopio de fluorescencia. Nivel de significación estadística al comparar los extractos con el control negativo: P < 0,01 (**) y P < 0,001 (***).



caprinos en Sudáfrica (20). Del mismo modo, Markovics et al. (21) han publicado que el consumo de plantas ricas en taninos como *Pistacia lentiscus* mejoran la respuesta frente a la coccidiosis en cabritos en torno al destete.

En este tipo de estudios, no sólo es importante conocer la actividad antiparasitaria del extracto utilizado, sino también evaluar su citotoxicidad. Aunque no se ha evaluado en profundidad a nivel de laboratorio la citotoxicidad de *Ruta pinnata*, éste no sería en principio un factor limitante de su uso como antiparasitario. Así, en un estudio coprológico realizado en lagartos endémicos de Canarias se encontró que las semillas de las rutáceas se hallaban entre las más frecuentemente encontradas en las heces, concluyendo así que éstas formaban parte de la alimentación de los lagartos (25).

Los hallazgos obtenidos en el presente estudio suponen una contribución al descubrimiento de nuevos compuestos con actividad antiparasitaria como alternativa al uso de anticoccidiósicos y anticoccidiostáticos convencionales. El efecto frente a la inhibición de la esporulación de ooquistes y de la viabilidad de los

esporozoítos podría implementarse valorando diferentes métodos de extracción, diferentes partes de la planta e incluso distintos momentos de maduración del fruto, además de realizar una comparación de la actividad anticoccidiósica entre diferentes rutáceas, como *R. graveolens* y *R. pinnata*. En este sentido, existen estudios que demuestran la actividad antihelmíntica del extracto crudo metanólico de *Calatropis procera* es menor que el efecto obtenido por el extracto acuoso de la misma planta en los mismos días de tratamiento (15). También existen ejemplos de plantas que muestran diferentes niveles de actividad antihelmíntica según los extractos procedan de una parte de la planta u otra, como ocurre con *Maesa lanceolata* (32). Finalmente, con el fin de validar el empleo de los extractos habría que realizar estudios *in vivo* utilizando la especie hospedadora de destino.

En resumen, los resultados del presente estudio demuestran que la planta endémica canaria *Ruta pinnata* presenta una importante actividad anticoccidiósica *in vitro* frente a *Eimeria ninakohlyakimovae*, lo cual abre la posibi-

lidad de diseñar nuevas alternativas de control frente a la coccidiosis caprina, no descartándose que la actividad de la planta pueda ser trasladable a otros parásitos animales o humanos.

Agradecimientos

El presente trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología de España (MEC, proyecto n° AGL2007-63415) y los Fondos FEDER, así como por la Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información (ACII-SI) (Ref. SolSubC200801000244).

Bibliografía

- 1.- Abdel-Sattar E, Maes L, Salama MM (2010) In vitro of plants from Saudi Arabia against malaria, leishmaniasis, sleeping sickness and Chagas disease. *Phytother Res.* 24:1322-8.
- 2.- Astelbauer F, Gruber M, Brem B, Greger H, Obwallner A, Wernsdorfer G, Congpoung K, Wernsdorfer WH, WAlochnik J (2012) Activity of selected phytochemicals against *Plasmodium falciparum*. *Acta Trop.* 123(2): 96-100.
- 3.- Bachaya HA, Iqbal Z, Khan MN, Sindhu ZU, Jabbar A (2009) Anthelmintic activity of *Ziziphus nummularia* (bark) and *Acacia nilotica* (fruit) against *Trichostrongylid* nematode of sheep. *J. Entopharmacol.* 123 (2): 325-329.
- 4.- Bramwell D (1998) *Flora of the Canary Islands English version pocket guide*. Rueda 1st edition.
- 5.- Bramwell D, Bramwell Z (2002) *Flores silvestres de las Islas Canarias*. Rueda 2, 4ª
- 6.- Cordero del Campillo M, Rojo FA, Martínez AR, Sánchez MC, Hernández S, Navarret I, Díez P, Quiroz H y Carvalho M (2000) Parasitosis del aparato digestivo. *Trichostrongiloidosis* y otras nematodosis. *Parasitología Parasitaria*. McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U. España.

7. Burt SA, Tersteeg-Zijderveld MH, Jongerius-Gortemaker BG, Vervelde L, Vernooij JC (2012) In vitro inhibition of *Eimeria tenella* invasion of epithelial cells by phytochemicals. *Vet. Parasitol.* (in press).
- 8.- Dai YB, Liu XY, Lium M, Tao JP (2006) Pathogenic effects of the coccidium *Eimeria ninakohlyakimovae* in goats. *Vet Res Commun.* 30 (2): 149-60.
- 9.- Dwinght D. Bowman (2004) *Parasitología para veterinarios.* Elsevier. España.
- 10.- Del Cacho E, Gallego M, Francesch M, Quilez J, Sánchez-Acedo C (2010) Effect of artemisinin on oocyst wall formation and sporulation during *Eimeria tenella* infection. *Parasitol Int.* 59(4): 506-11.
- 11.- De la Fuente C, Alunda JM (1992) A quantitative study of *Eimeria* infections of goats from central Spain. *Vet. Parasitol.* 41(1-2):7-15.
- 12.- Guarrera PM (1999) Traditional antihelmintic, antiparasitic and repellent uses of plants in Central Italy. *J Ethnopharmacol.* 68:183-292.
- 13.- Guimarães JS Jr, Bogado AL, da Cunha TC, Garcia JL (2007) In vitro evaluation of the disinfection efficacy on *Eimeria tenella* unsporulated oocysts isolated from broilers. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 16:67-71.
- 14.- Jalila A, Dorny P, Sani R, Salim NB, Vercruysse J (1998) Coccidial infections of goats in Selangor, peninsular Malaysia. *Vet Parasitol.* 74(2-4):165-72.
- 15.- Khalafalla RE, Müller U, Shahiduzzaman M, Dyachenko V, Desouky AY, Alber G, Dausgchies A. (2011) Effects of curcumin (diferuloylmethane) on *Eimeria tenella* sporozoites in vitro. *Parasitol. Res.* 108:879-886.
- 16.- Levine ND, Ivens V (1970) The coccidian parasites (Protozoa, Spo-rozoa) of ruminants. *Biological Monographs* 3:1-278.
- 17.- Maphosa V, Masika PJ (2012) In vivo validation of *Aloe ferox* (Mill). *Elephantorrhiza elephantina* Bruch. Skeels. and *Leonotis leonurus* (L) R. BR as potential anthelmintics and antiprotozoals against mixed infections of gastrointestinal nematodes in goats. *Parasitol. Res.* 110:103-108.
- 18.- Markovics A, Cohen I, Muklada H, Glasser TA, Dvash L, Ungar ED, Azaizeh H, Landau SY (2012) Consumption of *Pistacia lentiscus* foliage alleviates coccidiosis in young goats. *Vet. Parasitol.* 186: 165-169.
- 19.- Mundt HC, Dausgchies A, Uebe, Rinke M (2003) Efficacy of toltrazuril against artificial infections with *Eimeria bovis* in calves. *Parasitol. Res* 90: 166-167.
- 20.- Müller J, Hemphill A (2012) In vitro culture systems for the study of apicomplexan parasites in farm animals. *Int. J. Parasitol.* (in press).
- 21.- Peek HW, Landman WJ (2005) Resistance of anticoccidial drugs of Dutch avian *Eimeria* spp. Field isolates originating from 1996, 1999 and 2001. *Avian Pathol.* 32: 391-401.
- 22.- Rodríguez A, Nogales M, Rumeu B, Rodríguez B (2008) Temporal and spatial variation in the diet of the endemic lizard *Gallotia galloti* in an Insular Mediterranean Scrubland. *J. Herpetol.* 42:213-222.
- 23.- Ruiz A, González JF, Rodríguez E, Martín S, Hernández YI, Almeida R, Molina JM (2006) Influence of climatic and management factor on *Eimeria* infections in goats from semi-arid zones. *J Vet Med B* 53: 399-402.
- 24.- Ruiz A, Guedes AC, Muñoz MC, Molina JM, Hermosilla C, Martín S, Hernández YI, Hernández A, Pérez D, Matos L, López AM, Taubert A (2012) Control strategies using diclazuril against coccidiosis in goat kids. *Parasitol Res* 110 (6): 2131-6.
- 25.- Ruiz A, Matos L, Muñoz MC, Hermosilla C, Molina JM, Andrada M, Rodríguez F, Pérez D, López A, Guedes A, Taubert A (2012) Isolation of an *Eimeria ninakohlyakimovae* field strain (Canary Islands) and analysis of its infection characteristics in goat kids. *Res Vet Sci* S0034-5288 (12): 00246-9.
- 26.- Saratsis A, Regos I, Tzanidakis N, Voutzourakis N, Stefanakis A, Treuter D, Joachim A, Sotiraki S (2012) In vivo and in vitro efficacy of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) against *Eimeria* spp in lambs. *Vet. Parasitol.* 188:1-9.
- 27.- Souza MMC, Bevilacqua CML, Morais SM, Costa CTC, Silva ARA, Braz-Filho R (2008) Anthelmintic cetogenin from *Annona squamosa* L. Seeds. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 80: 271-277.
- 28.- Svensson C (1998) Prevention of *Eimeria alabamensis* coccidiosis by a long-acting baquiloprim/sulphadimidine bolus. *Vet Parasitol* 74 (2-4): 143-52.
- 29.- Taylor MA, Marshall RN, Marshall JA, Catchpole J, Bartram D (2011) Dose- response effects of diclazuril against pathogenic species of ovine coccidian and the development of protective immunity. *Vet Parasitol* 178 (1-2): 48-57.
- 30.- Vieira LS, Lima JD, Rosa JS (1997) Development of *Eimeria ninakohlyakimovae* Yakimoff & Rastegaieff, 1930 emend. Levine 1961 in experimentally infected goats (*Capra hircus*). *J. Parasitol.*, 83:1015-1018.
- 31.- Watkins LE, Wray MI, Basson R.P, Feller DL, Olson RD, Fitzgerald PR, Stromberg BE, Davis GM (1986) The prophylactic effects of monensin fed to cattle inoculated with coccidian oocysts. *Agric. Pract* 7:18-20.

Aplicación de la citometría de flujo al estudio de las células IgM positivas de doradas (*Sparus aurata*) vacunadas frente *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

Grasso, V.(1)*; Janeiro de Assunção, P.(2); Padilla, D.(1); El Aamri, F.(1); Román, L.(1); Real, F.(1) y Acosta, F.(1)

(1) Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria, IUSA, ULPGC, 35416, Arucas, Las Palmas.

(2) Instituto Tecnológico de Canarias (ITC), Playa de Pozo Izquierdo s/n, 35119 Sta Lucía, Las Palmas.

RESUMEN: La citometría de flujo (CF) es un método directo, específico y muy sensible que permite obtener señales cuantitativas de fluorescencia a partir de células individuales en suspensión. La CF ha sido ampliamente utilizada en el sector de la investigación en acuicultura debido al reciente desarrollo de los anticuerpos monoclonales (AcM) frente inmunoglobulinas de peces. Esta técnica permite determinar varios parámetros inmunológicos como la actividad fagocítica de los macrófagos del riñón anterior, la producción de anticuerpos frente antígenos específicos, y también permite detectar virus dentro de células inmunes. El objetivo de este estudio es analizar y comparar la producción total de células IgM positivas producidas en las branquias y bazo de juveniles de dorada vacunadas por baño frente a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Phdp). La cepa utilizada para diseñar la vacuna ha sido previamente aislada de un brote natural ocurrido en las Islas Canarias. Los peces experimentales fueron vacunados con tres vacunas inactivadas preparadas a partir de la cepa Phdp 94/99 y como control positivo se utilizó una vacuna comercial. La producción de IgM después de la vacunación se midió con citometría de flujo utilizando una técnica de tinción directa con AcM específicos marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Los resultados indican una mayor presencia de células IgM positivas en las branquias con respecto al bazo de los peces vacunados y una respuesta más elevada después de la segunda vacunación con respecto a la primera. Este resultado demuestra que la CF es una técnica eficaz, fiable y rápida para detectar las células IgM positivas en bazo y branquias de juveniles de dorada.

Palabras clave: *Sparus aurata*, vacunación, IgM, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

SUMMARY: Flow cytometry (FC) is a straightforward, highly specific and sensitive procedure which provides objective and quantitative recording of fluorescent signals from individual cells. FC has been used widely in the area of aquaculture research due mainly to the development of monoclonal antibodies (mAbs). Phagocyte activity of head-kidney macrophages of several fish species, antibody production against specific antigens or detection of viruses inside immune cells, are some of the several possible analysis approached by this assay. The aim of this work is to analyze and compare total IgM positive cells in the gill and spleen of seabream juveniles after bath immunization against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Phdp) using a direct and an indirect staining method. Strain used in this work was isolated from a natural outbreak in the Canary Islands. Fish were immunized with three different inactivated vaccines prepared with Phdp 94/99 antigen and a fourth commercial vaccine was used as a positive control. The effect on IgM production post-vaccination was compared among groups. Results show a higher number of IgM positives cells in the gill than in the spleen of vaccinated fish and also a higher response after second vaccination when compared to first vaccination. These results suggest that FC is an efficient, rapid, and trustable method to measure IgM positive cells in the gill and spleen of sea bream juveniles.

Key words: *Sparus aurata*, vaccination, IgM, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

Introducción

La disponibilidad de anticuerpos monoclonales o mAc ha ocasionado un gran impacto en inmunología de peces. En el mercado existen mAc específicos frente a las inmunoglobulinas (Ig) de varias especies de peces que reaccionan frente a antígenos de membranas de estas últimas permitiendo la identificación y caracterización de subpoblaciones de leucocitos. De entre los diferentes métodos para marcar células de peces con anticuerpos específicos, los más usados son:

- 1) Técnica Panning y Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)(3-6-12-19) incluyendo el método ELISPOT (25). En todos estos métodos las células son inmovilizadas sobre una superficie sólida.
- 2) Inmunobeads, en este método las células son separadas con un imán (13).
- 3) Citometría de flujo (2-20-24).

La técnica ELISA siempre ha sido considerada el mejor método (16) ya que las técnicas de aglutinación son rápidas y efectivas pero menos sensibles que ELISA (22). Con respecto a la citometría de flujo (CF), el método clásico es utilizar un primer anticuerpo no conjugado seguido por un segundo anticuerpo conjugado con un fluorocromo que excite y emita fluorescencia a 488 nm (26).

La vacunación es una alternativa sostenible a la quimioterapia que permite proteger el pez frente a las infecciones y tiene la ventaja de no generar residuos (23). Recientemente, el interés en desarrollar métodos estandarizados para medir la producción de anticuerpos se ha incrementado enormemente. Esto se debe básicamente a la introducción de programas de monitoreo en acuicultura, como por ejemplo la detección de anticuerpos séricos frente a nodavirus en cultivos de lubina. Los niveles de anticuerpos en el suero también se han utilizado en varias especies como indicador de la eficacia de la vacuna-

ción (9). En algunos casos existe una correlación positiva entre los anticuerpos producidos y la protección frente a la enfermedad, pero no siempre es así, y sobre todo en el caso de la vacunación por baño frente a Phdp. Mulero et al. (17) encontraron un aumento de la sensibilidad frente a la infección en doradas vacunadas por baño largo respecto al grupo control sin vacunar. Estos autores utilizaron la técnica ELISA para detectar las IgM en los peces vacunados. El mecanismo de defensa de la dorada frente a las infecciones, y la correlación entre vacunación y la producción de células IgM positivas queda aún por dilucidar.

Material y Método

2.1 Animales experimentales

Un total de 1500 juveniles de dorada con peso medio de 3 g fueron proporcionados por una granja local (ADSA, Alevines y Doradas S.A.) y mantenidos en las instalaciones del ICCM (Instituto Canario de Ciencias Marinas, Taliarte) durante todo el experimento. Los peces se distribuyeron de forma aleatoria en 15 tanques de 500 l (150 peces/tanque y por triplicado por cada tratamiento). Todos los tanques presentan aireación continua, sistema abierto de renovación de agua, la temperatura del agua se mantuvo alrededor de 22 °C y los peces fueron expuestos a un fotoperiodo natural de 12 h. Los peces fueron alimentados hasta la saciedad aparente con una dieta comercial de la casa Skretting (Burgos, España) dos veces al día.

2.2. Bacteria y vacunas

La cepa de Phdp 94/99 utilizada para elaborar las vacunas fue aislada de un brote natural ocurrido en las islas Canarias en 1999. Esta cepa fue caracterizada utilizando el sistema miniaturizado de identificación API 20E (BioMérieux®, España) y la técnica de la PCR. La cepa se cultivó en

agar sangre enriquecido con el 2% de cloruro de sodio y el 1% de glucosa para que produjera cápsula (1). Se prepararon tres vacunas inactivadas diferentes (bacterinas):

- 1) Vacuna inactivada con formol al 5 % en agitación continua durante la noche
- 2) Vacuna inactivada con calor. La inactivación se produjo exponiendo la bacteria a una temperatura de 80°C durante 10 minutos (15).
- 3) Vacuna inactivada con rayos UV. La bacteria fue expuesta a rayos UV durante dos horas utilizando un transiluminador BIORAD (transiluminator 2000).

La concentración final de cada una de las bacterinas fue ajustada a 10^8 ufc/ml por espectrofotometría (GENESYS 10UV®, Thermo) y medida a una longitud de onda 600 nm. Se utilizó la vacuna comercial Ictiovac PD® (Hipra, España) como control positivo.

2.3 Inmunización de los peces

Una vez alcanzado los 5 g de peso medio, los peces de cada grupo fueron inmunizados por inmersión directa en una dilución 1:10 de cada vacuna (9 litros de agua de mar: 1 litro de vacuna) durante 60 segundos (baño corto). Después de la inmunización los peces recibieron otro baño en agua de mar limpia antes de ser devueltos a sus respectivos tanques. El grupo control positivo recibió un baño corto con la vacuna comercial (Fig 1) y el grupo control negativo recibió el mismo tratamiento pero con tampón salino (PBS) (9 litros agua de mar: 1 litro PBS) (Fig 2). Posteriormente se recogieron muestras de bazo y branquias los días 4, 9, 11, 14, 18 y 23 post vacunación, para ello se tomaron 8 peces por tanque los cuales fueron anestesiados con 2-fenoxietanol y sacrificados en agua con hielo. Se procedió a aislar los leucocitos de los animales muestreados por métodos previamente descritos (7) y se almacenaron a -80 °C en medio dMEM

(Sigma) adicionado con un 10% de dimetilsulfóxido. Treinta y un días después de la primera vacunación los peces recibieron una segunda vacunación por baño corto (booster) y nuevamente se recogieron muestras de bazo y branquias de otros ocho peces de cada tanque.

2.4 Citometría de Flujo

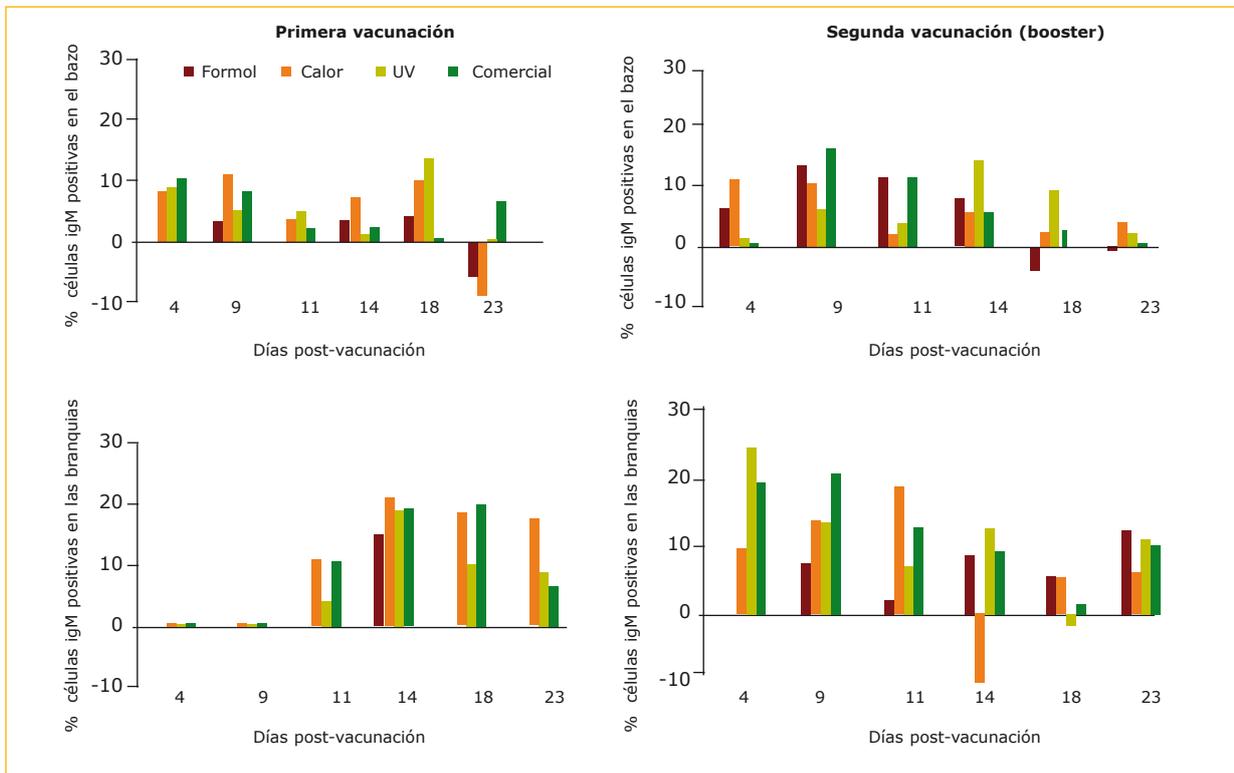
Antes de empezar el experimento se realizaron varios ensayos preliminares para determinar un protocolo de citometría de flujo eficaz para leucocitos de dorada. Para ello se diseñó un método de tinción directa de IgM de dorada utilizando un anticuerpo monoclonal (AquaMab, Aquatic Diagnostics Ltd, Stirling, Escocia) conjugado con FITC que reaccionó frente los leucocitos de las branquias y del bazo. La conjugación con FITC se realizó utilizando el FluoroTag™ FITC Conjugation Kit (Sigma, USA)

siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los leucocitos extraídos de bazo y branquias se ajustaron a 10^6 cel/ml, se suspendieron en un volumen final 250 ml de PBS, y finalmente se incubaron con 6 μ l del conjugado anti-IgM-FITC a temperatura ambiente (25 °C) en oscuridad durante 30 min. Las muestras en suspensión fueron analizadas con un citómetro Coulter Epics XL flow (Coulter, Miami, FL, USA) equipado con un laser de argón a 488 nm. Cada célula se caracterizó por tres parámetros ópticos: dispersión de luz hacia adelante o forward-angle-scatter (FSC), dispersión de luz hacia los lados o side-angle-scatter (SSC) y fluorescencia verde emitida (525 nm, detector FL1). Los datos recolectados fueron analizados con el software SYSTEM II (Coulter) y con el software WinMDI versión 2.8 (Joseph Trotter; the Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA).

Resultados

Los resultados muestran que la tinción directa con anticuerpos monoclonales conjugados con FITC es un buen método para marcar las células IgM positivas de dorada. Los histogramas de CF muestran un pico muy alto de fluorescencia (Fig. 1) y los datos son repetitivos. El grupo control negativo muestra los niveles más bajos de células teñidas (Fig. 2). La producción de IgM fue más débil después de la primera vacunación (Fig. 3 y Fig. 4) comparada con la producción de IgM después del booster (Fig. 5 y Fig. 6). Destacamos que la producción de IgM en los peces inmunizados fue mucho más alta en las branquias que en el bazo. La cinética de respuesta inmune no fue igual en todos los grupos ya que algunas vacunas presentaron un pico más temprano que otras. Por ejemplo, después de la primera vacuna, en las branquias la

Figura 1. Porcentaje de células IgM positivas en el bazo y branquias de los peces vacunados. Valores expresados como incremento sobre el control.



producción de IgM empezó el día 11 mientras que en el bazo empezó el día 4 pero con unos niveles más bajos. La vacuna inactivada con UV presentó un pico el día 4 después del booster, mientras que la vacuna comercial el día 9 y la vacuna inactivada con calor el día 11. La vacuna inactivada con formol presentó los niveles más bajos de IgM y el pico fue el día 23. En el bazo la producción de IgM fue considerablemente inferior a la producción en las branquias. En este órgano la vacuna inactivada por UV presentó un pico el día 14, la vacuna de formol y la comercial el día 9 y la inactivada por calor presentó un pico que se quedó constante entre los días 4 y 9.

Discusión

La citometría de flujo es una técnica sensible que permite hacer un análisis multiparamétrico y analizar cualitativamente y cuantitativamente una muestra célula por célula (4). Hasta la fecha no se ha realizado ningún estudio sobre células IgM positivas de dorada utilizando la citometría de flujo. En este trabajo describimos por primera vez un método para medir la producción de IgM de dorada en el bazo y en las branquias después de vacunación por baño. En nuestro estudio, la vacunación por baño produjo un incremento en el número de células IgM positivas en los peces vacunados. Los resultados son de considerarse fiables ya que se utilizaron anticuerpos monoclonales frente IgM de dorada y que además los picos de fluorescencia fueron repetitivos. Los resultados muestran que la producción fue más alta en las branquias que en el bazo. Este resultado está en concordancia con lo descrito por Dos Santos et al. (2000) (6), en el estudio de este autor las lubinas vacunadas por baño presentaron una mayor producción de IgM en las branquias con respecto a otros órganos inmunitarios. Esto indica la importancia de las branquias en la vacunación por baño. Nakanishi y Ototake (18) ya habían postulado que la bran-

quias y la piel son los sitios de mayor captación de antígeno durante la vacunación por baño y que solo una pequeña cantidad de antígeno es transportada al bazo. Según estos autores la duración de la vacunación también tiene que ver con la cantidad de antígeno captado. En este experimento hemos decidido suministrar la vacuna por baño corto para no estresar demasiado los peces. En el trabajo de Raida et al. (19) las truchas arcoíris inmunizadas por baño también presentaron un incremento en la producción de IgM; en el trabajo de Raida y colaboradores las IgM fueron medidas con ELISA. La FC debería considerarse un método fiable para medir las IgM en peces. Hasta la fecha esta técnica ha sido utilizada por otros autores para medir la fagocitosis en macrófagos de dorada frente algunas bacterias tipo *V. anguillarum* (8), frente levaduras (5) o para analizar las funciones de los leucocitos en algunas especies como salmón Atlántico (20), carpa (14), ostra plana Europea (21), ostra común (10), perca plateada y perca dorada (11).

Una buena vacuna en acuicultura debe presentar ciertas características como: Ser fácil de administrar, conferir una protección rápida y duradera y ser rentable desde el punto de vista económico. En este estudio hemos decidido vacunar por baño ya que es una práctica muy común en acuicultura frente patógenos como por ejemplo *Photobacterium* spp. La vacunación de peces en fases tempranas del desarrollo es una buena estrategia ya que la manipulación resulta sencilla (baño frente inyección intraperitoneal) y requiere menos cantidades de antígeno y de tiempo. Otra ventaja de vacunar los peces por baño es que esta vía de administración es la misma que utilizan muchos patógenos y por lo tanto genera una inmunidad mucosal específica.

En nuestro estudio el incremento de IgM apareció bastante rápido en las branquias y bazo de las doradas vacunadas sobre todo después de la segunda administración (booster). No

obstante hemos encontrados diferencias en las cinéticas de las diferentes vacunas. Es entonces necesario seguir investigando y ampliando los conocimientos sobre el sistema inmune de la dorada para poder conocer cuál es el mejor momento para revacunar. Sugerimos que la citometría de flujo es un método sensible, fiable y rápido que se puede utilizar como técnica principal o complementaria para medir IgM de dorada en branquias y bazo.

Bibliografía

- 1.- Acosta F, Ellis AE, Vivas J, Padilla D, Acosta B, Déniz S, Bravo J, Real F. (2006). Complement consumption by *Photobacterium damsela* subsp. piscicida in seabream, red porgy and seabass normal and immune serum. Effect of the capsule on the bactericidal effect. *Fish & Shellfish Immunol.* (20): 709-17.
- 2.- Arnardottir HH, Freysdottir J, Hardardottir I. (2012). Dietary fish oil decreases the proportion of classical monocytes in blood in healthy mice but increases their proportion upon induction of inflammation. *J Nutr. Apr;* 142(4): 803-8.
- 3.- Bastardo A, Ravelo C, Castro N, Calheiros J, Romalde JL. (2012). Effectiveness of bivalent vaccines against *Aeromonas hydrophila* and *Lactococcus garvieae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Fish & Shellfish Immunol.* (32): 756-761.
- 4.- Chilmonczyk S and Monge D. (1999). Flow cytometry as a tool for assessment of the fish cellular immune response to pathogens. *Fish & Shellfish Immunol.* (9): 319-333
- 5.- Cuesta A, Rodríguez A, Salinas I, Meseguer J, Esteban MA. (2007). Early local and systemic innate immune responses in the teleost gilthead seabream after intraperitoneal injection of whole yeast

- cells. *Fish & Shellfish Immunol.* (22): 242-251.
- 6.- Dipangka S and Dibyendu K. (2012). Immune responses and protection in catla (*Catla catla*) vaccinated against epizootic ulcerative syndrome. *Fish & Shellfish Immunol.* (32): 353-359.
- 7.- Dos Santos NMS, Taverne-Thiele JJ, Barnes AC, Ellis AE y Rombout JHWM. (2001). The gill is a major organ for antibody secreting cell production following direct immersion of sea bass (*Dicentrarchus labrax*L.) in a *Photobacterium damsela*e ssp. *Piscicida* bacterin: an ontogenetic study. *Fish & Shellfish Immunol.* 11(1): 65-74.
- 8.- Esteban MA, Mulero V, Muñoz J, Mesenguer J. (1998). Methodological aspects of assessing phagocytosis of *Vibrio anguillarum* by leucocytes of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) by flow cytometry and electron microscopy. *Cell tissue Res.* (293): 133-41.
- 9.- Fraser T, Rønneseth A, Gyri T, Haugland, Fjellidal P, Mayer I, Wergeland H. (2012). The effect of triploidy and vaccination on neutrophils and B-cells in the peripheral blood and head kidney of 0+ and 1+ Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) post-smolts. *Fish & Shellfish Immunol.* (33): 60-66.
- 10.-Goedken M and De Guise S. (2004). Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms. *Fish & Shellfish Immunol.* (16): 539-52.
- 11.-Hardford AJ, O'Halloran K, Wright P FA. (2006). Flow cytometry analysis and optimization for measuring phagocytosis in three Australian freshwater fish. *Fish & Shellfish Immunol.* (20): 562-573.
- 12.-Hossain MM, Kawai K, Oshima S. (2011) Immunogenicity of pressure inactivated *Edwardsiella tarda* bacterin to *Anguilla japonica* (Japanese eel). *Pak J Biol Sci.* Aug 1; 14(15):755-67.
- 13.-Kishida M, Baker BI, Eberle AN. (1989). The measurement of melanin-concentrating hormone in trout blood. *Gen Comp Endocrinol.* May; 74(2):221-9.
- 14.-Koumans-van Diepen JCE, van de Lisdonk MHM, Taverne-Thiele AJ. (1994). Characterisation of immunoglobulin-binding leucocytes in carp (*Cyprinus carpio* L) *Dev Comp Immunol.* (18): 45-46.
- 15.-López-Dóriga MV, Barnes AC, dos Santos NM, Ellis AE. (2000). Invasion of fish epithelial cells by *Photobacterium damsela*e subsp. *piscicida*: evidence for receptor specificity, and effect of capsule and serum. *Microbiology.* 146 (Pt 1):21-30.
- 16.-Morrison and Nowak. (2002). The antibody response of teleost fish. *Seminars in Avian and Exotic pet Medicine.* Vol 11, 1 46-54.
- 17.-Mulero I, Sepulcre MP, Fuentes I, García-Alcázar A, Meseguer J, García-Ayala A, Mulero V. (2008). Vaccination of larvae of the bony fish gilthead seabream reveals a lack of correlation between lymphocyte development and adaptive immunocompetence. *Mo Immunol.* 45(10): 2981-9.
- 18.-Nakanishi T and Ototake M. (1997). Antigen uptake and immune responses after immersion vaccination. *Dev Biol Stand.* (90): 59-68.
- 19.-Raida M, Nyle J, Holten-Andersen L, Buchmann K. (2011). Association between Plasma Antibody Response and Protection in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* Immersion Vaccinated against *Yersinia ruckeri*. *PLoS One.* 6(6):e18832.
- 20.-Petterson E.F, Bjercknes R, Wergeland HI. (2000), Studies of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) blood, spleen and head kidney leucocytes using specific monoclonal antibodies, immunohistochemistry and flow cytometry. *Fish & Shellfish Immunol.* (10): 695-710.
- 21.-Renault T, Xue QG, Chilmonczyk S. (2001). Flow cytometric analysis of European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemocytes using a monoclonal antibody specific for granulocytes. *Fish & Shellfish Immunol.* (11): 269-74.
- 22.-Romstad A, Reitan L, Midtlyng P, Gravningen K, Evensen Ø. (2012) Development of an antibody ELISA for potency testing of furunculosis (*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*) vaccines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L) 40 (1):67-71
- 23.-Sanmartin ML, Paramá A, Castro R, Cabaleiro S, Leiro J, Lamas J y Barja JL. (2008). Vaccination of turbot; *Psetta maxima*, against the protozoan parasite *Philasterides dicentrachi*: effects on antibody production and protection. *Journal of Fish Disease.* 31, 135-140.
- 24.-Shelley L, Ross P, Kennedy CJ. (2012). The effects of an in vitro exposure to 17β-estradiol and nonylphenol on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) peripheral blood leukocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology.* Volume 155, 3,440-446
- 25.-Siwicki AK and Dunier M. (1993). Quantification of antibody secreting cells to *Yersinia ruckeri* by ELISPOT assay after in vivo and in vitro immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vet Immunol Immunopathol.* 37(1):73-80.
- 26.-Stewart CC and Stewart SJ. (1997). *Current Protocols in Cytometry.* 6.2.1-6.2.18.

Refrigeración y congelación seminal en la especie canina: ¿métodos independientes o adicionales?

Batista, M.; Santana, M.; Álamo, D.; Cabrera, F.; González, F.; Gracia, A.

Grupo de Reproducción Animal, Instituto Universitario de Sanidad Animal, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

RESUMEN: Este artículo pretende evaluar si los principales procedimientos de la preservación seminal (refrigeración y congelación) pueden ser complementarios y mostrar un cierto grado de adición. Para tal fin, se planificó una experiencia donde partiendo de 18 eyaculados de 6 perros, el semen refrigerado durante diferentes periodos de tiempo (1, 6, 12, 24 y 48 horas), era posteriormente congelado en nitrógeno líquido. Posteriormente, muestras de los distintos grupos experimentales eran descongeladas y la calidad seminal post-descongelación fue definida. Los resultados mostraron que no existían diferencias significativas entre las muestras congeladas por un procedimiento convencional (nitrógeno líquido) y las muestras congeladas tras diferentes periodos de refrigeración, para ninguno de los parámetros seminales evaluados (motilidad espermática, porcentaje de acrosomías y porcentaje de morfoanomalías). En consecuencia, este estudio permite concluir que la refrigeración del semen hasta 48 horas antes de la criopreservación no produce una disminución de la calidad seminal comparado con el semen criopreservado por el procedimiento tradicional; por tanto, las limitaciones asociadas con el transporte de semen congelado (nitrógeno líquido) podrían superarse por el uso de semen refrigerado, que podría posteriormente ser congelado en destino.

Introducción

La refrigeración y la congelación del semen reducen la actividad metabólica de los espermatozoides y, consecuentemente, preserva la viabilidad espermática (Meyers 2006). Sin embargo, ambos procedimientos muestran ventajas y limitaciones. El semen canino es altamente estable durante el proceso de refrigeración, permitiendo el mantenimiento de niveles aceptables de calidad seminal a corto plazo (Verstegen y cols. 2005; Ponglowhapan y cols. 2004). Diferentes estudios han confirmado que el semen canino puede ser preservado a 4 °C durante 5-7 días en un diluyente a base de Tris-glucosahuevo (Verstegen y cols. 2005; Nizanski y cols. 2009), y tras este periodo de tiempo, la calidad seminal disminuye. Sin embargo, desde un punto de vista práctico, el semen refrigerado debería utilizarse en las primeras 48 horas (Peña y cols. 2006), y numerosos estudios han confirmado que el periodo de conservación y el tipo de recipiente que con-

tiene el semen influyen marcadamente sobre la viabilidad del semen refrigerado (Pinto y cols. 1999; Lopes y cols. 2009). Por otro lado, la congelación seminal es más compleja que la refrigeración y genera una marcada degradación de la calidad seminal tras la congelación-descongelación (Peña y cols. 2006). No obstante, la congelación del semen representa una herramienta básica en las técnicas de reproducción asistida (ART), permitiendo el almacenamiento de muestras biológicas de alto valor genético durante un periodo indefinido de tiempo.

En las últimas décadas, el transporte de material biológico (entre territorios cercanos y lejanos) se ha vuelto un procedimiento común dentro de la ART (Hendricks y cols. 2010). En las Islas Canarias, el envío de muestras de semen hacia otros países, que se encuentran geográficamente alejados de las islas, ocurre cada vez con mayor frecuencia. La mayor parte de las veces, estas muestras son enviadas como semen refrigerado, y el transporte de semen tarde entre 12 y

48 horas, por lo que esas muestras se utilizan habitualmente para perras que se encuentran en celo y requieren una inseminación inmediata. Por el contrario, el transporte de semen congelado, especialmente si se tratan de envíos internacionales, siempre requiere el uso de nitrógeno líquido (Peña y cols. 2006; Hendricks y cols. 2010). En el momento actual, el transporte aéreo de muestras seminales en nitrógeno líquido se encuentra sujeto a regulación como material peligroso y, en consecuencia, el transporte de muestras congeladas de semen resulta muy complejo y difícil de realizar (Bielanski 2005). Tales restricciones tienden a desaparecer cuando el semen es remitido como semen refrigerado (Hermansson y Linde-Forsberg, 2006). Por tanto, sería muy interesante valorar la posibilidad de remitir muestras refrigeradas y una vez llegada a destino, congelar esas muestras para su almacenamiento a largo plazo para un uso posterior.

El objetivo del presente estudio era determinar la calidad seminal de muestras congeladas-descongeladas,

tras haber sido previamente refrigeradas (a 4 °C) hasta 48 horas en un diluyente a base de Tris-glucosa-yema y comparar la viabilidad espermática con aquella observada en muestras congeladas siguiendo un protocolo tradicional.

Material y métodos

Animales

Se utilizaron 6 perros adultos, entre 2 y 5 años de edad y pesando entre 12 y 30 kg, cedidos por sus propietarios para el estudio. Los animales se alimentaban a base de pienso comercial, disponían siempre de agua y se encontraban con un plan sanitario adecuado. Todo el trabajo experimental se realizó de acuerdo a la normativa europea para experimentación animal.

Diseño experimental

Tres eyaculados de cada uno de los 6 perros, se recogió y tras su valoración individual, se mezcló en un pool, para posteriormente dividir las muestras resultantes en 6 alícuotas. La primera alícuota (alícuota C, control) se diluyó con un primer diluyente (Tris-glucosa, 20% yema de huevo, 3% glicerol) y después de 1 hora de equilibrado a 4 °C, se añadió un 2º diluyente (Tris-glucosa, 20% yema de huevo, 7% glicerol), para alcanzar una concentración final de 100 x 10⁶ espermatozoides/ml, 20% de yema de huevo y 5% glicerol. Las restantes 5 alícuotas (R1, R6, R12, R24, R48) se diluyeron con un diluyente de refrigeración (Tris-glucosa, 20% yema de huevo, 0% glicerol) y se enfriaron a 4 °C durante diferentes periodos de tiempo (1, 6, 12, 24 y 48 horas, respectivamente); tras el periodo de refrigeración, se añadió un segundo diluyente (Tris-glucosa, 20% yema de huevo, 10% glicerol). Finalmente, las muestras seminales (alícuotas C, R1, R6, R12, R24 y R48) se envasaron en pajuelas (0.5 mL) y congelaron en nitrógeno líquido. Tras la descongelación, la calidad seminal se

valoró, en un total de 30 dosis para cada uno de los grupos experimentales.

Recogida y valoración seminal

Los eyaculados se recogieron por estimulación manual, intentando obtener exclusivamente la 2ª fracción del eyaculado que se deposita en un tubo graduado. Inmediatamente tras la recogida, el volumen, concentración espermática, motilidad individual y porcentajes de morfoanomalías y acrosomías espermáticas fueron definidas en cada una de las muestras seminales.

El volumen se determinaba por lectura directa sobre el tubo graduado, mientras la concentración espermática se valoró utilizando un espectofotómetro (Spermacue®, Minitube GmbH) calibrado para semen canino. El porcentaje de espermatozoides móviles (motilidad total, motilidad individual) se determinó utilizando un sistema de automático de análisis computerizado (CASA system, Sperm Vision Lite®, Minitube Ibérica) sobre un mínimo de 1000 células espermáticas/muestra. Finalmente, los porcentajes de espermatozoides con acrosoma alterado y morfología anormal (cabeza, pieza intermedia y cola) se determinaron mediante la técnica de tinción Spermac®, valorando un mínimo de 100 células espermáticas por preparación, mediante un microscopio de contraste de fases a 1000X de magnificación (Peña, 2004).

Procesado seminal, refrigeración y congelación seminal

Tras la evaluación individual, los eyaculados se mezclaron y el pool resultante se dividía en 6 alícuotas (1-2 ml/alícuota). Una alícuota (alícuota control, C), representando 1/6 parte del total del volumen del pool, se procesó siguiendo el método tradicional (primera dilución, 1 hora de equilibrado a 4 °C, segunda dilución), para finalmente envasarse en pajuelas de 0.5 mL y congelarse en nitrógeno

líquido. Las restantes muestras seminales (5/6 de las alícuotas) se dispusieron en un tubo calibrado (a temperatura ambiente) y se adicionó un diluyente de refrigeración (Tris-glucosa, 20% yema de huevo, 0% glicerol), para obtener una concentración final de 200 x 10⁶ espermatozoides/ml; estas 5 alícuotas fueron enfriadas durante diferentes periodos de tiempo: R1 (1 hora), R6 (6 horas), R12 (12 horas), R24 (24 horas) y R48 (48 horas), para posteriormente añadirle un diluyente de congelación (similar composición al de refrigeración, pero con un 10% de glicerol), alcanzando una composición final similar a la obtenida en la alícuota C. Finalmente, las muestras seminales fueron envasadas (0.5 mL) y congeladas en nitrógeno líquido.

Valoración de la calidad seminal post-descongelación

Aproximadamente 1 mes tras la congelación, las pajuelas se descongelaron en baño María (70 °C, 8 segundos) y se disponían en un tubo con 0.5 mL de un tampón Tris precalentado a 37 °C. Tras un calentamiento (37 °C) durante 5 minutos, la calidad seminal (motilidad espermática, porcentajes de acrosomías y morfoanomalías espermáticas) se valoraba, utilizando las mismas técnicas y procedimientos que los descritos para el semen fresco.

Análisis espermático

Los resultados se presentan como media (± error estándar de la media). Los datos de motilidad espermática, porcentajes de morfoanomalías y porcentajes de acrosomías se analizaron utilizando un análisis repetido de varianza (ANOVA) mediante SAS software (SAS Institute, NC, USA). Cuando se detectaron diferencias significativas, las medias se comparaban utilizando el test de Tukey. Los valores se consideraban significativamente diferentes cuando $p < 0.05$.

Resultados

Las características seminales del semen en fresco (una vez mezclado) se presentan en la Tabla 1. Los valores fueron bastantes uniformes entre los machos, no existiendo diferencias significativas entre ninguno de los eyaculados seleccionados.

Respecto al porcentaje de motilidad espermática, antes de la congelación, los valores fueron muy similares entre los grupos experimentales (70-80%), sin detectarse diferencias significativas. En la Tabla 2, se reflejan los porcentajes de espermatozoides con motilidad total y con motilidad progresiva, en las muestras congeladas-descongeladas. Tras la descongelación, las muestras previamente refrigeradas durante 1 y 6 horas (R1 y R6) mostraban los valores más elevados de motilidad espermática, detectándose diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto a las muestras R12, R24 y R48. Al compararse el grupo control (C) con las muestras refrigeradas antes de la congelación (R1, R6, R12, R24, R48), no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de espermatozoides móviles totales.

Los porcentajes de espermatozoides con morfología anormal se muestran en la Tabla 3, observándose que no existen diferencias significativas entre los grupos, con valores muy homogéneos entre un 15 y un 20%. La mayor proporción de anomalías espermáticas se observaron a nivel de la cola espermática, siendo esta distribución muy uniforme en todos los grupos experimentales. Finalmente, la Tabla 4 registra los valores de acrosomas alterados; de manera similar a la morfología espermática, los valores medios de acrosomas alterados (rango: 7-10%) no mostraba cambios significativos entre las muestras refrigeradas antes de congelarse (R1, R6, R12, R24, R48) y el grupo control.

Discusión

Los resultados del presente estudio claramente demostraron que la cali-

Tabla 1. Características (media \pm dem) del semen fresco una vez mezclado (*pool*)

Concentración espermática ($\times 10^6$ células/mL)	Motilidad espermática total (%)	Motilidad progresiva (%)	Espermatozoides anormales (%)	Acrosomas no alterados (%)
201.33 \pm 20.9	93.42 \pm 2.2	86.26 \pm 2.7	19.67 \pm 1.7	96.67 \pm 2.4

Tabla 2. Porcentajes (media \pm dem) de espermatozoides móviles totales y con motilidad progresiva en muestras congeladas-descongeladas.

Refrigeración antes de la congelación	Motilidad total (%)	Motilidad progresiva (%)
	Tras descongelación	Tras descongelación
Control ¹	63.21 \pm 1.21 ^{ab}	39.94 \pm 2.03 ^a
1 h	67.03 \pm 1.79 ^{ab}	49.10 \pm 2.86 ^b
6 h	69.54 \pm 1.56 ^a	52.23 \pm 2.42 ^b
12 h	60.90 \pm 1.45 ^b	36.33 \pm 2.19 ^a
24 h	61.22 \pm 1.62 ^b	36.05 \pm 2.88 ^a
48 h	60.71 \pm 1.87 ^b	33.46 \pm 2.52 ^a

1: semen congelado siguiendo un método tradicional

ab: Letras diferentes dentro de la misma columna representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tabla 3. Porcentajes (media \pm dem) de espermatozoides con morfología anormal en muestras congeladas-descongeladas

Anomalías espermáticas	Control ¹	Tiempo de refrigeración previo a la congelación				
		1 hora	6 horas	12 horas	24 horas	48 horas
Cabeza	1.33 \pm 0.3 (0.0-4.0)	1.20 \pm 0.3 (0.0-3.0)	1.27 \pm 0.3 (0.00-3.00)	1.33 \pm 0.2 (0.00-3.00)	1.07 \pm 0.4 (0.00-6.00)	2.13 \pm 0.3 (0.00-4.00)
Pieza intermedia	3.20 \pm 0.5 (1.0-8.0)	2.80 \pm 0.42 (0.0-6.0)	2.93 \pm 0.4 (1.00-6.00)	4.07 \pm 0.7 (0.00-9.00)	3.73 \pm 0.5 (1.00-7.00)	3.87 \pm 0.4 (2.00-7.00)
Cola	13.93 \pm 1.1 (7.0-21.0)	13.60 \pm 1.3 (5.0-20.0)	12.87 \pm 0.9 (7.0-20.0)	13.20 \pm 1.1 (5.0-21.0)	13.67 \pm 1.1 (5.0-20.0)	12.80 \pm 1.0 (7.0-20.0)
Total	18.47 \pm 1.4 (12.0-29.0)	17.60 \pm 1.3 (9.0-24.0)	17.07 \pm 1.0 (13.0-26.0)	18.60 \pm 1.3 (9.0-26.0)	18.47 \pm 1.5 (9.0-27.0)	18.80 \pm 1.1 (11.0-27.0)

1: semen congelado mediante un protocolo tradicional

Tabla 4. Porcentajes (media \pm dem) de acrosomas dañados en muestras congeladas-descongeladas.

Control ¹	Tiempo de refrigeración previo a la congelación				
	1 hora	6 horas	12 horas	24 horas	48 horas
7.00 \pm 1.04 (1.0-19.0)	8.00 \pm 0.93 (4.0-13.0)	7.13 \pm 0.98 (3.0-14.0)	7.47 \pm 1.13 (2.0-16.0)	8.53 \pm 1.09 (3.0-16.0)	10.47 \pm 1.1 (3.0-17.0)

1: semen congelado mediante un protocolo tradicional

dad seminal post-descongelación de muestras caninas refrigeradas hasta 48 horas era comparable a la observada en muestras congeladas siguiendo un protocolo tradicional.

Una gran mayoría de estudios han confirmado que la motilidad espermática no se modifica marcadamente

durante las primeras 48 horas de conservación a 4 °C, con valores medios entre 60 y 80% (Rota y cols. 1995, England y Ponzio 1996, Iguer-Ouada y Verstegen 2001a, Ponglowhapan y cols. 2004, Shahiduzzaman y Linde-Forsberg 2007, Nizánsky y cols. 2009). Sin embargo, otros autores (Hermansson y Linde-Forsberg 2006,

Ponglowhapan y cols. 2006) afirman que la motilidad espermática canina disminuye tras sólo 48 horas de refrigeración. En nuestro estudio, la motilidad espermática permaneció prácticamente inalterada en el semen refrigerado, con porcentajes medios superiores al 70% durante las 48 horas; asimismo, no se detectaron diferencias entre las muestras refrigeradas (R1, R6, R12, R24, R48) y el grupo control. Por tanto, podría asumirse que la motilidad espermática de los diferentes grupos experimentales antes de la congelación era prácticamente similar. Tras la congelación-descongelación, la motilidad espermática total de las muestras refrigeradas hasta 48 horas no mostraba diferencias con las muestras conservadas de un modo convencional (C). Estos resultados son comparables a los descritos por la mayoría de los autores que utilizan un sistema convencional (sin refrigeración previa) para la criopreservación del semen, con valores de motilidad post-descongelación que oscilan entre un 45-70% (Hay y cols. 1997, Ström y cols. 1997, Rota y cols. 1999, Yildiz y cols. 2000, Iguer-Ouada y Verstegen 2001b, Martins-Bessa y cols. 2006, Bencharif y cols. 2010). Por lo tanto, los resultados de motilidad espermática pueden indicar que la refrigeración del semen a 4°C hasta durante 48 horas antes de su congelación no muestran desventajas respecto al método directo de criopreservación.

Por otro lado, la motilidad espermática post-descongelación en las muestras refrigeradas antes de congelarse, mostraba diferencias significativas en función del periodo de almacenamiento a 4°C. De hecho, las alícuotas R1 y R6 presentaron mayores porcentajes de espermatozoides con motilidad progresiva que las alícuotas R12, R24 y R48. Esta perfectamente asumido que los espermatozoides del perro son muy estables cuando se refrigeran, y que la motilidad espermática puede permanecer elevada durante un elevado periodo de tiempo (Verstegen y cols. 2005, Shahiduz-

zaman y Linde-Forsberg 2007), y no se detectan cambios en la capacidad funcional del espermatozoide (Kumi-Diaka y Badtrama 1994). Del mismo modo, la criopreservación del semen canino produce una degradación evidente de las células espermáticas, resultando en una obvia reducción de la motilidad espermática (Farstad 1996, Peña y cols. 2006). En nuestro estudio, la motilidad espermática antes de la congelación no se modificó por el tiempo de refrigeración; sin embargo, el descenso detectado en la motilidad post-descongelación de las muestras pertenecientes a las alícuotas R12, R24 y R48 puede ser resultado de una reducción en la capacidad de los espermatozoides para soportar el proceso de criopreservación, como consecuencia del incremento del periodo de refrigeración. En cualquier caso, no hay que descartar que las diferencias en la motilidad espermática post-descongelación pueden ser debidas a la refrigeración o la congelación, y por las interacciones entre ambos procesos.

Respecto al porcentaje de anomalías espermáticas, los resultados mostraron que la refrigeración del semen hasta 48 horas antes de congelarse no generaba un mayor desarrollo de morfoanomalías espermáticas, con una distribución muy uniforme entre los grupos experimentales. Nuestros resultados fueron similares a los descritos por otros autores, tanto en semen refrigerado a 4 °C (Farstad 1996, Peña y cols. 2006) como en muestras congeladas-descongeladas (Silva y Verstegen 1995, Silva y cols. 1996, Álamo y cols. 2005, Batista y cols. 2006) en diferentes razas caninas. De manera paralela a las anomalías morfológicas, los porcentajes de acrosomas alterados mostraron valores (7-10%) compatibles con los descritos para muestras refrigeradas y tras su descongelación (5-22%; Hay y cols. 1997; Álamo y cols. 2005, Batista y cols. 2006). En espermatozoides procedentes del epidídimo, la refrigeración del semen (hasta 4 días) antes de

la congelación no generaba modificaciones en el porcentaje de espermatozoides con acrosoma dañado (12-20%; Ponglowhapan y cols. 2006). Por el contrario, Hermansson y Linde-Forsberg (2006) detectaron un progresivo incremento en el porcentaje de acrosomas dañados post-descongelación, conforme se incrementaba el periodo de refrigeración previo a la congelación (de un 20 a un 38%), si bien no encontraron diferencias significativas, probablemente como consecuencia del bajo número de pajuelas que evaluaron en dicho estudio. En nuestro estudio, la falta de diferencias en los porcentajes de anomalías morfológicas y acrosomías post-descongelación entre los diferentes grupos experimentales resulta consistente con el análisis de motilidad espermática, puesto que la motilidad espermática no se modifica sustancialmente en las muestras congeladas tras un periodo previo de refrigeración y las muestras congeladas tras un protocolo convencional. En este sentido, la refrigeración del semen (hasta 48 horas) antes de congelarse y la crio-preservación directa podrán considerarse procesos igualmente válidos.

En conclusión, nuestro estudio mostró que la refrigeración del semen (4°C) hasta 48 horas antes de la congelación no producía una disminución en la calidad del semen cuando se comparaba con muestras seminales congeladas de una manera tradicional. Por lo tanto, en la especie canina, la congelación del semen que haya sido previamente refrigerado hasta 2 días podría ser una alternativa tan efectiva como el método habitual de criopreservación seminal. Las limitaciones asociadas con el transporte de semen congelado podrían superarse con el uso del semen refrigerado. De esta forma, el semen refrigerado podría ser directamente crioconservado tras su envío, confirmando la complementariedad de ambas técnicas para la preservación de muestras seminales.

Bibliografía

- 1.- Álamo D, Batista M, González F, Rodríguez N, Cruz G, Cabrera F, Gracia A, 2005: Cryopreservation of semen in the dog use of ultrafreezers of -152°C as a viable alternative to liquid nitrogen. *Theriogenology* 63, 72-82.
- 2.- Batista M, Alamo D, González F, Cruz MG, Gracia A, 2006: Influence of freezing technique (nitrogen liquid vs ultrafreezer of -152°C) and male-to-male variation over the semen quality in Canarian Mastiff breed dogs. *Reprod Dom Anim* 41, 423-428.
- 3.- Bencharif D, Amirat-Briand L, Garand A, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, Langlois ML, Barrière P, Destrumelle S, Vera-Munoz O, Tainturier D, 2010: Freezing canine sperm: Comparison of semen extenders containing Equex® and LDL (Low Density Lipoproteins). *Anim Reprod Sci* 119, 305-313.
- 4.- Bielanski A, 2005: Experimental microbial contamination and disinfection of dry (vapour) shipper dewars designed for short-term storage and transportation of cryopreserved germplasm and other biological specimens. *Theriogenology* 63, 1946-1957.
- 5.- England GC, Ponzio R, 1996: Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. *Theriogenology* 46, 165-171.
- 6.- Farstad W, 1996: Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Anim Reprod Sci* 42, 251-260.
- 7.- Farstad W, 2000: Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology* 53, 175-186.
- 8.- Hay MA, King WA, Gartley CJ, Leibo SP, Goodrowe KL, 1997: Canine spermatozoa-cryopreservation and evaluation of gamete interaction. *Theriogenology* 48, 1329-1342.
- 9.- Hendricks KE, Penfold LM, Evenson DP, Kaproth MT, Hansen PJ, 2010: Effects of air-transport careening X-irradiation on bovine sperm chromatin integrity and embryo development. *Theriogenology* 73, 267-272.
- 10.-Hermansson U, Linde-Forsberg C, 2006: Freezing of stored, chilled dogs spermatozoa. *Theriogenology* 65, 584-593.
- 11.-Iguer-Ouada M, Verstegen JP, 2001a: Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology* 55, 671-684.
- 12.-Iguer-Ouada M, Verstegen JP, 2001b: Validation of the sperm quality analyzer (SQA) for dog sperm analysis. *Theriogenology* 55, 1143-1158.
- 13.-Kumi-Diaka J, Badtrama G, 1994: Effect of storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa: In vitro bioassay for canine semen. *Theriogenology* 41, 1355-1366.
- 14.-Lopes G, Simões A, Ferreira P, Martins-Bessa A, Rocha A, 2009: Differences in preservation of canine chilled semen using different transport containers. *Anim Reprod Sci* 112, 158-163.
- 15.-Martins-Bessa A, Rocha A, Mayenco-Aguirre A, 2006: Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of canine semen in egg-yolk TRIS extenders. *Theriogenology* 66, 2047-2055.
- 16.-Meyers SA, 2006: Dry storage of sperm: applications in primates and domestic animals. *Reprod Fertil Dev* 18, 1-5.
- 17.-Nizánski W, Klimowicz M, Partyka A, Savic M, Dubiel A, 2009: Effects of the inclusion of Equex STM into tris-based extender on the motility of dog spermatozoa incubated at 5°C. *Reprod Dom Anim* 44, 363-365.
- 18.-Peña A, Lugalde L, Barrio M, Herradón P, Quintela L, 2003: Effects of Equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca²⁺ concentration of dog spermatozoa. *Theriogenology* 59, 1725-1739.
- 19.-Peña A, 2004: Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim Reprod Sci* 82, 209-224.
- 20.-Peña FJ, Núñez-Martínez I, Morán JM, 2006: Semen technologies in dog breeding: an update. *Reprod Dom Anim* 41, 21-29.
- 21.-Pinto CR, Paccamonti DL, Eilts BE, 1999: Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. *Theriogenology* 52, 609-616.
- 22.-Ponglowhapan S, Essén-Gustavsson B, Linde-Forsberg C, 2004: Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. *Theriogenology* 62, 1498-1517.
- 23.-Ponglowhapan S, Chatdarong K, Sirivaidyapong S, Lohachit C, 2006: Freezing of epididymal spermatozoa from dogs after cool storage for 2 or 4 days. *Theriogenology* 66, 1633-1636.
- 24.-Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, de Kruif A, 2002: Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa. *Theriogenology* 57, 1669-1681.
- 25.-Rijsselaere T, Van Soom A, Tanghe S, Coryn M, Maes D, de Kruif A, 2005: New techniques for the assessment of canine semen quality: a review. *Theriogenology* 64, 706-719.
- 26.-Rota A, Strom B, Linde-Forsberg C, 1995: Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology* 44, 885-900.
- 27.-Rota A, Peña A, Linde-Forsberg C, Rodríguez-Martínez H, 1999: In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. *Anim Reprod Sci* 57, 199-215.
- 28.-Rota A, Milani C, Cabianga G, Martini M, 2006: Comparison bet-

- ween glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. *Theriogenology* 65, 1848-1858.
- 29.-Shahiduzzaman AK, Linde-Forsberg C, 2007: Induced immotility during long-term storage at +5°C does not prolong survival of dog spermatozoa. *Theriogenology* 68, 920-933.
- 30.-Silva LD, Verstegen JP, 1995: Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology* 44, 571-579.
- 31.-Silva LD, Onclin K, Lejeune B, Verstegen JP, 1996: Comparisons of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. *Vet Rec* 138, 154-157.
- 32.-Ström B, Rota A, Linde-Forsberg C, 1997: In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology* 48, 247-256.
- 33.-Verstegen JP, Onclin K, Iguer-Ouada M, 2005: Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris-glucose extender: In vitro and in vivo studies. *Theriogenology* 64, 720-733.
- 34.-Yildiz C, Kaya A, Aksoy M, Tekeli T, 2000: Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology* 54, 579-585.
- 35.-Yu I, Leibo SP, 2002: Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C. *Theriogenology* 57, 1179-1190.

Reconstrucción tridimensional de la columna cervical en dos potros neonatos

Carrascosa, C.; Fernández, T.; Suárez, F.; Suárez-Bonnet, A.; Riskallal, C.; Rivero, M.A.; Radual Jaber, J.
Instituto de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Trasmontaña s/n 35416 Arucas (Gran Canaria). España;Correspondencia: Email: jjaber@dmor.ulpgc.es

RESUMEN: El propósito de este trabajo fue definir la anatomía normal de la columna cervical en dos potros mediante la reconstrucción tridimensional usando la tomografía axial computarizada. Para ello se obtuvieron imágenes transversales de 2 milímetros de espesor que proporcionaron excelentes detalles anatómicos de la región cervical de la columna vertebral y de estructuras anatómicas relevantes. La reconstrucción tridimensional puede ser una valiosa ayuda para el diagnóstico en la evaluación clínica de varias patologías espinales en potros. Además, esta técnica puede ser usada como una herramienta muy útil para la enseñanza de la anatomía en las facultades de veterinaria.

Palabras clave: tomografía axial computarizada, reconstrucción tridimensional, anatomía, columna vertebral, équidos.

Analysis of Foal Cervical Spine using Three-Dimensional Computed Tomographic Reconstruction

SUMMARY: The purpose of this paper was to describe the normal three-dimensional computed tomographic reconstruction of the equine cervical spine. Two millimetres thick transverse images of two foals were obtained. Images provided excellent anatomic detail of cervical spine and relevant anatomic structures were identified. Tridimensional reconstruction can be a valuable diagnostic aid for clinical evaluation of several spinal disturbances in foals. In addition, this technique can be used as a tool for teaching anatomy in veterinary schools.

Key words: Computed tomography, 3-D reconstruction, anatomy, spine, equine.

Introducción

La tomografía axial computarizada (TAC) es una técnica diagnóstica que utiliza rayos-x como fuente de imagen. Su fundamento está basado en el estudio de una delgada sección transversal del cuerpo examinada desde múltiples ángulos mediante un fino haz de rayos-x. La radiación transmitida se calcula con un detector que conectado a un ordenador analiza esta información mediante un algoritmo matemático que la transforma en una imagen tomográfica (8). Cuando se compara con la radiografía convencional, la imagen digital generada por la TAC permite un mejor contraste de tejidos. La manipulación de su escala de grises permite una visualización óptima de todos estos tejidos dentro de una sección corporal. Normalmente, el paciente se posiciona horizontal-

mente en la camilla del aparato de TAC para la adquisición de una imagen en el plano transversal. La mayoría de los aparatos de tomografía axial computarizada pueden reorientar estos datos para elaborar cambios en los planos sagital, dorsal, paraxial u oblicuo (11).

Los avances y mejoras recientes en esta técnica de imagen han permitido la aplicación de programas informáticos para la generación de imágenes tridimensionales de un área de interés anatómico. Esta técnica requiere de múltiples secciones de pequeño grosor que permiten obtener imágenes de las estructuras óseas con diferentes grados de rotación y una mejor visualización de los detalles anatómicos (10). La reconstrucción tridimensional mediante tomografía axial computarizada ha sido usada previamente para la evaluación de la

columna vertebral cervical y lumbar canina (6) y el estudio anatómico de la cabeza de leones marinos (3).

La contribución de la TAC al conocimiento anatómico y clínico de la especie equina está limitada por el alto coste y la ausencia de un adecuado diseño de estos equipos para caballos adultos. Los escáner de TAC usados en medicina veterinaria proceden de aquellos diseñados para pacientes humanos; por lo tanto, este tipo de máquinas son aptas únicamente para potros debido a las limitaciones de tamaño del equipo. Debido a esto, la mayor parte de los estudios en el caballo se centran en los procedimientos técnicos (2), o estudios parcelarios de la cabeza (1, 13, 15) y de la parte distal de las extremidades (12, 14).

Este trabajo describe la porción cervical de la columna vertebral en dos

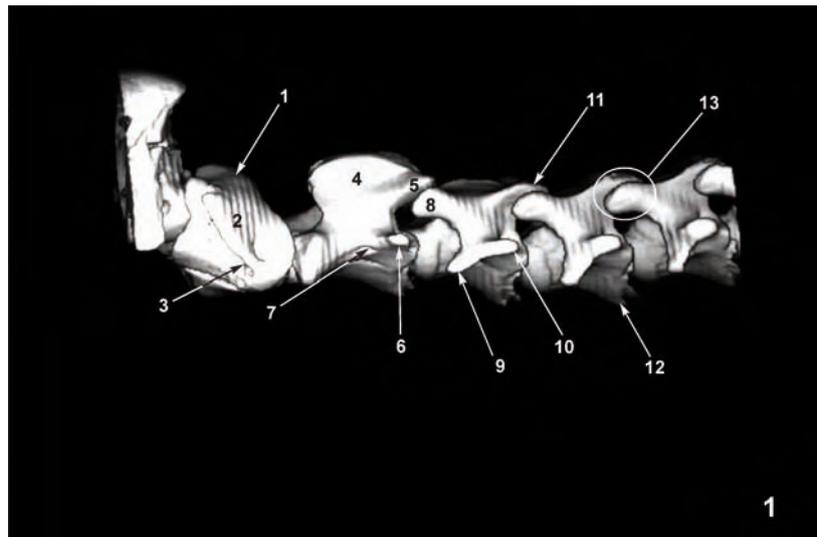
potros mediante la reconstrucción tridimensional con tomografía axial computarizada. La aplicación de esta técnica podría contribuir al conocimiento de la relación normal de las vértebras cervicales y a una mejor comprensión y evaluación clínica de algunas patologías responsables de causar incoordinación y alteraciones locomotoras en caballos.

Material y métodos

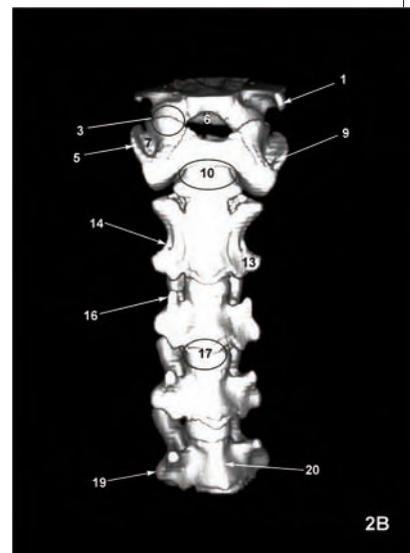
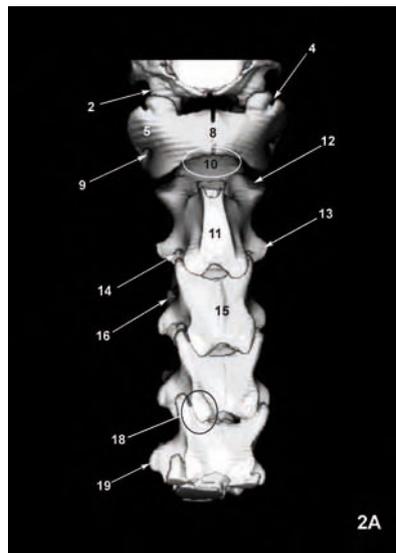
Las imágenes de TAC fueron obtenidas de dos potros neonatos de 5 días de edad y de raza Quarter Horse, clínicamente normales. Para realizar este estudio ambos animales fueron preanestesiados con xylacina a 0,5 mg/kg, IV (Rompun®, Bayer HealthCare AG, Alemania). La anestesia se indujo con un bolo de propofol a 2.0-2.5 mg/kg, IV (Diprivan®, AstraZeneca, Reino Unido) administrado a través de un catéter yugular. Los potros fueron intubados con un tubo endotraqueal para mantener la vía aérea. Los potros anestesiados se colocaron en decúbito esternal sobre la mesa del escáner, monitorizando su frecuencia respiratoria y cardíaca. Mediante un equipo de cuarta generación (General Electric Medical System, Milwaukee, USA) se obtuvieron una serie de imágenes transversales de 2mm de espesor, desde los cóndilos occipitales hasta la quinta vértebra cervical, haciendo especial énfasis en las áreas atlantoaxial y atlantooccipital. Los parámetros usados para las imágenes de TAC fueron 120 kVp y 560 mAs.

Resultados

La reconstrucción tridimensional por TAC permitió la visualización de todas las partes de las vértebras, incluyendo sus articulaciones (Figuras 1, 2A, 2B). Las imágenes más representativas fueron seleccionadas para mostrar detalles anatómicos de las estructuras incluidas en la región cervical de la columna vertebral. Las últimas dos vértebras no se incluyen porque éstas mostraron múltiples artefactos en su reconstrucción. En una



▲ Figura 1. Imagen tridimensional por TAC de la columna cervical, visión lateral. 1. Arco dorsal del atlas. 2. Apófisis transversa (ala) de Atlas. 3. Agujero transverso del atlas. 4. Apófisis espinosa del axis. 5. Apófisis articular caudal del axis. 6. Apófisis transversa del axis. 7. Agujero transverso del axis. 8. Apófisis articular craneal de la tercera vértebra cervical. 9. Tubérculo ventral de la apófisis transversa de la tercera vértebra cervical. 10. Tubérculo dorsal de la apófisis transversa de la tercera vértebra cervical. 11. Apófisis articular caudal de la tercera vértebra cervical. 12. Cresta ventral del cuerpo de la cuarta vértebra cervical. 13. Articulación entre los procesos articulares.



▲ Figura 2. Imagen tridimensional reconstruida por TAC de la columna cervical, visión dorsal (A) y ventral (B). 1. Apófisis paracondilar del hueso occipital (vista ventral solamente). 2. Cóndilos occipitales (vista dorsal solamente). 3. Articulación atlantooccipital (solo en la visión ventral). 4. Escotadura alar (vista dorsal solamente). 5. Ala del atlas. 6. Agujero magno (vista ventral solamente). 7. Fosa del atlas (vista ventral solamente). 8. Tubérculo dorsal del atlas (vista dorsal solamente). 9. Agujero transverso del atlas. 10. Diente del axis y articulación atlantoaxial. 11. Apófisis espinosa del axis (vista dorsal solamente). 12. Apófisis articular craneal del axis. 13. Apófisis transversa del axis. 14. Agujero transverso del axis. 15. Apófisis espinosa de la tercera vértebra cervical (vista dorsal solamente). 16. Tubérculo ventral de la apófisis transversa de la tercera vértebra cervical. 17. Articulación entre los cuerpos vertebrales. 18. Articulación entre las apófisis articulares. 19. Tubérculo dorsal de la apófisis transversa de la quinta vértebra cervical. 20. Cresta ventral de la quinta vértebra cervical (vista ventral solamente).

visión lateral de una imagen tridimensional reconstruida por TAC de la región cervical se puede ver la morfo-

logía del atlas o primera vértebra cervical. Ésta se articula con la cabeza cranealmente, mostrando procesos

articulares modificados también denominados foveas articulares, que una vez que se relacionan con los condilos del hueso occipital forman la articulación atlanto-occipital. También se visualizaron los agujeros transversos localizados lateralmente en las alas del atlas. El axis o segunda vértebra cervical mostró un proceso espinoso alargado y modificado como principal característica. En esta visión se observó la superficie articular craneal y los procesos articulares caudales orientados ventrolateralmente. A nivel de la base de su proceso transverso podía ser identificado el pequeño agujero transverso. En el resto de las vértebras se identificaron los tubérculos dorsales y ventrales de los procesos transversos, donde se podía observar como los tubérculos ventrales eran más prominentes en las vértebras cervicales más caudales. En estas últimas vértebras se identificaban los procesos articulares caudal y craneal, así como sus superficies articulares. Se pudo observar además, la cresta ventral surgiendo de los cuerpos vertebrales (Figura 1). En la vista dorsal y ventral de la columna cervical (Figura 2), se podían observar los condilos occipitales articulándose con las foveas articulares craneales del atlas. En esta imagen también se identificaba el diente del axis y su fijación a la fovea articular caudal situada en el caudal del arco ventral del atlas. Los procesos articulares craneales del axis se ajustaban a cada fovea caudal del atlas. En la visión dorsal, el proceso espinoso del axis se continuaba caudalmente hasta los procesos articulares caudales mediante dos crestas. La raíz de cada ala del atlas estaba perforada por la escotadura alar, que desembocaba dentro de la fosa del atlas. El agujero transverso se situaba caudalmente dentro de las masas laterales del atlas, así como a cada proceso transverso del resto de vértebras cervicales. En ambas visiones, los tubérculos dorsales y ventrales del proceso transverso de cada vértebra podían ser identificados. En la visión ventral se mostraban otras estructuras como el

proceso paracondilar del hueso occipital y el agujero magno (Figura 2).

Discusión

Recientemente, la disponibilidad de equipos usados y la disminución en los costes de mantenimiento, han facilitado un incremento del uso de la TAC en medicina veterinaria (1, 2, 6, 12, 13, 14, 15). Ésta permite obtener imágenes de alta resolución con un adecuado contraste de los tejidos blandos. Sin embargo, la calidad de estas imágenes puede verse afectada negativamente por el movimiento del paciente, por lo que generalmente todos los estudios de TAC son realizados sobre pacientes anestesiados. A pesar de ello, esta técnica es una excelente herramienta para el diagnóstico de muchas enfermedades en medicina de pequeños y grandes animales.

La reconstrucción tridimensional por TAC es un eficaz procedimiento que hasta la fecha no ha sido usado con mucha frecuencia en medicina veterinaria. La recopilación de datos requiere de múltiples secciones paralelas obtenidas en el mismo plano. Para reducir los artefactos producidos por el movimiento del paciente se utiliza un escáner muy rápido que permite obtener una secuencia de imágenes de gran calidad (8). Las ventajas de este procedimiento son que la superficie de las estructuras óseas pueden ser visualizadas con diferente grado de rotación y sin la superposición de tejidos blandos. Además, la extensión de las lesiones óseas puede ser visualizada con excelente detalle gracias a un programa informático que permite que la superficie ósea puede ser representada como una imagen en 3-D (10).

El uso de la reconstrucción en 3-D por TAC ha sido una importante ayuda diagnóstica en la evaluación clínica de malformaciones de vértebras cervicales, cambios degenerativos en sus caras articulares o estenosis cervicales en animales domésticos (6). En contraste, solo unos pocos estudios han hecho mención a descripciones anatómicas de áreas espe-

cíficas (3). La TAC es uno de los métodos más empleados para la valoración de la columna vertebral y el diagnóstico de enfermedades lumbosacras en medicina humana (4, 5). Sin embargo, existen pocos informes disponibles sobre la aplicación de la TAC o la reconstrucción en 3-D de cualquier región de la columna vertebral de mamíferos terrestres y la mayoría de éstos han sido realizados en animales muertos, destacando aquellos que describen la anatomía normal de la columna vertebral canina mediante comparación de imágenes tomográficas con cadáveres (7, 9). En este estudio hemos intentando hacer nuestras observaciones sobre estructuras reconocibles en animales vivos neonatales. Aún así serían necesarios más trabajos para definir el alcance de la reconstrucción en 3-D por TAC, tanto para imágenes morfológicas básicas, como para la interpretación de aquellas en pacientes con signos clínicos. Gran parte de esto, sin embargo, tendrá que venir de la experiencia clínica continuada y la comparación constante entre imágenes anatómicas o patológicas y el resultado de estudios post-mortem.

Desde el punto de vista docente, la tecnología de imágenes en tres dimensiones puede facilitar la enseñanza de anatomía a los estudiantes de veterinaria, permitiendo la visión de estructuras de una forma realista y tridimensional. Por lo tanto, esta técnica es una herramienta anatómica que permite la visualización de los huesos, la red vascular y de ciertos tejidos blandos seleccionados en una imagen tridimensional. Esta técnica elimina la dificultad de visualizar estructuras de la columna vertebral en imágenes o dibujos usados en la mayoría de los libros de texto de anatomía. Como la experiencia con la radiografía simple sugiere que existen variaciones entre caballos normales, serían necesarios más casos para determinar variaciones en potros clínicamente normales.

Bibliografía

- 1.- Allen J, Barbee D, Crisman M. 1988. Diagnosis of equine pituitary tumors by computed tomography. Part 1. Compendium equine 10: 1103- 1105.
- 2.- Barbee D, Allen J, Gavin P. 1987. Computed tomography in horses. Technique. Veterinary Radiology 28: 144-151.
- 3.- Dennison SE, Schwarz T. 2008. Computed tomographic imaging of the normal immature California sea lion head (*Zalophus californianus*). Veterinary Radiology & Ultrasound 49: 557-563.
- 4.- Dorwart RH. 1984. Computed tomography of the lumbar spine: techniques, normal anatomy, pitfalls, and clinical applications. Critical Reviews in Diagnostic Imaging 22: 1-42.
- 5.- Dorwart RH, LaMasters DL. 1985. Applications of computed tomographic scanning of the cervical spine. The Orthopedic Clinics of North America 16: 381-93.
- 6.- Drees R, Dennison SE, Keuler NS, Schwarz T. 2009. Computed tomographic imaging protocol for the canine cervical and lumbar spine. Veterinary Radiology & Ultrasound 50: 74-79.
- 7.- Feeney DA, Fletcher TF, Hardy RM. 1991. Atlas of correlative imaging anatomy of the normal dog: ultrasound and computer tomography. Philadelphia, W.B. Saunders.
- 8.- Grossman C. 1990. The spine. In magnetic resonance imaging and computed tomography of the head and spine. Baltimore, Williams & Wilkins, 390-394.
- 9.- Jones JC, Cartee RE, Bartels JE. 1995. Computed tomography anatomy of the canine lumbosacral spine. Veterinary Radiology & Ultrasound 36: 91-99.
- 10.-Kraus M, Mahaffey M, Girard E, Chambers J, Brown C, Coates J. 1997. Diagnosis of C5-C6 spinal luxation using three-dimensional computed tomographic reconstruction. Veterinary Radiology & Ultrasound 38: 39-41.
- 11.-Losonsky J, Abbott L, Kuriashkin I. 1997. Computed tomography of the normal feline nasal cavity and paranasal sinuses. Veterinary Radiology & Ultrasound 38: 251-258.
- 12.-Peterson P, Bowman K. 1988. Computed tomographic anatomy of the distal extremity of the horse. Veterinary Radiology 29: 147-156.
- 13.-Ragle C, Koblik P, Pascoe J, Honnas, C. 1988. Computed tomographic evaluation of the head trauma in a foal. Veterinary Radiology 29: 206-208.
- 14.-Ruohoniemi M, Kärkäinen M, Tervahartiala P. 1997. Evaluation of the variably ossified collateral cartilages of the distal phalanx and adjacent anatomic structures in the finnhorse with computed tomography and magnetic resonance imaging. Veterinary Radiology & Ultrasound 38: 344-351.
- 15.-Vink-Nooteboom, M., Junker, K., Van Den Ingh, T. and Dik, K. 1998. Computed tomography of cholesterinic granulomas in the choroid plexus of horses. Veterinary Radiology & Ultrasound 39: 512-516.

Hepatitis Reactivas no Específicas en Delfines Mulares (*Tursiops truncatus*) varados en las Islas Canarias: Estudio Patológico e Inmunohistoquímico

Jaber, J. R.*; Pérez, C.(1); Carrascosa, C.; Peña, S.; Monzón, M.; Suárez-Bonnet, A.; Díaz, B.; Zafra, R.(1); Herráez, P.; Fernández, T.; Fernández, A.

Facultad de Veterinaria, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Islas Canarias (España)

(1) Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparada, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, España.

RESUMEN: Este trabajo describe los hallazgos macroscópicos, histopatológicos e inmunohistoquímicos en lesiones de hepatitis reactivas no específicas (NSRH) en 17 delfines mulares (*Tursiops truncatus*) varados en las costas de las Islas Canarias. La apariencia histológica de las NSRH estaba caracterizado por una proliferación de células de Kupffer y la presencia de granulocitos, así como de linfocitos y células plasmáticas distribuidas por el parénquima hepático y en el estroma portal o perivenular, con o sin evidencia mínima de necrosis de hepatocitos. La NSRH fue diagnosticada en todos los animales del estudio, donde 14 de los 17 cetáceos del estudio eran del tipo crónico, y los 3 restantes, presentaban la forma activa reactiva crónica. La NSRH presentaba un infiltrado inflamatorio compuesto de linfocitos T CD3⁺ y células plasmáticas IgG⁺ en los espacios porta y sinusoides hepáticos. El anticuerpo policlonal anti-S100 reaccionó con un número variable de linfocitos de los espacios porta y los sinusoides hepáticos, así como con las células de Kupffer y las células epiteliales de los conductos biliares. La presencia de sustancias contaminantes, así como las infestaciones parasitarias o infecciones encontradas en el hígado y otros órganos fueron asociadas con la NSRH.

Palabras Clave: hígado, delfín, hepatitis, contaminantes, inmunohistoquímica.

Non-specific chronic reactive hepatitis in Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*), stranded in the Canary Islands: pathological and immunohistochemical study

SUMMARY: This paper describes the gross, histopathological and immunohistochemical features of non-specific reactive hepatitis (NSRH) lesions in 17 bottle-nosed dolphins (*Tursiops truncatus*) stranded on the coast of Canary Islands (Spain). The histological appearance of NSRH was the proliferation of Kupffer cells and presence of granulocytes, as well as lymphocytes and plasma cells scattered thorough the liver parenchyma and in the portal or perivenular stroma, without or with minimal evidence of hepatocyte necrosis. NSRH was diagnosed in all the animals of the study, where 14 out of 17 showed the chronic reactive stage, and the remaining three animals presented the chronic reactive active stage. NSRH was composed of inflammatory infiltration of CD3⁺ T lymphocytes and IgG⁺ plasma cells in portal spaces and hepatic sinusoids. The anti-S100 polyclonal antibody reacted with a variable number of lymphocytes from portal areas and hepatic sinusoids, as well as with Kupffer cells and epithelial cells of the bile ducts. The presence of persistent pollutants, as well as parasitic infestation or infections in the liver was related with the incidence of NSRH in animals of the study.

Keys words: liver, dolphin, hepatitis, contaminants, immunohistochemistry.

Correspondencia

Autor principal. Tel.: +34 928 457428. Email: jjaber@dmor.ulpgc.es (J.R. Jaber).

Introducción

Las hepatitis han sido diagnosticadas tanto en delfines de vida libre como en cautividad (1, 6, 8, 16, 24, 30). Los desordenes hepáticos crónicos de causa desconocida son comunes en delfines y suelen estar caracterizados clínicamente por pérdida de peso e ictericia. Las lesiones hepáticas consisten en la degeneración de hepatocitos, cambios grasos y fibrosis. La hepatitis aguda en delfines puede estar causada por toxinas alimenticias o ambientales, y agentes biológicos como virus, bacterias, hongos y parásitos. Generalmente, Los cambio histopatológicos del hígado pueden dar una idea de la etiología de este tipo de hepatitis en delfines (30). En todos estos estudios previos, las formas más comunes de hepatitis fueron hepatitis no purulentas, hepatitis intersticiales y pericolangitis subaguda o crónica. Sin embargo, solo en algunos de éstos ha sido descrita la hepatitis reactiva crónica no específica (NSRH) (16).

En mamíferos terrestres, la NSRH es una forma de hepatitis crónica que se define como una entidad morfológica ampliamente distribuida por el hígado, representando el residuo de una enfermedad intrahepática inflamatoria previa o una respuesta a una variedad de procesos extrahepáticos como por ejemplo enfermedades febriles, inflamación en alguna parte del lecho visceral o enfermedad celiaca (26, 27, 28, 32).

Los delfines, como otros cetáceos, están en la cima de la cadena alimentaria marina y pueden acumular contaminantes en sus tejidos durante su vida. Los compuestos organoclorados (OCs), especialmente bifenilos policlorados (PCBs) y diclorodifeniltricloroetanos (DDTs) han tenido una gran repercusión por sus efectos perjudiciales en la salud de los mamíferos marinos (2, 3, 7, 12, 17, 18, 20, 31).

A pesar del gran número de estudios toxicológicos realizados en delfines, no se han realizado trabajos que correlacionen los estudios toxico-

lógicos e histopatológicos del hígado. Dichos estudios podrían proporcionar una valiosa información sobre la causa de hepatitis crónica y otras enfermedades que afectan a mamíferos marinos.

El propósito de este estudio consistió en describir los cambios histopatológicos y la naturaleza del infiltrado inflamatorio en las lesiones de NSRH observadas en 17 delfines mulares varados en las Islas Canarias, correlacionando la gravedad de la NSRH con los niveles de un número de contaminantes en la grasa y el hígado, y la presencia de otras infecciones y enfermedades sistémicas.

Material y métodos

Animales y estudio patológico

Un total de 17 delfines mulares (9 machos y 8 hembras) fueron incluidos en este estudio. El examen post-mortem fue realizado según el protocolo estándar para los cetáceos (25). Tres muestras de cada hígado, así como de los nódulos linfáticos fueron incluidos en el estudio, para después ser fijadas en formol al 10%, deshidratadas en alcohol e incluidas en parafina. Las secciones (4 mm de grosor) fueron cortadas y teñidas con hematoxilina-eosina para su examen histopatológico. El número de neutrófilos, linfocitos y células plasmáticas presentes en el infiltrado inflamatorio se contaron en 15 campos seleccionados al azar de 640x, incluyendo espacios porta y sinusoides hepáticos. Las NSRH fueron clasificadas como leves, cuando

se observaban entre 20-50 células por campo; moderadas (entre 50-75 células por campo) y severas (mas de 75 células por campo).

Estudio inmunohistoquímico

Las secciones seleccionadas fueron teñidas con el test de inmunoperoxidasa para morbilivirus (23). El método de la avidina-biotina-peroxidasa (ABC) fue utilizado para estudiar el inmunofenotipo del infiltrado inflamatorio presente en las lesiones hepáticas (15). La actividad endógena de la peroxidasa fue bloqueada por la incubación en peróxido de hidrógeno al 0.3% en metanol durante 30 minutos. La incubación en pronasa al 0.01% (Sigma Chemicals, St Louis, MO, EEUU) durante 10 minutos a temperatura ambiente fue utilizada como método en la recuperación del antígeno para todos los anticuerpos a excepción del MHC de Clase II, donde se aplicó incubación en ácido cítrico al 0.01 M en microondas a 100° durante 7 minutos (Tabla 1). Posteriormente, las secciones fueron aclaradas en solución tampón fosfato salino (PBS) al 0.01 M, pH 7.2 e incubadas durante 30 minutos con suero normal de cabra al 10% (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) a temperatura ambiente (20-25°C).

Después de tres aclarados en PBS, un suero biotinilado de cabra para anticuerpos anti-inmunoglobulina G de conejo diluido en PBS (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) fue utilizado durante 30 minutos como reactivo secundario para los

Tabla 1. Detalle de los anticuerpos primarios usados en este estudio.

Especificidad	Especies de origen	Método de tratamiento*	Dilución	Fuente†
CD3 (pAb)	Humana	Pronasa	1/200	Dako
IgG (pAb)	Humana	Pronasa	1/50	Dako
MHC Clase II (pAb)	Humana	Microondas	1/50	Daki
Proteína S100 (pAb)	Bovina	Pronasa	1/200	Dako
Lisozima (pAb)	Humana	Pronasa	1/250	Dako

* Mejor método de tratamiento de los tres testados para cada anticuerpo

† Dako (Glostrup, Denmark).

pAb: anticuerpo policlonal; mAb: anticuerpo monoclonal

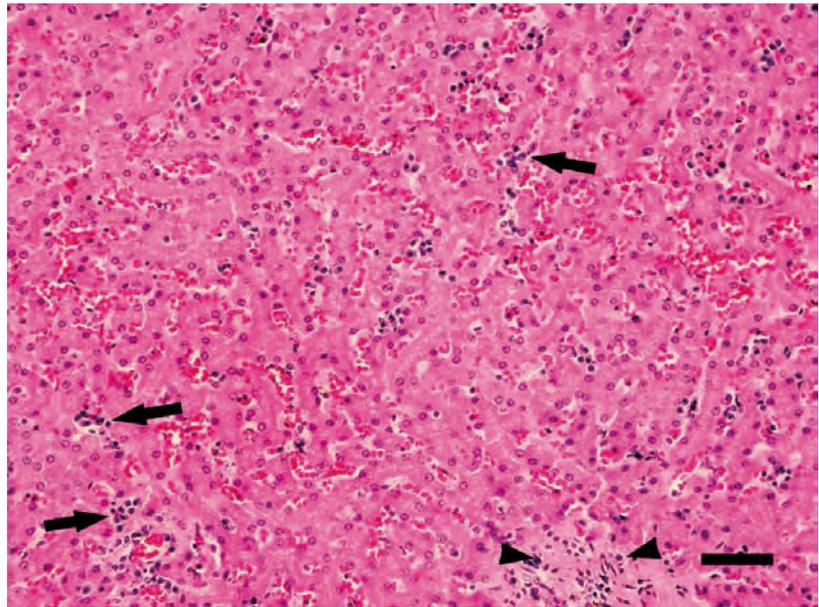
anticuerpos policlonales primarios (pAbs), mientras que este mismo suero de cabra biotilado para anticuerpos anti-inmunoglobulina de ratón diluido en PBS (Dako) se utilizó como reactivo secundario para los anticuerpos monoclonales primarios (mAbs) durante 30 minutos. El complejo ABC (vector) diluido en PBS fue aplicado como tercer reactivo. Entonces, estas secciones fueron incubadas con 3,3'-tetrahidroclorido de diaminobencidina (sigma), diluido al 0.035% en tampón salino (pH 7.6) conteniendo peróxido de hidrógeno al 0.01%. Finalmente, las secciones fueron aclaradas en agua corriente, contrateñidas con hematoxilina de Mayer y montadas con Eukitt. Como controles negativos, los anticuerpos primarios específicos fueron sustituidos por un tampón fosfato salino de conejo o ratón. Como controles positivos se utilizaron secciones de tejido procedentes de nódulos linfáticos mesentéricos de delfín y humano. Las secciones de tejido de animales sin evidencia de enfermedad hepática fueron utilizadas como hígados control.

Estudio toxicológico

Para llevar a cabo este estudio se analizaron muestras de grasa e hígado para detectar las concentraciones de PCB y DDT en 11 de 17 delfines mulares. La concentración total de PCB fue calculada como la suma de 11 derivados policlorados bifenílicos (PCBs) (IUPAC # 28, 52, 101, 105, 118, 138, 149, 153, 156, 180 y 187). Las concentraciones de DDTs se calcularon como la suma de seis compuestos de DDT (pp'-DDE, pp'-DDT, pp'-DDD, op'-DDE, op'-DDT, op'-DDD). Los niveles de PCB y DDT se compararon con el umbral toxicológico de aquellas concentraciones encontradas en otros estudios en mamíferos marinos (5, 12, 18, 19).

Resultados

La hepatitis reactiva crónica no específica (NSRH) fue diagnosticada en



▲ Figura 1. Hígado de delfín mular. Hepatitis reactivas crónicas no específica, infiltrado inflamatorio en el estroma de áreas portales (flecha) y sinusoides hepáticos, donde se identifican acumulaciones de linfocitos y células plasmáticas (flecha). HE, Bar = 200 μ m.

todos los animales examinados, donde se observó como 2 de las 17 eran severas, otras 2 eran moderadas, y las restantes fueron consideradas como leves. La única evidencia macroscópica de esta enfermedad fue un moderado aumento en el tamaño del hígado. De acuerdo a la composición y gravedad del infiltrado inflamatorio identificado en estos tejidos se distinguieron dos tipos diferentes de NSRH: Hepatitis reactiva activa crónica no específica y hepatitis reactiva crónica no específica.

Histologicamente, la NSRH estaba compuesta por un infiltrado inflamatorio en las áreas portales y en el parénquima sin evidencias de necrosis hepatocelular; en el primer tipo (hepatitis reactiva activa crónica no específica) había un infiltrado leve-moderado, compuesto principalmente por neutrófilos en el estroma de las áreas portales y de diferente intensidad entre las mismas, que incluía tractos portales normales, así como de una leve a marcada proliferación de leucocitos y células de Kupffer en los sinusoides y algunos neutrófilos en el estroma alrededor de las venas hepáticas. En el segundo tipo (hepatitis crónica reactiva no específica), la inflamación estaba compuesta por

células plasmáticas y linfocitos en el estroma de las áreas portales, alrededor de las venas hepáticas y también dentro de los sinusoides hepáticos (Fig. 1).

La hepatitis reactiva activa crónica no específica fue diagnosticada en 3 de los 17 animales del estudio; donde también se detectó colangitis parasitaria. Los cetáceos con severa NSRH (una del tipo crónica y otra del tipo activa) mostraron abundante infiltrado inflamatorio de neutrófilos, linfocitos y células plasmáticas en las áreas portales y los sinusoides hepáticos, en estos últimos se observaron acúmulos intravasculares de linfocitos y células plasmáticas (Fig. 1).

Cinco animales con NSRH mostraron parásitos en conductos biliares que fueron identificados como *Campyla spp.*. Estos trematodos producían un daño severo en los conductos biliares, dando lugar a colangitis focal supurativa, colangitis necrotizante severa o una colangitis crónica granulomatosa. Estos parásitos también fueron encontrados en los conductos pancreáticos de dos de los animales examinados con NSRH.

Todos los animales diagnosticados de NSRH presentaron algún proceso extrahepático pre-existente que podía

Tabla 2. Diagnóstico de causas extrahepáticas en animales con diferente grado de NSRH.

Diagnóstico			
Sinusitis parasitaria	Pneumonia	Gastritis	Enteritis
3 (1, 1, 1)	8 (3, 3, 2, 1, 1, 1, 1, 1)	4 (2, 1, 1, 1)	2 (1, 1)

(1) NSRH leve, (2) NSRH Moderada, (3) NSRH Severa

Tabla 3. DDTs y PCBs en blubber (ng g⁻¹ wet wt) e hígado (ng g⁻¹ wet wt) de *Tursiops truncatus* y grado de NRSR.

	Blubber		Hígado		grado
	PCBs	DDT	PCBs	DDT	NRSR
TT 43	--	--	1,035	460	1
	301	147			
TT 50			833	220	2
	(990)*	147			
	19,970	15,592			
TT 78			52,374	2,529	3
	(107,549)	(152,862)		3	
TT 93	--	--	6,638	3,171	3
	1,972	950			
TTC 94			2,028	706	1
	(3,912)	(1,885)			
	33,212	21,050			
TT 124			2,597	1,190	1
	(136,679)	(86,625)			
	10,133	3,347			
TT 144			--	--	1
	(18,062)	(5,977)			
	585	222			
TT 145			--	--	1
	(1,069)	(406)			
	7269	6,830			
TT 168			373	265	1
	(12,664)	(11,899)			
	7810	4,207			
TT 171			--	--	1
	(14,021)	(7,553)			
	12,859	464			
TT 311			--	--	1
	(36,740)	(1,326)			

TT = *Tursiops truncatus* con su número de referencia.

*En parentesis concentración en grasa también en ng g⁻¹ lipid wt.

haber influido en la aparición de las NSRH (Tabla 2). De esta manera, se observó una abundante infestación por *nasitrema spp* en los sacos paranasales de 3 de los animales con NRSR. Varios tipos de neumonía fueron encontrados en los cetáceos de este estudio. Seis de estos casos con grave o leve infestación por parásitos pulmonares (*Pseudalius inflexus* y *Stenurus minor*), mostrando lesiones macroscópicas e histológicas

consistentes con neumonía parasitaria, mientras que otros 2 casos de neumonía rean debidos a una infección bacteriana (*Corynebacterium spp.* y, *Staphylococcus spp.*). Otros animales fueron diagnosticados de gastritis y/o enteritis; en 4 animales. la gastritis se debía a una infestación por el nematodo *Anisakis simplex*. Otros 2 animales con NRSR presentaron enteritis de etiología desconocida.

No se detectaron antígenos para *Morbillivirus* en ninguno de los animales del presente estudio. El patrón de inmunoreactividad y la distribución de las células inmunomarcadas con anticuerpos CD3, IgG, S-100, lisozima y MHC de Clase II fue muy similar en los nódulos linfáticos humanos y de delfín mular. En los hígados control sólo se aislaron linfocitos T CD3⁺ y en menor cantidad células plasmáticas IgG⁺ tanto en los espacios porta como en los sinusoides hepáticos. El MHC de Clase II fue expresado ocasionalmente por células dentríticas en los espacios porta, mientras que la lisozima era expresada por células de Kupffer, monocitos circulantes y macrófagos aislados dentro de los espacios porta. En las NSRH, el infiltrado inflamatorio estaba compuesto por células plasmáticas y algunos linfocitos localizados en el parénquima hepático y las áreas portales. En estas lesiones se encontraron pequeños grupos de células T CD3⁺ tanto en los espacios porta, como en los sinusoides hepáticos (Figura 2). Algunos macrófagos en los espacios porta, así como células de Kupffer, y ocasionalmente monocitos circulantes fueron positivos a lisozima. El anti-S100 pAb reaccionó con un número variable de linfocitos en las áreas portales y sinusoides hepáticos, así como con células de Kupffer y células epiteliales de los conductos biliares. Un escaso número de macrófagos localizado en las áreas portales, así como de células de Kupffer fueron positivos para el MHC de Clase II. La mayoría de las células plasmáticas observadas en las áreas portales y los sinusoides hepáticos fueron positivos para IgG (Figura 3).

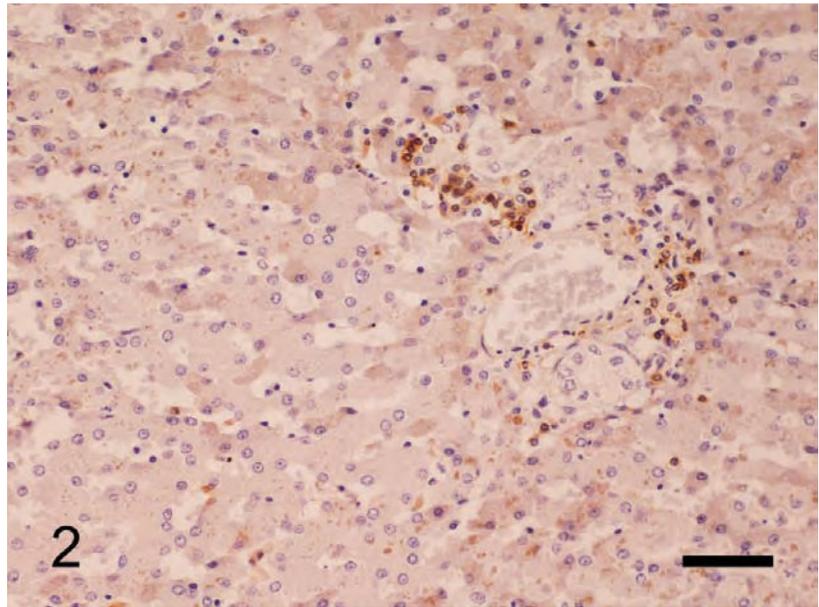
Los niveles de compuestos organoclorados (OCs) en el blubber y el hígado de los delfines mulares se presenta en la tabla 3. De todos estos compuestos, fueron los PCBs los que presentaban mayor concentración en los tejidos analizados. En general, se observo que los niveles de PCB en el hígado eran menores que los encontrados en el blubber. En este último, los niveles oscilaron entre 301 y 33,212

ng/g ww, mientras que en hígado se situaron entre 373 y 52,374 ng/g ww. Similar composición de derivados de PCB fue identificada en los dos tejidos, aparentemente con gran contribución de hexa y heptaclorobifenilos. Dentro de los pesticidas organoclorados, el DDT, estuvo presente en mayor concentración (Tabla 3). La concentración de DDTs en el blubber oscilaron entre 147 y 21,050 ng /g ww y en el hígado entre 220 y 3171 ng/g ww. El *p,p'*-DDE fue el componente, del grupo del DDT, con mayor concentración en los dos tejidos analizados.

Discusión

Los cambios hepáticos en la serie de cetáceos estudiados fueron similares a los hallados en un grupo de 14 ejemplares de delfín común (15). De esta manera, la hepatitis reactiva crónica no específica fue la lesión hepática más común en este estudio. Esta lesión ha sido definida en humanos (11, 13, 27, 28) y perros (9, 32) como una entidad caracterizada por la proliferación de células de Kupffer y la presencia de granulocitos así como células mononucleares diseminadas por todo el parénquima hepático y el estroma portal o perivenular, sin o con mínima evidencia de necrosis hepática. La causa de este tipo de hepatitis no es bien conocida y se han sugerido diferentes etiologías incluyendo endotoxinas debido a sepsis o incremento de la absorción gastrointestinal, una reacción inmunológica en el hígado por una enfermedad sistémica, enfermedades febriles o inflamación en el lecho visceral (32).

Una variedad de procesos inflamatorios hepáticos y extrahepáticos fue hallado en los animales con NRSR de nuestro estudio. Con frecuencia se observaba la acumulación de linfocitos y de células plasmáticas intrasinusoidales en aquellos cetáceos con severa NSRH en asociación con parasitosis de los conductos biliares, parásitos pulmonares e infestación de sacos paranasales, así como



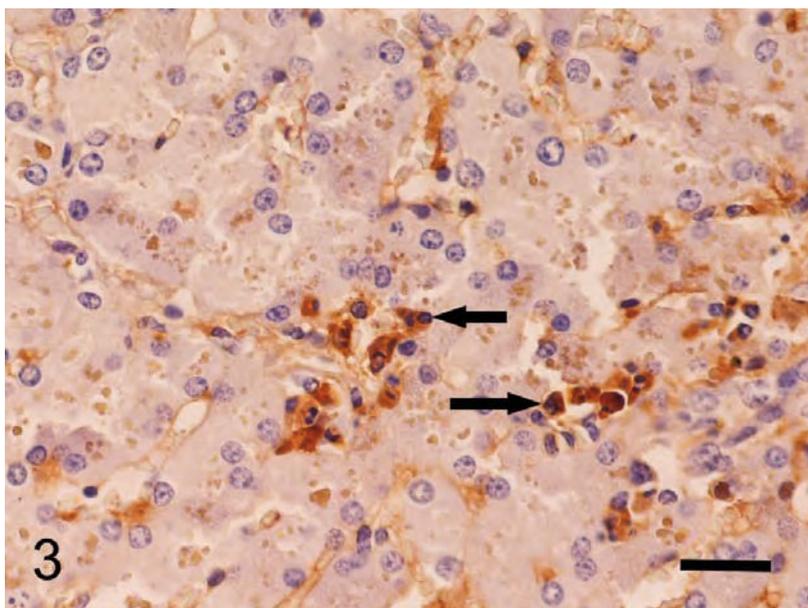
▲ Figura 2. Hígado de delfín mular. Hepatitis reactivas crónicas no específica, se observan pequeños grupos de células CD3⁺ T en espacios porta y sinusoides hepáticos. ABC, Bar = 200 μ m.

infecciones bacterianas. Por lo tanto, este hallazgo, probablemente, sea consecuencia de la persistencia local o sistémica de la estimulación antigénica del sistema inmune causada por la infección o la infestación, lo cual ha sido descrito en seres humanos (28) y perros (9, 32).

Los anticuerpos anti-CD3, IgG, lisozima y proteína S100 expresaron inmunoreacción en los cortes procedentes de nódulos linfáticos de delfín, con un patrón similar a la obtenida en la especie de origen u otras especies (29). Estos resultados sugieren que estos anticuerpos son apropiados para estudios inmunohistoquímicos en tejidos fijados en formol. Esto es de interés debido a la escasez del número de anticuerpos de los leucocitos utilizados en tejidos. El estudio inmunohistoquímico reveló que la NSRH estaba compuesta principalmente por infiltración de células plasmáticas IgG⁺ dentro de los sinusoides y en los espacios porta, y en menor número de linfocitos T CD3⁺, principalmente localizados en los espacios porta. En otras especies, como el perro, la hepatitis crónica reactiva no específica está también caracterizada por un infiltrado linfoplasmocitario en los espacios portales y sinusoides

hepáticos (9, 32); sin embargo, todavía el inmunofenotipo de este infiltrado no ha sido descrito. La naturaleza del infiltrado inflamatorio observado en los cetáceos de este estudio sugiere una respuesta humoral local ya que las células IgG eran abundantes, mientras que la cantidad variable de linfocitos CD3⁺ indica una respuesta celular local variable.

La bioacumulación de Ocs en tejidos de delfines ha sido descrita en delfines (10, 14, 39), pero las implicaciones patológicas no están del todo claras (4, 37). Los niveles de PCB y DDT en el blubber y el hígado se consideraron en el rango medio con respecto a otras poblaciones de delfines (7, 35). La concentración de PCB en el blubber de cuatro de nuestros delfines fue más elevada que la concentración umbral establecida para mamíferos marinos (21). En los siete animales donde se detectaron PCBs, también se observó NSRH. Dos de los animales con mayor severidad de NSRH mostraron mayor concentración de derivados de PCBs, lo que podría estar relacionado con la patogenia de este proceso. Las concentraciones de DDT en algunos machos adultos analizados en este estudio puede haber sido peligrosa.



▲ Figura 3. Hígado de delfín mular. Hepatitis reactivas crónicas no específicas, mostrando un infiltrado inflamatorio en el parénquima hepático compuesto por numerosas células plasmáticas IgG⁺ (flechas). ABC, Bar = 50 μm.

Así, las concentraciones de DDTs en el hígado de tres machos adultos (TT 78, TT 93, C124) fueron más del doble de la dosis efectiva que produce desórdenes endocrinos en mamíferos terrestres (22) y marinos (36). Todos los animales analizados con pesticidas organoclorados mostraron NSRH, pero en éstos últimos la NSRH fue más severa. Lesiones hepáticas similares fueron observadas en especies salvajes como los osos polares y los zorros árticos expuestos a contaminantes orgánicos persistentes en su dieta natural (33, 34) donde las lesiones más comunes fueron hepatomegalia, esteatosis, leve hiperplasia biliar e infiltración vascular de leucocitos.

En conclusión, las hepatitis reactivas crónicas no específicas fueron observadas en animales con desórdenes extrahepáticos relacionados con procesos infecciosos o parasitarios y presencia de contaminantes persistentes en el blubber y el hígado. Los delfines con severa NSRH mostraron los niveles más elevados de PCBs en hígado. Aunque un efecto directo no puede ser establecido para cualquiera de estas etiologías es razonable presumir que la acción combinada de

estos contaminantes podría afectar a la salud de los animales estudiados. Grupos más amplios de animales deberían ser estudiados para saber más sobre los efectos fisiológicos de estos contaminantes en mamíferos marinos.

Agradecimientos

Este trabajo fue subvencionado por la Consejería de Educación, Cultura y Deportes del Gobierno de Canarias (Pi 2005/170). También queremos agradecer a Marisa Mohamad y Jamal Jaber por sus comentarios para la realización de este trabajo.

Bibliografía

- 1.- Baker, J.R. (1992). Causes of mortality and parasites and incidental lesions in dolphins and whales from British waters. *The Veterinary Record*, 130, 569-572.
- 2.- Bull, J.C., Jepson, P.D., Ssuna, R.K., Deaville, R., Allchin, C.R., Law, R.J., Fenton, A. (2006). The relationship between polychlorinated biphenyls in blubber and levels of nematode infestations in harbour porpoises, *Phocoena phocoena*. *Parasitology*, 132, 565-573.

- 3.- Carballo, M., Arbelo, M., Esperón, F., Mendez, M., de la Torre, A., Muñoz, M.J. (2008). Organochlorine residues in the blubber and liver of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) stranded in the Canary Islands, North Atlantic Ocean. *Environmental Toxicology*, 23, 200-210.
- 4.- Carvan, M., Busbee, D., Hansen, L. (2003). Mechanisms 305 of aromatic hydrocarbon toxicity: Implications for dolphin morbidity and mortality. In: *Toxicology in Marine Mammals*, Vos J, Bossart G, Fournier M, O'Shea T, Editors, Taylor & Francis, London, pp 432-458.
- 5.- Castrillon, J., Gomez-Campos, E., Aguilar, A., Berdié, L., Borrell, A. (2010). PCB and DDT levels do not appear to have enhanced the mortality of striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) in the 2007 Mediterranean epizootic. *Chemosphere*, 81, 459-463.
- 6.- Cornaglia, E., Reborá, L., Gili, C., Di Guardo, G. (2000). Histopathological and immunohistochemical studies on cetaceans found stranded on the coast of Italy between 1990 and 1997. *Journal of Veterinary Medicine, A Physiology, Pathology, Clinical Medicine*, 47, 129-142.
- 7.- Corsolini, S., Focardi, S., Kannan, K., Tanabe, S., Borrell, A., Tatsukawa, R. (1995). Congener profile and toxicity assessment of polychlorinated biphenyls in dolphins, sharks and tuna collected from Italian coastal waters. *Marine Environmental Research*, 40, 33-53.
- 8.- Di Guardo, G., Agrimi, U., Morelli, L., Cardeti, G., Terracciano, G., Kennedy, S. (1995). Post mortem investigations on cetaceans found stranded on the coast of Italy between 1990 and 1993. *The Veterinary Record*, 136, 439-442.
- 9.- Egenvall, A., Bjoersdorff, A., Lilliehook, I., Olsson, E., Karlstam, E., Artursson, K., Hedhammar, A.,

- Gunnarsson, A. (1998). Early manifestations of granulocytic ehrlichiosis in dogs inoculated experimentally 329 with a Swedish Ehrlichia species. *The Veterinary Record*, 143, 412-417.
- 10.-Fair, P.A., Adams J., Mitchum G., Hulsey C.T., Reif J.S., Houde, M., Muir, D., Wirth, E., Wetzel, D., Zolman, E., McFee, W., Bossart, G.D. (2010). Contaminant blubber burdens in Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from two southeastern US estuarine areas: concentrations and patterns of PCBs, pesticides, PBDEs, PFCs and PAHs. *Science Total Environment*, 408, 1577-1597.
- 11.-Geraghty, J.M., Goldin, R.D. (1994). Liver changes associated with cholecystitis. *Journal of Clinical Pathology*, 47, 457-460
- 12.-Hall, A.J., Hugunin, K., Deaville, R., Law, R.J., Allchin, C.R., Jepson, P.D. (2006). The risk of infection from polychlorinated biphenyl exposure in the harbor porpoise (*Phocoena phocoena*): a case-control approach. *Environmental Health Perspectives*, 114, 704-711.
- 13.-Healey, C.J., Chapman, R.W., Fleming, K.A. (1995). Liver histology in hepatitis C infection: a comparison between patients with persistently normal or abnormal transaminases. *Gut*, 37, 274-278.
- 14.-Houde, M., Hoekstra P.F., Solomon K.R., Muir D.C.G. (2005). Organohalogen contaminants in delphinoid cetaceans. *Review Environmental Contamination Toxicology*, 184,1-57.
- 15.-Jaber, J.R., Pérez, J., Arbelo, M., Herráez, 354 P., Espinosa de los Monteros, A., Guisado, F., Fernández, T., Fernández, A. (2003). Immunophenotypic characterization of the hepatic inflammatory cell infiltrates in common dolphins. *Journal of Comparative Pathology*, 129, 226-230.
- 16.-Jaber, J.R., Pérez, J., Arbelo, M., Andrada, M., Hidalgo, M., Gómez-Villamandos, J.C., Van Den Ingh, T., Fernández, A. (2004). Hepatic lesions in cetaceans stranded in the Canary Islands. *Veterinary Pathology*, 41, 147-153.
- 17.-Jepson, P.D., Bennett, P.M., Allchin, C.R., Law, R.J., Kuiken, T., Baker, J.R., Rogan, E., Kirkwood, J.K. (1999). Investigating potential associations between chronic exposure to polychlorinated biphenyls and infectious disease mortality in harbour porpoises from England and Wales. *The Science of the Total Environment*, 15, 339-348.
- 18.-Jepson, P.D., Bennett, P.M., Deaville, R., Allchin, C.R., Baker, J.R., Law, R.J. (2005). Relationships between polychlorinated biphenyls and health status in harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) stranded in the United Kingdom. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 238-248.
- 19.-Kajiwara, N., Kunisue, T., Kamikawa, S., Ochi, Y., Yano, S., Tanabe, S. (2006). Organohalogen and organotin compounds in killer whales mass-stranded in the Shiretoko Peninsula, Hokkaido, Japan. *Marine Pollution Bulletin*, 52, 1066-1076.
- 20.-Kajiwara, N., Watanabe, M., Wilson, S., Eybatov, 378 T., Mitrofanov, I.V., Aubrey, D.G., Khuraskin, L.S., Miyazaki, N., Tanabe, S. (2008). Persistent organic pollutants (POPs) in Caspian seals of unusual mortality event during 2000 and 2001. *Environmental Pollution*, 152, 431-442.
- 21.-Kannan K., Blakenship, A.L., Jones P.D., Giesy J.P. (2000). Toxicity reference values for the toxic effects of polychlorinated biphenyls to aquatic mammals. *Human Ecological Risk Assessment*, 6, 181-201.
- 22.-Kelce, W., Stone, C., Laws, S., Gray, L., Kempainen, J., Wilson, E. (1995). Persistent DDT metabolite, p,p-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature*, 375,581-585.
- 23.-Kennedy, S., Smyth, J.A., Cush, P.F., Mcaliskey, M., McCullough, S., Rima, B.K. (1991). Histopathologic and immunocytochemical studies of distemper in harbor porpoises. *Veterinary Pathology*, 28, 1-7.
- 24.-Kirkwood, J.K., Bennett, P.M., Jepson, P.D., Kuiken, T., Simpson, V.R., Baker, J.R. (1997). Entanglement in fishing gear and other causes of death in cetaceans stranded on the coasts of England and Wales. *The Veterinary Record*, 14, 94-98.
- 25.-Kuiken, T., Baker, J.R. (1991). Guidelines for the postmortem examinations of cetaceans. London, Zoological Society of London.
- 26.-Liaw, Y.F., Sheen, 402 I.S., Chu, C.M., Chen, T.J. (1984). Chronic hepatitis with non specific histological changes. Is it a distinct variant of chronic hepatitis? *Liver*, 4,55-60.
- 27.-MacSween, R.N.M. (2002). Pathology of the liver. 4th ed. London, New York. Churchill Livingstone, pp 828.
- 28.-Mansuy, D. (1997). Molecular structure and hepatotoxicity: compared data about two closely related thiophene compounds. *Journal of Hepatology*, 26, 22-25.
- 29.-Pérez, J., García, P.M., Mozos, E., Bautista, M.J., Carrasco, L. (2001). Immunohistochemical characterization of hepatic lesions associated with migrating larvae of *Ascaris suum* in pigs. *Journal of Comparative Pathology*, 124,200-206.
- 30.-Ridgway, S.H. (1972). Homeostasis in the aquatic environment. In: *Mammals of the sea: Biology and Medicine*, ed. Ridgway SH. Thomas, Springfield, pp. 590-741.
- 31.-Ross, P., De Swart, R.L., Addison, R., van Loveren, H.,

- Vos, J., Osterhaus A. (1996). Contaminant-induced immunotoxicity in harbour seals: wildlife at risk?. *Toxicology*, 112, 157-69.
- 32.-Rothuizen, J., Van Den Ingh, T. (1998). Hepatitis in dogs; a review. *Tijdschr Diergeneesk*, 123, 246-252.
- 33.-Sonne, C., Dietz, R., Leifsson, P.S., Born, 425 E.W., Letcher, R.J., Kirkegaard, M., Muir, D.C., Riget, F.F., Hyldstrup, L. (2005). Do organohalogen contaminants contribute to histopathology in liver from East Greenland polar bears (*Ursus maritimus*)? *Environmental Health Perspectives*, 11, 1569-1574.
- 34.-Sonne, C., Wolkers, H., Leifsson, P.S., Jenssen, B.M., Fuglei, E., Ahlstrøm, O., Dietz, R., Kirkegaard, M., Muir, D.C., Jørgensen, E. (2008). Organochlorine-induced histopathology in kidney and liver tissue from Arctic fox (*Vulpes lagopus*) *Chemosphere*, 71, 1214-1224.
- 35.-Stein, J.E., Tilbury, K.L., Meador, J.P., Gorzelany, J., Worthy, G.A.J. and Krahn, M. (2003). Ecotoxicological investigations of bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) strandings: accumulation of persistent organic chemicals and metals. In: *Toxicology in Marine Mammals*, J. Vos, G. Bossart, M. Fournier and T. O' Shea, Eds, Taylor and Francis, New York, pp. 458-488.
- 36.-Tanabe, S., Iwata, H., Tatsukama, R. (1994). Global contamination by persistent organochlorines and their ecotoxicological impact on marine mammals. *The Science of the Total Environment*, 154, 163-177.
- 37.-Troisi, G.M., Haraguchi, K., Kaydoo, D.S., Nyman, 449 M., Aguilar, A., Borrell, A., Siebert, U., Mason, C.F. (2001). Bioaccumulation of polychlorinated biphenyls (PCBs) and dichlorodiphenylethane (DDE) methyl sulfones in tissues of seal and dolphin morbillivirus epizootic victims. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, 62, 1-8.
- 38.-Volta, U. (2008). Liver dysfunction in celiac disease. *Minerva Medica*, 99, 619-629.
- 39.-Weisbrod., A.V., Shea, D., Moore, M. J., Stegeman, J.J. (2001). Species, tissue and gender-related organochlorine bioaccumulation in white-sided dolphins, pilot whales and their common prey in the northwest Atlantic. *Marine Environmental Research*, 51, 29-50.

Torsión de lóbulo pulmonar: Revisión de la bibliografía a propósito de un caso clínico

Suárez-Bonnet, A.(1); Quesada-Canales, O.(1); Aguirre-Sanceledonio, M.(2); Arbelo, M.(1); Vega, G.(3); Medina, N.(1); Andrada, M.(1)

(1) Unidad de Histología y Patología Animal, Instituto de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria (IUSA).

(2) Departamento de Patología Animal. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Trasmontaña s/n 35416 Arucas (Las Palmas). Tfn: 928-451095, Fax: 928-451141. asuarez@becarios.ulpgc.es

(3) Hospital Veterinario Benartemi. C/ Benartemi 108, 35110, Vecindario. Las Palmas. Tfn: 928793148

RESUMEN: La torsión del lóbulo pulmonar (TLP) es una patología rara en perros y gatos y supone un elevado riesgo para la vida del paciente, que en la mayoría de los casos requiere de una lobectomía. La TLP es una rotación axial de un lóbulo pulmonar y su pedículo, normalmente centrada en el hilio o cerca de él. En este trabajo de revisión a propósito de un caso clínico pretendemos, por un lado realizar una revisión sobre la anatomía topográfica del pulmón de las especies canina y felina, y en segundo lugar, a propósito de un caso clínico, revisar y actualizar la información sobre la etiología, signos clínicos, métodos de diagnóstico, tratamientos y pronóstico de esta afección respiratoria. Por otra parte, también se discute la predisposición de ciertas razas caninas para desarrollar esta patología.

Palabras clave: Perro, pulmón, pedículo, torsión.

Lung lobe torsión: Review of the literature and a case report.

Summary

Lung lobe torsion is a rare life-threatening pathology in dogs and cats which in most cases requires a lobectomy. Lung lobe torsion may be defined as the rotation of a lung lobe along its long axis with twisting of the broncho-vascular pedicle at the hilus. In this paper, based on a case report, we review the veterinary literature about the anatomic topography of the lung and also the etiology, diagnostic procedures, treatment and prognostic aspect of this respiratory disorder. Besides, we also discuss the predisposition of certain canine breeds to develop the disease.

Key words: Dog, lung, pedicle, torsion.

La torsión del lóbulo pulmonar (TLP) es una patología rara, que pone en peligro la vida del paciente y que ha sido descrita en perros, gatos y humanos (Dye et al., 1998; Venuta et al., 2012). La TLP se define como la rotación de un lóbulo pulmonar en su eje largo comprometiendo a su pedículo broncovascular a nivel del hilio. La TLP ha sido descrita como de origen espontáneo (en animales sin historia previa de enfermedad o trauma) o secundaria a condiciones predisponentes. En opinión de los autores, se hace necesario revisar la anatomía funcional y topográfica del tracto respiratorio inferior, para comprender las regiones que pueden desarrollar esta patología y localizar las estructuras comprometidas.

Anatomía y anatomía topográfica

Los pulmones derecho e izquierdo, son los órganos fundamentales del aparato respiratorio, ya que de la fisiología de su parénquima depende el intercambio gaseoso en sangre. Entre los bronquios principales que resultan de la bifurcación traqueal y el tejido funcional respiratorio (alvéolos pulmonares) se intercala un complejo árbol bronquial (Figura 1), de bronquios de distinto calibre y bronquiolos, gracias al cual se asegura una distribución equitativa del aire a los alvéolos y se completan los procesos de humidificación y calentamiento del aire. Si prescindimos del corazón y los grandes vasos, y de las

porciones intratorácicas de la traquea y el esófago, los pulmones ocupan la cavidad torácica y se disponen como órganos semicónicos a uno y otro lado del corazón, desde la abertura craneal del tórax hasta el diafragma (Figuras 1 y 2).

Lobulación pulmonar

Los pulmones, derecho e izquierdo, de la especie canina presentan un lóbulo craneal y un lóbulo caudal. El lóbulo craneal del pulmón derecho se encuentra dividido en una *porción craneal* y una *porción caudal*. El lóbulo caudal no se encuentra dividido, y entre éste y la porción caudal del lóbulo craneal se topografía el lóbulo

medio. También, el pulmón derecho del perro presenta en su cara medial un lóbulo accesorio (Figura 2).

Vascularización pulmonar

Los pulmones presentan dos circuitos vasculares independientes: un circuito sanguíneo funcional, del que depende el intercambio gaseoso, y un circuito sanguíneo trófico o nutritivo que depende de los vasos bronquiales. Por el interior del pulmón, los trayectos vasculares de ambas circulaciones acompañan al árbol bronquial (Figura 2), llegando en el circuito funcional a alcanzar las paredes de los alvéolos y deteniéndose a nivel de los bronquiolos en el circuito trófico. Íntimamente relacionado con el circuito trófico discurren las fibras nerviosas simpáticas y parasimpáticas, así como las finas redes de vasos linfáticos. Debido a la multitud de ramas de estos circuitos vasculares y nerviosos, cuya explicación e ilustración serían tan extensas como ocupar otro artículo, remitimos a los lectores a alguno de los numerosos tratados de anatomía veterinaria con el objeto de obtener un conocimiento pormenorizado de la vascularización pulmonar.

Etiología

En principio cualquier mecanismo que incremente la movilidad de un lóbulo pulmonar parece favorecer el desarrollo de la torsión. Esta idea induce a pensar que las torsiones espontáneas de alguno de los lóbulos pulmonares deberían ser poco frecuentes, ya que son órganos que ocupan casi la totalidad de la cavidad torácica, sin embargo y como veremos en el apartado de discusión, debemos de considerar la torsión de un lóbulo pulmonar en el diagnóstico diferencial de perros con disnea sin patología respiratoria previa. En primer lugar el colapso parcial del pulmón lo libera de sus relaciones espaciales normales con la pared torácica, mediastino y lóbulos pulmonares adyacentes, que pueden incrementar

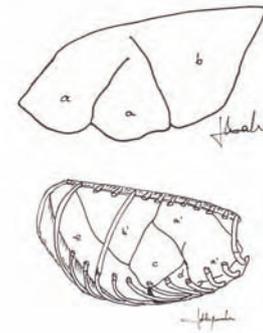
la movilidad. Un neumotórax a tensión junto a la consecuente atelectasia lobular pulmonar, puede facilitar un aumento de la movilidad que predispone a la torsión. Los perros de razas grandes y tórax profundo se afectan con frecuencia y en estos casos se asocia a causas espontáneas y secundarias, teniendo los animales afectados una edad media de 3,5 años. En las razas toy los animales afectados tienen una edad media de 1,7 años (Murphy et al., 2006).

Signos clínicos

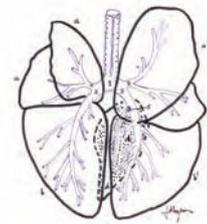
En estudios recientes los motivos de consulta más frecuentes de pacientes con TLP fueron letargia, taquipnea, anorexia, disnea, tos, hematemesis, reducción de los sonidos pulmonares, taquicardia, hipertermia, crepitaciones en la auscultación, palidez de mucosas, deshidratación, pulso débil y vómito (Neath et al., 2000; D'Anjou et al., 2005) (Tabla 1). La duración de los signos clínicos es variable y según algunos autores podría estar relacionado con la talla de los pacientes. En las razas toy los signos clínicos tienen una duración media de 3 días (de 1 a 9 días), en las razas pequeñas la media se sitúa en 3,5 días (1 a 21 días) y en las razas grandes encontramos una media de (4,5 días (de 2 a 102 días) (Murphy et al., 2006). Los pacientes afectados por TLP suelen desarrollar neutrofilia con desviación a la izquierda, monocitosis, eosinofilia y anemia (D'Anjou et al., 2005; Murphy et al., 2006). En un caso reciente se describe en un carlino hembra de 3,5 años, un síncope tusígeno con torsión de lóbulo pulmonar en la porción craneal del lóbulo izquierdo. En este caso los signos clínicos observados fueron únicamente taquipnea y taquicardia con síncope tras un episodio de tos (Davies et al., 2011).

Diagnóstico

El diagnóstico de TLP se hace en función de diferentes hallazgos como son;



▲ Figura 1. En estas imágenes esquemáticas se aprecia la topografía y lobulación pulmonar. a. lóbulo craneal izquierdo con sus porciones craneal y caudal, a'. lóbulo craneal derecho, b. lóbulo caudal izquierdo, b'. lóbulo caudal derecho, c. lóbulo medio, d. corazón, e. diafragma.



▲ Figura 2. En esta imagen esquemática se aprecia la lobulación pulmonar de la especie canina y se representa su árbol bronquial. a. lóbulo craneal izquierdo con sus porciones craneal y caudal, a'. lóbulo craneal derecho, b. lóbulo caudal izquierdo, b'. lóbulo caudal derecho, c. lóbulo medio, d. lóbulo accesorio.

Tabla 1.

Signos clínicos
Disnea
Taquicardia
Anorexia
Letargia
Tos
Pirexia
Dolor abdominal
Palidez de mucosas
Cianosis
Disminución de los sonidos cardiopulmonares

disnea, hallazgos radiográficos de efusión pleural y de patrón de consolidación lobular pulmonar, sin o con orientación anormal del bronquio en el lóbulo afectado. La ecografía torácica y la bronquioscopia aportan mayor fiabilidad al diagnóstico. Otros métodos diagnósticos que pueden realizarse



▲ Figura 3. A la apertura de la cavidad torácica se evidenció un moderado hemotórax. La apertura reglada de la cavidad torácica (hemitórax derecho) no permite en primera instancia determinar el origen de la hemorragia.

Tabla 2.

Diagnósticos diferenciales
Neumonía
Tromboembolismo pulmonar
Contusión torácica
Neoplasia
Atelectasia
Hemotórax
Piotórax
Quilotórax
Hernia diafragmática

son la tomografía axial computerizada, la toracoscopia y una broncografía de contraste. Los diagnósticos diferenciales para la TLP (Tabla 2) serían; neumonía, tromboembolismo pulmonar, contusión torácica, neoplasia, atelectasia, hemotórax, piotórax, quilotórax y hernia diafragmática. El diagnóstico definitivo sólo es posible mediante la inspección visual directa mediante el uso de toracoscopia, toracotomía o en la necropsia (Murphy *et al.*, 2006).

Tratamiento

El tratamiento para los perros afectados por TLP siempre debe ser la resección quirúrgica del lóbulo afectado. A menos que la TLP sea diagnosticada con prontitud, la reducción de la torsión y el mantenimiento del lóbulo afectado no se aconsejan por el elevado riesgo de reperfusión de toxinas a la circulación sistémica y la iniciación de la cascada de la coagulación. Por otra parte, se ha descri-

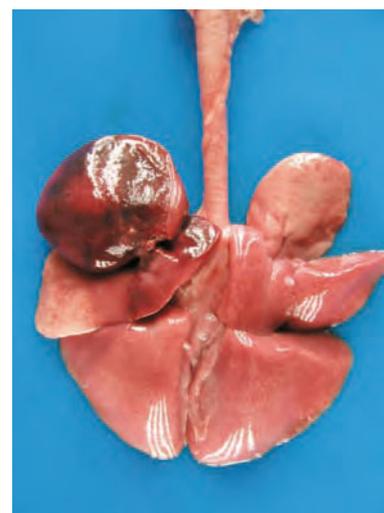
to la recurrencia de la TLP en casos en los que no se realizó lobectomía. Además, se ha descrito la recurrencia de TLP en un perro de raza carlino. En este caso el lóbulo pulmonar afectado en un principio fue el lóbulo craneal izquierdo, y tras dos años en los que el perro permaneció clínicamente sano, el paciente fue remitido al veterinario por una historia clínica de disnea, intolerancia al ejercicio e inapetencia de 3 días de duración. Tras la exploración clínica y por la sospecha de TLP, se procedió a realizar una toracotomía en el cuarto espacio intercostal derecho confirmándose una torsión de 180° del lóbulo craneal derecho (Spranklin *et al.*, 2003). El pronóstico para la mayoría de los animales afectados de TLP es bueno si el diagnóstico se realiza con celeridad y la cirugía tiene lugar en pocas horas.

Caso clínico

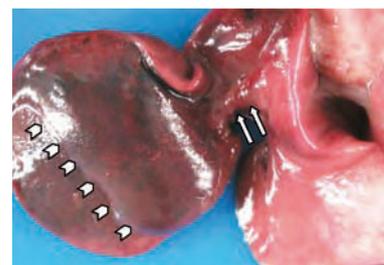
Se remite al Servicio de Necropsias de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, un perro carlino, macho, de dos meses de edad. La historia clínica mencionaba únicamente disnea sin especificar la duración, intensidad o naturaleza (inspiratoria o espiratoria) de la misma, y muerte súbita en pocas horas.

Necropsia

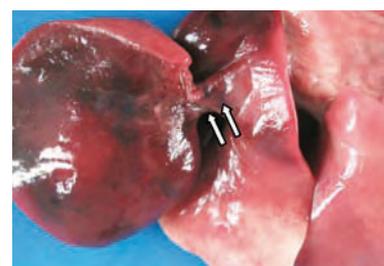
Durante la realización de la necropsia y a la apertura de la cavidad torácica se evidenció severo y extenso hemotórax (Figura 3). Al retirar el aparato respiratorio en su totalidad, se puso de manifiesto la torsión de 180° de la porción craneal del lóbulo craneal izquierdo (LCrI) (Figuras 4 a 6). La torsión afectaba al hilio del LCrI comprometiendo su vascularización e innervación. La porción craneal del LCrI presentaba aumento de tamaño, coloración rojo oscuro y una consistencia firme, manifestando la consolidación del lóbulo. La lesión que se produce en estos casos, y que puede diagnosticarse macroscópicamente se



▲ Figura 4. Tráquea y pulmones. Consolidación de la porción craneal del lóbulo craneal izquierdo. Este lóbulo presenta unos bordes redondeados y un color rojo oscuro en contraste con el color rosa pálido del resto de lóbulos pulmonares.



▲ Figura 5. Se observa con mayor detalle la torsión del pedículo bronco-vascular (Flechas). La superficie pulmonar presenta una marcada depresión (cabezas de flecha) originada por la tensión sobre la pleura visceral.



▲ Figura 6. Al resolver la torsión manualmente durante la necropsia (flechas), la superficie del lóbulo pulmonar presenta una superficie uniforme a diferencia de la figura 5.

denomina infartación hemorrágica. Esta lesión se produce cuando el riego arterial a un órgano no se ve interrumpido (debido a su mayor presión), pero el drenaje venoso (de menor presión) se ve dificultado por una torsión o estrangulación (tal como ocurre en los vólvulos intestinales, intususcepciones,

torsiones ováricas, etc). El resultado es que sigue llegando sangre a la zona afectada y al no evacuarse se produce acumulación de toxinas y se activa la cascada de coagulación. En la cavidad abdominal pudo observarse un color pálido de la serosa del intestino delgado y otros órganos. Este color pálido podría ser indicativo de un shock de tipo distributivo, que tiene lugar en casos de torsiones, vólvulos, etc. La causa de la muerte más probable en este paciente sería la del desarrollo de un distres respiratorio agudo, asociado a un shock hipovolémico que produjo falta de riego sanguíneo a órganos vitales. Además, a este proceso patológico hemos de añadir la acumulación de toxinas debido al estasis vascular y su posterior reabsorción por parte de la circulación sistémica.

Discusión

La torsión del lóbulo pulmonar es una enfermedad rara que puede llegar a representar un riesgo vital y que en la mayoría de los casos requiere de la realización de una lobectomía. Aunque se ha descrito en perros de todos los tamaños, aquellos perros de razas grandes y tórax profundo tienen una especial predilección para desarrollar esta patología (Gelzer *et al.*, 1997). Por otra parte, los casos descritos señalan el lóbulo medio del pulmón derecho como el más frecuentemente afectado, seguido por los lóbulos craneales derecho e izquierdo (Gallagher *et al.*, 1993; D'Anjou *et al.*, 2005). En los últimos años se han descrito varios trabajos científicos en los que se ha puesto de manifiesto una especial predilección por los perros de razas toy, especialmente los pug (carlinos), para desarrollar torsiones espontáneas de lóbulo pulmonar (Rooney *et al.*, 2001; Spranklin *et al.*, 2003; D'Anjou *et al.*, 2005; Murphy *et al.*, 2006; Davis *et al.*, 2011). Los perros carlinos desarrollan la TLP con una edad media de 1,5 años, mientras que la edad media para perros de razas de

talla mediana y grande se sitúa en los 7 y los 3,5 años respectivamente. El sexo parece ser un factor predisponente puesto que en un estudio retrospectivo sobre 7 perros de raza carlino en los que se había desarrollado TLP, 6 de los pacientes eran machos (Murphy *et al.*, 2006). Por otra parte, en este estudio también se señala una diferencia de esta patología respecto de la TLP que acontece en perros de razas mayores, ya que mientras en otras razas el lóbulo afectado con más frecuencia suele ser el lóbulo medio del pulmón derecho (Gelzer *et al.*, 1997; White *et al.*, 2000; Hofeling *et al.*, 2004; Della Santa *et al.*, 2006, en este estudio se resalta como en 6 de los pacientes la torsión se desarrolló en el lóbulo craneal izquierdo. En otro estudio anterior, también se describió el desarrollo de TLP en dos machos carlinos de 1,5 y 2 años de edad (Rooney *et al.*, 2001). La recurrencia de la TLP también ha sido descrita. En este caso Spranklin *et al.*, en 2003 proporciona datos sobre el desarrollo de TLP craneal derecho, en una perra carlina de 4 años a la que a los 2,5 años se le había realizado una lobectomía por una TLP craneal izquierdo. Se ha sugerido que la predilección para desarrollar una TLP craneal izquierdo sea una displasia del cartilago bronquial a nivel del hilio pulmonar (Hoover *et al.*, 1992), pero ninguno de los autores que han sugerido esta hipótesis han encontrado hallazgos histopatológicos que lo corroboren.

En nuestro caso clínico describimos una TLP en un perro carlino, macho, de dos meses de edad con una historia clínica de disnea de duración desconocida y muerte súbita. El paciente presentó torsión del lóbulo craneal izquierdo coincidiendo con los hallazgos de otros autores (D'Anjou *et al.*, 2005; Murphy *et al.*, 2006; Davies *et al.*, 2011). Todos los datos expuestos corroboran que los perros de raza carlino, y en particular los animales muy jóvenes están especialmente predisuestos para desarrollar una TLP.

El pronóstico para los perros con TLP varía en función de la rapidez con la que se diagnostique esta patología al tiempo que se resuelva adecuadamente de manera quirúrgica. Por otra parte, parece evidente que la raza tiene que tenerse en cuenta ya que los perros de raza carlino presentan aparentemente un mejor pronóstico que otras razas de mayor tamaño.

Debido a que en la actualidad, la raza carlino está teniendo un mayor éxito como animal de compañía, es posible que aumente la incidencia de esta patología por lo que los veterinarios deben de considerar esta patología en el diagnóstico diferencial de trastornos respiratorios en perros jóvenes de razas toy (Choi *et al.*, 2006).

Conclusión

La TLP es una afección respiratoria rara, espontánea o secundaria a patología respiratoria previa, que afecta a perros y a gatos, con predisposición en perros de razas grandes y tórax profundo y que acontece de manera espontánea en perros carlinos. Así mismo cuando esta patología se desarrolla en los perros carlinos existen diferencias en cuanto al lugar en que asienta la torsión y en su pronóstico. La TLP debe de considerarse siempre en el diagnóstico diferencial de perros carlinos jóvenes que presenten una sintomatología de disnea, tos y letargia y que no tengan historia clínica previa de patología respiratoria.

Bibliografía

- 1.- Choi J, Yoon J. Lung lobe torsion in a Yorkshire terrier. *J Small Anim Pract.* 2006, 47:557.
- 2.- d'Anjou MA, Tidwell AS, Hecht S. Radiographic diagnosis of lung lobe torsion. *Vet Radiol Ultrasound.* 2005; 46:478-484.
- 3.- Davies JA, Snead EC, Pharr JW. Tussive syncope in a pug with lung-lobe torsion. *Can Vet J.* 2011; 52:656-660.
- 4.- Della Santa D, Marchetti V, Lang J, Citi S. What is your diagnosis?

- Torsion of the right middle lung lobe. *J Am Vet Med Assoc.* 2006; 229:1725-1726.
- 5.- Dye TL, Teague HD, Poundstone ML. Lung lobe torsion in a cat with chronic feline asthma. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1998; 34:493-495.
 - 6.- Gelzer AR, Downs MO, Newell SM, Mahaffey MB, Fletcher J, Latimer KS. Accessory lung lobe torsion and chylothorax in an Afghan hound. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1997; 33:171-176.
 - 7.- Hofeling AD, Jackson AH, Alsup JC, O'Keefe D. Spontaneous midlobar lung lobe torsion in a 2-year-old Newfoundland. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2004; 40:220-223.
 - 8.- Hoover JP, Henry GA, Panciera RJ. Bronchial cartilage dysplasia with multifocal lobar bullous emphysema and lung torsions in a pup. *J Am Vet Med Assoc.* 1992; 201:599-602.
 - 9.- Murphy KA, Brisson BA. Evaluation of lung lobe torsion in Pugs: 7 cases (1991-2004). *J Am Vet Med Assoc.* 2006; 228:86-90.
 - 10.-Rooney MB, Lanz O, Monnet E. Spontaneous lung lobe torsion in two pugs. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2001 Mar-Apr; 37:128-30.
 - 11.-Spranklin DB, Gulikers KP, Lanz OI. Recurrence of spontaneous lung lobe torsion in a pug. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2003; 39:446-451.
 - 12.-Venuta F, Anile M, de Giacomo T, Coloni GF. Prevention of middle lobe torsion after right upper lobectomy with a polymeric sealant. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2012; 143:240-241
 - 13.-White RN, Corzo-Menendez N. Concurrent torsion of the right cranial and right middle lung lobes in a whippet. *J Small Anim Pract.* 2000; 41:562-565.

Expresión inmunohistoquímica de COX-2 en neoplasias caninas y felinas. Utilidad terapéutica

Suárez-Bonnet, A.; Herráez, P.; Espinosa de los Monteros, A.

Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico Veterinario. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

La enzima prostaglandina G/H sintetasa, también conocida como ciclooxigenasa (COX), controla la síntesis de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico. Se reconocen fundamentalmente dos isoformas de esta enzima que son denominadas COX-1 y COX-2. En la actualidad sabemos que un cierto número de tumores expresan altos niveles de COX-2, mientras que esto no sucede en los tejidos normales de los cuales proceden, definiendo este hecho como una neo-expresión o sobre-expresión de esta enzima. Existen sólidas pruebas que sugieren que a nivel celular la COX-2 contribuye a la transformación neoplásica, a la capacidad de invasión de tejidos y al desarrollo de metástasis, pese a que los mecanismos exactos por los cuales ejerce su acción no están totalmente dilucidados. Estos datos han condicionado que la expresión tumoral de la COX-2 se haya convertido en un área de intensa investigación. De hecho, recientes trabajos indican que la COX-2 puede usarse como objetivo terapéutico en el tratamiento de algunos tipos de tumores en el hombre, perro y gato (Dore 2011).

Se han publicado recientemente varios trabajos sobre la expresión inmunohistoquímica de COX-2 en diferentes tipos tumorales en las especies canina y felina. Entre los tumores que sobre-expresan o neo-expresan COX-2 se encuentran los carcinomas de células escamosas, mamarios, de células transicionales, melanomas y los mastocitomas cutáneos caninos (Dore 2011; Prada et al., 2011).

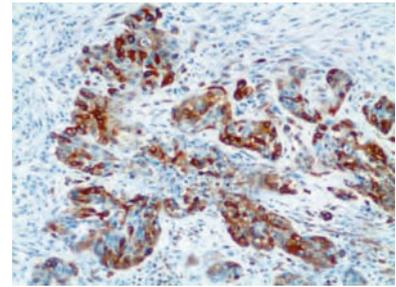
En la actualidad sólo se ha demostrado una acción antitumoral de los inhibidores de la COX-2 en los casos de carcinomas de células transi-

cionales. No obstante, los altos niveles de expresión observada en otros tipos tumorales, hace probable que la manipulación farmacológica con inhibidores de la COX-2 en aquellos casos en los que se demuestre su sobre-expresión, pueda producir algún tipo de respuesta antitumoral. En todo caso, esta hipótesis debe de ser contrastada en un gran número de paciente en los que haya realizado la detección de esta enzima.

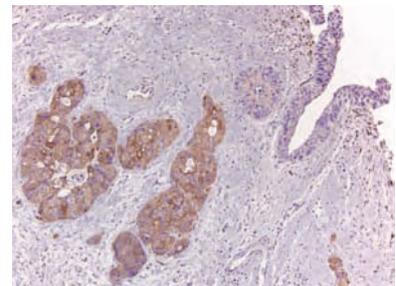
Uno de los métodos empleados para detectar la presencia de la COX-2 es la técnica inmunohistoquímica. Esta técnica tiene la ventaja de realizarse sobre cortes de tejido, procedentes de la misma muestra que se remitió al laboratorio de anatomía patológica para su diagnóstico, por lo que no requiere de nuevas tomas de muestra. Además esta técnica permite visualizar de manera directa en qué células ocurre la expresión de la enzima, por lo que puede determinarse si esta ocurre en las células neoplásicas o en células reactivas y/o inflamatorias (Dore 2011).

Actualmente el Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico Veterinario de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria es el único que oferta esta técnica de diagnóstico, y colabora con diversos centros veterinarios y con la empresa farmacéutica Meril en el estudio de la expresión de COX-2 en neoplasias caninas y felinas.

Esperamos que la petición más generalizada, por parte de los oncólogos clínicos veterinarios, de esta técnica de diagnóstico, permita arrojar luz sobre el verdadero papel de la enzima COX-2 en las neoplasias de los animales de compañía.



▲ Figura 1. Carcinoma simple túbulo-papilar de mama, Grado II. Especie felina. Tinción inmunohistoquímica empleando el anticuerpo anti-COX-2. Sobreexpresión de COX-2 en células epiteliales neoplásicas de origen mamario.



▲ Figura 2. Carcinoma de células transicionales. Especie canina. Tinción inmunohistoquímica empleando el anticuerpo anti-COX-2. Obsérvese que el epitelio de transición normal es negativo (esquina superior derecha), mientras que las células neoplásicas que invaden la túnica muscular presentan sobreexpresión de COX-2.

Bibliografía

- 1.- Dore M. 2011. Cyclooxygenase-2 Expression in animal cancer. *Veterinary Pathology* 48, 254-265.
- 2.- Prada J, Queiroga FL, Gregório H, Pires I. 2011. Evaluation of Cyclooxygenase-2 Expression in Canine Mast Cell Tumours. *Journal of Comparative Pathology*. In press.

Inmunotipificación de linfomas. Herramienta diagnóstica de valor pronóstico

Suárez-Bonnet, A.; Espinosa de los Monteros, A.; Herráez, P.

Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico Veterinario. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

Los linfomas son un diverso grupo de neoplasias que se originan de células linforeticulares. Con frecuencia se desarrollan en tejidos linfoides tales como los ganglios/nódulos linfáticos, bazo y médula ósea, no obstante también pueden originarse en casi todos los tejidos del organismo. El linfoma es una de las neoplasias más comunes en el perro. La incidencia anual estimada es de 13 a 24 casos por cada 100.000 pacientes en riesgo (Backgren, 1965; Dorn *et al.*, 1968), mientras que, la incidencia anual para pacientes con más de 10 años de edad se cifra en 84 por cada 100.000 (Dorn *et al.*, 1970).

La clasificación de los linfomas se realiza en base a la localización anatómica, tipos histológicos y a la caracterización inmunofenotípica.

El protocolo diagnóstico debe de realizarse en base a un meticuloso e imprescindible examen clínico que debe incluir un estudio hematológico y bioquímico, así como a una evaluación citológica (Tabla 1) e histológica de los nódulos linfáticos o de tejidos extranodales. De esta manera, el examen morfológico de las células que componen el proceso neoforativo es esencial en el diagnóstico del linfoma. Debe de tenerse la precaución de evitar el estudio de ganglios linfáticos de áreas de fácil inflamación como la región mandibular, siendo de elección los ganglios preescapulares y los poplíteos. También, debe de tenerse en cuenta que las células linfoides son frágiles y que durante la extensión de las preparaciones citológicas debe de realizarse la menor presión posible para evitar fragmentar las células de la muestra.

Para un diagnóstico histológico preciso, se recomienda la extirpación

Tabla 1. Criterios de evaluación para el estudio de preparaciones citológicas en casos de linfoma.

Tamaño celular (en comparación con el tamaño eritrocitario)
Pequeño: 1-1,5 eritrocito
Mediano: 2-2,5 eritrocito
Grande: > 3 eritrocito
Morfología nuclear y posición respecto al citoplasma
Redondo
Irregularmente redondo
Convoluta
Hendido
Central vs excéntrico
Número, tamaño, visibilidad y localización nucleolar
Únicos vs múltiples
Grandes vs pequeños
Indiferenciados
Prominentes
Central vs marginal
Citoplasma
Escaso
Moderado
Abundante
Pálido (ligeramente basófilo o claro)
Moderadamente basófilo
Marcada basofilia (Azul oscuro)
Índice mitótico en 5 campos a 40x
Bajo: 0-1 figura mitótica
Moderado: 2-3 figuras mitóticas
Elevado: >3 figuras mitóticas
Grado tumoral basado en el tamaño celular e índice mitótico
Bajo grado: Índice mitótico bajo y tamaño celular pequeño
Elevado grado: Índice mitótico moderado o elevado y tamaño celular medio o grande

completa, incluyendo la cápsula, de un ganglio linfático, su fijación en formol tamponado al 10% y su envío a un laboratorio de Anatomía Patológica. La disponibilidad de este tejido no sólo resulta esencial para el diagnóstico del proceso, sino que además, nos permite sobre las mismas secciones de tejido realizar técnicas inmunohistoquímicas para carac-

terizar inmunofenotípicamente la neoplasia.

Así, la determinación del inmunofenotipo del linfoma canino, en linfoma de células B y células T, ha demostrado ser una test diagnóstico de utilidad a la hora de emitir un pronóstico (Teske *et al.*, 1994, Raskin 2010) en este grupo de neoplasias. Los anticuerpos empleados en cada

caso son, anti-antígenos CD20, CD21, CD79 α , para determinar el origen de los tipos B, mientras que los anticuerpos anti-antígenos CD3, CD4 y CD8, se emplean para identificar las neoplasias de células T.

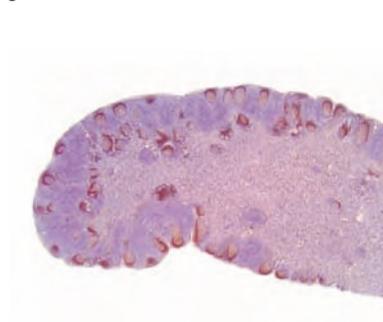
De esta manera, se ha descrito que los pacientes caninos con linfomas de tipo T, presentan significativamente un mayor riesgo de recidivas (52 vs 160 días) y un menor tiempo de supervivencia total (153 vs 330 días) en comparación con los linfomas de células B, tras la instauración del tratamiento farmacológico.

En el Servicio de Diagnóstico Anatomopatológico Veterinario de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, tenemos a disposición de los hospitales y clínicas veterinarias el test inmunohistoquímico para la detección de células B (Figura 1) y células T (Figura 2), en los casos en los que se ha emitido un diagnóstico de linfoma. Cuando el oncólogo solicita la inmunotipificación del linfoma, ésta se realiza sobre el mismo tejido que fue remitido al laboratorio para su diagnóstico histológico.

Como conclusión, hay que enfatizar la importancia de un diagnóstico



▲ Figura 1. Ganglio linfático. Especie canina. Tinción inmunohistoquímica empleando el anticuerpo anti-CD3, que identifica células T en la zona parafolicular de un ganglio linfático normal.



▲ Figura 2. Ganglio linfático. Especie canina. Tinción inmunohistoquímica empleando el anticuerpo anti-CD79 α , que identifica células T en los folículos linfoides de un ganglio linfático normal.

preciso, destacando para ello la anatomía patológica, así como la utiliza-

ción de nuevas herramientas con valor pronóstico como la inmunotipificación, que puedan ayudar en la toma de decisiones en relación al paciente con linfoma.

Bibliografía

- 1.- Backgren AW. Lymphatic leukemia in dogs: an epizootiological, clinical and haematological study. *Acta Vet Scand.* 1965. 6, 3-12.
- 2.- Dorn CR, Taylor DO, Schneider R, Hibbard HH, Klauber MR. Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *J Natl Cancer Inst.* 1968. 40:307-318.
- 3.- Dorn CR, Taylor DO, Schneider R. The epidemiology of canine leukemia and lymphoma. *Bibl Haematol.* 1970. 403-415.
- 4.- Raskin RE, 2010. Sistema linfático. En, *Citología canina y felina.* Multimédica.

Paralelismo entre la artritis reumatoide humana y las artritis por micoplasmas en las especies animales

Ramírez, A. S.; Rosales, R. S.; Suárez-Pérez, A.; Poveda, C. G.; Vega-Orellana, O.; Mederos Iriarte, L. E.; Poveda, J. B.

"Entre la medicina de animales y la medicina humana no hay una línea divisoria ni debería estar allí. El objeto es diferente, pero la experiencia obtenida constituye la base de toda la medicina". Rudolf Virchow (1821-1902)

La medicina comparada es el estudio con mentalidad abierta de las enfermedades comparables en las diferentes especies. Esta disciplina fomenta el intercambio de conocimientos entre las ciencias básicas y clínicas y las medicinas humana y veterinaria. Hay que recordar que la determinación del papel de diversos virus en la oncogénesis y el extraordinario desarrollo de la tecnología reproductiva en la especie humana fueron impulsados inicialmente por estudios en animales, sin olvidar la existencia de las zoonosis, enfermedades que se transmiten entre humanos y animales (Michell, 2000 y 2005).

Rudolf Virchow es considerado el padre de la patología moderna y junto con Sir William Osler, padre de la medicina moderna, fueron grandes defensores de "*Una Medicina*". Este concepto une la profesión de médico y de veterinario. Como hijo de un carnicero, Virchow notó la conexión entre las enfermedades humanas y animales, acuñando el término de zoonosis. A pesar de su prometedor futuro, el concepto "*Una Medicina*" necesitó que el epidemiólogo Calvin Schwabe lo redefiniera en 1984. Se basó en la estrecha relación entre humanos, animales domésticos y la salud pública y propuso un enfoque unificado humano y veterinario de las zoonosis (Cardiff y cols., 2008).

Posteriormente, el concepto de "*Salud de los Ecosistemas*" extendió "*Una Medicina*" a todo el ecosistema, incluyendo la fauna silvestre,

por lo que el término, con una clara connotación clínica reflejaba insuficientemente las interacciones entre la salud humana y animal, incluyendo la ecología, salud pública y otras dimensiones sociales (Zinsstag y cols., 2011). Por todo esto "*Una Medicina*" evolucionó a "*Una Salud*", enfatizando la importancia de la epidemiología y la salud pública. Este nuevo concepto cambia la percepción de que los animales son un riesgo para la salud humana hacia la perspectiva de que los humanos y animales compartimos riesgos (Rabinowitz y cols., 2008).

La medicina comparada es una apuesta de futuro real para el conocimiento en nuestros tiempos. Se trata de una estrategia basada en el trabajo multidisciplinar, cuyos frutos han conducido a avances importantes en el conocimiento de múltiples aspectos de muchas enfermedades. Esto ha permitido, a su vez, obtener mayor información sobre la relación causa-efecto existente en dichas entidades nosológicas, lo que conlleva nuevas soluciones terapéuticas y preventivas a muchas patologías, sobre todo a las que por su carácter crónico y sigiloso resultaban difíciles de estudiar en las poblaciones humanas (Michell, 2005).

Los modelos de experimentación animal, llevados a cabo predominantemente con roedores, están empezando a mostrar sus limitaciones en el estudio de muchos aspectos de las enfermedades que afectan a las poblaciones humanas, debido a las considerables diferencias entre estas

especies, y ello a pesar de los múltiples esfuerzos de los investigadores por mejorarlos (Coleman, 2003). Por tanto, hay que apostar por la búsqueda de modelos de experimentación y de estudios observacionales con animales alternativos que nos permitan crear un escenario propicio para establecer comparaciones mejores y más fiables entre el desarrollo de la enfermedad en las poblaciones humanas y animales (Galibert y cols., 2001).

El crecimiento exponencial del estudio de genomas individuales ha demostrado la alta conservación en las secuencias de los genes entre humanos y especies domésticas como los perros. También se ha visto que las prácticas de crianza de perros de pura raza están siendo de mucha utilidad a genetistas y a patofisiólogos de enfermedades tales como el cáncer, diabetes y desórdenes mentales (Argyle, 2005).

Michell (2005) también va más allá, entrando en el desarrollo novedoso de diagnósticos y terapéutica. Tratamientos contra cánceres inducidos en roedores que fueron exitosos han resultado fallidos en pacientes humanos. Sin embargo, se ha demostrado que el comportamiento del cáncer en perros es similar al de humanos. Consecuentemente, perros con tumores desarrollados de forma natural son un objeto de estudio ideal para el estudio de nuevas técnicas diagnósticas y para probar nuevos medicamentos anticancerígenos, en un entorno de evaluación pre-clínica en

un modelo relevante sin la necesidad de utilizar perros de experimentación (con tumores inducidos).

Las principales ventajas que aporta la Medicina Comparada al estudio de las enfermedades serían (Michell, 2005):

- El control de aquellos factores difíciles de controlar cuando se estudian las poblaciones humanas, como pueden ser la dieta o la selección genética.
- La mayor presencia de partos múltiples en determinadas especies animales, además de un menor espacio de tiempo entre generaciones, implica una inestimable ventaja para el estudio de los factores asociados a las enfermedades pre y perinatales.
- Una esperanza de vida más corta, así como las diferencias de esperanza de vida entre razas de una misma especie, puede dar información sobre qué factores están relacionados con la evolución biológica de las distintas razas, y como se relaciona con la esperanza de vida.
- Ventajas a la hora de la realización de estudios alométricos, ya que especies como la canina cuentan con razas cuyos pesos pueden variar entre 2 y 80 kg dependiendo de la raza y del estado de madurez sexual.
- Mayor acercamiento a la hora de realizar estudios de rendimiento deportivo.
- El estudio de las zoonosis y de aquellas enfermedades que tienen que ver con los ambientes compartidos por las poblaciones humanas y animales, como puede ser el caso de la exposición a alérgenos, sustancias tóxicas, etc.

Actualmente, nos enfrentamos al desafío que implica el estudio de las enfermedades crónicas y la importancia del conocimiento de los factores que favorecen su aparición. Un ejemplo de este tipo de enfermedades es, sin duda, la artritis reumatoide humana. Las artritis humanas están fre-

cuentemente asociadas con procesos de tipo infeccioso, al contrario de lo que ocurre aparentemente con la artritis reumatoide, que se caracteriza por presentarse en forma de poliartritis crónica, cuya etiología se desconoce. La artritis reumatoide tiene una causa multifactorial. Lo que desencadena la enfermedad continúa siendo un misterio, sin embargo, se ha observado que los factores que juegan un papel importante en la enfermedad son genéticos, medioambientales y la autoinmunidad. La hipótesis más aceptada en la actualidad es que la artritis reumatoide está desencadenada por la acción de un agente infeccioso. Se han sugerido como estimulantes artritogénicos muchas infecciones bacterianas y virales, aunque el mecanismo de la enfermedad reumatoide es una reacción antígeno-anticuerpo más que un tipo de enfermedad infecciosa transmisible. El fenómeno autoinmune podría explicarse por una alteración agente-mediada de los antígenos del hospedador. Parece que hay consenso en que la acumulación de células inflamatorias, la activación del sistema del complemento por inmunocomplejos y la liberación de linfocinas por activación de células linfoides son importantes en la patogénesis de la artritis reumatoide. Una respuesta inmune en contra de un antígeno persistente podría iniciar y perpetuar estas reacciones. Además, podría ser innecesario que el antígeno persistiera en las articulaciones, ya que los complejos inmunes podrían ser generados en un lugar distante y luego atrapados en el cartilago articular (Cole y Ward, 1979).

Cualquiera que sea el mecanismo patogénico involucrado, parece claro que ni los eventos iniciadores ni los sostenedores de la artritis reumatoide han sido identificados. A pesar del interés de encontrar una etiología viral a la enfermedad, la mayoría de sus características se pueden observar en varias artritis animales crónicas inducidas por micoplasmas (Orden *Mollicutes*) (Cole y Ward, 1979).

Desde que en los años 50 Thomas McPherson Brown apuntó a los micoplasmas como causas potenciales de artritis (Brown y Scammell, 1988), algunos autores han implicado a los micoplasmas como cofactores de las enfermedades inflamatorias articulares, especialmente en la artritis reumatoide. Muchas características de la artritis reumatoide pueden ser observadas en artritis crónicas producidas por diferentes especies animales (Cole y Ward, 1979). En la Tabla 1 se puede ver una relación de micoplasmas y la especie a la que le puede provocar artritis.

La mayoría de estos micoplasmas también causan problemas respiratorios. Por el contrario, existen especies cuyo principal cuadro lesional afecta a las vías respiratorias y que a su vez pueden exhibir complicaciones articulares asociadas (Cole y Ward, 1979). Es conocido que *Mycoplasma (M.) pneumoniae*, agente productor de la neumonía atípica en humanos (Embree y Embil, 1980), induce secuelas respiratorias como no respiratorias, incluyendo la artritis (Taylor-Robinson, 1981). Sin embargo, la proporción de infecciones respiratorias producidas por este microorganismo que terminan desarrollando artritis es desconocida.

Mycoplasma arthritidis, *M. fermentans* y *M. hominis* han sido aislados de articulaciones de pacientes con artritis reumatoide y, alguna vez, de pacientes que no presentaban la misma enfermedad (Jansson y Wagner, 1967; Mårdh y cols., 1973). Sin embargo, la mayoría de los científicos ha fallado en el aislamiento de micoplasmas a partir de las articulaciones afectadas por la artritis reumatoide (Stewart y cols., 1974; Cole y Ward, 1979; Taylor-Robinson, 1981).

La habilidad de *M. penetrans*, *M. pneumoniae* y *M. genitalium* de invadir células del hospedador y de establecer una residencia durante una coinubación prolongada sugiere un papel intracelular más activo para los micoplasmas del que se había considerado previamente (Baseman y

Tabla 1. Relación de animales y los micoplasmas que les pueden provocar artritis.

Animal	Mycoplasma
Murino	<i>M. arthritidis</i>
Murino	<i>M. pulmonis</i>
Cerdo	<i>M. hyorhinis</i>
Cerdo	<i>M. hyosynoviae</i>
Aves	<i>M. gallisepticum</i>
Aves	<i>M. synoviae</i>
Pavo	<i>M. meleagridis</i>
Rumiantes	<i>M. mycoides</i> sbsp. <i>mycoides</i> SC
Rumiantes	<i>M. bovis</i>
Rumiantes	<i>M. agalactiae</i>
Cocodrilo	<i>M. crocodily</i>
Caimán	<i>M. alligatoris</i>
Elefante	<i>M. elephantis</i>

cols., 1995). Además, durante el curso de la infección natural producida por micoplasmas en humanos, las células B pueden ser activadas de una manera no-específica, conduciendo a una estimulación policlonal y a la producción de auto-anticuerpos (Schäffner y cols., 1998).

La presencia de anticuerpos específicos en el suero o fluido sinovial en pacientes con artritis reumatoide se ha utilizado para implicar a los micoplasmas en la artritis reumatoide. Bartholomew (1967) utilizó un antígeno polivalente compuesto a partir de cuatro cepas de micoplasmas supuestamente aisladas de pacientes enfermos de artritis reumatoide y de la enfermedad de Reiter, describiendo asimismo, la existencia de anticuerpos (por la técnica de fijación de complemento) en los pacientes con artritis reumatoide. Williams y Bruckner (1971) encontraron anticuerpos frente a *M. fermentans* mediante la técnica de inhibición del metabolismo en pacientes con artritis reumatoide, así como Jansson y colaboradores (1975) encontraron ocasionalmente anticuerpos frente a *M. arthritidis* también en pacientes con artritis reumatoide. En cambio, otros investigadores fallaron en demostrar una única asociación con la artritis reumatoide. Hernández y colaboradores (1977) sugirieron que la artritis

podía ser una complicación secundaria en la infección por *M. pneumoniae*, el agente causal de la neumonía atípica primaria en humanos, mientras que Obeck y colaboradores (1976) encontraron que un mono Rhesus con poliartritis severa crónica desarrolló aglutininas y anticuerpos frente a dicho micoplasma; no obstante, ningún micoplasma ni otra bacteria pudo ser aislada de sus articulaciones.

Hasta ahora uno de los problemas al intentar clasificar la artritis reumatoide como una enfermedad infecciosa era la carencia de evidencia epidemiológica. Con el estudio epidemiológico desarrollado por Ramírez y cols. (2005) se intentó determinar si existía alguna relación entre *M. pneumoniae* y la artritis reumatoide, mediante un estudio de casos y controles. Para su realización se obtuvo el consentimiento de los pacientes y la aprobación del Comité Ético Local.

Se estudiaron en dicha ocasión 78 casos de pacientes con artritis reumatoide, todos pacientes externos del Hospital Insular (Gran Canaria, España) que cumplieran los criterios revisados por la American Rheumatism Association, y se emparejaron cada uno con dos controles, sumando un total de 156 controles (para lo que se eligieron personas que no presentaban artritis reumatoide así como ninguna otra enfermedad autoinmune). Se compararon, mediante pruebas estadísticas, diversas variables entre los dos grupos para intentar identificar diferencias. Las variables estudiadas fueron: edad, género, estado civil, trabajo, si habían sufrido neumonía y si presentaban anticuerpos frente a *M. pneumoniae*, lo que implicaría un contacto anterior con este microorganismo.

Se demostró la existencia de una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de una infección previa por *M. pneumoniae* y la posterior aparición de la artritis reumatoide (Ramírez y cols., 2005), mientras que Horowitz y cols. (2000) no encontraron diferencias en la pre-

valencia de anticuerpos en suero a *M. fermentans* entre pacientes con artritis reumatoide y los controles sanos. Por otro lado en el trabajo de Ramírez y cols. (2005) no se encontró ninguna relación entre haber padecido un episodio de neumonía y el padecimiento de la artritis reumatoide, tal vez debido a que la clínica de infección pulmonar puede cursar desde síntomas parecidos a la gripe hasta la neumonía patente.

Sin embargo, estos resultados no se pueden traducir en considerar que *M. pneumoniae* es la causa de la artritis reumatoide. El tipo de estudio epidemiológico realizado (de casos y controles) sólo detecta relaciones pero no causalidades. Además, no puede establecerse qué ocurrió primero: si la infección por *M. pneumoniae* desencadenó la aparición de la enfermedad o si una persona con la enfermedad está más predispuesta a ser infectada con *M. pneumoniae* (Ramírez y cols., 2005).

¿Por qué se sigue pensando que los micoplasmas podrían estar involucrados en el desencadenamiento de la artritis reumatoide?

El fracaso en el aislamiento sistemático de micoplasmas en pacientes con artritis reumatoide puede ser debido, por un lado, a que la acción del sistema inmune produce su desaparición, y por otro lado, a la dificultad que entraña su aislamiento debido a su dependencia de nutrientes específicos. De igual manera, en las poliartritis por *Mycoplasma hyosynoviae* en la especie porcina, resulta imposible aislar este microorganismo en las articulaciones después de un mes de evolución de la enfermedad.

M. pneumoniae posee adhesinas o proteínas que le permiten adherirse a los tejidos humanos. Estas adhesinas están relacionadas con la patogenicidad de este microorganismo. Además, la composición de estas proteínas es muy similar a ciertas estructuras moleculares existentes en distintos tejidos de mamíferos. Este mimetismo podría

generar los auto-anticuerpos que se encuentran en la artritis reumatoide (Baseman y Tully, 1997).

Mycoplasma arthritidis (productor de la artritis en roedores) produce un superantígeno que hiperestimula la producción de anticuerpos y desencadena enfermedad autoinmune y otras enfermedades inflamatorias. También se ha sugerido que puede existir un equivalente a este superantígeno en micoplasmas humanos (Cole y Griffith, 1993).

Otra información que apoya la hipótesis de la posible implicación de micoplasmas en el desencadenamiento de la artritis reumatoide es la utilización con éxito de la minociclina, antibiótico perteneciente al grupo de las tetraciclinas, en el tratamiento de la artritis reumatoide, sabiendo que los micoplasmas son sensibles a las tetraciclinas y que los micoplasmas son la causa más común de artritis en pacientes con inmunodeficiencia primaria (O'Dell y cols., 1997).

Por otra parte, cuando se desarrolló el estudio al que hacemos referencia (Ramírez y cols., 2005), no existía el grado de desarrollo de las técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa que existe en la actualidad, las cuales nos permiten la detección de ADN bacteriano, incluso una vez que el hospedador ha logrado destruir al agente causal de la enfermedad. En este sentido, un estudio relativamente reciente ha logrado detectar la presencia de ADN de *M. pneumoniae* mediante una técnica de PCR anidada aplicada a muestras de líquido sinovial en 19 de 24 pacientes con artritis reumatoide (79%), en 6 de 6 pacientes con artritis no reumatoide (100%) y en 8 de 10 muestras (80%) de pacientes que acudieron a la consulta de reumatología con el fin de que le drenaran una articulación inflamada. Asimismo, se relacionó la presencia de ADN de *M. pneumoniae* con el aumento de la producción de líquido sinovial y con la presencia de artritis recidivante, no habiéndose detectado ADN de este agente causal en las muestras de líquido sinovial de

pacientes con artritis traumática (Johnson y cols., 2007).

A raíz de los resultados de este tipo de estudios (Johnson y cols., 2007), parece cada vez más lógico pensar que agentes causales como *M. pneumoniae* y otras especies de micoplasmas (como *M. fermentans* o *M. salivarium*) pueden actuar como factores determinantes en la artritis reumatoide. Es muy probable que la cronicación de una infección causada por alguna o varias especies de micoplasmas conduzca a la producción de un proceso sistémico en el que las articulaciones puedan convertirse en órganos diana (de ahí la presencia de ADN de estos agentes causales en el líquido sinovial). Asimismo, también cabe la posibilidad de que los micoplasmas causantes de este proceso sistémico y fruto de la convivencia hostil con su hospedador, generen un proceso de tipo autoinmune que incluya la producción de autoanticuerpos por parte del hospedador que generen un proceso de artritis reumatoide (Schäffner y cols., 1998; Cole y Ward, 1979).

Conclusiones

A pesar de las numerosas investigaciones realizadas, todavía se tiene que presentar evidencias convincentes que impliquen a los micoplasmas en la etiología de la artritis reumatoide humana. Las similitudes entre las artritis crónicas animales inducidas por micoplasmas y la artritis reumatoide humana justifican que se continúe con la investigación orientada a la búsqueda de una posible etiología común (Cole y Ward, 1979; Brown y Scammell, 1988; Ramírez y cols., 2005; Johnson y cols., 2007).

La artritis reumatoide es un gran reto para los epidemiólogos y para la medicina comparada en estos tiempos, ya que la profundización en el conocimiento de los factores que influyen en el desarrollo de este tipo de enfermedades será fundamental para diseñar nuevas estrategias de tratamiento y prevención basadas en la

actuación sobre la causa de la enfermedad, a diferencia de las estrategias de tratamiento existentes en la actualidad, que se basan principalmente en paliar los síntomas de esta enfermedad crónica.

La investigación de los procesos artríticos en las especies animales que comparten hábitats con las poblaciones humanas y que no están sujetos a una vida ligada a la producción animal, como puede ser el caso de las poblaciones de perros como animales de compañía, contribuirán a suministrar información de importancia crucial sobre los diferentes factores que influyen en el desarrollo de este tipo de enfermedades, que a su vez, podrá ser de aplicación en el estudio de la artritis reumatoide en las poblaciones humanas. En Canarias, la prevalencia media anual de artritis reumatoide en la población de mayores de 20 años de edad es de 2 enfermos cada 10.000 habitantes (estando situado hasta la fecha el valor de prevalencia anual entre 1 y 4 enfermos cada 10.000 habitantes), según datos de la Asociación Española de Reumatología.

La medicina comparada podría contribuir a mejorar la vida de las personas y animales que han de convivir con el padecimiento de este tipo de enfermedades, pero para ello, será necesaria una mentalidad abierta por parte de los equipos de investigación, pues los agentes causales no entienden de la fronteras del conocimiento humano. En el caso de los agentes biológicos infecciosos, éstos solamente tratan de sobrevivir basándose en una convivencia con el hospedador que, en el caso de los enfermos de artritis reumatoide, es sumamente molesta y dolorosa.

Bibliografía

- 1.- Argyle, D.J. (2005): The benefits of comparative medicine – A hundred years to come to our senses. *Vet. J.* 170: 147-148.
- 2.- Bartholomew, L.E. (1967): Characterization of mycoplasma strains and antibody studies from

- patients with rheumatoid arthritis. Ann. NY Acad. Sci. 143:522-534.
- 3.- Baseman, J.B., Lange, M., Criscimagna, N.L., Giron, J.A., Thomas, C.A. (1995): Interplay between mycoplasmas and host target cells. Microb. Pathog. 19: 105-116.
 - 4.- Baseman, J.B., Tully, J.G. (1997): Mycoplasmas: sophisticated, re-emerging, and burdened by their notoriety. Emerg. Infect. Dis. 3: 21-32.
 - 5.- Brown, T.M., Scammell, H. (1988): The Road Back: Rheumatoid Arthritis, Its Cause and Its Treatment. New York, N.Y.: M. Evans and Company, Inc.
 - 6.- Cardiff, R.D., Ward, J.M., Barthold, S.W. (2008). 'One medicine – one pathology': are veterinary and human pathology prepared? Lab. Invest. 88: 18-26.
 - 7.- Cole, B.C., Griffith, M.M. (1993): Triggering and exacerbation of autoimmune arthritis by the *Mycoplasma arthritidis* superantigen MAM. Arthritis. Rheum 36: 994-1002.
 - 8.- Cole, B.C., Ward, J.R. (1979): Mycoplasmas as Arthritogenic Agents. In: The Mycoplasmas II: Human and Animal mycoplasmas. Tully JG and Whitcomb, (Eds.) New York, Academic Press. pp. 367-398.
 - 9.- Coleman, R.A. (2003): Of mouse and man – what is the value of the mouse in predicting gene expression in humans. Drug Discovery Today. 8: 233-235.
 - 10.- Embree JE, Embil JA. (1980): Mycoplasma in diseases of humans. Can. Med. Assoc. J. 123(2): 105-11.
 - 11.- Galibert, F., Wilton, A.N., Chuat, J., (2001). The canine model in medical genetics. In: The Genetics of the Dog. Ruvinsky, A., Sampson, J. (Eds.). CABI, Wallingford. pp. 503-520.
 - 22.-Hernández, L.A., Urquhart, G.E.D., Dick, W.C. (1977): *Mycoplasma pneumoniae* infection and arthritis in men. Br. Med. 2: 14-16.
 - 13.-Horowitz S, Evinson B, Borer A, Horowitz J. (2000): *Mycoplasma fermentans* in rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. J. Rheumatol. 27: 2747-2753.
 - 14.-Jansson, E., Mäkisara, P., Tuuri, S. (1975): Mycoplasma antibodies in rheumatoid arthritis. Scand. J. Rheumatol. 4: 165-168.
 - 15.-Jansson, E., Wagner, O. (1967): Mycoplasma in collagen diseases and blood dyscrasia. Ann. NY Acad. Sci. 143(1): 535-543.
 - 16.-Johnson, S.M., Bruckner, F., Collins, D. (2007): Distribution of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma salivarium* in the Synovial Fluid of Arthritis Patients. J. Clin. Microbiol. 45(3):953-957.
 - 17.-Mårdh, P.A., Nilsson, F.J., Bjelle, A. (1973): Mycoplasmas and bacteria in synovial fluid from patients with arthritis. Ann. Rheum. Dis. 32(4): 319-325.
 - 18.-Michell, A.R. (1999): Diet and chronic renal failure; is self-sustaining progression in terminal decline? J. Nutr. Med. 9: 63-76.
 - 19.-Michell, A.R. (2000): Only one medicine: the future of comparative medicine and clinical research. Res. Vet. Sci. 69: 101-106.
 - 20.-Michell, A.R. (2005): Comparative clinical science: the medicine of the future. Vet. J. 170: 153-162.
 - 21.-Obeck, D.K., Toft, J.D., Dupuy, H.J. (1976): Severe polyarthritis in a rhesus monkey: suggested mycoplasma aetiology. Lab. Anim. Sci. 26(4): 613-618.
 - 22.-O'Dell, J.R., Haire, C.E., Palmer, W., Drymalski, W., Wees, S., Blakely, K. (1997): Treatment of early rheumatoid arthritis with minocycline or placebo: results of a randomised, double blind placebo-controlled trial. Arthritis Rheum. 40: 842-848.
 - 23.-Rabinowitz, P.M., Odofi, N.L., Dein, F.J. (2008): From "Us vs. Them" to "Shared risk": Can animals help link environmental factors to human health? Ecohealth. 5: 224-229.
 - 24.-Ramírez, A.S., A. Rosas, J.A. Hernández-Beriain, J.C. Orengo, P. Saavedra, C. de la Fe, A. Fernández and J.B. Poveda. (2005): Relationship between rheumatoid arthritis and *Mycoplasma pneumoniae*: a case-control study. Rheumatol. 44: 912-914.
 - 25.-Schäffner, E., Opitz, O., Pietsch, K., Bauer, K., Ehlers, S., Jacobs, E. (1998): Human pathogenic Mycoplasma species induced cytokine gene expression in Epstein-Barr Virus (EBV)-positive lymphoblastoid cell line. Microb. Pathog. 24: 257-262.
 - 26.-Stewart, S.M., Duthie, J.J., Mackay, J.M., Marmion, B.P., Alexander, W.R. (1974): Mycoplasmas and rheumatoid arthritis. Ann. Rheum. Dis. 33: 346-352.
 - 27.-Taylor-Robinson, D. (1981): Mycoplasmal arthritis in man. Isr. J. Med. Sci. 17: 616-621.
 - 28.-Williams, M.H., Bruckner, F.E. (1971): Immunological reactivity to *Mycoplasma fermentans* in patients with rheumatoid arthritis. Preliminary communication. Ann. Rheum. Dis. 30: 271-273.
 - 29.-Zinsstag, J., Schelling, E., Waltner-Toews, D., Tanner, M. (2011): From "one medicine" to "one health" and systemic approaches to health and well-being. Prev. Vet. Med. 101: 148-156.

Fiebre Q

Fleitas, J. L.; Rosales, R. S.; Suárez-Pérez, A.; Poveda, C. G.; Vega-Orellana, O.; Mederos-Iriarte, L. E.; Ramírez, A. S.

Introducción

La fiebre Q es una zoonosis que ha sido diagnosticada por todo el mundo a excepción de Nueva Zelanda (Hilbink y cols., 1993). Y a pesar de ser una enfermedad emergente o re-emergente en muchos países, ha estado muy desatendida. Si bien, habría que matizar que el uso de técnicas de diagnóstico más sensibles y un aumento de su vigilancia puede haber colaborado en considerar la enfermedad como emergente (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005).

El término de fiebre Q proviene del inglés “Q fever o Query fever” y fue propuesto en 1937 por Edward H. K. Derrick para describir una enfermedad febril de causa desconocida que se presentaba en los trabajadores de un matadero de Australia (Derrick, 1937). Intentó sin éxito el aislamiento del agente causal de la enfermedad, realizando inoculaciones en cobayas a partir de muestras obtenidas de pacientes aquejados de la misma. Lo contrario ocurrió con Burnet y su colaborador Freeman que al teñir cortes de bazo de cobayas inoculadas, lograron visualizar numerosas formas bacilares que recordaban a las rickettsias sugiriendo que la enfermedad podría estar ocasionada por microorganismos del género *Rickettsia*, (Burnet y Freeman, 1937). Paralelamente, Davis se encontró con que al alimentar cobayas con garrapatas obtenidas en Nine Mile, Montana, alguno de estos animales experimentaban un cuadro febril (Davis y Cox, 1938). En 1938, Cox logró replicar este agente en huevos embrionados de gallina (Cox y Bell, 1939). Finalmente, se llegó a la conclusión de que el agente productor de la fiebre Q y el agente Nine Mile eran el mismo microorganismo (Cox, 1938; Davis y Cox, 1938; Cox y Bell, 1939).

Este agente etiológico recibió inicialmente el nombre científico de *Rickettsia burnetii*, para posteriormente renombrarse como *Coxiella (C.) burnetii* en honor a los científicos Cox y Burnet por su contribución al conocimiento de la fiebre Q. La cepa Nine Mile es su cepa tipo (Skerman y cols., 1980). En la Tabla 1 se muestra la clasificación taxonómica.

C. burnetii ha sido aislada de multitud de especies animales, humanos, especies domésticas ganaderas como rumiantes, cerdos, caballos, conejos, animales de compañía como perros y gatos, así como de animales silvestres como ungulados, peces, reptiles y anfibios, además de estar presente en garrapatas. Desde el punto de vista de la salud pública hay que resaltar el carácter epidémico de la misma, mientras que en la sanidad animal se trata de un problema patológico en las explotaciones (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005).

Características generales y taxonomía

C. burnetii es una pequeña bacteria, parásito intracelular obligado, no capsulada, inmóvil y muy pleomórfica. Su aspecto varía entre coco y bacilar, y sus dimensiones oscilan entre 0,4 y 1 micra de largo, y 0,2 y 0,4 micras de ancho (Baca y Paretsky, 1983; Weiss y Moulder, 1984). Su replicación se realiza por fisión binaria (Baca y Paretsky, 1983).

Actualmente, se considera que *C. burnetii* es la única especie incluida en el género *Coxiella*. No obstante, Tan y Owens (2000) aislaron, de cangrejos de río que presentaban una alta mortalidad, microorganismos cuyo gen 16S ARNr tiene un 95,6% de similitud con *C. burnetii*. Decidieron nombrarla *C. cheraxi*, aunque esta

nomenclatura tiene que ser todavía validada. De igual forma Woc-Colburn y cols. (2008) detectaron microorganismos del Género *Coxiella* en loros de cabeza azul con signos clínicos y después de analizar los resultados creen que se trata de una nueva especie.

Por otro lado, se ha detectado la presencia de microorganismos simbiotes en garrapatas, cuya secuencia del gen 16S del ARNr está también muy relacionada con la de *C. burnetii*. Más específicamente se trata de endosimbiontes, simbiotes que tienen una asociación con sus hospedadores tan íntima que se considera que es beneficiosa para ambos. Estos microorganismos que se transmiten transovariamente se han encontrado en la mayoría de las garrapatas (Noda y cols., 1997). Noda y cols. (1997) consideraron a estas coxiellas una forma de *C. burnetii* que evolucionó a endosimbionte en garrapatas. Este paso se lleva a cabo, entre otras cosas, mediante la reducción de su genoma (Gil y cols., 2004).

El ciclo de vida de *C. burnetii* no está completamente caracterizado, pero tiene varios participantes distintos que varían tanto morfológicamente como fisiológicamente (Seshadri y Samuel, 2001), similar a lo que ocurre en la Familia *Chlamydiae* (Hackstadt y Williams, 1981). Éstas serían las variantes celulares grandes (LCV) y las pequeñas (SCV), considerándose estas últimas una especie de endospora (Weiss y Moulder, 1984). También se ha descrito una tercera variante conocida como la variante celular pequeña y densa (SDC) (McCaul y cols., 1981). Las mencionadas formas de *C. burnetii* se corresponden a diferentes fases de desarrollo de esta bacteria durante su ciclo intracelular (McCaul y cols., 1991). A las SCVs y

las SDCs se les considera como las formas de resistencia tanto dentro del hospedador como en el medio externo (Amano y Williams, 1984).

Además, *C. burnetii* sufre variación de una fase similar a la variación lisa/rugosa de algunas bacterias Gram negativas (Weiss y Moulder, 1984). En la naturaleza y en los animales de laboratorio, *C. burnetii* existe mayoritariamente con un fenotipo denominado fase I. La fase II es una forma relativamente avirulenta que se puede obtener en pureza tras repetidos pases de los microorganismos por huevos embrionados o cultivo celular. Esta variación está relacionada con cambios en la capa de lipopolisacáridos (LPS) (Woldehiwet, 2004).

C. burnetii ha desarrollado una estrategia única que le permite la multiplicación y supervivencia en los fagolisosomas de las células hospedadoras eucariotas, cuyo medio interno es ácido, con pH entre 4,7 y 5,2 (Seshadri y Samuel, 2001). Normalmente se encuentran en fagocitos, siendo las células hospedadoras más usuales los macrófagos (Tissot-Dupont y Raoult, 2008). Tras su entrada en la célula hospedadora, *C. burnetii* resulta capturada por los fagosomas, los cuales se unen rápidamente a los lisosomas, formando fagolisosomas, que se unen rápidamente entre ellos. Esta fusión progresiva de los fagolisosomas conduce a la formación de una gran y única vacuola en el interior de la célula hospedadora (Hackstadt y Williams, 1981).

Ciclos de la enfermedad

La enfermedad presenta dos ciclos, un ciclo doméstico donde el contagio es de animal a animal y otro ciclo, el salvaje, donde están involucrados hospedadores de la fauna silvestre y la intervención de las garrapatas como vectores es esencial. Aunque ambos ciclos están bien diferenciados, pueden estar interrelacionados. Así, cuando existe un estrecho contacto con animales infectados o en zonas de alta contaminación ambiental se

produce la infección humana (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005).

Vías de infección

La ruta aerógena ha sido descrita tradicionalmente como la vía de transmisión más frecuente en la especie humana. Cuando la infección tiene lugar por esta vía, se supone que las primeras células en ser infectadas durante la fase aguda de la enfermedad son los macrófagos alveolares (Maurin y Raoult, 1999; Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005). Las células hepáticas de Kupffer son también susceptibles de ser parasitadas por vía sanguínea, especulándose que la fuente de infección de estas células podría provenir de la vía digestiva (La Scola y cols., 1997). Sin embargo, se considera que la vía oral en el consumo de leche contaminada o sus derivados no es tan importante (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005).

Fiebre Q humana

La fiebre Q en humanos se describió por primera vez en la década de los 30 del siglo pasado. Se considera fundamentalmente una enfermedad ocupacional, afectando a personas relacionadas con el ganado como ganaderos, veterinarios, trabajadores de mataderos, personal de laboratorio... El periodo de incubación de la fiebre Q aguda varía entre 1 y 3 semanas, dependiendo de la dosis infectante a la que haya estado expuesto el paciente. En la mayoría de los casos (60%), la enfermedad en su fase aguda resulta ser inaparente o bien presenta una sintomatología inespecífica. Esto conduce a que la fiebre Q sea una enfermedad de difícil diagnóstico clínico y que probablemente, estemos ante una enfermedad infra-diagnosticada (Marrie, 1990b).

El 20% de los casos agudos pueden requerir de medicación y/u hospitalización. La mayoría de los pacientes infectados muestran una fase de

bacteriemia que normalmente se hace perceptible en las fases tardías del periodo de incubación. La enfermedad podría producir neumonía o hepatitis. En cualquier caso e independientemente de la ruta de infección, la presencia de *C. burnetii* en la sangre puede involucrar a otros órganos tales como el hígado, el bazo, los pulmones, la médula ósea o el tracto genital femenino. Es más, se pueden presentar determinadas complicaciones que pueden amenazar la vida de los pacientes entre las que se incluyen la meningoencefalitis, la miocarditis o la pericarditis (Stein y Raoult, 1998).

En pacientes con valvulopatía previa (Raoult y cols., 1990), y en menor medida, en mujeres embarazadas (Stein y Raoult, 1998) y en pacientes inmunocomprometidos (Raoult y cols., 1993), la fiebre Q puede cronicarse y convertirse en una enfermedad de curso fatal para el paciente, presentando alrededor de un 15% de mortalidad. De este modo, la fiebre Q crónica se define como aquel proceso provocado por la infección de *C. burnetii* que se extiende en el tiempo más de seis meses y que se caracteriza por la presencia de IgA e IgG contra antígenos de la fase I (Peacock y cols., 1983).

Fiebre Q en rumiantes

Los animales que se infectan de manera natural con *C. burnetii* no suelen experimentar síntomas clínicos relacionados con la enfermedad. En la fase aguda de la infección, la presencia de fiebre Q puede ser demostrada mediante diferentes técnicas diagnósticas a partir de muestras de sangre, pulmón, bazo e hígado. Aún así, la mayoría de los animales suelen mantenerse asintomáticos, sin mostrar siquiera un cuadro febril. A menudo, la infección por *C. burnetii* en estos animales se cronifica y se caracteriza por una excreción continua de la bacteria en heces y orina, con lo que estos animales se convierten en portadores excretores del agente causal que, además, se caracterizan por

ser portadores inaparentes. El útero y las glándulas mamarias son los principales órganos diana en la infección crónica por *C. burnetii* en estos animales, siendo esta cualidad de la infección en los animales favorecedora de la dispersión de *C. burnetii* en el medioambiente durante y tras las épocas de parto. Las secreciones de parto y postparto y las placentas presentan una alta contaminación por parte de esta bacteria.

Sin duda, entre las lesiones causadas por la fiebre Q entre los rumiantes, las de más impacto en la sanidad de las explotaciones, y por tanto, las que provocan las mayores pérdidas económicas, son las relacionadas con el aparato reproductor. En rumiantes domésticos se ha descrito metritis, que se traduce en disminuciones de los índices de fertilidad, abortos, nacimientos prematuros acompañados de aumentos en la mortalidad neonatal y perinatal (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005).

El comportamiento de la enfermedad es distinto según las especies, en el ganado vacuno produce principalmente infertilidad mientras que en el ovino y caprino es el aborto. Los abortos son más frecuentes en el ganado ovino que en el caprino, presentando los fetos una apariencia normal, mientras que las placentas de animales con un grado de infección considerable muestran un engrosamiento de las áreas intercotiledonarias acompañado de exudados copiosos, de aspecto cremoso, de color amarillento o marrón decolorado (Masala y cols., 2007).

En el caso concreto del ganado caprino, se ha observado que la infección por *C. burnetii* produce cuadros de aborto en el último tercio de la gestación. Pero a diferencia con la oveja, especie en la que el aborto es la principal manifestación clínica de la infección, en la cabra cobra más importancia relativa el nacimiento prematuro y el nacimiento a término de crías débiles, lo que se traduce en un aumento de la mortalidad neonatal y perinatal (Berri y cols., 2007).

Diagnóstico clínico

Existen estudios que relacionan a la fiebre Q con la producción de fiebre, debilidad, anorexia, rinitis, conjuntivitis, bronconeumonía, pérdida de peso, artritis y mamitis, además de haberse observado el nacimiento de animales débiles que sobreviven al parto, con anemia, ataxia, emaciación y parálisis. En el caso concreto del ganado ovino, en hembras preñadas infectadas en el segundo y tercer tercio de gestación, los primeros signos clínicos se detectan entre los 5 y 12 días tras la infección, apareciendo en primer lugar un proceso febril bifásico (Barlow y cols., 2007). A una perra parturienta, fuente de infección en un brote de neumonía por fiebre Q en varios miembros de una familia que estaban presentes en el parto del animal, se observó que una parte de los cachorros murieron poco después de nacer, muriendo el resto de cachorros antes de las 24 horas postparto (Buhariwalla y cols., 1996). Sin duda, los signos clínicos observados en los rumiantes domésticos, al margen de la consabida importancia de esta enfermedad en los índices reproductivos de estos animales, deben tener repercusiones considerables en la productividad de los animales afectados, no cuantificadas aún. Estos síntomas, además, son asociables en diferentes tipos de cuadros cuya repercusión en la sanidad y producción animal han sido ampliamente estudiados, como es el caso de las neumonías, las mamitis subclínicas y las artritis (Buxadé y cols., 1996).

Diagnóstico anatomopatológico

C. burnetii cuenta con una serie de órganos diana. La detección de dicho agente causal a partir de muestras de tejidos de dichos órganos es posible gracias a técnicas inmunológicas. Las técnicas existentes serían la inmunoperoxidasa (Brouqui y cols., 1994), el sistema de captura de antígeno mediante ELISA/ELIFA (Thiele y cols., 1992) y la inmunofluorescencia

a partir de anticuerpos monoclonales o policlonales, siendo aplicable esta última técnica únicamente en las muestras tratadas con parafina (McCaul y Williams, 1990; Thiele y cols., 1992; Muhlemann y cols., 1995). Estas técnicas son utilizadas rutinariamente en medicina humana con el fin de analizar los tejidos de las válvulas cardiacas en los pacientes de fiebre Q crónica, una vez estas han sido extraídas del paciente (Maurin y Raoult, 1999).

En medicina veterinaria, la principal aplicación de estas técnicas en animales vivos ha sido el análisis de placentas y, en menor medida, el de órganos diana en los fetos tras los abortos, ya que la *Coxiella* suele afectar de manera más importante a la placenta que al feto (Masala y cols., 2007; Sánchez y cols., 2007).

Diagnóstico mediante cultivo de *Coxiella burnetii*

Esta técnica diagnóstica se utiliza más como una herramienta para poder replicar a esta bacteria para posteriores pruebas laboratoriales o ensayos experimentales que como técnica rutinaria de diagnóstico. Además, dado el fuerte riesgo de contagio para el hombre, el cultivo de *C. burnetii* precisa de ser llevado a cabo en instalaciones que cumplan las exigencias contempladas para el Grupo de Contención 3 (Manual de la OIE sobre animales terrestres, 2008). Cuando en el examen microscópico de las muestras se detecta un bajo nivel de contaminación por otras bacterias y un número importante de células de *C. burnetii*, es posible el aislamiento directo por inoculación de huevos de gallina embrionados o de cultivos celulares. El proceso dura entre 10 y 15 días y pueden ser necesarios varios pases para llegar a obtener un cultivo puro de *C. burnetii* (Ho y cols., 1995).

En el caso de muestras muy contaminadas con otras bacterias (placentas, descargas vaginales, heces, leche, etc.) puede ser necesario recurrir previamente al cultivo celular, a la inoculación en animales de experimentación.

En este sentido, los animales más apropiados son los ratones y, preferiblemente debido a la facilidad con la que detectan los síntomas tras la inoculación, las cobayas (Scott y cols., 1987).

Diagnóstico serológico

En medicina humana, las técnicas serológicas en conjunción con los hallazgos clínicos, han sido ampliamente utilizadas para confirmar el diagnóstico rutinario de la fiebre Q. A ello ha contribuido su sencillez, así como su sensibilidad y especificidad. Por otra parte, estas técnicas permiten diferenciar la enfermedad aguda de la crónica. Eso sí, es necesario esperar un mínimo de dos o tres semanas después de la infección para poder detectar la fase aguda de la enfermedad, produciéndose el pico máximo de producción de anticuerpos contra *C. burnetii* en torno al mes y medio tras la infección (Maurin y Raoult, 1999).

Aunque en medicina veterinaria, la serología también ha sido ampliamente utilizada en estudios sobre diferentes poblaciones animales con el fin de establecer las tasas de seroprevalencia de las mismas, su aplicación rutinaria orientada al diagnóstico individual de la enfermedad puede resultar compleja. La ausencia de signos clínicos en muchas ocasiones unido a que los animales infectados pueden permanecer seropositivos durante varios años tras la infección aguda, o pueden eliminar la bacteria al medio antes de desarrollar anticuerpos, o también pueden ser infectados sin expresar seroconversión, contribuye a la citada complejidad del diagnóstico serológico individual en los animales. Para interpretar los resultados en las poblaciones se precisan al menos de 10 animales (abortados o no), precisándose para establecer la presencia de infección, tanto la respuesta serológica cómo la evidencia de la existencia de *C. burnetii* mediante cultivo o técnicas como la PCR (Arricau-Bouvery y cols., 2001; Berri y cols., 2001).

Las técnicas más utilizadas hoy en día son: la fijación del complemento (FC) (Guigno y cols., 1992), la inmunofluorescencia indirecta (IFI) (Tissot-Dupont y cols., 1994), y el método del enzoinmunoensayo (ELISA) (Waag y cols., 1995).

Otras técnicas serológicas propuestas para el diagnóstico de la fiebre Q incluyen el “dot immunoblotting” (Cowley y cols., 1992), el “Western blotting” (Blondeau y cols., 1990), el test de la hemólisis indirecta (Tokarevich y cols., 1990) y el radioinmunoensayo (Doller y Gerth, 1984).

Diagnóstico mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El diagnóstico de la fiebre Q mediante PCR ha sido utilizado con éxito tanto en la medicina humana como en la veterinaria para la detección de *C. burnetii* en cultivos y en muestras procedentes de tejidos diana, leche, secreciones vaginales, semen, orina y heces (Maurin y Raoult, 1999; Rodolakis y cols., 2007; Vaidya y cols., 2008). Este método ha sido probado directamente sobre muestras de sangre humana, pero los resultados no han sido satisfactorios para las PCR convencionales, siendo frecuentes los falsos positivos (Maurin y Raoult, 1999). Las técnicas nuevas de PCR a tiempo real parecen haber solucionado este problema, convirtiendo a este tipo de técnicas en un medio de detección precoz, siendo muy eficaz antes de los 17 días tras la infección. Es capaz de detectar la enfermedad en el periodo de tiempo en el que no se puede detectar una respuesta inmune por medio de técnicas serológicas. Por otra parte, la PCR detecta *C. burnetii* en cultivos en viales de bioseguridad de muestras de sangre de pacientes de fiebre Q aguda y crónica que ya habían iniciado su tratamiento antibiótico, mientras que el cultivo de *C. burnetii* por sí solo, no permite la detección de la bacteria en este tipo de pacientes que ya han iniciado su medicación (Musso y Raoult, 1995).

Se han desarrollado cebadores específicos a partir de la secuencia de diversos genes como el gen de la superóxido dismutasa (conocido también como *sodB*), el gen *com1* que codifica una proteína de 27 kDa de la membrana, el operón que codifica dos proteínas de choque térmico (*htpA* y *htpB*), el gen que codifica la isocitrato deshidrogenasa (*icd*) y el gen IS1111, el cual codifica para una transposasa, siendo éste último el más usado para la detección de *C. burnetii* mediante PCR (Spyridaki y cols., 2002; Vaidya y cols., 2008). También se han desarrollado PCRs basadas en la amplificación de regiones de genes presentes en otras bacterias para la detección de *C. burnetii*. Un ejemplo de este tipo de genes es el 16s ARNr (Spyridaki y cols., 2002).

De las PCR convencionales destinadas al diagnóstico de la fiebre Q, la de mayor éxito ha sido la Trans-PCR, basada en la amplificación de regiones específicas del gen *IS1111*. Este transposón se encuentra en un número variable de copias (entre 7 y 110) según el análisis de este gen en diferentes aislamientos de *C. burnetii* realizados en distintas regiones del mundo (Klee y cols., 2006). La presencia de copias múltiples del gen en el genoma de *C. burnetii* logra que la amplificación de sus regiones específicas en una sola etapa sea mayor que la lograda para otras PCRs basadas en la amplificación de regiones específicas de un único gen, con lo que la sensibilidad de la prueba se ve considerablemente aumentada.

Vacunas

En materia de Medicina Preventiva, existen publicaciones sobre el diseño y prueba de diferentes tipos de vacunas de aplicación en animales desde finales de la década de los 80, diseñándose también con posterioridad vacunas de aplicación en medicina humana (Williams y cols., 1993). Las pérdidas económicas provocadas por la fiebre Q entre profesionales de riesgo (ganaderos y trabajadores de matadero)

Tabla 1. Clasificación taxonómica actual de *C. burnetii*.

CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA de <i>Coxiella burnetii</i>	
Dominio:	Bacteria
Filo:	Proteobacteria
Clase:	Gamma Proteobacteria
Orden:	Legionellales
Familia:	Coxiellaceae
Género:	<i>Coxiella</i>
Especie:	<i>C. burnetii</i>

han sido evaluadas en Australia, llevando a las autoridades sanitarias de este país a la puesta en marcha de un plan de prevención basado en la vacunación contra la enfermedad en estos colectivos de riesgo desde el año 2002, con resultados positivos espectaculares (Gidding y cols., 2009). Otro ejemplo de resultados satisfactorios tras la instauración, esta vez, de un plan de control integral de la fiebre Q, con medidas de prevención aplicadas al campo de la Sanidad Animal, lo tenemos en el plan de control de la fiebre Q llevado a cabo en Eslovaquia (Serbezov y cols., 1999).

España y fiebre Q

En España, la primera evidencia que se tuvo de la existencia de la fiebre Q fue el aislamiento de *C. burnetii* a partir de tres especies diferentes de garrapatas (*Hyalomma marginatum*, *Rhipicephalus bursa* y *Rhipicephalus sanguineus*) recogidas de animales de Sevilla y Madrid en el año 1949 (Pérez Gallardo y cols., 1949), siendo diagnosticada por primera vez en la especie humana en el año 1950 en Salamanca (Prada y cols., 1950). Desde entonces, ha sido detectada en múltiples regiones de nuestro país, si bien, quizás donde ha habido una mayor continuidad en la labor investigadora sobre esta enfermedad ha sido en el País Vasco, donde la fiebre Q es endémica y cuya presentación clínica aguda más frecuente en humana es la neumónica (Téllez y cols., 1988; Sanzo y cols., 1993).

En Canarias, se tenía conocimiento de la presencia de fiebre Q desde

los años 70, tras el estudio de una serie de casos de fiebre Q de ciudadanos finlandeses que habían contraído la enfermedad durante su estancia en el Archipiélago Canario y en otros lugares donde la enfermedad era endémica (Palosuo y cols., 1974). El primer estudio seroepidemiológico sobre fiebre Q humana en Canarias se realizó en Lanzarote en el año 1986 utilizando la fijación del complemento (FC) (Pascual, 1994), siendo el primero de una serie de tres estudios realizados en esta isla entre 1986 y 1991. En el último estudio de esta serie se detectó una seroprevalencia en la especie humana del 10,9% mediante FC y del 18,7% mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI). Además, verificó en una muestra representativa de la ganadería de caprino de la isla (principal producción de rumiantes de la región), que el 32,7% de las ganaderías analizadas fueron positivas por IFI (Pascual, 1994).

Trece años después, se publicó el primer estudio epidemiológico de fiebre Q humana en la totalidad del Archipiélago Canario, también realizado mediante IFI y arrojó una seroprevalencia de entre el 21,5% al 35,8% (Bolaños y cols., 2004). En este año, otro estudio serológico basado en la aplicación del ELISA en el que se estudiaba una muestra representativa de los ganados caprino, ovino y bovino de la isla de Gran Canaria, arrojó unos valores de seroprevalencia de 60,4%, 31,7% y 12,2% respectivamente para las mencionadas especies (Rodríguez y cols., 2010). Asimismo, en Canarias se han publicado varias revisiones de casos de fiebre Q clínica en la especie humana, de entre las cuales, destaca la que se realizó sobre la población del sureste de Gran Canaria (Bolaños y cols., 2003).

Bibliografía

1.- Amano, K., Williams J.C. (1984): Sensitivity of *Coxiella burnetii* peptidoglycan to lysozyme

hydrolysis and correlation of sacculus rigidity with peptidoglycan-associated proteins, J. Bacteriol. 160: 989-993.

- 2.- Arricau-Bouvery, N., Rodolakis, A. (2005): Is Q Fever an emerging or re-emerging zoonosis? Vet. Res. 36: 327-349.
- 3.- Arricau-Bouvery, N., Souriau, A., Moutoussamy, A., Ladenise, K., Rodolakis, A. (2001): Étude de l'excrétion de *Coxiella burnetii* dans un modèle expérimental caprin et décontamination des lisiers par la cyanamide calcique. Renc. Rech. Ruminants. 8:153-156.
- 4.- Baca, O.G., Paretzky, D. (1983): Q fever and *Coxiella burnetii*: a model for host-parasite interactions. Microbiol. Rev. 47: 127-149.
- 5.- Barlow, J., Rauch, B., Welcome, F., Kim, S.G., Dubovi, E., Schukken, Y. (2007): Association between *Coxiella burnetii* shedding in milk and subclinical mastitis in dairy cattle. Vet. Res. 39: 23-32.
- 6.- Berri M., Souriau A., Lechopier P., Rodolakis, A. (2001): Relationships between the shedding of *Coxiella burnetii*, clinical signs and serological responses of 34 sheep. Vet. Rec. 148: 502-505.
- 7.- Berri, M., Rousset, E., Champion, J.L., Russo, P., Rodolakis, A. (2007): Goats may experience reproductive failures and shed *Coxiella burnetii* at two successive parturitions after a Q fever infection. Res. Vet. Sci. 83: 47-52.
- 8.- Blondeau, J.M., Williams, J.C., Manie, T.J. (1990): The immune response to phase I and II *Coxiella burnetii* antigens as measured by western immunoblotting. Ann. BY. Acad. Sci. 590: 187-202.
- 9.- Bolaños, M., Santana, O.E., Pérez-Arellano, J.L., Moreno, A., Moreno, G., Burgazzoli, J.L., Martín-Sánchez, A.M. (2003):

- Fiebre Q en Gran Canaria. Aportación de 40 nuevos casos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 21: 20-23.
- 10.-Bolaños M., Santana, O.E., Angel-Moreno, A., Pérez-Arellano, J.L., Limiñana, J.M., Serra-Majem, L., Martín-Sánchez, A.M. (2004): Seroprevalence of infection by *Coxiella burnetii* in Canary Islands (Spain). *Europ. J. Epidemiol.* 18(3): 259-262.
- 11.-Brouqui, P., Dumler, J.S., Raoult, D. (1994): Immunohistologic demonstration of *Coxiella burnetii* in the valves of patients with Q fever endocarditis. *Am. J. Med.* 97: 451-458.
- 12.-Buhariwalla, F., Cann, B., Marrie, T.J. (1996): A dog-related outbreak of Q fever. *Clin. Infect. Dis.* 23(4): 753-755.
- 13.-Burnet, F.M., Freeman, M. (1937): Experimental studies on the virus of Q fever. *Med. J. Aust.* 2: 299-302.
- 14.-Buxadé, C. y cols. (Coord.). (1996): Zoo-tecnia. Bases de Producción Ani-mal. Tomo IX.: Producción Ca-prina. Madrid. Ed. Mundiprensa.
- 15.-Cox, H.R. (1938): A filter-passing infectious agent isolated from ticks. III. Description of organism and cultivation experiments. *Public. Health. Rep.* 53: 2270-2276.
- 16.-Cox, H.R., Bell, E.J. (1939): The cultivation of *Rickettsia diaporica* in tissue culture and in the tissues of developing chicken embryos. *Public. Health. Rep.* 54: 2171-2175.
- 17.-Cowley, R., Fernandez, F., Freemantle, W., Rutter, D. (1992): Enzymeimmunoassay for Q fever: comparison with complement fixation and immunofluorescence tests and dot immunoblotting. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2451-2455.
- 18.-Davis, G.E., Cox, H.R. (1938): A filter-passing infectious agent isolated from ticks. I. Isolation from *Dermacentor andersoni*, reactions in animals and filtration experiments. *Public Health Rep.* 53: 2259-2261.
- 19.-Derrick, E.H. (1937): "Q" fever, new fever entity: clinical features, diagnosis and laboratory investigation. *Med. J. Aust.* 2: 281-299.
- 20.-Doller, G., Gerth, H.J. (1984): Early diagnosis of Q fever: detection of immunoglobulin M by radioimmunoassay and enzyme immunoassay. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 3: 550-553.
- 21.-Gidding, H.F., Wallace, C., Lawrence, G.L., McIntyre, P.B. (2009): Australia's national Q fever vaccination program. *Vaccine.* 27: 2037-2041.
- 22.-Gil, R., Latorre, A., Moya, A. (2004): Bacterial endosymbionts of insects: insights from comparative genomics. *Environ. Microbiol.* 6: 1109-1122.
- 23.-Guigno, D., Coupland, B., Spith, E.G., Farrell, I.D., Desselberger, U., Caul, E.O. (1992): Primary humoral antibody response to *Coxiella burnetii*, the causative agent of Q fever. *J. Clin. Microbiol.* 30: 1958-1967.
- 24.-Hackstadt, T., Williams, J.C. (1981): Biochemical stratagem for obligate parasitism of eukaryotic cells by *Coxiella burnetii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 3240-3244.
- 25.-Hilbink, F., Penrose, M. y Kováková, E. Kazar, J. (1993): Q fever is absent from New Zeland. *Int. J. Epidemiol.* 22: 945-949.
- 26.-Ho, T., Htwe, K.K., Yamasaki, N., Zhang G.Q., Ogawa, M., Yamagushi, T., Fukushi, H., Hirai, K. (1995): Isolation of *Coxiella burnetii* from dairy cattle and ticks, and some characteristics of the isolates in Japan. *Microbiol. Immunol.* 39: 663-671.
- 27.-Klee, S., Tyczka, J., Ellerbrok, H., Franz, T., Linke, S., Baljer, G., Apple, B. (2006): Highly sensitive Real Time-PCR for specific detection and quantification of *C. burnetii*. *BMC Microbiol.* 6: 2-9.
- 28.-La Scola, B., Lepidi, H., Raoult, D. (1997): Pathologic changes during acute Q fever: influence of the route of infection and inoculum size in infected guinea pigs. *Infect. Immun.* 65: 2443-2447.
- 29.-Manual de la OIE sobre animales terrestres. (2008): Fiebre Q. http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.01.12.%20Fiebre%20Q.pdf
- 30.-Marrie, T.J. (1990a): *Coxiella burnetii* (Q fever). In G. L. Mandell and J. E. Bennett (ed.), Principles and practice of infectious diseases, 3rd ed. Churchill Livingstone, Inc., New York, N.Y. pp.1727-1734.
- 31.-Marrie, T.J. (1990b): Acute Q fever, In T. J. Marrie (ed.), Q fever, vol. 1. The disease. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. pp.125-160.
- 32.-Masala, G., Porcu, R., Daga, C., Denti, S., Canu, J., Patta, C., Tola, S. (2007): Detection of pathogens in ovine and caprine abortion samples from Sardinia, Italy, by PCR. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19: 96-98.
- 33.-Maurin, M., Raoult, D. (1999): Q fever. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 518-553.
- 34.-McCaul, T.F., Williams, J.C. (1990): Localization of DNA in *Coxiella burnetii* by post-embedding immunoelectron microscopy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 590: 136-147.
- 35.-McCaul, T.F., Hackstadt, T., Williams, J.C. (1981): Ultrastructural and biological aspects of *Coxiella burnetii* under physical disruptions, p. 267-280. In W. Burgdorfer and R. L. Anacker (ed.), *Rickettsiae and rickettsial diseases*. Academic Press, Inc., New York, N.Y.
- 36.-McCaul, T.F., Banerjee-Bhatnagar, N., Williams, J.C. (1991): Antigenic differences between *Coxiella burnetii* cells revealed by postembedding immunoelectron microscopy and immunoblotting. *Infect. Immun.* 59: 3243-3253.
- 37.-Muhlemann, K., Matter, L.,

- Meyer, B., Schoper, K. (1995): Isolation of *Coxiella burnetii* from heart valves of patients treated for Q fever endocarditis. *J. Clin. Microbiol.* 33: 428–431.
- 38.-Musso, D., Raoult, D. (1995): *Coxiella burnetii* blood cultures from acute and chronic Q fever patients. *J. Clin. Microbiol.* 33: 3129–3132.
- 39.-Noda, H., Munderloh, U.G., Kurtti, T.J. (1997): Endosymbionts of ticks and their relationship to *Wolbachia* spp. and tick-borne pathogens of humans and animals. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3926–3932.
- 40.-Palosuo, T., Leinikki, P., Petterson T., Saikku, P., Jääntti, V. (1974): Hazards of expanding tourism: report of six cases of Q fever in Finland. *Scand. J. Infect. Dis.* 6: 173–176.
- 41.-Pascual, F. (1994): Estudio epidemiológico de la fiebre Q en la isla de Lanzarote (Islas Canarias). Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de G.C.
- 42.-Peacock, M.G., Philip, R.N., Williams, J.C., Faulkner, R.S. (1983): Serological evaluation of Q fever in humans: enhanced phase I titers of immunoglobulins G and A are diagnostic for Q fever endocarditis. *Infect. Immun.* 41: 1089–1098.
- 43.-Pérez Gallardo, F., Clavero, G., Hernández, S. (1949): Hallazgo en España de la *Rickettsia burnetii*, agente etiológico de la fiebre Q. *Rev. San. Hig. Pub.* 23: 489–496.
- 44.-Prada, J., Gay, B., Llorente, A. (1950): Primer caso de fiebre Q humana en España. *Gac. Med. Esp.* 24: 332–333.
- 45.-Raoult, D., Raza, A., Marrie, T.J. (1990): Q fever endocarditis and other forms of chronic Q fever, p. 179–199. In T. J. Marrie (ed.), *Q fever*, vol. 1. The disease. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- 46.-Raoult, D., Levy, P.Y., Tissot Dupont, H., Chicheportiche, C., Tamalet, C., Gastaut, J.A., Salducci, J. (1993): Q fever and HIV infection. *AIDS.* 7: 81–86.
- 47.-Rodolakis, A., Berri, M., Héchar, C., Caudron, C., Souriau, A., Bodler, C.C., Blanchard, B., Camuset, P., Devillechalse, P., Naport, J.C., Vadet, J.P., Arricau-Bouvery, N. (2007): Comparison of *Coxiella burnetii* shedding in milk of dairy bovine, caprine and ovine herds. *J. Dairy Sci.* 90: 5352–5360.
- 48.-Rodríguez, N.F., Carranza, C., Bolaños, M., Pérez-Arellano, J.L., Gutierrez, C. (2010): Seroprevalence of *Coxiella burnetii* in domestic ruminants in Gran Canaria island, Spain. *Transbound Emerg. Dis.* 57: 66–67.
- 49.-Sánchez, J., Souriau, A., Buendía, A.J., Arricau-Bouvery, N., Martínez, C.M., Salinas, J., Rodolakis, A., Navarro, J.A. (2007): Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: a histopathological and immunohistochemical study. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 50: 396–400.
- 50.-Sanzo, J. M., Garcia-Calabuig, M.A., Audicana, A., Dehesa, V. (1993): Q fever: prevalence of antibodies to *Coxiella burnetii* in the Basque Country. *Int. J. Epidemiol.* 22: 1183–1187.
- 51.-Scott, G.H., Williams, J.C., Stephenson, E.H. (1987): Animal models in Q fever: pathological response of inbred mice to phase I *Coxiella burnetii*. *J. Gen. Microbiol.* 133: 691–700.
- 52.-Serbezov, V.S., Kazar, J., Novkirishki, V., Gatcheva, N., Kovacova, E., Voynova V. (1999): Q fever in Bulgaria and Slovakia. *Emerg. Dis.* 5: 388–394.
- 53.-Seshadri, R., Samuel, J.E. (2001): Characterization of a Stress-Induced Alternate Sigma Factor, RpoS, of *Coxiella burnetii* and Its Expression during the Development Cycle. *Infect. Immun.* 69: 4874–4883.
- 54.-Skerman, V.B.D., McGowan, V., Sneath, P.H.A. (1980): Approved lists of bacterial names. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30: 225–420.
- 55.-Spyridaki, I., Psaroulaki, A., Loukaides, F., Antoniou, M., Hadjichristodoulou, C., Tselentis, Y. (2002): Isolation of *Coxiella* by a centrifugation shell-vial assay from ticks collected in Cyprus: detection by nested polymerase chain reaction (PCR) and by PCR-restriction fragment length polymorphism analyses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66: 86–90.
- 56.-Stein, A., Raoult, D. (1998): Q fever during pregnancy: a public health problem in Southern France. *Clin. Infect. Dis.* 27: 592–596.
- 57.-Tan, C.K., Owens, L. (2000): Infectivity, transmission and 16S rRNA sequencing of a rickettsia, *Coxiella cheraxi* sp. nov., from the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Dis. Aquat. Organ.* 41: 115–122.
- 58.-Télez, A., Sainz, C., Echevarria, C., De Carlos, S., Fernandez, M.V., Leon, P., Brezina, R. (1988): Q fever in Spain: acute and chronic cases 1981–1985. *Rev. Infect. Dis.* 10: 198–202.
- 59.-Thiele, D., Karo, M., Krauss, H. (1992): Monoclonal antibody based capture ELISA/ELIFA for detection of *Coxiella burnetii* in clinical specimens. *Eur. J. Epidemiol.* 8: 568–574.
- 60.-Tissot-Dupont, H., Raoult, D. (2008): Q fever. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 22: 505–514.
- 61.-Tissot-Dupont H., Thirion, X., Raoult, D. (1994): Q fever serology: cutoff determination for microimmunofluorescence. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 1: 189–196.
- 62.-Tokarevich, N.K., Schramek, S., Daiter, A.B. (1990): Indirect haemolysis test in Q fever. *Acta Virol.* 34: 358–360.
- 63.-Vaidya, V.M., Malik, S.V.S., Kaur, S., Kumar, S., Barbudhe, S.B. (2008): Comparison of PCR, Immunofluorescence Assay, and Pathogen Isolation for Diagnosis of Q Fever in Humans

- with Spontaneous Abortions. J. Clin. Microbiol. 46: 2038–2044.
- 64.- Waag, D., Chulay, J., Marrie, T., England, M., Williams, J.C. (1995): Validation of an enzyme immunoassay for serodiagnosis of acute Q fever. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 14: 421–427.
- 65.- Weiss, E., Moulder, J.W. (1984): Genus III. *Coxiella*, In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md. p. 701–704.
- 66.- Williams, J.C., Peacock, M.G., Waag, D.M., Kent, G., England, M.J., Nelson, G., Stephenson, E.H. (1993): Vaccines against coxiellosis and Q fever. Development of a chloroform-methanol residue subunit of phase I *Coxiella burnetii* for the immunization of animals. Ann. N.Y. Acad. Sci. 653: 88–111.
- 67.- Woc-Colburn, A.M., Garner, M.M., Bradway, D., West, G., D'agostino, J., Trupkiewicz, J., Barr, B., Anderson, S.E., Rurangirwa, F.R., Nordhausen, R.W. (2008): Fatal Coxiellosis in Swainson's Blue Mountain Rainbow Lorikeets (*Trichoglossus haematodus moluccanus*). Vet. Pathol. 45: 247–254.
- 68.- Woldehiwet, Z. (2004): Q fever (coxiellosis): epidemiology and pathogenesis. Res. Vet. Sci. 77: 93–100.

Pioderma Canina

Ortega, D. (1); Acosta, B.(2); Ferrer, O.(2)

(1) Doctorado en Clínica e Investigación Terapéutica de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

(2) Dpto. Patología Animal. Facultad de Veterinaria de las Palmas de Gran Canaria

La pioderma es una de las enfermedades más comunes de la piel en perros (WAEEL, M.K et al., 2011). La pioderma literalmente significa presencia de pus en la piel y puede ser causado por procesos infecciosos, inflamatorios y/o causas neoplásicas; incluso algunos acúmulos de exudado neutrofilico pueden llamarse piodermas. Sin embargo, la pioderma debida a infección bacteriana de la pieles la más común. Las piodermas son comunes en perros y menos en gatos (LEIB y MONROE, 1997; FRANK et al., 2003; LOEFFLER, 2005; MORRIS, 2010).

Las piodermas se clasifican según la profundidad de la infección en (IHRKE, 1996;LEIB y MONROE, 1997):

1. Piodermas de superficie: piodermas que se restringen a la superficie de la piel, y no se extiende más profundo del estrato córneo o dentro del folículo del pelo.
2. Pioderma superficial: infecciones que incluyen el folículo del pelo pero no se extienden dentro de la dermis.
3. Piodermas profundas: son infecciones que se extienden dentro de la dermis.

Las pseudopiodermas no son realmente piodermas, ya que la infección solo juega un papel secundario, es decir, que estamos ante un proceso inflamatorio de la epidermis en los que solo existe un crecimiento de gérmenes sobre ésta, pero sin infección y por tanto, la terapia antiinfecciosa no es efectiva (BENSIGNOR, 2009).

Una pioderma resistente es aquella que no responde a un determinado número de tratamientos habituales, particularmente antibióticos y, en consecuencia, necesita un tratamiento agresivo que incluye antibióticos

específicos (FOGEL y MANZUC, 2009).

Se debe sospechar de pioderma si el paciente tiene una historia de prurito, especialmente si el prurito tiene respuesta previa a la terapia antimicrobiana. La presencia de pápulas, pústulas y collaretes epidérmicos debe crear un alto indicio de sospecha de pioderma (CARLOTTI, 1996; LEIB y MONROE, 1997; SCOTT et al., 2001). Obviamente, hay que llevar a cabo un apropiado diagnóstico diferencial teniendo en cuenta que otras enfermedades de la piel pueden manifestarse con la presentación de pústulas aunque no tengan un origen bacteriano (ej., dermatofitosis, pénfigo foliáceo, dermatitis pustular eosinofílica). Además hay que considerar que muchas enfermedades de la piel cursan con infecciones secundarias, lo que nos obliga a realizar un diagnóstico exacto (FOGEL y MANZUC, 2009).

Causas bacterianas de la pioderma canina

La superficie de la piel en animales y humanos está colonizada por bacterias que están bien adaptadas al microentorno del estrato superficial córneo y folículos pilosos (LLOYD, 1992). De esta manera, la flora normal contribuye a la inmunidad de la piel.

Las bacterias del género estafilococos viven como miembros de la flora normal de la piel y las mucosas de humanos y animales (SCOTT, et al., 2001; LEE et al., 2003).

Sin embargo, muchas especies son también patógenos oportunistas que pueden causar serias enfermedades de la piel y en otros tejidos del cuerpo y cavidades (KLOOS, 1975; SCOTT et al., 2001).

Aunque, en la actualidad a los estafilococos coagulasas negativos se les

esté prestando una mayor atención a su importancia médica, (KLOOS, 1994), son las especies coagulasas positivas las que desde siempre se les ha dado una consideración importante como patógenos en medicina veterinaria. Durante muchos años, cuatro especies coagulasas positivas han sido reconocidas y documentadas como patógenas: *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus* y *S. schleiferi* (WERCKENTHIN et al., 2001; FRANK et al., 2003). Considerando que *S. aureus* es el patógeno predominante de humanos, mientras que *S. intermedius* y *S. schleiferi* son patógenos predominantes del perro (KLUYTMANS et al., 1998; HERNÁNDEZ et al., 2001; FRANK et al., 2003; MAYER et al., 2005).

Staphylococcus intermedius, es una bacteria gram positiva coagulasa positiva reconocida como una especie diferente de *Staphylococcus aureus* desde los años ochenta. Está considerada el agente infeccioso más común en las piodermas caninas. Sin embargo, la nomenclatura ha ido cambiando debido a recientes avances en la caracterización molecular. El grupo de los *Staphylococcus intermedius* incluyen 3 especies generalmente diferentes: *Staphylococcus intermedius* aislado de palomas, *Staphylococcus pseudointermedius* que es el verdadero patógeno canino, y *Staphylococcus delphini* originalmente aislado del delfín (DEVRIESE et al., 2005).

Los *Staphylococcus intermedius* se adhieren a las células epidérmicas de perros sanos, pero muestra una mayor capacidad de adhesión a las células epidérmicas de los perros atópicos (McEWAN, 2000; SIMOU et al., 2005; McEWAN et al., 2006). Esto se produce porque cambia la disponibilidad de la fijación de los receptores

cutáneos para los estafilococos facilita la adhesión de la bacteria (WAEEL y HUSEIN, 2011).

Actualmente, se siguen considerando como patógenos aislados de las lesiones de piodermas caninas: *Staphylococcus aureus*, *S. schleiferi* (subsp. *Schleiferi*, coagulasa negativo y subsp. *Coagulans*, coagulasa positivo) y *S. hyicus* (SAIJONMAA-KOULUMIES, 1996).

Entre las bacterias que residen de forma normal en la piel del perro también se encuentran los estafilococos coagulasa negativos, *Streptococcus*, *Micrococcus spp.*, y *Acinebacter spp.*

Las bacterias transitorias de la piel canina incluyen: *Bacillus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Escherichia Coli*, *Proteus mirabilis* y *Pseudomona aeruginosa* (PATEL, 2006).

Pseudomona aeruginosa es un patógeno frecuente en perros con otitis crónica externa y otitis media (HARRIS, 1978; GOODWIN *et al.*, 1978; COLE *et al.*, 1998), pero es infrecuente aislarlo de infecciones de piel. (KRISTENSEN *et al.*, 1978; KROGH *et al.*, 1981; SCOTT *et al.*, 2001; SEOL *et al.*, 2002). Estos organismos suelen aislarse de la piel de perros con piodermas profundas crónicas donde típicamente se asocian con infecciones causadas por otros agentes tales como *S. intermedius* y *Escherichia Coli* (SCOTT *et al.*, 2001). El aislamiento único de *Pseudomona aeruginosa* de lesiones de pioderma es muy raro y los autores solo tienen constancia de un caso descrito en la literatura (DONE, 1974). No obstante, recientemente se ha publicado un trabajo (HILLER, 2006) en donde se analizaron los patrones de presentación clínicos e histopatológicos de 20 perros con pioderma afectados únicamente por *Pseudomona aeruginosa*.

Manifestaciones clínicas de la pioderma

1. Pioderma superficial

En este caso la infección abarca la epidermis y sus anexos, no alterando

las membranas basales. En consecuencia, las bacterias se desarrollan en el interior de los estratos epidérmicos o en el folículo piloso. A estos lugares llegan también células inflamatorias y es frecuente observar pústulas, y cuando éstas se rompen, se forman costras y collaretes epidérmicos (FOGEL y MANZUC, 2009). Cuando la pioderma se desarrolla en el estrato córneo, puede separar a este último de los estratos más profundos, como ocurre en los márgenes de algunos collaretes epidérmicos, que crecen centrifugamente a causa de esta situación. A esto se lo denomina pioderma disecante (FOGEL y MANZUC, 2009).

Existen varios tipos dentro de este grupo:

- Pioderma de los pliegues de la piel (Intertrigo) (FOURRIER *et al.*, 1986; IHRKE, 1996; LEIB y MONROE, 1997): Estas lesiones son vistas en defectos anatómicos donde hay una importante colonización bacteriana: labios, cara, vulva, abdomen caudal, pliegues gruesos, pliegues mamarios y por obesidad. La dermatosis es localizada con eritema, exudación, supuración y mal olor.
- Impétigo:
 - Impétigo juvenil: aparecen pústulas subcorneales con costras en la zona ventral del cuerpo (FOURRIER, *et al.*, 1986; IHRKE, 1996; LEIB y MONROE, 1997): Esta enfermedad es auto limitante. Se desarrolla en animales jóvenes de 16 semanas de vida. El *Staphylococcus Pseudointermedius* es el agente etiológico principal (NESBITT y ACKERMAN, 1998).
 - Impétigo adulto: pústulas grandes (bullas) por todo el cuerpo. Esta enfermedad es en ocasiones severa, y puede provocar postración. En general el impétigo en perros adultos suele ser secundario a una enfermedad de base como hiperadrenocorticismo, terapia con corticoides, o múltiples traumas, por ejemplo, durante cacerías (FOURRIER,

et al., 1986; IHRKE, 1996; LEIB y MONROE, 1997). Se han podido aislar de estas lesiones bullosas, Bacterias Gram Negativas (*Pseudomona*, *E. Coli* y *Enterobacter*) así como *S. intermedius* (NESBITT y ACKERMAN, 1998).

- Foliculitis:

- La Foliculitis bacteriana superficial es la forma más común de pioderma. Hay una amplia variación en la historia y signos clínicos asociados con la enfermedad. El agente patógeno principalmente asociado a foliculitis es *S. pseudointermedius* (NESBITT y ACKERMAN, 1998).
- Foliculitis juvenil: se presenta con numerosas pústulas foliculares en la parte ventral del abdomen. La afección a menudo se cura en la pubertad, aunque algunos casos podría deberse a una alergia temprana, y de hecho, tratarse de una foliculitis secundaria (FOURRIER, *et al.*, 1986).



- Foliculitis de los perros de pelo corto: hay pústulas foliculares generalizadas, collaretes epidérmicos y costras, pelos mordidos (“pelaje apolillado”). Esta enfermedad está presente en razas de pelo corto. El prurito desaparece cuando la lesión se cura. Puede ser recurrente (FOURRIER, *et al.*, 1986; IHRKE, 1996; LEIB y MONROE, 1997).
- Foliculitis secundaria: es una enfermedad muy común caracterizada por pústulas foliculares, collaretes epidérmicos y costras que pueden aparecer de

manera generalizada. El prurito permanece después de curadas las lesiones en los casos que existe una dermatosis prurítica de base. La enfermedad también puede generar prurito en dermatosis no pruríticas. (En tal caso el prurito desaparece cuando la lesión se cura). La foliculitis secundaria puede ser recurrente si la causa de base no se trata (FOURRIER *et al.*, 1986).



- Hipersensibilidad bacteriana y/o pioderma de extensión superficial: es una enfermedad poco común basado en una triada clínica: pústulas eritematosas foliculares, placas seborreicas y bullas hemorrágicas. A veces hay un severo prurito. La existencia de una alergia real a bacterias es presumible y debatible (FOURRIER, *et al.*, 1986). En la pioderma de extensión superficial, las áreas de alopecia y eritematosas se expanden centrífugamente y aparecen también collaretes epidérmicos y costras. Estas lesiones están frecuentemente asociadas a pústulas foliculares intactas y transitorias. Estas entidades son a menudo recurrentes (FOURRIER, *et al.*, 1986; IHRKE, 1996; LEIB y MONROE, 1997).
- Foliculitis profunda: es la llamada “dermatitis acral de lamido”, que en la mayoría de los casos se caracteriza por ser una infección folicular bacteriana profunda, a menudo acompañada de hidradenitis retrógrada. Se debe buscar una causa alérgica o psicógena después de instaurar un tratamiento antiinfeccioso (FOURRIER, *et al.*, 1986).
- Foliculitis piotraumática: algunos casos de foliculitis (ej. En labrador

retrieve) aparecen placas exudativas que producen dolor. Están rodeadas de pústulas foliculares o forúnculos lo que puede ayudar a diferenciar de la clásica dermatitis piotraumática. Esta enfermedad puede ser secundaria a enfermedades alérgicas de la piel y llegar a ser recurrentes (FOURRIER, *et al.*, 1986; IHRKE, 1996; LEIB y MONROE, 1997).

2. Pioderma profunda

Las piodermas profundas son menos comunes que las piodermas superficiales pero son más complicadas de controlar. Existen diversos factores que predisponen a la pioderma profunda. A menudo son el resultado de una foliculitis superficial preexistente. En otras ocasiones se debe a demodicosis, endocrinopatías, enfermedades metabólicas, deficiencias inmunes, alergias y traumas. Los traumas con penetración de la dermis predisponen a la entrada de bacterias (NESBITT y ACKERMAN, 1998; FOGEL y MANZUC, 2009).

- Forunculosis (FOURRIER, *et al.*, 1986):
 - Acné, pápulas y pústulas se aprecian en la cara, particularmente en la zona del mentón. La enfermedad tiene más incidencia en perros jóvenes.



- Forunculosis secundaria: pústulas localizadas o generalizadas. Se asocia a foliculitis y está provocada o agravada por una terapia excesiva por ejemplo, con glucocorticoides.
- Pioderma nasal: pústulas y costras están presentes sobre el puente de la nariz y párpados. La

causa es desconocida. Pueden quedar cicatrices severas. Esta verdadera pioderma nasal bacteriana debe diferenciarse de la forunculosis estéril eosinofílica posiblemente debida a picaduras de artrópodos y no originada por una infección bacteriana.

- Celulitis (FOURRIER, *et al.*, 1986; IHRKE, 1996; LEIB y MONROE, 1997):

* Celulitis localizada:

- Pioderma de los puntos de presión: hay lesiones necróticas en los codos, la grupa, metatarso, zonas laterales de los dedos. Se debe a un trauma continuado por apoyo en perros de gran peso.
- Otras celulitis localizadas: Hay otras lesiones necrotizantes que aparecen en otras localizaciones como, por ejemplo, región perianal. La causa no se conoce bien y, algunas veces, son secundarios a forunculosis.

* Celulitis generalizada (FOURRIER, *et al.*, 1986; IHRKE, 1996; LEIB y MONROE, 1997):

- Piodemodicosis: se trata de una enfermedad necrotizante extensa de la piel, que es secundaria a una demodicosis generalizada por un estado de posible inmunodeficiencia.



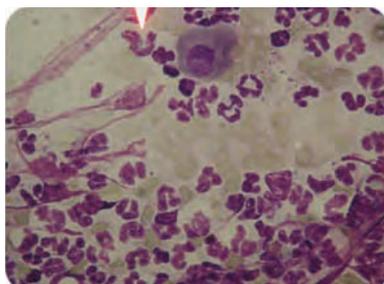
- Otras: lesiones necrotizantes extensas y frecuentemente secundarias a inmunodeficiencias subyacentes.

* Complejo pioderma interdigital (FOURRIER, *et al.*, 1986; IHRKE, 1996; LEIB y MONROE, 1997): En la pododermatitis no infecciosa (no hay pioderma) se caracteriza por eritema, edema, heridas exudativas y alopecia. Hay numerosas causas de pododermatitis incluyendo aumento de la flora superficial

bacteriana, bacterias exógenas y/o dermatitis por sobrecrecimiento de *Malassezia spp.* Se encuentran las mismas lesiones en la pododermatitis que en la pioderma interdigital junto con otras como forunculosis, ulceración, fístulas y necrosis (celulitis). La pioderma interdigital con frecuencia es secundaria a pododermatitis debida a otras causas. Puede llegar a ser crónica si la causa subyacente no se identifica y se trata.

3. Pseudo-pioderma

- **Dermatitis piodérmica:**
La dermatitis piodérmica (“hot spot”, dermatitis húmeda aguda) no es una verdadera pioderma pero son lesiones auto-infligidas con excesivo crecimiento bacteriano en su superficie. Las lesiones típicas tienen una presentación aguda y se caracterizan por tener alopecia, eritema, supuración, prurito y/o dolor. Estas lesiones están comúnmente asociadas a enfermedades pruríticas de la piel (alergia a pulgas, otitis, saculitis, etc) aunque se entienden poco su etiología. Se suele producir la curación espontánea en unos días (NESBITT y ACKERMAN, 1998).
- **Piodermas juveniles:**
 - Piodermajuvenil de cachorros recién nacidos: lesiones costrosas presentes en la cara, tórax y área dorso-lumbar. Éstas se deben a causas traumáticas. No se requiere tratamiento ya que la cura es espontánea (FOURRIER, *et al.*, 1986).
 - Celulitis juvenil: la etiología de esta enfermedad es desco-



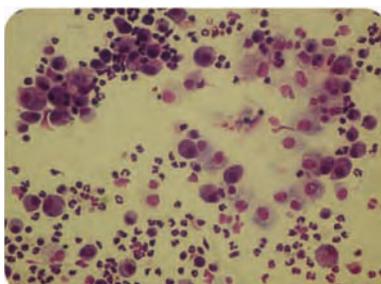
nocida. El cuadro típico clínico es edema facial y forunculosis con fístulas, costras y otitis externa supurativa. También, adenopatías y abscesos estériles pueden estar presentes. La aparición de esta enfermedad poco común ocurre antes de los 4 meses de edad, en uno o varios cachorros de una camada. Hay curación espontánea en pocas semanas dejando cicatrices como secuela. Sin embargo, a veces se requiere de terapia inmunosupresora sistémica, y un control de las infecciones secundarias es beneficioso (FOURRIER, *et al.*, 1986; IHRKE, 1996; LEIB y MONROE, 1997).

Diagnóstico de la pioderma: clínico y laboratorio

El diagnóstico de la pioderma canina está basado en la historia clínica, examen físico y exámenes complementarios. Existen varias pruebas que pueden usarse para confirmar el diagnóstico clínico de la pioderma (BENSIGNOR, 2009):

A. Citología dérmica

La citología es la prueba más rápida para evaluar la presencia de pioderma o el crecimiento bacteriano excesivo. Los casos verdaderos de pioderma deberían demostrar bacterias intracelulares con la citología, por lo general dentro de neutrófilos. Cuando las lesiones se hacen más crónicas y más profundas, se pueden identificar células mononucleares y macrófagos. La presencia de células plasmáticas y



fibroblastos sugieren una estimulación antigénica crónica o la cicatrización. Más de dos bacterias por campo de aceite de inmersión son sugestivas de crecimiento bacteriano excesivo. Un número anormal de bacterias es más típico de citologías de naturaleza crónica (IHRKE, 1996; KWOCKKA, 1993).

Características de las citologías:

- **Intertrigo:** el examen citológico de los frotis cutáneos o las pruebas con cinta adhesiva revelan imágenes de colonización bacteriana, con bacterias muy numerosas, a menudo agrupadas en racimos sobre corneocitos. Es raro observar imágenes de invasión bacteriana (polimorfonucleares degenerados que han fagocitado bacterias) (BENSIGNOR, 2009; FOGEL y MANZUC, 2009).
- **Pioderma mucocutánea:** el examen citológico puede ofrecer imágenes de colonización bacteriana, pero es poco patognomónico (BENSIGNOR, 2009; FOGEL y MANZUC, 2009).
- **Impétigo del perro joven:** el examen citológico de las lesiones pustulosas, después de pinchar cuidadosamente la cúpula de una pústula, permite observar abundantes microorganismos asociados a polimorfonucleares neutrófilos degenerados. Abundan las imágenes de fagocitosis, que indican una invasión bacteriana (BENSIGNOR, 2009; FOGEL y MANZUC, 2009).
- **Impétigo del perro adulto:** el examen citológico revela numerosas imágenes de fagocitosis y microorganismos, que indican una invasión bacteriana (BENSIGNOR, 2009; FOGEL y MANZUC, 2009).
- **Foliculitis:** el examen citológico de las pústulas intactas, cuidadosamente pinchadas, permite visualizar abundantes polimorfonucleares degenerados que han fagocitado bacterias (BENSIGNOR, 2009; FOGEL y MANZUC, 2009).
- **Forunculosis localizada:** es fundamental realizar frotis cutáneos

para examen citológico. En estas infecciones profundas son raras las imágenes de fagocitosis de cocos, caracterizadas por una inflamación piogranulomatosa rica en polimorfonucleares y macrófagos (BENSIGNOR, 2009; FOGEL y MANZUC, 2009).

- Forunculosis piotraumática: a menudo el examen citológico es decepcionante, aunque muestra imágenes de colonización bacteriana por cocos (BENSIGNOR, 2009; FOGEL y MANZUC, 2009).
- Forunculosis generalizadas: presencia de polimorfonucleares degenerados, macrófagos y bacterias (BENSIGNOR, 2009; FOGEL y MANZUC, 2009).
- Celulitis localizada: el examen citológico es bastante útil, pues permite identificar polimorfonucleares, macrófagos y bacterias. Sin embargo, no siempre es fácil identificar imágenes de fagocitosis (BENSIGNOR, 2009; FOGEL y MANZUC, 2009).
- Dermatitis piotraumática: el examen citológico es poco útil, ya que apenas muestra imágenes de colonización bacteriana inespecíficas (BENSIGNOR, 2009; FOGEL y MANZUC, 2009).
- Forunculosis eosinofílica: abundantes polimorfonucleares eosinófilos y ausencia de microorganismos (BENSIGNOR, 2009; FOGEL y MANZUC, 2009).

B. Histopatología

El estudio histopatológico es poco utilizado para el diagnóstico de la pioderma, en la mayoría de las ocasiones las bacterias no se observan en el estudio de la biopsia, pero el modelo de inflamación y los tipos de células pueden ser útiles para el diagnóstico. La presencia de bacterias es más frecuente en las capas superficiales. La principal ventaja de la biopsia es que nos sirve para dar pistas sobre la enfermedad subyacente que origina la pioderma. Siempre se deben tomar varias muestras y éstas deben referir-

se a un servicio de dermatopatología (IHRKE, 1996; KWOCZKA, 1993).

C. Bacteriología

En presencia de piodermas profundas (celulitis, pioderma interdigital profunda, etc). Conviene realizar estos cultivos para tipificar correctamente la flora responsable. En casos de piodermas superficiales, son muy poco utilizados, ya que no brindan información útil para la terapéutica, por los siguientes motivos (FOGEL y MANZUC, 2009).

La bacteria principalmente implicada en la génesis de las piodermas es *Staphylococcus Pseudointermedius*. Siendo menos habituales las piodermas por gram negativos. *S. Pseudointermedius* es muy sensible a los antibióticos típicos para gram positivos como Cefalexina, Lincomicina o Enrofloxacin, y más del 99% de las piodermas responden bien a estos antibióticos (FOGEL y MANZUC, 2009).

Muchos antibióticos potencialmente útiles no tienen buen resultado en la piel por tener poca difusión, mala actividad en exudado purulento o carecer de actividad intracelular (lugar donde permanece vivo *Staphylococcus Pseudointermedius*) (FOGEL y MANZUC, 2009).

La sensibilidad *in vitro* de determinados antibióticos no siempre coincide con la sensibilidad *in vivo*, por consiguiente, muchas bacterias sensibles a algunos antibióticos en el laboratorio, no lo son en el organismo (FOGEL y MANZUC, 2009).

El germen aislado en un cultivo de piel puede no ser la causa de la pioderma o no estar involucrado en el cuadro (FOGEL y MANZUC, 2009).

Se recomienda realizar cultivos en los casos de piodermas profundas generalizadas crónicas, en toda pioderma recidivante crónica que ha sido tratada con varios antibióticos y en las otitis bacterianas crónicas (FOGEL y MANZUC, 2009).

Resultados de sensibilidad y resistencia antibiótica

Antibióticos sistémicos útiles para el tratamiento de la pioderma canina:

Los antibióticos más usados para el tratamiento de la pioderma canina están incluidos en la siguiente tabla. Todos ellos tienen una buena difusión cutánea debido a su liposolubilidad y se pueden administrar oralmente lo que facilita la medicación a largo plazo (facilita la administración). Son todos bactericidas excepto los macrólidos que son bacteriostáticos (CARLOTTI, 1996; BENSIGNOR, 2009).

Las cepas MRSP (Meticillin Resistente *Staphylococcus Pseudointermedius*) expresan resistencia a otra clase de antibióticos como los Macrólidos, Tetraciclinas, Aminoglicósidos y Fluoroquinolonas (MORRIS *et al.*, 2006; JONES *et al.*, 2007). Particularmente, la resistencia a las Fluoroquinolonas (Enrofloxacin, Marbofloxacin) es alrededor del 55%. (INTORRE *et al.*, 2007). En un estudio, las tasas de MRSP y MRSS (Meticillin Resistente *Staphylococcus Schleiferei*) aisladas de piodermas y otitis fueron del 17 y 40% respectivamente (MRSA 35% en infecciones profundas). Los antibióticos orales que ejercieron un efecto más seguro frente a MRSP fueron Clo-ranfenicol y Trimetoprin-sulfa. MRSS mostró buenos ratios de susceptibilidad a toda clase de antimicrobianos excepto a Fluoroquinolonas (MORRIS *et al.*, 2006).

Las Tetraciclinas tienen muy baja actividad contra estafilococos. Sin embargo, la Minocilina puede usarse en caso de pioderma debida a *Staphylococcus spp.* meticilin-resistente a dosis de 15 mg/kg BID (KAWAKAMI *et al.*, 2010).

Los Aminoglicósidos tienen una baja difusión cutánea al ser hidrosolubles, pero además presentan el problema de ser tóxicos (elevado potencial nefrotóxico) (NOLI, 2011).

La Rifampicina es un antibiótico efectivo frente a estafilococos pero, como todavía se utiliza para tratar la

tuberculosis en humanos, y sobre todo porque su uso en medicina veterinaria tiene una gran tasa de resistencias, debería usarse excepcionalmente y realmente cuando no exista otra posibilidad terapéutica. Además, debería asociarse a betalactámicos para minimizar el riesgo de aparición de cepas resistentes de estafilococos (CARLOTTI *et al.*, 1997; DECRISTOPHORIS *et al.*, 2011).

La Novobiocina: este antibiótico está disponible en algunos países para tratar la enfermedad de vías respiratorias altas agudas o crónicas en animales combinados con Tetraciclina. Sin embargo, no hay estudios clínicos que hayan demostrado su efectividad en la pioderma canina. (FULHAM *et al.*, 2011).

Para aquellos casos con piodermas recurrentes debidas a una dermatosis subyacente incurable y frecuentemente de origen alérgico, que requieran de tratamiento intermitente antibiótico para el control de las erupciones, se plantea la pregunta de si sería aconsejable este tipo de terapias. En un estudio controlado doble ciego placebo, perros alérgicos con piodermas recurrentes se trataron con Cefalexina a la dosis estándar o placebo durante 3 días a la semana para prevenir recidivas. Estas fueron más frecuentes en el grupo placebo. Los perros afectados con alergia alimentaria tenían menos recaídas debido a la facilidad de controlar la causa subyacente. Pero lo más relevante es que no aparecieron resistencias a estafilococos en este estudio. (GUAGUÉRE *et al.*, 2003).

- Antibióticos tópicos útiles para el tratamiento de la pioderma canina:
 - La Mupirocina y el Ácido Fusídico son los tratamientos tópicos para mascotas más efectivos frente a estafilococos, (SCOTT *et al.*, 2001) debido a su alta actividad sobre los estafilococos coagulasa-positivo, incluyendo cepas resistentes a Meticilina de *Staphylococcus pseudointermedius* que son de particular importancia.

Tabla 1.

CLASE	CARACTERÍSTICAS	EJEMPLOS
Macrólidos	Estrecho espectro/ Gram +	Eritromicina: 30-50 mg/kg div. En 2-3 tomas. Lincomicina: 40-50 mg/kg div. En 2-3 tomas. Clindamicina: 5.5 -11 mg/kg SID.
Penicilina M	Resistencia a penicilinasas. Estrecho espectro/Gram +	Oxacilina: 30-50 mg/kg div. en 2 tomas.
Penicilina A potenciada con ácido clavulámico	Resistencia a penicilinasas. Amplio espectro.	Amoxicilina-clavulámico: 25 mg/kg div. En 2 tomas.
Cefalosporina	Resistente a penicilinasas. Amplio espectro.	Cefalexina: 30-60 mg/kg div. En 2 tomas o SID. Cefadroxilo: 44-70 mg/kg div. En 2 tomas. Cefovecin: 8 mg/kg cada 14 días SC.
Cefalosporina P	Resistente a penicilinasas. Bajo espectro/Gram +	Ácido fusídico (el único de este grupo): uso tópico.
Sulfonamidas- Diaminopyrimidinas	Amplio espectro	Trimetoprim-sulfa: 30 mg/kg (5 mg) SID o div en 2 tomas. Ormetoprim-sulfadimetoxina: 30 mg/kg (5mg de ormetoprim). SID después de una dosis doble el primer día.
Fluoroquinolonas	Amplio espectro y excelente penetración tisular (no utilizar en cachorros de raza gigantes).	Enrofloxacin: 5 mg/kg SID o div. En 2 tomas. Marbofloxacin: 2 mg/kg/SID Difloxacin: 5 mg/kg/SID Pradofloxacin: 3 mg/kg/SID

- La Mupirocina penetra bien en la piel y es bien tolerada. Muestra alta eficacia *in vitro* sobre estafilococos susceptibles y resistentes a Meticilinas en perros sanos y perros con piodermas (FULHAM *et al.*, 2011). Aunque, no hay estudios clínicos publicados en perros con pioderma, en un estudio abierto sobre acné felino se ha visto que la Mupirocina es efectiva (WHITE *et al.*, 1997). En la actualidad, hay una tendencia entre veterinarios dermatólogos de no usar antibióticos de uso humano debido al desarrollo de resistencias.
- El Ácido Fúsidico en crema está disponible para uso veterinario, el producto está registrado en Europa. Se sabe que

Staphylococcus Pseudointermedius se puede eliminar de la piel y mucosas de perros sanos con un tratamiento tópico a base de Ácido Fusídico (SAIJONMAA *et al.*, 1998). No hay publicados estudios sobre esta formulación, sin embargo, es ampliamente utilizado en dermatología veterinaria aunque se necesitan datos clínicos. El Ácido Fusídico podría ser una buena alternativa al tratamiento sistémico en los casos de pioderma canina localizada, sin embargo, se observa una resistencia significativamente más elevada en cepas de *S. pseudointermedius* meticilina-resistentes comparando con cepas meticilina-susceptibles, de ahí la importancia una vez

más de realizar antibiogramas (MEUCCI *et al.*, 2010).

Piodermas producidas por agentes meticilin resistentes

Desde el inicio del uso de terapias antimicrobianas en la práctica de la medicina, los estafilococos han desarrollado respuesta de resistencias contra los antibióticos. Recientemente, se ha encontrado un número significativo de especies de estafilococos que infectan a humanos y animales domésticos con un cierto grado de resistencia a los antimicrobianos (WERCKENTHIN *et al.*, 2001; VANDENESCH *et al.*, 2003).

En medicina humana, la resistencia ejercida por los *S. aureus* metilresistentes ha contribuido al desarrollo de resistencias a múltiples drogas desde comienzo de siglo (BARBER *et al.*, 1961). La Meticilina y la Oxacilina son miembros de una clase de antimicrobianos conocidos como penicilinas semisintéticas, resistentes a las penicilinasas. La Oxacilina y la Meticilina se emplean en laboratorios para los tests de detección de sensibilidad bacteriana toda esta clase de antibióticos (CHAMBEERS *et al.*, 1997).

Las penicilinas semisintéticas se desarrollaron para combatir a los estafilococos resistentes a las penicilinas de primera generación, actuando sobre la producción bacteriana de la enzima penicilinasas. La enzima penicilinasas es una enzima elaborada por los estafilococos capaces de hidrolizar e inactivar a las penicilinas. Aunque, la clase semisintética sea resistente a las penicilinasas, ésta tiene una susceptibilidad adquirida a la proteína fijadora de penicilina, conocida como PBP2a o PBP2. La PBP del estafilococo está codificada por el gen mec A, que confiere una resistencia intrínseca a todos los antibióticos beta-lactámicos y sus derivados (BERGER-BACH *et al.*, 2002).

La resistencia de muchos estafilococos meticilin resistentes a *S. aureus* (MRSA) ejercida sobre Aminoglucósidos, Fluoroquinolonas, Macrólidos, Ácido Fúsidico y Mupirocina es también común, aun-

que por mecanismos que difieren de PBP. (BERGER-BACH *et al.*, 2002; DESHPANDE *et al.*, 2002).

Los *S. aureus* Meticilin Resistentes (MRSA) pueden transmitirse dentro de los hospitales y por contacto ocasional dentro de la comunidad (SAIID-SALIM *et al.*, 2003; FEY *et al.*, 2003; ROBERTS *et al.*, 2005). Debido a la problemática de las infecciones por MRSA en poblaciones humanas, las infecciones en animales domésticos están recibiendo una especial atención en los últimos tiempos en la literatura científica. La posibilidad de zoonosis inversa y la creación de animales reservorios que puedan reinfectar personas es un tema de especial preocupación (SCOTT *et al.*, 1988; CEFAL *et al.*, 1994; SEGUIN *et al.*, 1999; MANIAN *et al.*, 2003; VAN DUIJKEREN *et al.*, 2004; GUARDABASSI *et al.*, 2004; WEESE *et al.*, 2005; O'MAHONEY *et al.*, 2005; LOEFFLER *et al.*, 2005).

Por otro lado, las metil resistencias ejercidas por *Staphylococcus intermedius* (MRSI) y *S. schleiferi* (MRSS) en veterinaria han sido menos estudiadas (GORTTEL *et al.*, 1999; PATEL *et al.*, 1999; GUARDABASSI *et al.*, 2004; KANIA *et al.*, 2004; MAY *et al.*, 2005).

La pioderma bacteriana y otitis son extremadamente común en perros, y las infecciones por estafilococos son usualmente tratadas empíricamente con Beta-lactámicos, Macrólidos, o Sulfonamidas (para piodermas) o uso tópico de Aminoglucósidos, Fluoroquinolonas o Ácido Fúsidico (para otitis externas) (HILL *et al.*, 1994; WHITE *et al.*, 1996; IHRKE *et al.*, 1999).

Recientemente se han publicado diversos trabajos sobre *Staphylococcus intermedius* meticilin resistentes (MRSI) tanto en Estados Unidos como en Europa (MORRIS *et al.*, 2003-04; LOEFFLER *et al.*, 2007). Estos estudios han aislado cepas resistentes de la piel y conducto auricular. En los Estados Unidos también se han conseguido aislar cepas resistentes de *S. schleiferi* (MRSS) en estas mismas

zonas (MORRIS *et al.*, 2003-04). Esta resistencia se debe al gen mec A (BEMIS *et al.*, 2006). La resistencia antibiótica múltiple puede llegar a ser un verdadero desafío en tales casos. Esto es probablemente la causa de la mayoría de las piodermas resistentes. Se sabe que existen además, otros factores de riesgo asociados a la resistencia antimicrobiana en casos de piodermas canina producida por estafilococos (BEMIS *et al.*, 2006).

El seguimiento de las resistencias antimicrobianas en bacterias aisladas en veterinaria es muy importante, ya que el aumento de la resistencia en animales puede llevar a conducir al fracaso de los tratamientos individuales de pacientes y supone un riesgo de zoonosis para el propietario. (GUARDABASSI *et al.*, 2004; MANIAN *et al.*, 2003). Además, el aumento de las resistencias a antimicrobianos, que son de vital importancia en los tratamientos de medicina humana, debe valorarse su uso veterinario y si es necesario aplicar restricciones (MANIAN *et al.*, 2003; WHO *et al.*, 2005).

Por otro lado, el aumento de cepas mec A positivas de *S. intermedius* (MRSI), resistentes a todos los agentes antimicrobianos avalados y con licencia como terapia sistémica en el tratamiento de pioderma canina y felina u otitis suponen un importantísimo problema (LOEFFLER *et al.*, 2007).

Rara veces, se puede presentar una pioderma profunda severa debida a *Pseudomonas aeruginosa*. Algunas cepas de esta bacteria pueden originar una grave presentación clínica y las multiresistencias constituyen un reto terapéutico (HILLIER *et al.*, 2006).

Bibliografía

- 1.- Barber, M. (1961): Methicillin-resistant staphylococci. Journal of Clinical Pathology; 14: 385-393.
- 2.- Bemis, D.A., Jones, R.D., Hiatt, L.E., Ofori, E.D., Rohrbach, B. W., Frank, L. A. y Kania, S.A. (2006): Comparison of tests to detect oxacillin resistance in *Staphylococcus intermedius*,

- Staphylococcus schleiferi, and Staphylococcus aureus isolates from canine hosts. *Journal of Clinical Microbiology*; 44: 3374-3376.
- 3.- Bensignor, E. (2009): Atlas de piodermas caninos. Editorial Mayo, S.A. Barcelona, España: 40-87; 58-59.
 - 4.- Berger-Bach, I. B. y Rohrer, S. (2002): Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. *Archives of Microbiology*; 178: 165-171.
 - 5.- Boag, A., Loeffler, A. y Lloyd, D.H. (2004): Methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from companion animals (Letter). *Veterinary Record*; 154: 411.
 - 6.- Carlotti, D.N. (1996): New Trends in Systemic Antibiotic Therapy of Bacterial Skin Diseases in Dogs. Supplement of the Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian; 18: 40-47.
 - 7.- Carlotti, D.N. y Atance, A. (1997): El empleo de la rifampicina en el tratamiento de las piodermas profundas crónicas del perro; revisión bibliográfica y presentación de trece casos clínicos. *Clínica Veterinaria de Pequeños Animales*; 17:211-216.
 - 8.- Cefai, C., Ashurst, S. y Owens, C. (1994): Human carriage of methicillin-resistant Staphylococcus aureus linked with pet dog. *Lancet*; 344: 539-540.
 - 9.- Chambers, H.F. (1997): Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clinical Microbiology Reviews*; 10: 781-791.
 - 10.-Cole, L.K., Kwochka, K.W., Kowlaski, J.J. y Hillier, A. (1998): Microbial flora and antimicrobial susceptibility patterns of isolated pathogens from the horizontal ear canal and middle ear in dogs with otitis media. *Journal of the American Veterinary Medical Association*; 212: 534-538.
 - 11.-Decristophoris, P., Mauri, F., Albanese, F., Carnelli, A., Vanzetti, T. y Zinsstag, J. (2011): Antibiotic treatments of a methicillin-resistant Staphylococcus pseudointermedius infection in a dog: A case presentation. *Schweiz. Arch.Tierheilk.* 153: 405-409.
 - 12.-Deshpande, L. M., Fix, A. M. y Pfaller, M. A. (2002): The SENTRY Antimicrobial Surveillance Program Participants Group, Jones RN. Emerging elevated mupirocin resistance rates among staphylococcal isolates in the SENTRY antimicrobial surveillance program (2000): Correlations of results from disc diffusion, Etest and reference dilution methods. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*; 42: 283-290.
 - 13.-Devriese, L. Vancanneyt, M., Baele, M. Vaneechoutte, M., De Graef, E., Snauwaert, C. Cleenwerck, I., Dawyndt, P., Swings, J. Decostere, A. y Haesebrouck, F. (2005): Staphylococcus pseudintermedius sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 55: 1569-1573.
 - 14.-Done, S.H. (1974): Pseudomonas aeruginosa infection in the skin of a dog: a case report. *British Veterinary Journal*; 130: 68-69.
 - 15.-Duquette, R. A. y Nuttal, T.J. (2004): Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in dogs and cats: an emerging problem. *Journal of Small Animal Practice*; 45: 591-597.
 - 16.-Fey, P. D., Said-Salim, B., Rupp, M. E., Hirnrichs, S.H., Boxrud, D.J., Davis, C.C, Dreiswirth, B.N. y Schlievert, P.M. (2003): Comparative molecular analysis of community- or hospital-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 47: 196-203.
 - 17.-Fogel, F. y Manzuc, P. (2009): Dermatología Canina Para La Práctica Clínica Diaria. Editado por Pfizer. Editorial InterMédica, Buenos Aires, Argentina: 64,202-204.
 - 18.-Fourrier, P., Carlotti, D.N. y Magnol, J.P. (1986): Les pyodermites du chien. *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie* ; 23: 462-535.
 - 19.-Frank, L.A., Kania, S.A., Hnilica, K.A., Wilkes, R.P. y Bemis, D.A. (2003): Isolation of Staphylococcus schleiferi from dogs with pyoderma. *Journal of the American Veterinary Medical Association*; 222: 451-454.
 - 20.-Fulham, K.S., Lemarie, S.L., Hosgood, G. y Dick, H.L.N. (2011): In vitro susceptibility testing of methicillin-resistant and methicillin-susceptible staphylococci to mupirocin and novobiocin. *Veterinary Dermatology*; 22: 88-94.
 - 21.-Goodwin, J.L. y Maccamley, R.M. (1978): Otitis externa associated with Ps. aeruginosa infection. *Veterinary Record*; 103: 343.
 - 22.-Gortel, K., Campbell, K.L., Kakoma, I., Whitem, T., Schaeffer, D.J. y Weisiger, R.M. (1999): Methicillin resistance among staphylococci isolated from dogs. *American Journal of Veterinary Research*; 60: 1526-1530.
 - 23.-Guardabassi, L., Loeber, M.E. y Jacobson, A. (2004): Transmission of multiple antimicrobial-resistant Staphylococcus intermedius between dogs affected by deep pyoderma and their owners. *Veterinary Microbiology*; 98: 23-27.
 - 24.-Guaguère, E., Rème, C.A., Mondon, A. y Salomon, C. (2003): Use of cephalexin intermittent therapy to prevent recurrent pyoderma in dogs with underlying allergic dermatitis: a double-blind placebo-controlled trial. En: Proceedings of the 19th Annual Meeting of the European Society of Veterinary Dermatology, European College of Veterinary Dermatology, Tenerife, Spain; 144. Expand+Clinical

- Infectious Diseases cid.oxford-journals.org
- 25.-Harris, M. (1978): Otitis externa associated with *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Veterinary Record*; 103:244.
- 26.-Hernández, J.L., Calvo, J., Sota, R., Agüero, J., Gracia-Palomo J.D. y Fariñas, M.C. (2001): Clinical and microbiological characteristics of 28 patients with *Staphylococcus schleiferi* infection. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*; 20: 153–158.
- 27.-Hill, P.B. y Moriello, K.A. (1994): Canine pyoderma. *Journal of the American Veterinary Medical Association*; 204: 334–340.
- 28.-Hillier, A., Alcorn, J.R., Cole, L.K. y Kowalski, J.J. (2006): Pyoderma caused by *Pseudomonas aeruginosa* infection in dogs: 20 cases. *Veterinary Dermatology*; 17: 432-439.
- 29.-Ihrke, P.J. (1996): Bacterial Skin Disease in the Dog. A Guide to Canine Pyoderma. Bayer/Veterinary Learning Systems.
- 30.-Ihrke, P.J., Papich, M.G. y Demanuelle, T.C. (1999): The use of fluoroquinolones in veterinary dermatology. *Veterinary Dermatology*; 7: 133–143.
- 31.-Intorre, L., Vanni M, D.I., Bello, D., Pretti, C., Meucci, V., Tognetti, R., Soldani, G., Cardini, G. y Jousson, O. (2007): Antimicrobial susceptibility and mechanism of resistance to fluoroquinolones in *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus schleiferi*. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*; 30: 464-469.
- 32.-Jones, R.D., Kania, S.A., Rohrback, B.W., Frank, L.A. y Bemis, D.A. (2007). Prevalence of oxacillin- and multidrug-resistant staphylococci in clinical samples from dogs: 1,772 samples (2001-2005). *Journal of the American Veterinary Medical Association*; 230: 221-227.
- 33.-Kania, S.A., Williamson, N.L., Frank, L.A., Wilkes, R.P., Jones, R.D. y Bemis, D.A. (2004): Methicillin resistance of staphylococci isolated from the skin of dogs with pyoderma. *American Journal of Veterinary Research*; 65: 1265–1268.
- 34.-Kawakami, T., Shibata, S., Muyarama, N., Nagata, M., Nishifuji, K., Iwakasi, T. y Fukata, T. (2010): Antimicrobial susceptibility and methicillin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* subsp.coagulans isolated from dogs with pyoderma in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*; 72:1615-161.
- 35.-Kloos, W.E. y Bannerman T.L., (1994): Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clinical Microbiological Review*; 7: 117–140.
- 36.-Kloss, W.E. y Musselwhite, M.S. (1975): Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. *Applied Microbiology*; 30: 381–395.
- 37.-Kluytmans, J., Berg, H., Steegh, P., Vandenesch, F., Etienne, J. y Van Belkum, A. (1998): Outbreak of *Staphylococcus schleiferi* wound infections: strain characterization by randomly amplified polymorphic DNA analysis, PCR ribotyping, conventional ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*; 36: 2214–2219.
- 38.-Kristensen, S. y Krogh, H.V. (1978): A study of skin diseases in dogs and cats.III. Microflora of the skin of dogs with chronic eczema. *Nordisk Veterinaermedicin*; 30: 223–230.
- 39.-Krogh, H.V. y Kristensen, S. A. (1981): Study of skin diseases in dogs and cats.VI. Microflora of the major canine pyodermas. *Nordisk Veterinaermedicin*; 33: 17–22.
- 40.-Kwochka, K.W. (1993): Recurrent pyoderma. *Current Veterinary dermatology. The Science and Art of Therapy*, St Louis, Mosby Year Book: 3-21.
- 41.-Lee, P.K., Zipoli, M.T., Weinberg A.N., Mathew, T.Z., Richard, A.J. y Morton, N.S. (2003): Pyodermas: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* and other Gram-positive bacteria. Editado por Freedberg, I.M., Eisen, A.Z., Wolff, K., Austen, K.F., Goldsmith, L.A., Katz, S.I. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*, 6th edición. New York: McGraw-Hill; 1856–1878.
- 42.-Leib, M.E. y Monroe W.E. (1997): Diseases of the integument. *Textbook of Practical Small Animal. Internal Medicine*; 3- 116.
- 43.-Lloyd, D.H (1992): Therapy for canine pyoderma. EditadoporKirk, R.W. y Bonagura, J.D. *Current Veterinary Therapy XI*. Philadelphia, WB Saunders Company: 539-544.
- 44.-Loeffler, A., Boag, A.K. Sung, J., Lindsay, J.A., Guardabassi, L., Dalsgaard, A.H., Stevens, K.B. y Lloyd, D.H. (2005): Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among staff and pets in a small Animal referral hospital in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 56: 692- 697.
- 45.-Loeffler, A., Linek, M., Moodley, A., Guardabassi, L., Sung, J.M., Winkler, M., Weiss, R. y Lloyd, D.H. (2007): First report of multiresistant, *mecA*-positive *Staphylococcus intermedius* in Europe: 12 cases from a veterinary dermatology referral clinic in Germany. *Veterinary Dermatology*; 18: 412-421.
- 46.-Loeffler, A., Boag, A.K., Sung, J., Lindsay, J.A., Guardabassi, L., Daslgaard, A., Smith, H., Stevens, K.B. y Lloyd, D.H. (2005): Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among staff and pets in a small animal referral hospital in the UK.

- Journal of Antimicrobial Chemotherapy; 56: 692–697.
- 47.-Manian, F.A. (2003): Asymptomatic nasal carriage of mupirocin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a pet dog associated with MRSA infection in household contacts. *Clinical Infectious Diseases*; 36: 26–28.
- 48.-May, E.R., Hnilica, K.A., Frank, L.A., Jones, R.D. y Bemis, D.A. (2005): Isolation of *Staphylococcus schleiferi* from healthy dogs and dogs with otitis, pyoderma, or both. *Journal of the American Veterinary Medical Association*; 227: 31–92.
- 49.-McEwan, N.A. (2000): Adherence by *Staphylococcus intermedius* to canine keratinocytes in atopic dermatitis. *Research in Veterinary Science*; 68: 279–283.
- 50.-McEwan, N.A., Mellor, D., y Kalna, G. (2006): Adherence by *Staphylococcus intermedius* to canine corneocytes: a preliminary study comparing non inflamed and inflamed atopic canine skin. *Veterinary Dermatology*; 17: 151–154.
- 51.-Meucci, V., Vanni, M., Guardabassi, L., Moodley, A., Soldani, G. y Intorre, L. (2010): Evaluation of methicillin resistance in *Staphylococcus intermedius* isolated from dogs. *Veterinary Research Communications*; 34: suppl 1:79–82.
- 52.-Morris, D. (2010): Methicillin-resistant *Staphylococci* implications for Small Animal Practice. *Dermatology of companion animals, CVMA scientific presentations*: 65–69.
- 53.-Morris, D.O., Rook, K.A., Shofer, F.S. y Rankin, S.C. (2003–2004): Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates. *Veterinary Dermatology*; 17: 332–337.
- 54.-Nesbitt, G.H. y Ackerman, L.J. (1998): Canine and Feline Dermatology. Diagnosis and treatment. Editado por Veterinarian Learning Systems. Triton, New Jersey: 205–219.
- 55.-Noli, C. y Morris, D. (2011): Guidelines on the use of systemic aminoglycosides in veterinary dermatology. *Veterinary Dermatology*; 22:378–380.
- 56.-O'Mahoney, R., Abbott, Y., Leonard, F.C., Markey, P.J., Quinn, P.J., Pollock, P.J., Fanning, S. y Rossney, A.S. (2005): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from animals and veterinary personnel in Ireland. *Veterinary Microbiology*; 109: 285–296.
- 57.-Pak, S.I., Han, H.R. y Shimizu, A. (1999): Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from dogs in Korea. *Journal of Veterinary Medical Science*; 61: 1013–1018.
- 58.-Patel, A., Lloyd, D.H. y Lampport, A.I. (1999): Antimicrobial resistance of feline staphylococci in south-eastern England. *Veterinary Dermatology*; 10: 257–261.
- 59.-Patel, A. (2006): Bacterial pyoderma. Editado por August, J.R. Consultation in feline internal medicine. Elsevier Saunders, St. Louis; 5:251.
- 60.-Rankin, S., Roberts, S., O'Shea, K., Maloney, D., Lorenzo, M. y Benson, C.E. (2005): Pantone-Valentine leukocidin (PVL) toxin positive MRSA strains isolated from companion animals. *Veterinary Microbiology*; 108: 145–148.
- 61.-Rich, M. y Roberts, L. (2004): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from companion animals. *Veterinary Record*; 154: 310.
- 62.-Roberts, S., O'Shea, K., Morris, D. y Rankin, S. (2005): A real-time PCR assay to detect the Pantone-Valentine leukocidin toxin in staphylococci: screening *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans* strains from companion animals. *Veterinary Microbiology*; 107: 139–44.
- 63.-Saiid-Salim, B., Mathema, B. y Kreiswirth, B. (2003): Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging pathogen. *Infection Control and Hospital Epidemiology*; 21: 451–455.
- 64.-Saijonmaa-Koulumies, L., Parsons, E. y Lloyd, D.H. (1998): Elimination of *Staphylococcus intermedius* in healthy dogs by topical treatment with fusidic acid. *Journal of Small Animal Practice*; 39: 341–347.
- 65.-Saijonmaa-Koulumies, L.E. y Lloyd, D.H. (1996): Colonisation of the canine skin with bacteria. *Veterinary Dermatology*; 7: 153–162.
- 66.-Scott, D.W., Miller, W.H., Griffin, C.E. (2001): Muller and Kirk's Small Animal Dermatology 6th ed. Philadelphia, WB Saunders Company: 230–232, 274–335, 647–650.
- 67.-Scott, D.W., Miller, W.H. y Griffin, C.E. (2001): Bacterial skin diseases. En: Muller and Kirk's Small Animal Dermatology, 6th edn. Philadelphia, PA: W.B. Saunders: 230–232; 274–335; 647–650.
- 68.-Scott, G.M., Thomson, R., Malone-Lee, J. y Ridgway, G.L. (1988): Cross-infection between animals and man: possible feline transmission of *Staphylococcus aureus* infection in humans. *Journal of Hospital Infection*; 12: 29–34.
- 69.-Seguin, J. C., Walker, R.D., Caron, J.P., Kloos, W.E., George, C.G., Hollis, R. J., Jones, R.N. y Pfaller, M.A. (1999): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a veterinary teaching hospital: potential human-to-animal transmission. *Journal of Clinical Microbiology*; 37: 1459–1463.
- 70.-Seol, B., Naglic, T., Madic, J. y Bedekovic, M. (2002): In vitro

- antimicrobial susceptibility of 183 *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from dogs to selected antipseudomonal agents. *Journal of Veterinary Medicine B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*; 49: 188–92.
- 71.-Simou, C., Thoday, K.L., Forsythe, P.J. y Hill, P.B. (2005): Adherence of *Staphylococcus intermedius* to corneocytes of healthy and atopic dogs: effect of pyoderma, pruritus score, treatment and gender; *Veterinary Dermatology*; 16: 385–391.
- 72.-Tomlin, J., Pead, M.J., Lloyd, D.H., Lloyd, D.H., Howell, S., Hartmann, F., Jackson, H.A. y Muir, P. (1999): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in 11 dogs. *Veterinary Record*; 144: 60–64.
- 73.-Vandenesch, F., Naimi, T. y Enright, M.C. (2003): Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: Worldwide emergence. *Emerging Infectious Disease*; 9: 978–84.
- 74.-Van Duijkeren, E., Wolfhagen, M.J., Box, A.T., Heck, M.E., Wannet, W.J. y Fluit, C. (2004): Human-to-dog transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Diseases*; 10: 2235–2237.
- 75.-Wael, M.K. y Husein, M.G. (2011): Diagnosis of Recurrent Pyoderma in Dogs by Traditional and Molecular Based Diagnostic Assays and Its Therapeutic Approach. *Journal of American Science*; 7(3): 120-134.
- 76.-Weese, J.S. (2005):Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging pathogen in small animals. *Journal of the American Animal Hospital Association*; 41: 150–157.
- 77.-Werckenthin, C., Cardoso, M., Martel, J.L. y Schwarz, S. (2001): Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine *S. aureus*, porcine *S. hyicus*, and canine *S. intermedius*. *Veterinary Research*; 32: 341–362.
- 78.-White, S.D. (1996): Systemic treatment of bacterial skin infections of dogs and cats. *Veterinary Dermatology*; 7: 133–143.
- 79.-White, S.D., Bourdeau, P.B., Blumstein, P. Ibisch, C., Guaguère, E., Denerolle, P., Carlotti, D.N. y Scott, K.V. (1997): Feline acne and results of treatment with mupirocin in an open clinical trial:25 cases. *Veterinary Dermatology*; 8:157-164.
80. Who (2005): Critically important antibacterial agents for human medicine for risk management strategies of non-human use. Canberra, ACT: World Health Organization; 3–12.

Importancia de los controles veterinarios en fronteras como garantes de la sanidad animal y la salud pública en Europa

Samuel Contreras Falcón

Jefe de Servicio de Sanidad Exterior. Área de Sanidad y Política Social. Delegación del Gobierno en Canarias. samuel.contreras@seap.minhap.es

Importance of the border veterinary checks to guarantee the european animal and public health

SUMMARY: The present work reviews the importance of the border veterinary checks to guarantee the european animal and public health status. These checks are based on guidelines and regulations developed by international health and trade organizations previously to a risk analysis composed of hazard identification, risk management and risk communication associated with the importation of live animals and animal products from third countries. Border veterinary checks are particularly relevant in the Canary Islands as a logistic tricontinental platform, given the fragility of the islands ecosystem.

The interdependence of humans, animals, and their environment has never been more important than now. Current global health challenges have prompted a call for more adjusted border veterinary controls based on import risk analysis.

Keywords: border inspection post; veterinary checks; product of animal origin; risk assessment.

La globalización, la sanidad animal y la salud pública.

La integración económica avanza en todo el mundo a ritmos agigantados. La globalización ha logrado ingentes beneficios a muchos países y ciudadanos, fruto de las relaciones comerciales entre las denominadas economías abiertas (23). Aunque no existe una definición universalmente convenida de globalización, los economistas emplean comúnmente el término para referirse a la integración internacional de los mercados de productos básicos, capitales y trabajo (3). Dentro del capítulo de los productos básicos toman una posición notable los animales vivos y los productos de origen animal, al ser estos una importante fuente de aminoácidos, vitaminas y minerales a nivel nutricional, a la par que una notable fuente de subproductos destinados a otras industrias no alimentarias (22). La deman-

da internacional de estos productos se ha visto incrementada en las últimas décadas, valiéndose del desarrollo paralelo de nuevas iniciativas innovadoras en materia de transporte y logística comercial, siendo posible en la actualidad transportar animales vivos y productos de origen animal de un extremo a otro del planeta en apenas días (36). En este sentido cabe destacar que los agentes patógenos no entienden de fronteras físicas, sino tan solo de reservorios y hospedadores. Estos productos proceden de países terceros con sistemas de producción intensivistas distintos a los europeos, y por ende productos que ofrecen distintas garantías sanitarias. La introducción de enfermedades animales en un territorio libre de la misma puede traer consigo consecuencias drásticas en la cabaña ganadera del país importador, con una repercusión indirecta sobre los indicadores macroeconómicos ganaderos, o lo

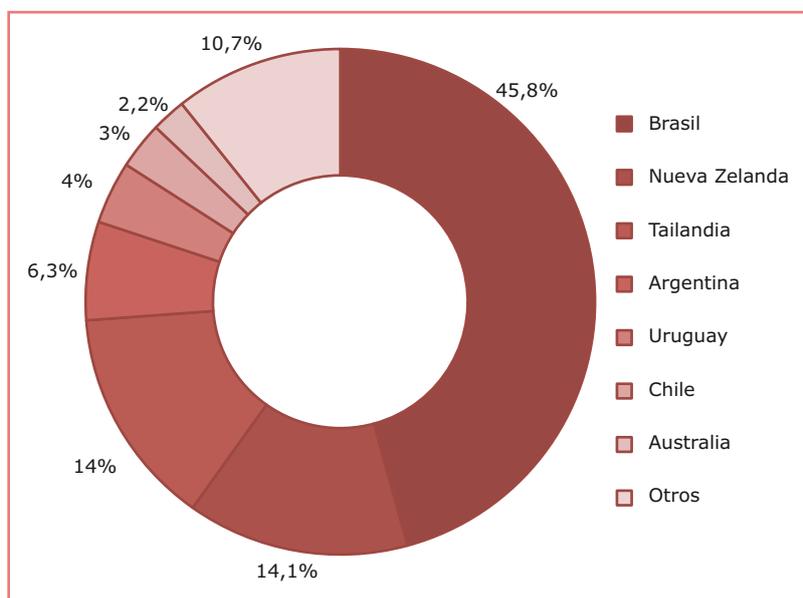
que es peor, directa, en casos en que el agente patógeno sea capaz de atravesar la barrera interespecie produciendo las tan temidas zoonosis (18,45). Según datos de la Organización Mundial de la Sanidad Animal, el 60 % de los patógenos humanos son de naturaleza zoonótica, así como el 75 % de las enfermedades emergentes. Es por ello, que el país importador debe de establecer unas medidas de control exhaustivas que otorgue a las partidas animales importadas garantías para el binomio de la sanidad animal y la salud pública (46). A esta ecuación, debemos añadir una nueva variable, los consumidores. Los europeos demandamos productos agroalimentarios no solo de calidad sino también seguros. La alimentación, ha sufrido un proceso de transformación partiendo desde una mera necesidad fisiológica, hasta alcanzar las cotas más altas de un proceso social, económico y cultural,

que se sustenta en la seguridad alimentaria como pilar fundamental. Con la visión integrada de la granja a la mesa, los más de 500 millones de europeos nos abastecemos de productos no solo procedentes del mercado único comunitario, sino también de los más de 200 países terceros con los que comercializa la Unión, gracias al gigante de la globalización (4, 7).

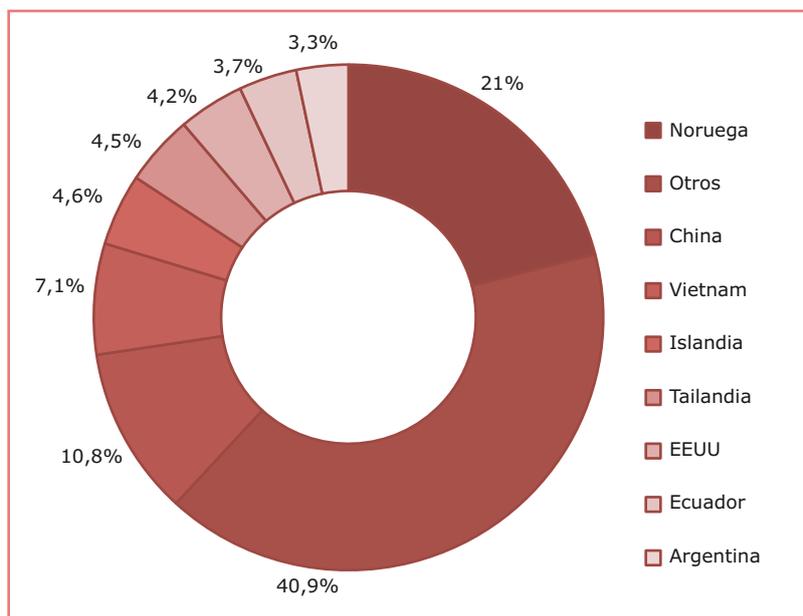
El comercio internacional de animales y sus productos: principios y acuerdos sanitarios.

Según la Oficina Estadística de la Unión Europea (Eurostat) (20), en el año 2010 la Unión de los 27 importó 79,3 millones de toneladas de animales y productos de origen animal. Dentro de las importaciones de carnes y sus preparados, Brasil fue el país de origen principal con casi la mitad del total (45,8 %). Una proporción relativamente elevada de carne de bóvidos de las importaciones de los 27 procede de América del Sur. Dentro de los pequeños rumiantes, la carne de cordero es la principal importada, siendo su origen Nueva Zelanda y Australia. Respecto a las carnes de aves, destacan en número las importaciones de origen brasileño y Tailandés (Gráfica 1). En ese mismo año, el mayor suministrador de productos de la pesca fue Noruega con un 21 %, seguido de China con un 10,8 %, y Vietnam con un 7,1 %. Las importaciones asiáticas en este sector quedan dominadas fundamentalmente por crustáceos, especialmente langostinos y gambas (Gráfica 2). En contraste con el aumento de las importaciones de productos de la pesca a la UE, las proporciones de leche y productos lácteos han sufrido un descenso. Dentro de estos productos, la mantequilla y el queso son los productos más significativos de las importaciones de lácteos representando el 50 % en 2010. Respecto a sus orígenes, más del 53% de los productos lácteos proceden de la vecina Confederación Suiza, mientras que Croacia, Noruega, y Albania forman

Gráfica 1. Principales importaciones UE de carne y productos cárnicos de terceros países. Fuente: Modificado de Eurostat pocket book. Food: From farm to fork statistic. 2011 edition.



Gráfica 2. Principales importaciones UE de productos de la pesca de terceros países. Fuente: Modificado de Eurostat pocket book. Food: From farm to fork statistic. 2011 edition.

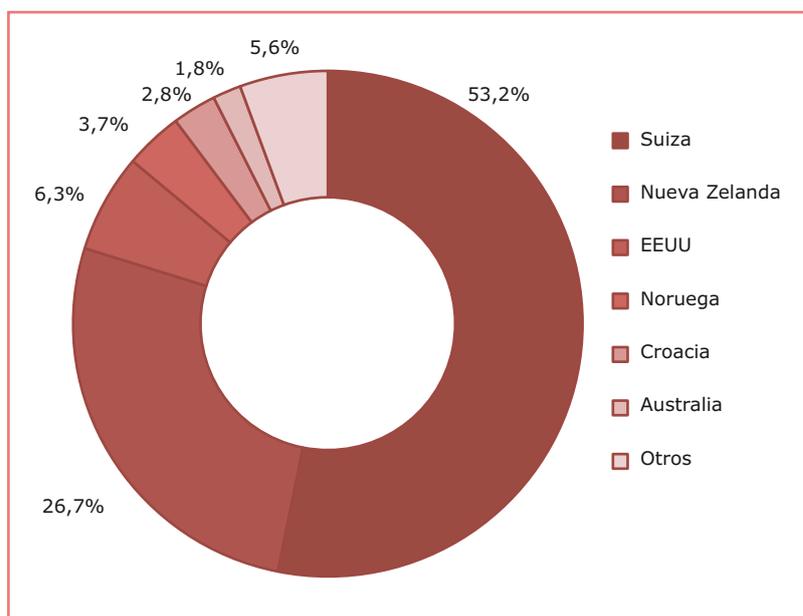


parte de los diez principales socios comerciales de estos productos. El segundo y tercer lugar quedan ocupados por Nueva Zelanda y Estados Unidos respectivamente (Gráfica 3). Ante esta diversidad de orígenes a la par que sistemas de producción, los

países importadores deben establecer una serie de medidas de control en fronteras como ya ha sido comentado. Pero aquí la cuestión no es solo aplicar medidas sanitarias de protección, sino de cómo deben éstas ser aplicadas. Es decir, dentro del marco

del comercio internacional es necesario discernir entre protección y proteccionismo no justificado. Una restricción sanitaria a la importación que no esté realmente justificada por motivos diversos puede ser un instrumento proteccionista muy eficaz debido a su complejidad técnica, y por consiguiente un obstáculo especialmente engañoso y difícil de impugnar, pudiendo esto suponer el desarrollo de barreras injustificadas al comercio internacional, bajo un falaz amparo sanitario. En este sentido queda más que justificado el desarrollo de normas y reglas de carácter internacional emanadas entorno a un acuerdo global, y bajo la tutela de organismos internacionales con competencias en comercio (4). La conclusión de la Ronda Uruguay de Negociaciones Comerciales Multilaterales en Marrakech dio lugar al establecimiento de la Organización Mundial del Comercio (OMC) el 1 de enero de 1995, y a la entrada en vigor del Acuerdo sobre la Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias (MSF), y el Acuerdo sobre Obstáculos Técnicos al Comercio (OTC). Centrándonos en los derechos establecidos en el Acuerdo MSF, los países miembros de la OMC pueden adoptar las medidas sanitarias necesarias para proteger la salud y la vida de las personas y de los animales, siempre que tales medidas no sean incompatibles con las disposiciones de dicho acuerdo. Estas medidas no podrán discriminar de manera arbitraria o injustificable el comercio entre miembros de la OMC, evitándose que estas se conviertan en una restricción encubierta del comercio internacional. Por otro lado, el citado acuerdo establece en su artículo 3 la necesidad de implementar las medidas sanitarias bajo una normativa armonizada en directrices y recomendaciones de organismos internacionales en materia. En este sentido destacamos dentro del marco de los controles veterinarios en fronteras a la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE), la Organización de las Naciones Unidas

Gráfica 3. Principales importaciones UE de productos lácteos de terceros países. Fuente: Modificado de Eurostat pocket book. Food: From farm to fork statistic. 2011 edition.



para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS). En base al artículo 6 del mencionado acuerdo, las medidas sanitarias adoptadas deberán fundamentarse en un previo análisis del riesgo mediante todos sus elementos vertebrados en una evaluación científica cuantitativa y cualitativa. Durante todo el proceso, el principio de transparencia recogido en el artículo 7 debe estar presente con la finalidad de divulgar al resto de los países miembros de la OMC las modificaciones realizadas en sus medidas sanitarias, incluso tras previa petición razonable por otro miembro. Así mismo, el principio de equivalencia queda incluido en el articulado del Acuerdo MSF presentando como objetivo el alcanzar el mismo nivel de protección sanitaria pero con medidas diferentes. Es decir, el país exportador debe convencer al país importador acerca de la similitud de sus medidas sanitarias, que aunque puedan ser distintas, cumplen con los requisitos sanitarios del país importador. A fin de facilitar la evaluación de la equivalencia, los Miembros exportadores están obligados a conceder un

acceso razonable al importador para realizar inspecciones, evaluaciones y demás procedimientos pertinentes. La mayoría de las determinaciones de equivalencia tienen carácter bilateral. Sin embargo, el Acuerdo insta a los Miembros a realizar consultas con el objetivo de lograr también acuerdos de equivalencia multilaterales. Este acceso consentido se fundamenta en el principio de transparencia también desarrollado por el Acuerdo (47).

Controles veterinarios en las fronteras europeas: los Puestos de Inspección Fronterizos

La importancia de los controles veterinarios en las fronteras es un hecho clave en las políticas internacionales y comunitarias de sanidad animal y salud pública, con un claro anclaje histórico. No podemos olvidar el desastre que ocasionó en 1920 la introducción de la peste bovina en Bélgica desde la India a través del comercio, y la creación de la OIE cuatro años más tarde (45). Con la apertura del mercado único a principio de los años 90, las distintas fronteras comunitarias pasaron a formar

Tabla 1. Requisitos zoonosanitarios europeos básicos de importación para animales vivos, y sus carnes y productos cárnicos parcialmente tratados. Fuente: modificación de Batho et al, (2008).

Enfermedad	Estatus sanitario del país tercero (tiempo precedente a la exportación)	Profilaxis vacunal
Peste bovina		
Fiebre aftosa		
Pleuroneumonía contagiosa bovina		
Lengua azul		
Peste porcina africana		
Enfermedad vesicular porcina		
Enfermedad de Teschen	Oficialmente libre	No vacunación
Peste de los pequeños rumiantes	(12 meses)	(últimos 12 meses)
Enfermedad epizootica hemorrágica		
Viruela ovina y caprina		
Fiebre del Valle del Rift		
Fiebre equina africana		
Enfermedad de Newcastle		
Enfermedad de Newcastle (carnes)		No vacunación
Influenza aviar hiperpatógena (carnes)		Permisible
Influenza aviar	Oficialmente libre	No vacunación
	(3 años)	
Estomatitis vesicular contagiosa	Oficialmente libre	No vacunación
	(6 meses)	(últimos 12 meses)

una única frontera europea con criterios de control e inspección homogeneizados, produciéndose para ello el desarrollo y la modificación de una base legal no actualizada a los nuevos tiempos y por tanto, a las nuevas crisis sanitarias (7). En este sentido, y desde el punto de vista de la vigilancia veterinaria en frontera, los puestos de inspección fronterizos adquieren mayor importancia en sus procedimientos acorde a un previo análisis del riesgo realizado por los veterinarios expertos de la Comisión Europea. Los requisitos de sanidad animal y salud pública de los países terceros exportadores previamente sometidos a control in situ por la Oficina Alimentaria y Veterinaria (FVO) de la Comisión, son sometidos a un ejercicio de verificación del cumplimiento de la legislación veterinaria en base a un principio de certificación veterinaria (13,47). En este sentido, el anclaje legal al respecto queda representado por la Directiva 97/78 del Consejo, de 18 de diciembre de 1997, por la que se establecen los principios relativos a la organización de controles veterinarios de los productos que se introduzcan en la Comunidad procedentes de países terceros, y por la que se deroga la

Directiva 90/675/CEE (13), y su transposición a nuestro ordenamiento jurídico nacional mediante el Real Decreto 1977/1999, de 23 de diciembre, por el que se establecen los principios relativos a la organización de los controles veterinarios sobre los productos procedentes de países terceros (25). De forma paralela, y respecto a los controles a realizar en animales vivos, el marco legal se desarrolla en la Directiva 91/496/CEE del Consejo, de 15 de julio de 1991, por la que se establecen los principios relativos a la organización de controles veterinarios de los animales que se introduzcan en la Comunidad procedentes de países terceros (11). Según el artículo 3 del citado Real Decreto, la introducción de las partidas de productos de origen animal procedentes de países terceros en el territorio español, se efectuará exclusivamente a través de un puesto de inspección fronterizo autorizado. Según la Directiva 97/78/CE, estos se definen como cualquier puesto de inspección, designado y autorizado por la Comisión Europea, para realizar los controles veterinarios de los productos que lleguen a la frontera de uno de los 27 territorios comunitarios procedentes de países terceros. De

forma paralela, existen un marco legal que establece que los puestos de inspección fronterizos se compondrán de instalaciones destinadas a los controles veterinarios, bajo responsabilidad del veterinario oficial, o, en el caso de los productos de la pesca, del veterinario oficial o del agente oficial, y en donde se desarrollan los requisitos de infraestructuras, equipo técnico, procedimientos, registros, etc, necesarios para su autorización (9). En virtud de las comentadas normas, los controles veterinarios a realizar sobre animales y productos de origen animal son los siguientes:

Control documental: consistente en verificar que los datos que aparecen en los certificados o documentos veterinarios u otros documentos expedidos en el país tercero, cumplen con la normativa que resulte aplicable, y que la información previa comunicada por el interesado en la carga coincide con dicha documentación.

- Control de identidad: donde los datos que figuran en los certificados o documentos veterinarios u otros documentos que acompañen a las partidas, deben concordar con los productos o animales presentados en la inspección.
- Control físico: los productos y animales presentados en la inspección deben cumplir con los requisitos de la legislación comunitaria o en su defecto nacional y se hallan en condiciones de ser utilizados para los fines que se especifiquen en el certificado o documento veterinario u otros documentos de acompañamiento.

El control documental se fundamenta en el principio de certificación veterinaria establecido en el Título 5 de Código Sanitario de los Animales Terrestres, en adelante el Código Terrestre (46). Los certificados veterinarios deben recoger el cumplimiento avalado por las autoridades veterinarias del país tercero exportador, de los requisitos de sanidad animal y de salud pública establecidos en la legislación comunitaria (31). Desde el punto de

vista zoonosanitario, las exigencias se basan en la probación por parte del país exportador de su estatus sanitario con respecto a las principales enfermedades animales de la lista de la OIE, por su libre estatus de enfermedad y la no vacunación durante un período variable según las enfermedades (**Tabla 1**). Respecto a la vertiente de salud pública, para los productos de origen animal los requisitos que deben cumplir los países terceros exportadores se reducen al cumplimiento de las respectivas secciones y anexos de los reglamentos que forman el paquete de higiene, a la par que del cumplimiento del artículo 29 de la Directiva 96/23 respecto a la presentación de planes de vigilancia de residuos zoonosanitarios actualizados (**2,12**). En materia de higiene general, destacar aquí el Reglamento (CE) N° 852/2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios, y en materia de requisitos específicos de higiene y de control oficial, los Reglamentos (CE) N° 853/2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal y 854/2004, por el que se establecen normas específicas para la organización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano. Finalmente, es necesaria la inclusión del país exportador o partes del mismo, así como de los establecimientos de origen de los productos en listas autorizadas por la Comisión Europea en virtud de los artículos 11 y 12 del Reglamento (CE) N° 854/2004 (**30, 31, 32**). Respecto a los planes de vigilancia de residuos, la Decisión 2011/163/UE establece el listado de países cuyos planes de residuos han sido aprobados en base al mencionado artículo 29 de la Directiva 96/23 (**10**). Además, en función de las especies susceptibles a determinadas enfermedades infecciosas o parasitarias, se incluyen requisitos de salud pública adicionales, siendo este el caso particular de la carne de rumiantes por las encefalopatías transmisibles o la de porcino por la triquinosis dada la importancia zoonótica de ambas enfermedades (**2**). Dentro del control docu-

mental, es necesaria la verificación por parte de los servicios veterinarios del PIF de una serie de garantías anejas a los certificados y a las propias partidas que los amparan. Se incluyen aquí entre otras, la verificación de alertas del RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) de la Comisión Europea, de las características de seguridad de certificación implantadas por determinados países como medida de lucha contra la falsificación (hologramas 3D, marcas de agua, n° de serie, microtexto...) y la comprobación de la existencia de medidas de emergencia o cláusulas de salvaguardia asociadas al tercer país exportador, establecimiento de origen, producto o partida. En cuanto al **control de identidad**, el artículo 4 del Real Decreto 1977/1999 incluye la verificación de los precintos cuando los productos de origen animal lleguen en contenedores, debiendo coincidir con la documentación de origen si así lo exige la legislación comunitaria o nacional en su defecto. Además, es necesaria la comprobación de la presencia de los sellos o marcas oficiales o de salubridad, de identificación del país tercero y del establecimiento de origen, y de su concordancia con los que aparezcan en el certificado o documento veterinario u otros documentos que acompañen a la partida. Finalmente, el **control físico** a realizar sobre los productos de origen animal se resume principalmente en el anexo IV del Real Decreto 1977/1999. Con la finalidad de verificar las garantías de origen certificadas por el país tercero y confirmar que no se han alterado dichas condiciones durante el transporte, se procede a realizar exámenes organolépticos o sensoriales, pruebas físico-químicas simples y determinaciones de laboratorio centradas en la detección de residuos, agentes patógenos, contaminantes y pruebas de alteración. Para ello, y a efectos de comprobar el correcto mantenimiento de la cadena de frío durante el transporte, se verifica la temperatura de los productos y del medio de transporte, así como la forma de estiba, comprobando además posibles pérdidas de fluidos o materias

contumaces. La comprobación de los materiales empleados para entrar en contacto con los alimentos se incluye dentro del control físico, verificándose los requisitos establecidos en la legislación europea y nacional al respecto. La inspección organoléptica del producto se basa en la comprobación de las características de olor, color, consistencia, sabor, textura, transparencia, y turbidez del producto con el fin de detectar cualquier alteración en el mismo (**13**). Respecto a los animales vivos, el artículo 4 de la Directiva 91/496, incluye como control físico el examen clínico de los animales, pruebas de laboratorio, extracciones de muestras oficiales para la detección de residuos y la verificación del cumplimiento de los requisitos mínimos de bienestar animal durante el transporte establecidos en el Reglamento (CE) N° 1/2005, relativo a la protección de los animales durante el transporte y las operaciones conexas (**29**).

Importancia del análisis del riesgo en sanidad exterior

Desde un punto de vista aduanero, el Reglamento (CE) n° 450/2008 por el que se establece el código aduanero comunitario modernizado (**35**), define riesgo como la probabilidad de que se produzca un hecho en relación con la entrada, salida, tránsito, transferencia o destino final de las mercancías que circulen entre el territorio aduanero de la Comunidad y otros países o territorios situados fuera de aquel, o con la presencia de mercancías que no tengan estatuto comunitario, que puedan, en otros, constituir una amenaza para la seguridad y protección de la Comunidad y de sus residentes, para la salud pública, la sanidad animal o la fitosanidad, para el medio ambiente o para los consumidores. Desde un punto de vista sanitario, el análisis de dicho riesgo se define como la ponderación de la probabilidad de un efecto perjudicial para la salud y de la gravedad de ese efecto, como consecuencia de un factor de peligro, siendo un proceso dinámico basado en su determinación, gestión y

comunicación (34,42). Según el Capítulo 2.1. del Código Terrestre, entre los factores que contribuyen a los posibles riesgos en los alimentos de origen animal se incluyen las prácticas ganaderas inadecuadas, las deficiencias de higiene en todas las fases de la cadena alimentaria, la utilización inapropiada de medicamentos veterinarios, la contaminación química o ambiental durante el procesado o extracción del producto o de sus materias primas, ... La preocupación concreta sobre los riesgos alimentarios se centran en la actualidad en los riesgos microbiológicos, residuos zoonos, utilización prohibida o descontrolada de aditivos por encima de los límites máximos legalmente permitidos, contaminantes químicos, incluidas las toxinas biológicas, y otros residuos con impacto en la salud pública fruto de intentos de adulteración fraudulenta de productos, destacando es este sentido como ejemplo la melamina detectada en productos lácteos originarios de China (1,26). Lo cierto, es que la lista al respecto ha seguido aumentando para incluir organismos modificados genéticamente, hormonas y alérgenos, fruto de las nuevas investigaciones prospectivas (41,45). Al respecto, la principal finalidad del análisis del riesgo asociado a las importaciones según el Código Terrestre es proporcionar a los países importadores un método objetivo y justificable para evaluar los riesgos de enfermedad asociados a cualquier importación de animales, productos de origen animal, material genético animal, alimentos para animales, productos biológicos y material patológico (36,37,44). Este se vertebra entorno a tres elementos fundamentales, la determinación del riesgo, su gestión y finalmente su comunicación (42). Dicho análisis en el ámbito de los puestos de inspección fronterizos, se gestiona en base a la información disponible del país exportador y de las inspecciones realizadas por expertos veterinarios de la Unidad F de la Comisión Europea, que a su vez comunica a los estados miembros

cualquier incidencia (comunicaciones, notificaciones RASFF, alertas, ...) respecto a la importación de animales vivos y sus productos (2). Dentro de la evaluación del riesgo, puesto que para la mayoría de las enfermedades figurantes en el Código Terrestre existen normas difundidas y reconocidas internacionalmente, existiendo un amplio consenso sobre los riesgos posibles, una evaluación cualitativa será probablemente suficiente (44). Aunque si bien, ningún método de evaluación del riesgo asociado a las importaciones es aplicable a todas las situaciones y, según las circunstancias, un método puede convenir más que otro (42,45). En este sentido, la evaluación cuantitativa es también necesaria para estudios epidemiológicos sobre la cabaña ganadera (8,21,36,37), o en la determinación de analitos contaminantes en productos de origen animal originarios del país tercero exportador (1). En cualquiera de los casos el análisis del riesgo se desarrolla de forma transparente en base a la experiencia adquirida por las misiones de la FVO, los propios estados miembros a través de sus puestos de inspección fronterizos, y los resultados de la toma de muestra derivada de las alertas del RASFF respecto al país de origen, establecimiento exportador e importador ubicado en la UE (33). La falta de esa transparencia vulneraría este mismo principio establecido en el Acuerdo MSF de la OMC, evitando la fluidez de los intercambios comerciales por trabas sanitarias carentes de nitidez (47).

Canarias como plataforma logística del comercio internacional: un desafío sanitario y veterinario

El archipiélago canario se encuentra en una situación geográfica privilegiada como un espacio de encuentro intermedio entre Europa, África y América. Más allá de una región ultraperiférica, el posicionamiento de canarias como nodo de intercambio tricontinental es un hecho tácito en las políticas de cooperación internacional, económica y de

vecindad de las instituciones públicas y privadas, que se vertebran en amplios intereses comerciales y logísticos (39). Este hecho supone una oportunidad para fomentar la diversificación de la economía del Archipiélago, no debiendo dejar de lado por ello la vigilancia sanitaria. Canarias cuenta aproximadamente con 11 puertos de interés general dependientes de Puertos del Estado, y 8 aeropuertos integrados en AENA. Dentro de estos recintos existen en funcionamiento más de 20 Instalaciones Fronterizas de Control Sanitario de Mercancías, de los cuales 4 son Puestos de Inspección Fronterizos, quedando ampliada esta cifra en un futuro próximo en las islas orientales. La justificación de estas instalaciones y sus futuras ampliaciones responden a unas claras demandas de expansión de negocio en materia de logística comercial en canarias apaciguada hasta la fecha por la actual crisis económica. No debemos olvidar que desde el punto de vista mercantil y financiero, la demanda de productos de origen animal, y especialmente los pesqueros con nuestros vecinos africanos, así como el consumo de estos productos por el canal HORECA canario, es de gran relevancia en una economía local respaldada por los sectores turístico y de servicio, y en donde la salud pública juega un papel de vital importancia (39). Por otro lado, la sanidad animal es la otra pieza integrante dentro de este gran puzzle. La insularidad es una variable de gran consideración dentro del análisis del riesgo al introducir animales o productos de origen animal procedentes de terceros países (45). El ecosistema canario se desarrolla entorno a una homeostasis en donde las condiciones climatológicas, el control sanitario de las poblaciones humana y animal, y sus actividades, así como el control de mercancías juegan un papel de vital importancia. El aislamiento geográfico sin embargo ha propiciado el no desarrollo de las enfermedades animales de gran impacto económico y sanitario que acontecen en el resto de Europa, y que ha impulsado la calificación sanitaria de indemnidad para muchas de ellas por la Comisión

Europa. Pero cierto es que la introducción de algunas de estas enfermedades (Fiebre Aftosa, Pestes Porcinas, Encefalopatía Espongiforme Bovina, enfermedad de Newcastle...) provocaría un desastre a todos los niveles (23). En este sentido, los controles veterinarios en los PIF de las islas se hacen indispensables para garantizar la sanidad animal y la salud pública en los intercambios comerciales con países terceros que utilizan canarias como plataforma europea de logística, protegiendo así la cabaña ganadera y la salud de los consumidores mediante la vigilancia, el seguimiento y el control de las importaciones de partidas conformes, y de las partidas transbordadas conformes o no conformes destinadas al territorio peninsular, a otros Estados Miembros o a otros países terceros (45).

Perspectivas futuras de los controles veterinarios en fronteras

Las nuevas tecnologías aplicadas en el sector primario junto con las buenas prácticas agroganaderas presentan como objetivo primordial no solo abastecer los mercados de proteínas de origen animal, sino además que esta actividad sea rentable. El nacimiento de estos productos surge en explotaciones de países terceros y en sus industrias alimentarias bajo el control de distintos sistemas sanitarios que deben cumplir los estándares europeos (6,7). Este hecho otorgado por la globalización de los mercados genera la necesidad por parte de los estados de fortalecer sus servicios veterinarios oficiales para promover y proteger la salud animal y humana y, al mismo tiempo, facilitar el comercio internacional en el marco del Acuerdo de la Organización Mundial del Comercio sobre Medidas Sanitarias y Fitosanitarias. Fruto de esta dinámica global surgen riesgos sanitarios con un carácter reemergente o emergente, para los que los servicios de inspección veterinaria deben estar preparados (40). En base a esos nuevos peligros, o frente al cambio de la situación epidemiológica cono-

cida para un peligro en cuestión, es necesaria la modificación de los sistemas de inspección. Ya no hablamos solo de auditar toda una cadena agroalimentaria desde la granja a la mesa, ni de únicamente pasar de un solo control oficial al autocontrol (33,40). Los controles veterinarios tienden en la actualidad a dirigirse hacia peligros menos tangibles y evidentes que requieren de un apoyo laboratorial avanzado y acreditado. Es el caso de los residuos zoonosológicos que han hecho aflorar problemas de salud pública como la antibiorresistencia (17), los contaminantes ambientales, destacando aquí el refuerzo de los controles sobre determinados productos japoneses tras el reciente accidente nuclear de Fukushima (27), o la incertidumbre científica respecto a determinados organismos modificados genéticamente (19). Es por ello que los controles en fronteras deben ser sometidos a una revisión con la finalidad de reforzarlos, destacando aquí el trabajo realizado al respecto por la Directora de General of Health and Consumer Protection de la Comisión Europea en cuanto a homogeneizar en un único marco legal los requisitos para los animales vivos y sus productos en línea con el paquete de higiene y la nueva Estrategia de Salud Animal (2007-2013). De forma análoga, la modificación de otros procedimientos aduaneros y paraaduaneros conlleva la necesidad de adaptar los procedimientos de los controles veterinarios sobre animales y sus productos procedentes de países terceros con la finalidad de detectar eficazmente las partidas sujetas a dichos controles, así como agilizar el tiempo de almacenamiento durante un control rutinario o inmovilización (4,44). En cualquier caso, como consecuencia de la expansión de la economía mundial, de la liberalización del comercio de alimentos, de la creciente demanda de consumo, de los avances de la ciencia y tecnología, y de las mejoras del transporte y las comunicaciones, el comercio internacional de alimentos frescos y elabora-

dos continuará aumentando, y el acceso de los países a los mercados de exportación de los alimentos, continuará dependiendo de su capacidad de cumplir los requisitos reglamentarios de los países importadores en base a los estándares fijados por los organismos internacionales en juego. La aparición de nuevos riesgos sin duda seguirá modificando los procedimientos sobre los que sustentan los controles veterinarios tras un previo análisis del riesgo, en donde la comunicación entre autoridades y organismos sanitarios y veterinarios jugarán un papel fundamental en las actuaciones de contención, siendo una muestra de ello en la actualidad, la rápida movilización técnico-científica con respecto a la enfermedad de Schmallenberg realizada por los servicios veterinarios en Europa, y en particular en España, con la notificación del primer caso de esta enfermedad en la provincia de Córdoba el pasado 13 de marzo de este año (7, 27, 29).

Conclusión

La revisión acerca de la intervención de la profesión veterinaria en el campo multidisciplinar de la salud pública es histórica, y demuestra claramente la veracidad de nuestra emblemática profesional "higie pecoris, salus populi". La interrelación entre humanos, animales y medioambiente nunca había adquirido el nivel de importancia asignada en la actualidad. La apertura comercial y la globalización de mercados han acelerado los procesos de intercambio de animales y de productos alimenticios frescos y procesados de origen animal entre diversos países y bloques económicos. Es por ello que los sistemas nacionales de control estén basados en directrices científicas recogidas en reglamentos de organismos internacionales como FAO, la OMS y la OIE, para armonizar las normas sanitarias evitando que estas supongan trabas injustificadas para el flujo comercial. Puesto que las barreras

entre enfermedades animales y humanas son ficticias, estas mercancías no solo acarrear beneficios económicos, sino también posibles peligros para la sanidad animal y la salud pública que deben ser controlados en base a un previo análisis del riesgo. Es por ello, que la actuación del veterinario en los puestos de inspección fronterizos es indispensable para salvaguardar la cabaña ganadera europea y la salud de la población de los 27.

Bibliografía

- 1.- Ahl, A.S., Suttmoller, P. (1997): Contamination of animal products: prevention and risks for public health. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* 16 (2): 297-715.
- 2.- Batho, H., Bendixen, H., Meyer-Gerbautlet, H., Westergaard, J., Bendixen, H., Marchant, B., Porter, A., Williams, J., Brown, M. (2008): *The EU Veterinarian*. 1º de European Commission, Bruselas: 322, 407-430.
- 3.- Bordo, M. D., Taylor, A. M., Williamson, J. G. (2003): *Globalization in Historical Perspective*, Chicago y Londres: University of Chicago Press: 1-10.
- 4.- Brückner, G.K. (2011): Ensuring safe international trade: how are the roles and responsibilities evolving and what will the situation be in ten years' time? *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* 30 (1): 317-324.
- 5.- Cobb S.P. (2011): The spread of pathogens through trade in poultry meat: overview and recent developments. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* 30 (1): 149-164.
- 6.- Comisión Europea. Directorate General of Health and Consumers Protection: http://ec.europa.eu/dgs/health_consumer/index_en.htm.
- 7.- Comisión Europea. (2000): Libro blanco sobre seguridad alimentaria. COM (1999) 719 final.
- 8.- De La Rocque S., Balenghien T., Halos L., Dietze K., Claes F., Ferrari G., Guberti V., Slingenberg J. (2011): A review of trends in the distribution of vector-borne diseases: is international trade contributing to their spread? *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* 30 (1): 119-130.
- 9.- Decisión 2001/812 de la Comisión, de 21 de noviembre de 2001, por la que se fijan las condiciones de autorización de los puestos de inspección fronterizos encargados de los controles veterinarios de los productos introducidos en la Comunidad procedentes de terceros países.
- 10.- Decisión 2011/163/UE de la Comisión, de 16 de marzo de 2011, relativa a la aprobación de los planes enviados por terceros países de conformidad con el artículo 29 de la Directiva 96/23/CE del Consejo.
- 11.- Directiva 91/496/CEE del Consejo, de 15 de julio de 1991, por la que se establecen los principios relativos a la organización de controles veterinarios de los animales que se introduzcan en la Comunidad procedentes de países terceros y por la que se modifican las Directivas 89/662/CEE, 90/425/CEE y 90/675/CEE.
- 12.- Directiva 96/23/CE del Consejo, de 29 de abril de 1996, relativa a las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos y por la que se derogan las Directivas 85/358/CEE y 86/469/CEE y las Decisiones 89/187/CEE y 91/664/CEE.
- 13.- Directiva 97/78, por la que se establecen los principios relativos a la organización de controles veterinarios de los productos que se introduzcan en la Comunidad procedentes de países terceros.
- 14.- Drew, T.W. (2011): The emergence and evolution of swine viral diseases: to what extent have husbandry systems and global trade contributed to their distribution and diversity? *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* 30 (1): 95-106.
- 15.- European Commission. (2007): A new Animal Health Strategy for the European Union (2007-2013) where "Prevention is better than cure". COM 539 (2007) final.
- 16.- European Commission. (2011). General guidance on EU import and transit rules for live animals and animal products from third countries.
- 17.- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. (2010): The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010. *EFSA Journal* 10(3):2598. doi:10.2903/j.efsa.2012.2598.
- 18.- European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control (2012). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010; *EFSA Journal* 10(3):2597. doi:10.2903/j.efsa.2012.2597.
- 19.- EFSA Panels on GMO and AHAW (2012): Scientific Opinion on the Guidance on the risk assessment of food and feed from genetically modified animals and animal health and welfare aspects. *EFSA Journal* 10 (1): 2501. doi:10.2903/j.efsa.2012.2501.
- 20.- Eurostat pocket book. (2011): Food: From farm to fork statistic. Disponible online: www.epp.eurostat.ec.europa.eu.
- 21.- Martínez-López B, Perez AM, De la Torre A, Rodriguez JM. (2008): Quantitative risk assessment of foot-and-mouth disease introduction into Spain via importation of live animals. *Preventive Veterinary Medicine* 15 (86:(1-2):43-56.
- 22.- Murphy, S.P., Allen, L.H. (2003). Nutritional Importance of Animal

- Source Foods. *Journal of Nutrition*. 133: 3932-3935.
- 23.-Narro C, Zinsstag J, Tiongco M. (2012). A One Health Framework for Estimating the Economic Costs of Zoonotic Diseases on Society. *Ecohealth*. 2012 Mar 7[Epub ahead of print].
- 24.-Organización Mundial del Comercio. (2011): Estadísticas del comercio internacional. Disponible online: <http://www.wto.org/indexsp.htm>.
- 25.-Real Decreto 1977/1999, de 23 de diciembre, por el que se establecen los principios relativos a la organización de los controles veterinarios sobre los productos procedentes de países terceros.
- 26.-Reglamento (CE) N° 1135/2009 de la Comisión de 25 de noviembre de 2009 por el que se establecen las condiciones particulares de importación de determinados productos originarios o procedentes de China y se deroga la Decisión 2008/798/CE.
- 27.-Reglamento de Ejecución (UE) 961/2011 de la Comisión, de 27 de septiembre de 2011, por el que se imponen condiciones especiales a la importación de piensos y alimentos originarios o procedentes de Japón a raíz del accidente en la central nuclear de Fukushima y por el que se deroga el Reglamento (UE) 297/2011.
- 28.-Reglamento (UE) n° 1006/2011 de la Comisión, de 27 de septiembre de 2011, por el que se modifica el anexo I del Reglamento (CEE) n o 2658/87 del Consejo, relativo a la nomenclatura arancelaria y estadística y al arancel aduanero común.
- 29.-Reglamento (CE) n° 1/2005 del Consejo, de 22 de diciembre de 2004, relativo a la protección de los animales durante el transporte y las operaciones conexas y por el que se modifican las Directivas 64/432/CEE y 93/119/CE y el Reglamento (CE) n° 1255/97.
- 30.-Reglamento (CE) n° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal.
- 31.-Reglamento (CE) n° 854/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas para la organización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano.
- 32.-Reglamento (CE) n° 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 relativo a la higiene de los productos alimenticios.
- 33.-Reglamento (CE) n° 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales.
- 34.-Reglamento (CE) N° 178/2002 del parlamento europeo y del consejo de 28 de enero de 2002 por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria.
- 35.-Reglamento (CE) n° 450/2008, por el que se establece el código aduanero comunitario (código aduanero modernizado).
- 36.-Revisión del Reglamento Sanitario Internacional (2005), adoptado por la 58.ª Asamblea Mundial de la Salud celebrada en Ginebra el 23 de mayo de 2005. BOE núm. 62, Miércoles 12 marzo de 2008.
- 37.-Sánchez-Vizcaino F, Perez A, Lainez M, Sánchez-Vizcaino JM. (2010): A quantitative assessment of the risk for highly pathogenic avian influenza introduction into Spain via legal trade of live poultry. *Risk Analysis* 30(5):798-807.
- 38.-Sanchez-Vizcaino F, Perez A, Lainez M, Sanchez-Vizcaino JM. (2010): Quantification of the risk for introduction of virulent Newcastle disease virus into Spain through legal trade of live poultry from European Union countries. *Avian Pathology* 39(6): 459-65.
- 39.-Santana-Gallego, M., Ledesma-Rodríguez, F., Pérez-Rodríguez, J. V. (2011): Tourism and trade in small island regions: The case of the Canary Islands. *Tourism Economics* 17 (19): 107-125.
40. Schneider, H. (2011): Good governance of national Veterinary Services. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* 30 (1): 325-338.
- 41.-Sugiura, K., Murray, N. (2011): Risk analysis and its link with standards of the World Organisation for Animal Health. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* 30 (1): 281-288.
- 42.-World Organisation for Animal Health. (2010): Handbook on Import Risk Analysis for Animals and Animal Products. Introduction and Qualitative Risk Analysis. Volume 1. de OIE, Paris.
- 43.-World Organisation for Animal Health. (2012): Inmediaty notification report 2012/1, Ref OIE: 11740.
- 44.-World Organisation for Animal Health (2011): Risk analysis. En *Terrestrial Animal Health Code*, 19ª de. OIE, Paris: 67-72.
- 45.-World Organisation for Animal Health. (2011): The Spread of Pathogens through International Trade. 1ª de Stuart MacDiarmid, Paris.
46. World Health Organization (OIE). 2011. *Terrestrial Animal Code*. Volume 1. Section 2. 20th ed. Paris.
- 47.-World Trade Organization. (1994): Agreement on the Application of Sanitary and Phitosanitary Measure. En *The Results of the Uruguay Round of the Multilateral Trade Organizations. The Legal Text*. WTO, Geneva: 69-84.

Instrucciones para la publicación de artículos

La “**Revista Canaria de las Ciencias Veterinarias**” tiene como objetivo publicar manuscritos que versen sobre todos los aspectos de las Ciencias Veterinarias, que pueden ser redactados bajo diferentes formatos (Artículos de revisión, Artículos científicos, Casos clínicos o Comunicaciones cortas). El artículo deberá ser original y no haberse publicado en ninguna otra revista nacional o internacional.

Normas Generales

Los trabajos se presentarán y copia, mecanografiados a doble espacio en letra Times New Roman 12'. Las tablas y gráficos irán al final, impresas en hojas separadas y numeradas, con leyenda que explique el contenido de la tabla o gráfico. Todas las páginas irán numeradas, aunque no debe hacerse referencia alguna a esta numeración en el texto. Se incluirá diskette con el texto en Word (especificar en la etiqueta del diskette: título, autor y teléfono de contacto). Las tablas y gráficos se incluirán en archivos diferentes. Las imágenes se enviarán en soporte informático en formato TIFF 300 puntos/pixel. Se incluirán los correspondientes pies de fotografías. Las imágenes se enviarán sueltas, y en una hoja aparte, al final del manuscrito, se redactarán los pies de foto. Estas deben remitirse identificadas con un número que se corresponda con su leyenda, y aparecer numeradas y mencionadas en el texto del manuscrito de forma consecutiva. En cualquier caso, es preciso señalar la orientación de la(s) fotografía(s).

Sección Artículo Científicos

Deberá constar de los siguientes apartados:

1. **Título** del manuscrito en la primera página, incluyendo apellidos e inicial del nombre de cada autor; institución o centro y la dirección.
2. **Resumen y summary:** con una extensión máxima de 200 palabras, en el que se expondrá concisamente el objeto de trabajo, los resultados y las conclusiones más relevantes.
3. **Palabras claves** (de 2 a 5).
4. **Introducción.**
5. **Material y métodos.**
6. **Resultados.**
7. **Discusión.**
8. **Bibliografía.**

El título, el resumen y las palabras clave deberán traducirse al inglés.

Sección Casos Clínicos

En esta sección se describen de forma ordenada y objetiva los casos clínicos y su evolución . Se estructurarán de la siguiente forma: resumen, caso clínico, discusión y citas bibliográficas.

Sección Comunicaciones cortas

Las comunicaciones cortas, cuya extensión tendrá un máximo de 800 palabras, deberán ir acompañadas del correspondiente título (no más de 10 palabras), guardando una mínima estructura en su redacción: antecedentes/planteamiento del problema, una pequeña discusión y unas conclusiones finales. El manuscrito debe redactarse sin subdividirse en secciones.

Sesión Artículos de Revisión

Los artículos de revisión se estructurarán a criterio del autor, permitiendo una lectura comprensible. Al final del artículo debe incluirse una bibliografía.

Bibliografía

Se ordenará alfabéticamente, numerándose las citas de modo consecutivo. Todas las referencias bibliográficas serán citadas en el texto con su numeración correspondiente. Los artículos se citan en la revista de la siguiente forma:

3. Rosser, E. (1999): Advances in the diagnosis and treatment of atopy. Vet. Clin. of North Am.: Small Animal Practice 29 (6): 1437.

En el caso de citas de libros:

Muller, GH.; Kirk, RW. Scott, DW (1990): En Dermatología en Pequeños Animales. 4ª de WB. Saunders, Philadelphia: 510-514.

Condiciones de publicación

Los trabajos remitidos serán sometidos a revisión por el Consejo Editorial de la revista, que informará al autor de su aceptación o de su devolución, indicando en este caso las causas de su no publicación.

Envío de artículos

Los artículos se remitirán en soporte magnético junto con las copias en papel al Consejo Editoral, Facultad de Veterinaria, Crtra. Gral. del Norte, km 6,5 nº80, CP 35416. Arucas (Las Palmas); o bien vía e-mail: reveterinaria@canarias.org.

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

El agua potable en Gran Canaria: características de la red de suministro y vigilancia de la salud
Raposo, A.; Pérez, E.; Herrera, M.; Millán, R.; Sanjuán, E.; Carrascosa, C.

Ensayo de inmunoprotección frente a la coccidiosis caprina producida por *Eimeria ninakohlyakimovae* mediante la utilización de ooquistes irradiados
Muñoz, M.C.; Molina, J.M.; Hermosilla, C.; Taubert, A.; Andrada, M.; Lara, P.C.; Bordón, E.; Pérez, D.; López, A.M.; Matos, L.; Guedes, A.C.; Falcón S.; Falcón, Y.; Martín, S.; Ruiz, A.

Actividad in vitro de la planta endémica canaria *Ruta pinnata* frente al coccidio caprino. *Eimeria ninakohlyakimovae*
López, A.M.; Muñoz, M.C.; Molina, J.M.; Hermosilla, C.; Taubert, A.; Pérez, D.; Matos, L.; Guedes, A.C.; Martín, S.; Ruiz

El agua potable en Gran Canaria: características de la red de suministro y vigilancia de la salud
Raposo, A.; Pérez, E.; Herrera, M.; Millán, R.; Sanjuán, E.; Carrascosa, C.

Aplicación de la citometría de flujo al estudio de las células IgM positivas de doradas (*Sparus aurata*) vacunadas frente *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*
Grasso, V.; Janeiro de Assunção, P.; Padilla, D.; El Aamri, F.; Román, L.; Real, F. y Acosta, F.

Refrigeración y congelación seminal en la especie canina: ¿métodos independientes o adicionales?
Batista, M.; Santana, M.; Álamo, D.; Cabrera, F.; González, F.; Gracia, A.

Reconstrucción tridimensional de la columna cervical en dos potros neonatos
Carrascosa, C.; Fernández, T.; Suárez, F.; Suárez-Bonnet, A.; Riskallal, C.; Rivero, M.A.; Raduan Jaber, J.

Hepatitis Reactivas no Específicas en Delfines Mulares (*Tursiops truncatus*) varados en las Islas Canarias: Estudio Patológico e Inmunoquímico
Conrado Carrascosa, T.; Fernández, M. M.; Suárez-Bonnet, A.; Suárez, F. Raduan Jaber, J.

CASOS CLÍNICOS

Expresión inmunohistoquímica de COX-2 en neoplasias caninas y felinas. Utilidad terapéutica
Suárez-Bonnet, A.; Herráez, P.; Espinosa de los Monteros, A.

Inmunotipificación de linfomas. Herramienta diagnóstica de valor pronóstico
Suárez-Bonnet, A.; Espinosa de los Monteros, A.; Herráez, P.

Torsión de lóbulo pulmonar: Revisión de la bibliografía a propósito de un caso clínico
Suárez-Bonnet, A.; Quesada-Canales, O.; Aguirre-Sanceledonio, M.; Arbelo, M.; Vega, G.; Medina, N.; Andrada, M.

COMUNICACIONES CORTAS

Expresión inmunohistoquímica de COX-2 en neoplasias caninas y felinas. Utilidad terapéutica
Suárez-Bonnet, A.; Herráez, P.; Espinosa de los Monteros, A.

ARTÍCULOS DE REVISIÓN

Paralelismo entre la artritis reumatoide humana y la artritis por microplasma en las especies animales
Ramírez, A. S.; Rosales, R. S.; Suárez-Pérez, A.; Poveda, C. G.; Vega-Orellana, O.; Mederos Iriarte, L. E.; Poveda, J. B.

Fiebre Q
Fleitas, J. L.; Rosales, R. S.; Suárez-Pérez, A.; Poveda, C. G.; Vega-Orellana, O.; Mederos-Iriarte, L. E.; Ramírez, A. S.

Pioderma Canina
Ortega, D.; Acosta, B.; Ferrer, O.

Importancia de los controles veterinarios en fronteras como garantes de la sanidad animal y la salud pública en Europa
Samuel Contreras Falcón



Máster en Sanidad y Seguridad Alimentaria Doctorado en Sanidad y Seguridad Alimentaria

Ilustre Colegio Oficial de Veterinarios de Las Palmas
Ilustre Colegio Oficial de Veterinarios de S/C de Tenerife

