



ISSN 0376 - 4362

Publicación de la  
Sociedad de Medicina  
Veterinaria del Uruguay

**REDACTOR RESPONSABLE**  
Hugo Fontañá, DMV  
Presidente SMVU

**CONSEJO EDITOR**  
†Prof. Walter García Vidal, DMV MSc.  
Academia Nacional de Veterinaria  
Aldrovandi, Ariel; DMTV  
Facultad de Veterinaria  
Carro, Silvana; DMTV  
Facultad de Veterinaria  
Jaime Gril

Bachiller Facultad de Veterinaria  
Kremer, Roberto; DV; MSc.  
Facultad de Veterinaria  
Maisonave, Jacqueline; DV; PhD.  
Facultad de Veterinaria  
Marianita Olivera

**DILAVE "Miguel C. Rubino"**  
Pérez C., Raquel; DV; MSc  
Facultad de Agronomía  
Puignau, Juan P. DMV;  
**IICA - Uruguay**  
Solari, María A.; DV;  
**DILAVE "Miguel C. Rubino"**  
**ASESOR**

Bibliotecóloga Elba Dominguez,  
Técnico de Hemeroteca, Dpto. Doc. y  
Biblioteca, Facultad de Veterinaria.  
Montevideo - Uruguay.

**EDITOR**

Walter Roel  
Ediciones Maya  
Joaquín de Salterain 1520 - Tel. 417596

**PUBLICIDAD**

Luis Roel  
Tel. 63 16 64

**COMPOSICION ARMADO Y  
DIAGRAMACION**

Dra. Ana M. Cópola

**IMPRESION**

Tall. Graficos Vanguardia S.A.  
Dep. Legal 8268/95

## CONTENIDO

### Estudio ultraestructural de las fibras del Sistema Elástico en el vínculo del Gallus gallus dom. 1. adulto

Pérez Carrascosa, V.; Cotta Pereira, G.; Calvo Marín, J.; Fila varela, D.

3

### Posibilidades del dot-ELISA para el diagnóstico de la fascioliasis bovina

Castro, E.; Freyre, A.; Falcón, D.; Molinari, C.

8

### Estrategias de control de síndrome de Tristeza en un establecimiento ganadero

Fuentes, J.J..

17

### La sanidad animal y el comercio global agropecuario

Casas Olascoaga, R.

19

Esta edición consta de 2.500 ejemplares y se distribuye sin costo a todos los socios de la Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay. Por suscripciones: ANTEL : 62.08.73 c/u \$50, anual (4) \$ 200. Las suscripciones no canceladas antes del 31 de diciembre de cada año se considerarán tácitamente renovadas para el año siguiente. Esta publicación no se responsabiliza por los conceptos vertidos por los autores. Se autoriza la reproducción total o parcial de los resúmenes editados mencionando la fuente. Canje de Revista "VETERINARIA" a cargo del Departamento de Documentación y Biblioteca de la Facultad de Veterinaria (convenio SMVU/Fac. Vet. 16/12/1988).

FACULTAD DE VETERINARIA FOTO CARATULA: CASA DEL VETERINARIO - CERRO LARGO 1895

Entrado y  
El 25 de Julio 1995  
Donación -

COMITE DE ARBITROS DE TRABAJOS CIENTIFICOS 1989 - 1994

ALEIXO, J.A.	(D.V.)	BRASIL	LOPEZ PEREZ, A.	(DV)	URUGUAY
ALVES P., C.	(DMV)	BRASIL	MARTIN E.	(DMV)	ARGENTINA
AZZARINI, M.	(Ing. Agr.)	URUGUAY	NARI, A.	(DMV)	URUGUAY
BOSCH, R.	(DMV)	ARGENTINA	NIETO, A.	(DQ)	URUGUAY
CAPANO, F.	(DMV)	URUGUAY	PERDOMO, E.	(DMV)	URUGUAY
CASAS OLASCOAGA, R.	(DMV)	URUGUAY	PEREZ CLARIGET, R.	(DMV)	URUGUAY
CARBALLO, M.	(DMV)	URUGUAY	QUINONES S., C.	(DMV)	URUGUAY
CARDOZO, H.	(DMV)	URUGUAY	QUINONES, J.	(DMV)	ARGENTINA
CAVESTANY, D.	(DMV)	URUGUAY	RIET ALVARIZA, F.	(DMV)	URUGUAY
CUENCA, L.	(DMV)	URUGUAY	RIET CORREA, F.	(DMV)	BRASIL
CUELLAR ORDOÑEZ, J.A.	(MVZ)	MEXICO	RODRIGUEZ, M. I.	(DMV)	ARGENTINA
da SILVEIRA OSORIO, J.C.	(DMV)	BRASIL	RODRIGUEZ, A.M.	(Ing. Agr.)	URUGUAY
DURAN DEL CAMPO, A.	(DMV)	URUGUAY	SCARSI, R.	(DMV)	URUGUAY
EHEVARRIA, C.	(DV)	BRASIL	SCHINCA F., R.	(MV)	MEXICO
ERLICH, R.	(Lic. Biol.)	URUGUAY	RODRIGUEZ H.	(DMV)	SUECIA
FERNANDEZ, D.	(Ing. Agr.)	URUGUAY	TREJO GONZALEZ, A.	(MC)	MEXICO
FORCHETTI, O.	(DMV)	ARGENTINA	TOLOSA, J. S.	(DMV)	ARGENTINA
GIL TURNES, C.	(DMV)	BRASIL	TONNA, H.	(DMV)	URUGUAY
GUARINO, H.	(DV)	URUGUAY	TORTORA, J.	(DMV)	MEXICO
HOLENWNGER, J.	(DMV)	URUGUAY	VAZQUEZ, M.	(DMV)	ARGENTINA
IBANEZ, N.	(PROF.)	ARGENTINA	VIDOR, T.	(DMV)	BRASIL
LOPEZ BAÑOS, B.	(MVZ)	MEXICO	YARZABAL, L.	(DM)	URUGUAY

SOCIEDAD DE MEDICINA VETERINARIA DEL URUGUAY

CONSEJO DIRECTIVO

**PRESIDENTE:** Dr. Hugo Fontaina  
**VICE-PRESIDENTE:** Dr. Julio García Lagos  
**SECRETARIO:** Dr. Ignacio Pereira  
**PRO SECRETARIO:** Dra. María A. Solari  
**TESORERO:** Dra. Adriana Rodríguez  
**PRO TESORERO:** Dr. Luis Delucchi  
**SECRETARIA DE ACTAS:** Dra. Virginia Diana

ASOCIACIONES ESPECIALIZADAS  
 QUE INTEGRAN LA S.M.V.U.

**Comisión de Reproducción e  
 Inseminación Artificial**  
**Sociedad de Buiatría del Uruguay**  
**Comisión de Industria Pesquera y Acuicultura**  
**Asociación de Veterinarios**  
**en el área de la carne**  
**Asociación Uruguaya de  
 Veterinarios Laboratoristas**

CENTROS VETERINARIOS AGRUPADOS EN LA SOCIEDAD

<b>ARTIGAS</b> Dra Marianela Acevedo L. A. de Herrera 380 C.P. 55.000	Trinidad C.P. 85.000	Dr. José Martínez	18 de Julio 431
<b>TOMAS GOMENSORO</b> Dr. Nelson Barreda 25 de Agosto s/n C.P. 55.002	<b>FLORIDA</b> Dr. Rodolfo Azzarini Cardozo 495 C.P. 94.000	Julián Graña 124 C.P. 27.000	C.P. 45.100
<b>PANDO</b> Dr. Eduardo Bianchi 25 de Mayo 1017 C.P. 91.000	<b>LAVALLEJA</b> Dr. Gonzalo Curotto Veterinaria "La Mariscal" Mariscal C.P. 30.001	Rocha	Paso de los Toros
<b>CERRO LARGO</b> Dr. Hugo Arambillete A.Saravia 437 C.P. 37.000 Melo	<b>MALDONADO</b> Dr. Juan C. Dibarboure 25 de Mayo 892 Maldonado C.P. 20.000	<b>SALTO</b> Dr. Julio Hirigoyen Amorin 55 C.P. 50.000 Salto	<b>TREINTA Y TRES</b> Dr. Luis Tarán Rincón 203 C.P. 33.000 T. y Tres
<b>COLONIA</b> Dr. Guillermo Piferer Limite Oeste 1818 C.P. 70.002 Tarariras	<b>PAYSANDU</b> Dr. Eduardo Paradiso Uruguay 1189 C.P. 60.000	<b>SAN JOSE</b> Dr. Jorge Marra 18 de Julio 589 C.P. 80.000	<b>CHUY</b> Dr. Julio Correa Rocha Artigas 360 C.P. 27.100 Chuy
<b>DURAZNO</b> Dr. Carlos Etcheverrito 18 de Julio 386 C.P. 97.000	<b>RIO NEGRO</b> Dr. Carlos De Mateo 19 de Abril 1920 Young C.P. 65.100	San José	<b>SANTA LUCIA</b> Dr. Gustavo Naya Rivera 330 C.P. 90.700
<b>FLORES</b> Dr. Hugo Rusiñol Batlle y Ordóñez 893	<b>RIVERA</b> Dr. Rafael Piazze Agraciada 558 ap. 2 Rivera C.P. 40.000	<b>SORIANO</b> Dr. Fernando López Serafin Rivas 730 C.P. 75.000 Mercedes	<b>VICHADERO</b> Dr. Carlos Saravia Joaquín Correa s/n C.P. 40.003 Vichadero
	<b>ROCHA</b>	<b>TACUAREMBO</b> Dr. Antonio Albernaz Ituzaingó y Gral. Flores (Asoc. Rural) C.P. 45.000 Tacuarembó	<b>TACUAREMBO</b> Dr. Antonio Albernaz Ituzaingó y Gral. Flores (Asociación Rural) C.P. 45.000
		<b>PASO DE LOS TOROS</b> Dr. José Baptista	

# Estudio ultraestructural de las fibras del Sistema Elástico en el vínculo del *Gallus gallus dom.* l. adult.

Pérez Carrascosa, V. \*; Cotta Pereira, G.\*\*; Calvo Marín, J. \*\*; Fila Varela, D.\*\*\*\*

## RESUMEN

Utilizando la técnica preconizada por Cotta-Pereira y cols. (1976) se pudieron distinguir en los vínculos de animales adultos, los tres tipos de fibras del Sistema Elástico.

De este modo se observaron las fibras elásticas constituidas por material amorfo central envuelto por microfibrillas de 10 a 12 nm. de diámetro. Las fibras oxitalámicas constituidas solamente por haces de microfibrillas de aspecto tubular de 10 a 12 nm. de diámetro. Las fibras elaunínicas de características intermedias, constituidas por haces de microfibrillas con escaso material amorfo electrodenso.

La presencia de fibroblastos con un sistema vacuolar bien desarrollado, así como la íntima relación entre los distintos tipos de fibras del sistema elástico en el vínculo, indicarían que estas células son responsables de sintetizar los componentes de dichas fibras.

La presencia de fibras oxitalámicas y elaunínicas representan fases ontogénicas de la formación de las fibras elásticas, esto indicaría que la elastogénesis es un proceso continuo durante toda la vida del animal.

*Palabras Clave:* Sistema Elástico, fibras elásticas, fibras elaunínicas, fibras oxitalámicas.

## SUMMARY

Using the technique advocated by Cotta-Pereira et al. (1976), it was possible to distinguish in the vincula of adult animals the three types of fibers of the Elastic System.

In this hand, were observed that the elastic fibers made up of central amorphous material enveloped by 10 to 12 nm. diameter microfibrils. The oxitalan fibers consist only of bundles of microfibrils of tubular appearance, also 10 to 12 nm. in diameter. The elaunin fibers, with characteristic intermediate, made up of bundles of microfibrils with scarce intermingled electrodense amorphous material.

The presence of fibroblasts with a well developed vacuolar system, as a close relationship between the different types of fibers of the elastic system in the vinculum, indicated that these cells are responsible for the synthetization of the components of such fibers. The presence of oxytalan and elaunin fibers representing ontogenic phases in the formation of elastic fibers is assumed to indicate that the elastogenesis is a continued process throughout the life of the animal.

*Keywords:* Elastic Sistem, elastic fibers, elaunin fibers, oxitalan fibers.

## INTRODUCCION

Los vínculos son haces de tejido conjuntivo que se localizan sobre la superficie dorsal del tendón flexor

digital profundo. Están constituidos por fibras elásticas y colágenas densamente agrupadas.

Las fibras elásticas han sido reconocidas histológicamente

desde hace muchos años (Unna, 1891; Weigert, 1898; Verhoeff, 1908). Estudios ultraestructurales demuestran que las fibras elásticas están constituidas por dos

\*Profesor Adjunto, Dpto. de Morfología y Desarrollo, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay.  
Dpto. de Morfología, Facultad da Saude, Universidade de Brasilia, Brasil.

\*\*Profesor Titular, Laboratorio de Histología y Embriología, Instituto de Biología, Universidade de Estado de Rio de Janeiro, Brasil.

\*\*\*Asistente, Dpto. de Morfología y Desarrollo, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay.

\*\*\*\*Ayudante, Depto. de Morfología y Desarrollo, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay.

sustancias químicas separables (Ross y Bornstein, 1969; Ross, 1973). En las fibras elásticas maduras, el centro está compuesto de material amorfo, homogéneo, que representa cerca del 90 % de las mismas (Geenlee y cols., 1966; Ross y Bornstein, 1971; Kanai y Kaufman, 1972; Ross, 1973; Cotta-Pereira y cols., 1976; Spicker y cols., 1975), en el cual fue identificada la proteína elastina (Ross y Bornstein, 1969). El otro componente circunda el material amorfo central y está formado por haces de microfibrillas.

Junto con las fibras elásticas pueden encontrarse otras, que aunque no poseen elastina o la presentan en pequeña cantidad, constituyen parte de un Sistema Elástico de fibras conjuntivas.

Las fibras oxitalámicas fueron observadas inicialmente por Fullmer (1958), su ultraestructura revela que están constituida por haces de microfibrillas (Carmichael y Fullmer, 1966) de 10 a 12 nm. de diámetro, semejante al de las microfibrillas de las fibras elásticas (Rodrigo y Cols., 1973; Cotta-Pereira y cols., 1976 a, 1978, 1979). El otro elemento del Sistema Elástico lo constituyen las fibras elauónicas descritas por Gawlik (1965). La ultraestructura de éstas revela un material amorfo disperso entre las microfibrillas (Cotta-Pereira y cols., 1975, 1976 a; Rodrigo y cols., 1973).

En el presente trabajo, se pretende estudiar los tipos de fibras que presenta el Sistema Elástico en el vínculo del Gallus gallus dom. l. adulto por el método de microscopía electrónica.

#### MATERIALES Y METODOS

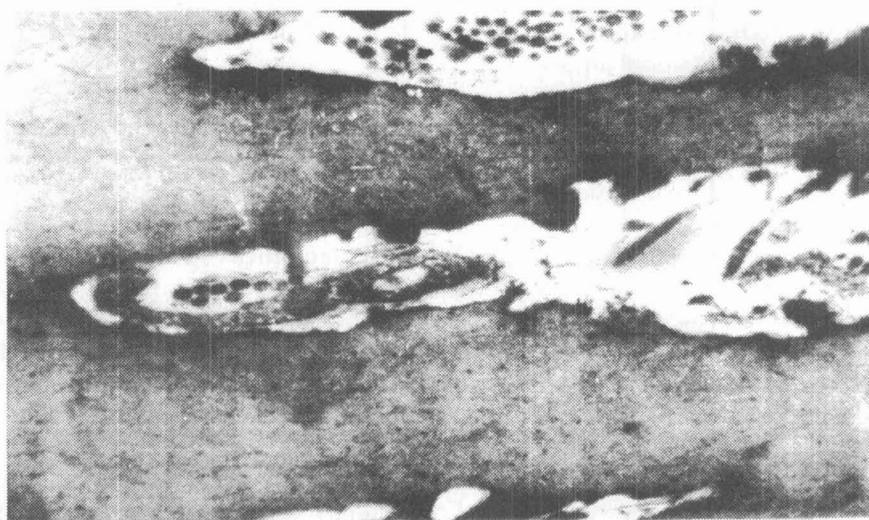
Se sacrificaron por decapitación ocho Gallus gallus dom. adultos de la raza Leghorn, de los

que fueron retirados los dedos. Se obtuvo por disección fragmentos de la región mediana del vínculo, los que fueron fijados durante 2 horas en solución de glutaraldeído al 3 % y ácido tánico al 0,25 % en tampón Millonig 0,1 M, pH 7,3 (Futaesaku y cols., 1972; Cotta-Pereira y cols., 1976 b). Después los fragmentos fueron lavados en solución tampón y postfijados en tetróxido de osmio al 1 % en tampón Millonig 0,1 M Ph 7,3, durante 1 hora. Posteriormente, el material fue deshidratado en soluciones crecientes de etanol, y, después de tres cambios de óxido de propileno, se procedió a la inclusión en Epón 812 a 60 °C durante 48 horas. En la inclusión los fragmentos fueron orientados con el fin de obtener cortes longitudinales y trans-

colorcados con azul de toluidina en carbonato de sodio y examinados al microscopio óptico para la orientación de los cortes ultrafinos (60-90 nm). Estos últimos, fueron recogidos en rejillas con retícula de 200 a 400 cuadrículos, contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo, y examinados en microscopio electrónico ZEISS, E.M. 9B. con posterior obtención de electromicrografías.

#### RESULTADOS

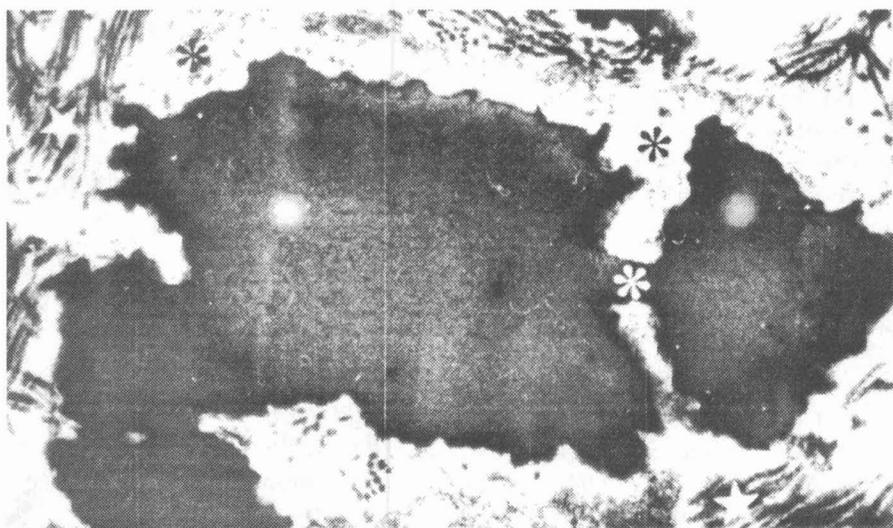
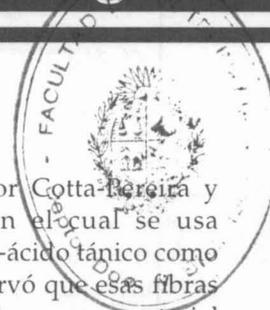
En los cortes longitudinales de la parte mediana del vínculo se observó la presencia de gran cantidad de fibras elásticas orientadas principalmente en sentido longitudinal, de diferentes diámetros y longitud variable. Cada



**Fig. 1.** Electromicrografía de la región mediana del vínculo mostrando fibras elásticas maduras cortadas longitudinalmente. El material amorfo aparece en negro. La fibra se presenta ramificada. Fibrillas de colágeno se observan entre las ramificaciones de la fibra elástica (estrella). Aumento: \* 36.000.

versales. En ultramicrotomo SORVALL modelo Parter-Blum MT2-B se obtuvieron cortes semifinos (1 um), los que fueron colocados en láminas de vidrio,

fibra mostró un constituyente principal central y electrodenso, ocasionalmente se observaron algunas microfibrillas periféricas. Se evidenció la presencia de



**Fig. 2.** Electromicrografía de la región mediana del vínculo mostrando fibras elásticas cortadas transversalmente con el material amorfo en negro y su relación con prolongaciones citoplásmicas de fibroblastos (asteriscos negros) y con fibrillas de colágeno (estrella). Se observan 2 fibras elásticas unidas por un puente de material amorfo (asterisco blanco). Aumento: \* 18.000.

ramificaciones (Fig. 1).

En las regiones situadas entre las numerosas y espesas fibras elásticas observamos fibrillas de colágeno y prolongaciones celulares pertenecientes a fibroblastos (Fig. 1 y 2).

Además de las fibras elásticas y de las fibrillas de colágeno, se visualizaron haces de microfibrillas que corresponden ultraestructuralmente a las fibras oxitalámicas (Fig 3), las que miden de 10 a 12 nm. de diámetro. En corte transversal presentaban una región central poco densa, rodeada por una región electrodensa, dando apariencia tubular. También fueron observados haces de microfibrillas con material electrodensito entremezclado, de características ultraestructurales similares a las descritas para las fibras elauinicas (Fig 3).

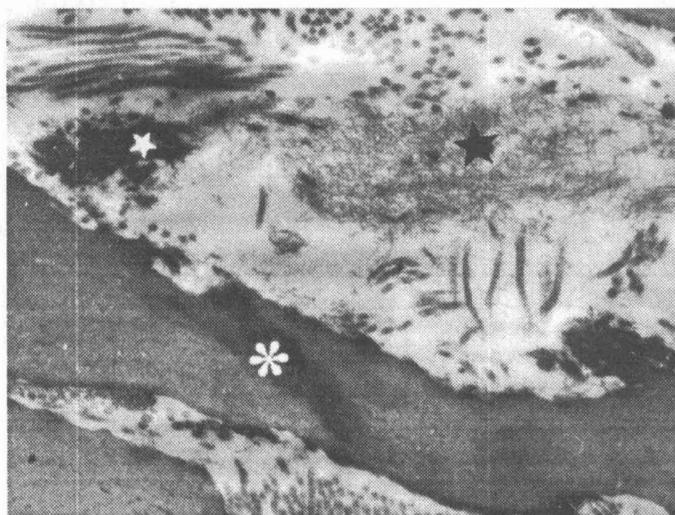
#### DISCUSION

La microscopía electrónica

mostró que las fibras que constituyen la mayor parte del vínculo del animal adulto, corresponden al patrón estructural de las fibras elásticas. La identificación se hizo con la técnica

preconizada por Cotta-Pereira y cols. (1976), en el cual se usa glutaraldehído -ácido tánico como fijador. Se observó que esas fibras están constituidas por un material amorfo central electrodensito, envueltas por microfibrillas de 10 a 12 nm. de diámetro.

Se observaron fibras oxitalámicas formadas por haces de microfibrillas, de 10 a 12 nm de diámetro como fueron descritas por Cotta-Pereira y cols. (1976), las que aparecen en corte transversal con una zona central poco coloreada, y otra periférica electrodensa, lo que les da una apariencia tubular. Estos datos concuerdan con los de Fahrenbach y cols. (1966), Greenlee y cols. (1966), Jones y Barson (1971) y Cleary y cols. (1981), no siendo esta la característica observada por Kewley y cols. (1978). Feroze (1982) mencionó que la apariencia tubular en el corte transversal de las microfibrillas se debería al hecho que, en los cortes ultrafinos



**Fig. 3.** Electromicrografía de la región mediana del vínculo mostrando un fibra elástica madura constituida principalmente por amorfo que aparece en negro (asterisco). También puede observarse una fibra oxitalámica formada por microfibrillas (estrella negra) y una fibra elauinica que presenta material amorfo disperso entre las microfibrillas (estrella blanca). Aumento: \* 17.000.

contrastados con uranilo y plomo, estos se depositaran en la periferia de la microfibrilla, permaneciendo el centro claro. Ya Cleary y cols. (1981) informaron que las microfibrillas se constituyen, en realidad, de una región central proteica envuelta por varias cadenas de glucoproteínas dispuestas en espiral. Estos dos componentes de las microfibrillas, de características tintoriales diferentes, tratados con uranilo y plomo, mostraron una parte central clara y otra periférica oscura. Mayores informaciones son necesarias para que se afirmen opiniones contrarias.

De acuerdo con lo descrito por Cotta-Pereira y cols (1976), usando la técnica del glutaraldehído y ácido tánico, las fibras elásticas se revelaron como haces de microfibrillas y material amorfo electrodenso entremezclado.

Los fibroblastos presentes en el vínculo son, aparentemente las células capaces de sintetizar los componentes de las fibras elásticas. La presencia de un sistema vacuolar citoplasmático bien desarrollado especialmente el retículo endoplásmico rugoso con fino material en su interior. El aparato de Golgi, evidencia la actividad biosintética de esta célula. A esto podemos agregar la íntima relación entre los diferentes tipos de fibras y estas células, por medio de prolongaciones citoplasmáticas o invaginaciones de la membrana celular, hecho observado por Schwarz (1964) y Fahrenbach y cols. (1966). Debido a que estos tres tipos de fibras presentes en el vínculo del animal adulto, representan las fases ontogénicas en el desarrollo de las fibras elásticas (Fahrenbach y cols., 1966; Jones y Barson, 1971 y Albert, 1972) se podría sugerir que la elastogénesis es un proceso

continuo y que se produce durante toda la vida del animal, aunque con diferentes ritmos. Este hecho también fue observado por Braverman y Fofenko (1982) en la dermis humana.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Albert, E.N. (1972). Developing elastic tissue: an electron microscopic study. *Am. J. Pathol.*, 69: 89-94.
2. Braverman, I.M. y Fofenko, E. (1982). Studies in cutaneous aging: I: The elastic fiber network. *J. Invest. Dermatol.*, 78: 434-443.
3. Carmichael, G.G. y Fullmer, H.M. (1966). The fine structure of oxytalan fiber. *J. Cell. Biol.*, 28: 33-36.
4. Cleary, E.G.; Fanning, J.C. y Prosaer, I. (1981). Possible roles of microfibrils in elastogenesis. *Connective Tissue Res.*, 8: 161-166.
5. Cotta-Pereira, G.; Kattembach, W.M. y Rodrigo, F.G. (1979). Elastic-related fibers in basement membranes. *Front. Matrix Biol.*, 7: 90-100.
6. Cotta-Pereira, G.; Rodrigo, F.G. y Bittencourt-Sampaio, S. (1975). Ultrastructural study of elastin fibers in the secretory coil of human eccrine sweat glands. *Brit. J. Dermatol.*, 93: 623-629.
7. Cotta-Pereira, G.; Rodrigo, F.G. y Bittencourt-Sampaio, S. (1976a). Oxytalan, elastin and elastic fibers in the human skin. *J. Invest. Dermatol.*, 66: 143-148.
8. Cotta-Pereira, G.; Rodrigo, F.G. y David-Ferreira, J.F. (1976b). The use of tannic acid-glutaraldehyde in the study of elastic fibers. *Stain Technol.*, 51: 7-11.
9. Cotta-Pereira, G.; Rodrigo, F.G. y David-Ferreira, J.F. (1978). Comparative study between the elastic system fibers in the human thin and thick skin. *Biol. Cellulaire*, 31: 297-302.
10. Fahrenbach, W.H.; Sandberg, L.B. y Cleary, E.G. (1966). Ultrastructural studies on early elastogenesis. *Anat. Rec.*, 155: 563-575.
11. Feroze, N.G. (1982). Ultrastructural pathology of the cell and matrix. 2nd. p. 908. Butterworths London.
12. Fullmer, H.M. (1958). Differential staining of connective tissue fibers of stress. *Science*, 127: 1240.
13. Futaesaku, Y.; Mizuhira, V. y Nakamura, H. (1972). The new fixation method using tannic acid for electron microscopy and some observation of biological specimens. *Proceedings of International Congress of Histochemistry and Cytochemistry*, 4: 155-156.
14. Gawlik, K. (1965). Morphological and morphochemical properties of the elastic system in the motor organ of man. *Folia Histochem.*

- Cytoch., 3: 233-251.
15. **Greenlee, T.K.; Ross, R. y Hartman, J.L.** (1966). The fine structure of elastic fibers. *J. Cell Biol.*, 30: 59-71.
  16. **Jones, A.W. y Barson, A.J.** (1971). Elastogenic in the developing chick lung: a light and electron microscopic study. *J. Anat.*, 110: 1-15.
  17. **Kanai, A. y Kaufman, H.E.** (1972). Electron microscopic studies of the elastic fiber in human sclera. *Invest. Ophthal.*, 11: 816-820.
  18. **Kewley, M.A.; Williams, G. y Steven, F.S.** (1978). Studies of elastic tissue formation in the developing bovine ligamentum nuchae. *J. Path.*, 124: 95-101.
  19. **Rodrigo, F.G.; Cotta-Pereira, G. y Riches, D.J.** (1973). Ultrastructural observations on uninvolved skin in dermatitis. "Elastic" versus "reticular" fibrils. *Brit. J. Dermat.*, 89: 543-545.
  20. **Ross, R.** (1973). The elastic fiber. A review. *J. Histochem. Cytochem.*, 21: 199-208.
  21. **Ross, R. y Bornstein, P.** (1969). The elastic fibers. I: The separation and partial characterization of its macromolecular components. *J. Cell Biol.*, 40: 366-381.
  22. **Ross, R. y Bornstein, P.** (1971). Elastic fiber in the body. *Sci. Amer.*, 224: 44-52.
  23. **Schwarz, W.** (1964). Elektronenmikroskopische untersuchungen uber die bildung elastischer fasern in der gewebekultur. *Z. Zellforsch.*, 63: 636-643.
  24. **Spicker, S.S.; Brissie, R.M. y Thompson, N.T.** (1975). Variability of dermal elastin visualized ultrastructurally with iron hematoxylin. *Am. J. Path.*, 79: 481-498.
  25. **Unna, P.G.** (1891). Notiz betreffend die tanzersche orcein farbung des elastischen gewebes. *Prakt. Dermat.*, 12: 394-396.
  26. **Verhoeff, F.H.** (1908). Some new staining of wide applicability. Including a rapid differential stain for elastic tissue. *J. Am. Med. Assoc.*, 50: 876-877.
  27. **Weigert, C.** (1898). Uber eine methode zur farbung elastischer fasern. *Zentralbl. Allgem. Path.*, 54: 289-292.

Aprobado para su publicación:  
10/10/95.

**USE LA  
CABEZA.**



**USE IVOMEC**

**MSD AGVET**   
División de Merck Sharp & Dohme

**cibeles**   
12 de Diciembre 767  
Teles.: 201278 - 291001 - 206231

# Posibilidades del dot-ELISA para el diagnóstico de la fascioliasis bovina\*

Castro, E.\*\*; Freyre, A.\*\*; Falcón, D.\*\*; Molinari, C.\*\*

## RESUMEN

Se evaluó la técnica de dot-ELISA para la detección de anticuerpos contra *Fasciola hepatica* en 57 sueros de vacas y novillos raza Hereford, de frigorífico, empleando como antígeno los productos de secreción/excreción del parásito adulto.

Veinte vacunos que presentaban sólo ejemplares adultos de *F. hepatica* y sin lesión hepática presentaron títulos *Moniezia* entre 1:32 y 1:256. Quince bovinos sin *F. hepatica*, quiste hidático, *Paramphistomum*, nódulos de *Oesophagostomum*, ni nematodos gastrointestinales reaccionaron negativamente, al igual que 5 bovinos infestados sólo con *Paramphistomum* y 5 bovinos que presentaban larvas enquistadas de *Oesophagostomum*. Cinco de 12 vacunos con infestaciones únicas a quiste hidático hepático, reaccionaron positivamente con el antígeno de *F. hepatica*, tal vez debido a la presencia de anticuerpos residuales contra *F. hepatica* o a epitope(s) comunes entre ambos parásitos. Se ensayaron 12 sueros de terneros con infestación de nematodos gastrointestinales adultos de *Haemonchus sp.* y *Ostertagia sp.*, 7 de los cuales reaccionaron al dot-ELISA y contra quiste hidático, no pudiéndose arrojar conclusiones válidas al respecto.

La repetibilidad del método fue buena. Sólo hubo variación de los títulos a diluciones dobles. El uso de dipsticks resultó más práctico que la utilización de discos individuales de nitrocelulosa. La reacción del dot-ELISA para *F. hepatica* en el vacuno sería de especificidad muy variable de acuerdo a las condiciones y los resultados de este estudio en particular. Esta característica es pasible de ser mejorada. Ello es deseable por tratarse de una reacción de fácil ejecución y excelente sensibilidad, que merece ser puesta a punto en el futuro.

*Palabras clave:* Bovinos, inmunodiagnóstico, *Fasciola hepatica*

## SUMMARY

The dot-ELISA technique was evaluated for detection of *F. hepatica* antibodies in 57 Hereford cattle sera at slaughterhouse. Secretion/excretion products of adult parasites were used as antigens.

20 steers parasitized with only adult specimens of *F. hepatica* had antibody titers of 1:32 to 1:256. 15 steers free of *F. hepatica*, hydatid cyst, *Paramphistomum*, *Moniezia*, *Oesophagostomum* nodules and gastrointestinal nematodes, and 5 steers with only *Oesophagostomum* nodules, did not react in the dot-ELISA. 5 of 12 steer sera with only hydatid cyst infections reacted positive with *F. hepatica* antigen, maybe due a presence of residuals antibodies or a commonly epitope(s). It was assayed 12 sera from calves infected with gastrointestinal nematodes (*Haemonchus sp.* and *Ostertagia sp.*) and 7 reacted positivity to the dot-ELISA reaction and against hidatid cyst. It can not offer reliable conclusion.

Repetibility of the assay was good. Dipsticks were more practical than individual nitrocellulose disks.

The specificity of the dot-ELISA for *F. hepatica* in cattle was quite variable in the conditions of the present study. This characteristic can be improved, something worth trying on account that the assay can be easily performed and has excellent sensitivity.

*Key words:* cattle, immunodiagnosis, *Fasciola hepatica*

\* Proyecto financiado por la International Foundation for Science, Estocolmo, Suecia (Proyecto B/1910-1)

\*\* Instituto de Parasitología, Facultad de Veterinaria, Avda. Alberto Lasplaces 1550. Montevideo, Uruguay.

## INTRODUCCION

El tradicional análisis coproparasitario para la detección de huevos de *Fasciola hepatica* adolece de algunos inconvenientes:

1) no detecta la infección durante el período prepatente

2) su sensibilidad no es muy buena y depende, además, del laboratorista

3) es una técnica tediosa y no automatizable.

Por ello, desde hace algunos años se están evaluando métodos alternativos de diagnóstico de la fascioliasis por medio de la detección de anticuerpos circulantes. Estos métodos seroinmunológicos pueden complementar el diagnóstico coproparasitario rutinario, y ser también de utilidad en estudios epidemiológicos.

La técnica enzimática de inmunoensayo (ELISA) ha sido ampliamente usada para el diagnóstico de laboratorio de la fascioliasis natural y experimental en ovinos (12, 28) y bovinos (1,4,8,9,25). Para aumentar la sensibilidad y especificidad del test se fracciona el antígeno (11,16). En la detección de la fascioliasis ovina, se obtienen resultados alentadores al utilizarse los productos metabólicos de *F. hepatica* (2,28). La mayor sensibilidad, especificidad y precocidad de estos últimos queda demostrada al compararse su comportamiento, mediante la técnica de ELISA, con un extracto soluble de ejemplares adultos en la detección de anticuerpos específicos, durante la infestación natural de bovinos (22).

Con el fin de desarrollar una técnica inmunodiagnóstica más sencilla y económica, y aumentar la

reproducibilidad evitando así el "efecto edge" (6,5,13), se sustituyeron las microplacas por membranas de nitrocelulosa (10,17, 18). Se usaron discos aislados de nitrocelulosa y placas de membranas de nitrocelulosa descartables, estas últimas fueron más prácticas, pero de costo elevado (18).

Posteriormente se ensayó el "dipstick", fijando los discos de nitrocelulosa a tiras de plástico con una goma insoluble en agua, el cual permite testar, al mismo tiempo, un suero frente a diversos antígenos (19).

Hasta el momento, el dot-ELISA ha sido usado en parasitología veterinaria para la detección de anticuerpos contra *Babesia canis* (24), *Amblyoma americanum* en bovinos y *Dermacentor andersoni* en bovinos y conejos (26, 27), *Sarcocystis muris* (23), contra *F. hepatica* (3, 29), *Anaplasma marginale* (15), y para el diagnóstico de la leishmaniasis canina visceral\*.

El objetivo del presente trabajo fue indagar, primariamente, las posibilidades diagnósticas de la técnica de dot-ELISA para el diagnóstico de la fascioliasis en el vacuno.

a) Determinar la mínima dilución indicativa de infestación a *F. hepatica* en el test de dot-ELISA en vacunos.

b) Adquirir una noción acerca de los títulos habituales de anticuerpos en la infestación natural.

c) Determinar la especificidad de la reacción en presencia de quistes hidáticos, larvas enquistadas de *Oesophagostomum*, y formas adultas de *Paramphistomum*, *Ostertagia* y *Haemonchus*.

## MATERIAL Y METODOS

### 1) Animales

Se utilizaron muestras de suero de vacas y novillos raza Hereford obtenidas en frigorífico, y de terneros raza Hereford de campo.

#### A) Frigorífico

Se seleccionaron 5 grupos de animales de acuerdo a la inspección y palpación de vísceras, al corte de parénquima hepático y pulmonar, y al estudio coprológico (método de Mc Master), practicándose la técnica de dot-ELISA en el suero proveniente de los siguientes vacunos:

a) sin la presencia de *F. hepatica*, quiste hidático, *Paramphistomum*, *Moniezia*, larvas enquistadas de *Oesophagostomum*, ni ejemplares adultos de nematodos gastrointestinales (15 sueros). (Controles negativos).

b) presentando únicamente *F. hepatica* en los canalículos biliares, pero sin lesión hepática macroscópica como supuesto de no infestación previa (20 sueros). (Controles positivos).

c) presentando únicamente quistes hidáticos en hígado (12 sueros).

d) presentando únicamente formas larvianas de *Oesophagostomum* (nódulos intestinales) (5 sueros).

e) presentando únicamente ejemplares adultos de *Paramphistomum* (5 sueros).

#### B) Campo

La presencia de parásitos gastrointestinales se debió estudiar

\* Comunicación personal M. Portús.

en terneros de campo, en virtud de que la mayoría de los animales que van a faena son categorías resistentes (mayores de 4 años) o fueron dosificados previamente. Se seleccionaron 12 terneros raza Hereford de 18 meses de edad provenientes de un establecimiento sin antecedentes de infección por *F. hepatica*. Se realizó contaje de huevos según el método de Mc Master modificado, utilizando sólo aquellos sueros provenientes de animales con contajes superiores a 200 h.p.g.. Se determinó el género parasitario por coprocultivo según el método de Roberts-O'Sullivan (21).

Para confirmar la ausencia de quiste hidático se realizó la técnica de dot-ELISA usando como antígeno líquido hidático. Para descartar infecciones patentes por *Paramphistomum* se realizó sedimentación simple.

## 2) Antígeno

Se utilizó como antígeno los productos de secreción-excreción obtenidos de ejemplares adultos de *F. hepatica* según la técnica decrita por Dawes (7) y modificada por Arriaga et al. (3). La determinación proteica se realizó según el método de Lowry et al. (14), obteniéndose 1,37 mg de proteína por ml. La concentración óptima de antígeno se determinó confrontando soluciones a 0,53 y 0,85 mg/ml de proteína a dilución constante de conjugado (1:100) contra suero sin diluir y diluciones dobles de suero a partir de 1:2. La concentración de trabajo fue de 0,53 mg/ml de proteína.

Se utilizó un solo lote de antígeno y esta preparación se conservó en alícuotas a -20°C hasta su uso.

## 3) Sueros control

Como sueros control positivos, se utilizó un pool de sueros provenientes de novillos y vacas que presentaron únicamente ejemplares adultos de *F. hepatica* en la faena. Los órganos de estos animales no presentaron quiste hidático, *Paramphistomum*, *Moniezia*, larvas enquistadas de *Oesophagostomum* ni ejemplares adultos de nematodos gastrointestinales.

Como sueros control negativos, se utilizó un pool de sueros de animales que no presentaron ninguno de los parásitos anteriores en la faena.

Se hicieron alícuotas de los dos pool anteriores, las que se almacenaron a -20°C. En todas las determinaciones del test de dot-ELISA se incluyeron alícuotas de ambos pools.

## 4) Bloqueo. Diluciones de suero y conjugado

Como agente bloqueante se utilizó leche bovina en polvo al 5% en tampón fosfato-NaCl isotónico (pH 7,4), conteniendo 0,05% de Tween 20. La membrana se incubó a 37°C por 30 min.

Tanto las diluciones de suero como de conjugado se hicieron con tampón fosfato-NaCl isotónico (pH 7,4) conteniendo 0,05 de Tween y leche bovina en polvo al 1%. Ambos se incubaron a 37°C por 20 min.

Se utilizó un preparado comercial de antiIgG bovina obtenida en cabra, conjugada con peroxidasa (Chemicon, USA). La dilución óptima de trabajo se obtuvo enfrentando diluciones dobles de conjugado a partir de 1:50 hasta 1:1600 con una concentración antigénica constante de 0,53 mg/ml de proteína, y diluciones dobles de suero a partir de 1:2.

## 5) Substrato

Como substrato de la enzima se usó el 4-cloro-1-naftol (Sigma Chemie Gmgh) según Hawkes et al. (10). Se preparó una solución madre de 30 mg en 10 ml de metanol absoluto y se almacenó a 4°C hasta una semana. Antes de su uso se diluyeron 2 ml de esta solución en 8 ml de tampón fosfatos-NaCl isotónico y se le agregaron 6 microlitros de peróxido de hidrógeno al 30%. La membrana de nitrocelulosa fue incubada con esta solución entre 10 y 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad.

## 6) Discos y dipsticks

Se ensayó el uso de discos de 3 mm de diámetro colocados en pocillos de placas de microtitulación. También se ensayaron "dipsticks" (19) consistentes en discos de nitrocelulosa pegados a tiras de plástico rígido en ángulo de 90°. Esta variación de la técnica de Pappas (19) se hizo con el fin de que los discos quedaran completamente sumergidos en 100 microlitros de reactivo. Una vez fijado el antígeno, algunos se usaron en el momento, y otros fueron conservados a menos 20°C por 30 días.

Para facilitar la manipulación de los "dipsticks" en la placa de microtitulación, para una secuencia de diluciones de un mismo suero, se adhirieron 12 "dipsticks" a una varilla de aluminio con cemento de contacto. Tanto para el uso de los discos de nitrocelulosa como de los "dipsticks" se utilizaron las mismas variables.

## 7) Procedimiento de rutina

Como procedimiento de rutina

se utilizó el protocolo para el diagnóstico de la leishmaniasis canina de Portús et al\*, pero una vez depositado el antígeno, se secó la membrana a 56°C durante 15 min.

- Adsorción del antígeno a la membrana. (1)

- Bloqueo con fosfato-NaCl-Tween 20 al 0,05%-leche bovina en polvo al 5%. Incubación a 37°C por 30 min.(100l).

- El suero se testó sin diluir y a diluciones dobles a partir de 1:2 hasta 1:512 en fosfato-NaCl-Tween 20 al 0,05%-leche bovina en polvo al 1%. Incubación a 37° por 20 min.. (100l)

- 3 lavados de 5 min. cada uno con fosfato-NaCl-Tween 20 al 0,05%. (200l)

- Incubación de conjugado a la dilución 1:100 en tampón, a 37° por 20 min. (100l)

- 3 lavados de 5 min. cada uno con fosfato-NaCl-Tween 20 al 0,05%. (200l)

- Incubación de la solución substrato en la oscuridad entre 10-15 min. (100l). La reacción se corta con agua de canilla.

Cada test incluyó los siguientes controles:

a. Control del conjugado: el antígeno fue incubado sin suero, sólo con tampón fosfato-NaCl isotónico-Tween 20 al 0,05% y leche bovina en polvo al 1% conjugado y substrato.

b. Control del substrato: el antígeno fue incubado sin suero y sin conjugado, sólo con tampón fosfato-NaCl isotónico-Tween 20 al 0,05% y leche bovina en polvo al 1% y substrato.

c. Control positivo y

d) Control negativo (Ver 3) (Sueros control).

**Cuadro 1**

**Resultados de 57 sueros vacunos ensayados por la técnica de dot-ELISA para *F. hepatica***

Playa de faena	Total	Técnica de dot-ELISA	
		Reaccionantes (+)	Reaccionantes (-)
Sin <i>F. hepatica</i> , ni otros parásitos	15	0	15
Con <i>F. hepatica</i>	20	20	0
Con quiste hidático, solamente	12	5	7
Con <i>Paramphistomum</i> , solamente	5	0	5
Con larvas enquistadas de <i>Oesophagostomum</i> , solamente	5	0	5
<b>TOTAL</b>	<b>57</b>	<b>25</b>	<b>32</b>

## 8) Lectura

En la lectura se visualizó una intensa mancha azul (reacción positiva), una mancha tenue (reacción sospechosa), y sin mancha (reacción negativa). Se tomó como título para el dot-ELISA la mayor dilución de suero que mostró una mancha intensa. Una diferencia del cuádruple en el título de anticuerpos se consideró que reflejaba una modificación real; una diferencia del doble no se consideró significativa.

## 9) Análisis estadístico

Se estudió la repetibilidad del test y su poder discriminante. Se tomaron seis muestras, 3 sueros controles positivos y 3 sueros controles negativos, con cinco lecturas cada una. Para cada grupo (seronegativos y seropositivos), se testaron las diferencias de medias (ANOVA). La asociación entre los resultados de la autopsia y los resultados del dot-ELISA, se testó con Chi cuadrado utilizando todos

los sueros.

## RESULTADOS

### 1) Discos y dipsticks

No se observaron diferencias en el resultado de la prueba al utilizar los dos sistemas. Si bien la preparación del "dipsticks" es engorrosa, resultó más práctica durante el ensayo que la utilización de los discos aislados.

### 2) Resultados obtenidos con los sueros

Los resultados obtenidos con todos los sueros estudiados se exhiben en el Cuadro 1, no incluyéndose los 12 sueros de terneros infestados con nematodos gastrointestinales. Se consideran títulos indicativos de infección 1:32 y mayores. En la figura 1 se muestra la distribución de los títulos de aquellos 43 sueros que presentaron alguna reacción.

- Los sueros de bovinos que no tenían *F. hepatica* ni otras parasitosis

\*Comunicación personal M. Portús.

no reaccionaron por encima de la dilución 1:8.

- Los sueros de bovinos infestados sólo con *F. hepatica* presentaron títulos de 1:32 a 1:256.

- Los sueros de bovinos infestados sólo con quiste hidático presentaron títulos de 1:2 a 1:128.

- Los sueros de bovinos que sólo presentaron formas larvarias de *Oesophagostomum*, y los que presentaron *Paramphistomum*, se comportaron de forma similar que los sueros provenientes de vacunos que no presentaron ninguna parasitosis.

- De los 12 sueros de terneros infestados por parásitos gastrointestinales adultos (*Haemonchus placei* y *Ostertagia ostertagi*), 7 de ellos presentaron títulos entre 1:8 y 1:64. Cabe destacar que estos sueros que reaccionaron positivamente y 2 de los sueros que no reaccionaron, fueron positivos a la reacción de dot-ELISA usando como antígeno líquido hidático.

### 3) Especificidad

La especificidad del método fue

muy variable: no existieron reacciones cruzadas frente a otro trematode (*Paramphistomum* sp.) ni frente a la presencia de larvas enquistadas de *O. radiatum*.

Ninguno de los 15 sueros de bovinos no infestados con *F. hepatica*, quiste hidático, larvas de *Oesophagostomum*, parasitosis múltiple por gastrointestinales adultos, *Paraphistomum*, *Moniezia*, reaccionaron positivamente en el dot-ELISA. Siete sueros no mostraron reacción a ninguna dilución, y sólo uno de ellos reaccionó sin diluir. Los 8 sueros restantes mostraron una coloración tenue; 1 a la dilución 1:2, 4 a 1:4 y 3 a 1:8.

Cinco de 12 animales infestados sólo con quiste hidático presentaron una reacción francamente positiva en el dot-ELISA, con títulos entre 1:32 y 1:128. Tres no reaccionaron a ninguna dilución, y otros 4 presentaron coloraciones tenues hasta la dilución 1:4 comportándose como los sueros de los bovinos que no presentaban ninguna parasitosis; pero 5 de ellos presentaron una reacción francamente positiva, 2 sueros a la dilución 1:32 otros 2 a la dilución 1:64 y 1 a la dilución 1:128.

Con respecto a los sueros bovinos que sólo presentaban *Paraphistomum*: 3 reaccionaron tenuemente, 1 de ellos reaccionó a suero sin diluir y los otros 2 a la dilución 1:8. Los 2 restantes no reaccionaron.

De los 5 sueros de bovinos que sólo presentaban larvas de *Oesophagostomum* sólo 2 reaccionaron tenuemente, 1 a la dilución 1:2 y el otro a la dilución 1:4, no reaccionando los 3 restantes.

Los resultados obtenidos de los 12 sueros de terneros que presentaban infección múltiple por parásitos gastrointestinales adultos

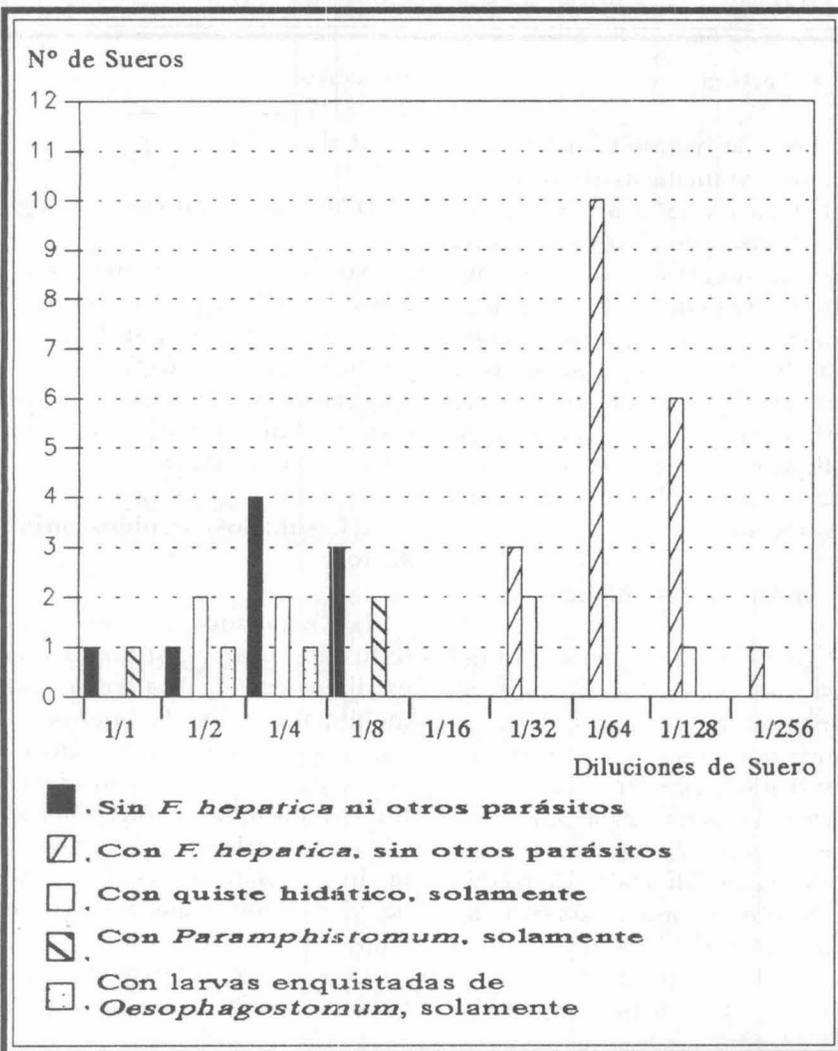


Fig. 1 Distribución de los títulos de 43 sueros vacunos que reaccionaron por la técnica de dot-ELISA para *F. hepatica*

fueron invalidados por presentar también quiste hidático.

#### 4) Sensibilidad

Todos los sueros de bovinos infestados con *F. hepatica* reaccionaron positivamente, no ocurriendo falsos resultados negativos. Tres de ellos reaccionaron a la dilución 1:32, 10 a la dilución 1:64, 6 a la dilución 1:128 y 1 a la dilución 1:256.

#### 5) Repetibilidad

Hubo variación de los títulos, solamente en diluciones dobles. En el cuadro 2 se expresan los resultados del estudio de 3 sueros positivos y 3 sueros negativos al test de dot-ELISA con 5 lecturas cada uno.

#### 6) Análisis estadístico

Los títulos de anticuerpos fueron transformados logarítmicamente. Los resultados del estudio de ANOVA para cada uno de los grupos seropositivo y seronegativo, muestra un F de 1.165 ( $p=0.0090$ ) y un F de 10.588 ( $p=0.0027$ ) respectivamente. Desde el punto de vista práctico y con el objetivo de estimar la repetibilidad del método es importante centrar la atención en las varianzas residuales en ambos grupos seropositivos y seronegativos (0.1378 y 0.1376 respectivamente). Las desviaciones típicas para cada uno de ellos fue de 0.37. El intervalo de confianza a un nivel de 0.95 está dado por el antilogaritmo de 2 desviaciones típicas por debajo y por encima del valor medio de cada muestra (antilog.  $(2 \times 0.37) = 2.09$ ), estando en este caso, entre una dilución a la mitad y una dilución al doble.

Cuadro 2

#### Títulos de 6 sueros ensayados 5 veces por el test de dot-ELISA

		Lecturas				
Sueros +	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	
1	1/64	1/32	1/32	1/32	1/64	
2	1/64	1/64	1/128	1/128	1/128	
3	1/128	1/64	1/64	1/128	1/64	
Sueros -	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	
4	1/4	1/2	1/2	1/2	1/4	
5	1/4	1/4	1/4	1/8	1/8	
6	1/2	1/1	1/1	1/2	1/2	

Los valores promedio (Ln) y las desviaciones típicas obtenidos para los resultados de los sueros positivos fueron de -4.2719 y 0.5091 respectivamente, y para los sueros negativos fueron de -0.9407 y 0.5836 respectivamente. Las lecturas para los resultados negativos son algo más dispersas que para los resultados positivos. Las medias son diferentes con un valor de  $t = -16.4106$ , con un nivel de significación de  $1.3323 \times 10^{-15}$ . Entre los valores observados como positivos y los valores observados como negativos, existe un intervalo bien definido donde no hay observaciones, lo que hace que no haya clasificaciones erradas.

El cuadro 1 muestra los resultados obtenidos de los sueros clasificados según los datos obtenidos de frigorífico y los resultados obtenidos según el dot-ELISA. La sensibilidad observada fue de 100% con un intervalo de confianza entre 86-100%, a nivel 95%. En virtud de que en los resultados obtenidos no se contemplaron las proporciones de las distintas enfermedades, se calcularon entonces intervalos de confianza (95) para especificidades

parciales en presencia de cada agente parasitario y en su ausencia, obteniéndose lo siguiente:

- Oesophagostomum* entre 54.9-100%
- Paramphistomum* entre 59.4-100%
- Quiste hidático entre 45.8-79.2% (promedio 58%)
- Ausencia de los distintos agentes parasitarios estudiados entre 81.9-100%

El test de Chi cuadrado para estudiar la asociación entre los resultados obtenidos en frigorífico y los resultados del test diagnóstico se realizó sobre los sueros de animales sin ninguna parasitosis, sólo con *F. hepatica*, y sólo con quiste hidático (Cuadro 1)

De acuerdo al resultado obtenido ( $X^2=39.45$ ,  $p<0.0001$ ), se acepta asociación entre ambos resultados.

#### DISCUSION

El formato de los "dipsticks" utilizado fue diferente al sugerido por Pappas et al. (19), con el fin de que quedaran completamente sumergidos en 100 microlitros de reactivo, puesto que sería muy

oneroso utilizar 300 microlitros de una dilución de conjugado 1/100. Sin embargo, el formato sugerido por estos autores es más resistente y tienen la ventaja de poder utilizar varios antígenos diferentes al mismo tiempo.

La reactividad de los "dipsticks" que fueron congelados se mantuvo, coincidiendo con lo comunicado por Zimmerman et al. (29) quienes almacenaron el antígeno en discos de nitrocelulosa hasta por un año. Ello permite acortar el tiempo de ejecución de la reacción en por lo menos 45 minutos.

Es posible optimizar la practicidad del método. Así, inspirados en el procedimiento de rutina de Portús et al. (\*) se usará una plancha de poliestireno de 96 tubos huecos para realizar la técnica más fácilmente. Con esto se evitará el uso de discos aislados de nitrocelulosa y de "dipsticks", así como también los problemas de ruido de fondo que se presentan cuando se realizan todos los pasos con posterior filtración por vacío. De esta forma se pueden ensayar 2 diluciones de 40 sueros o titular 10 sueros, utilizándose un rectángulo de membrana de aproximadamente 8 x 10 cm. El tiempo de ejecución de la prueba se puede acortar significativamente, al conservar los rectángulos de la membrana de nitrocelulosa con el antígeno fijado y bloqueado.

De acuerdo al resultado del test de  $X^2$  se acepta la asociación entre los resultados obtenidos de playa de faena (como criterio verdadero de clasificación) y los resultados obtenidos del dot-ELISA. La especificidad del método fue muy variable: no existieron reacciones cruzadas frente a otro trematode (*Paramphistomum* sp) ni frente a la

presencia de larvas enquistadas de *O. radiatum*. Se prefirió no dar datos porcentuales debido a la insuficiente cantidad de sueros ensayados.

Cinco de 12 animales con quiste hidático reaccionaron positivamente en el dot-ELISA pudiéndose deber a la presencia de epitope(s) comunes o a anticuerpos residuales contra *F. hepatica*. Al utilizar sueros provenientes de animales de frigorífico se desconoce si sufrieron o no infestaciones recientes tratadas o infestaciones patentes. Respecto a *O. ostertagi* y *H. placei* no se pueden arrojar conclusiones en virtud de que los sueros que reaccionaron contra *F. hepatica* también reaccionaron contra quiste hidático. De acuerdo a estos resultados se podría convalidar la hipótesis de que es posible que haya epitope(s) comunes con quiste hidático. Sin embargo, es prematuro descartar la posibilidad de epitope(s) comunes con alguno de estos parásitos gastrointestinales.

Los sueros control negativos pudieron haber presentado anticuerpos residuales de infecciones parasitarias anteriores a la faena. No obstante, con el antígeno utilizado y los títulos considerados reactivos para *F. hepatica* no se detectaron tales anticuerpos. Con ello se reafirma la validez de los sueros control negativos utilizados en el contexto del presente estudio. Las reacciones menores o iguales a 1:8 en los grupos de sueros de animales sin *F. hepatica* tal vez se deban a anticuerpos inespecíficos. Estudios anteriores que utilizaron antígeno de secreción/excreción para la detección de la fascioliasis ovina (Zimmerman et al. 1985, Arriaga et al. 1989), no se ocuparon de este problema. Sin embargo, la

sensibilidad fue muy buena ya que de los 20 sueros de animales que sólo presentaban *F. hepatica*, todos reaccionaron, y el título menor fue de 1:32.

El hecho de que el test de Bartlett haya dado homogeneidad de varianzas implica que la variación en las lecturas no se ve afectada por los títulos de anticuerpos, siendo el método igualmente preciso para muestras seropositivas como para muestras seronegativas. Por lo tanto, de acuerdo al resultado de la ANOVA, se puede decir que el método es confiable y repetible para cualquier nivel de anticuerpos. La repetibilidad del test obtenida en el presente estudio coincide con la hallada por Pappas (20) y Tenter (23).

No se pueden arrojar conclusiones válidas en cuanto a la comparación con otras técnicas de ELISA (1, 2, 4, 8, 16, 23, 26) que emplean distintas fracciones antigénicas y cantidades variables de antígeno para medir anticuerpos en animales con cargas parasitarias variables y muchas veces desconocidas. No existen, que sepamos, comunicaciones sobre el empleo del dot-ELISA para el diagnóstico de la distomatosis en el vacuno.

## CONCLUSIONES

La reacción de dot-ELISA para *F. hepatica* en el vacuno, utilizando antígenos de secreción/excreción resultó de especificidad muy variable. Afortunadamente, esta característica es pasible de ser mejorada, utilizando fracciones antigénicas no comunes con *Haemonchus*, *Ostertagia* o quiste hidático, o bien absorbiendo sueros previamente con preparaciones antigénicas de estos parásitos.

La alta sensibilidad de este

\*Comunicación personal M. Portús

sistema diagnóstico, su gran capacidad de automatización (un mínimo de 10 reacciones en 85 minutos), facilidad de ejecución, la no exigencia de instrumentos de laboratorio, y la necesidad de contar con un método que suple el tradicional análisis coproparasitario para *F. hepatica*, ameritan la puesta a punto de la técnica de dot-ELISA en el futuro.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Ambroise-Thomas, P.; Desgeorges, P.T.; Bouttaz, M.** Le diagnostic Immunoenzymologique (ELISA) de la Fasciolose Humaine et Bovine. Detection d'anticorps et/ou d'antigenes circulants (Ann. Soc. Bel. Med. Trop.), 60:47-60, 1980.
2. **Arriaga, C.; Gómez, A.; Bautista, C. R.; Morilla, A.** Evaluación de un antígeno somático y uno metabólico de *Fasciola hepatica* en diferentes pruebas inmunológicas para el diagnóstico de la fascioliasis en bovinos. Téc. Pec. Mex., 44:41-51, 1983.
3. **-----, Paniagua, R.; Ruiz-Navarrete, A.; Bautista, C. and Morilla, A.** Comparison of dot-enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA), Passive Haemagglutination Test (PHT) and Thin Layer Immunoassay (TIA) in the Diagnosis of Natural or Experimental *Fasciola hepatica* Infections in Sheep. Vet. Parasitol., 30:197-203, 1989.
4. **Burden, D. J. and Hammet, N. C.** Microplate enzyme linked immunosorbent assay for antibody to *Fasciola hepatica* in cattle. Vet. Rec., 103:158, 1978.
5. **Burt, S. M.; Carter, T. J. N.; Kricka, L. J.** Thermal characteristics of Microtiter plates used in immunological assays. J. Immuno. Method, 31:231-236, 1979.
6. **Chessum, B. S.; Denmark, J. R.** Inconstant ELISA, Lancet, 1:161, 1978.
7. **Dawes, B.** Maintenance in vitro of *Fasciola hepatica* Nature (London), 174:654-655, 1954.
8. **Farrel, C.** An enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Fasciola hepatica* infection in cattle. Am. J. Vet. Res., 42 (2), 237-240, 1981.
9. **Hall, R. F.; Lang, B. Z.; Waldhalm, D. G.; Farrel, C. J.; DeLong, W.J.; Verson, D. O.** Experimentally induced *Fasciola hepatica* infection in young calves. Am. J. Vet. Res., 43(10), 1876-1878, 1982.
10. **Hawkes, R.; Niday, E. and Gordon, J.** A dot immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. Anal. Biochem., 119:142-147, 1982.
11. **Hillyer, G.V.** Isolation of *Fasciola hepatica* tegument antigen. J. Clin. Microbiol., 12:695-699, 1980.
12. **Jemli, M. H.; Dorchies, P. H. et Magnaval, J. I.** Application de la Technique ELISA au Diagnostic Immunologique de la fasciolose ovine: Comparaison avec l'immunofluorescence indirecte et la Double diffusion en gélose. Revue Méd. Vét. 138(4), 355-359, 1987.



Distribuidora Exclusiva:



Distribuidora:

**QUEIRUGA**  
**PRODUCTOS VETERINARIOS**

**ARENAL GRANDE 2682 TEL.: 29 61 59**  
**MONTEVIDEO - URUGUAY**

13. **Kricka, L. J.; Carter, T. J. N.; Burt, S. M. et al.** Variability in the adsorption properties of Microtiter plates used as solid supports in enzyme immunoassay, *Clin. Chem.*, 26:741-744, 1980.
14. **Lowry, O.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. and Randall, R. P.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275, 1951.
15. **Montenegro-James, S.; Guillen, A. T.; Ma, S-J.; Tapang, P.; Abdel-Gawad, A.; Toro, M. and Ristic, M.** Use of the dot-enzyme-linked immunosorbent assay with isolated *Anaplasma marginale* initial bodies for serodiagnosis of anaplasmosis in cattle, *J. A. V. M. A.*, 51, 10:1518-1521, 1990.
16. **Oldham, G.** Antibody response to *Fasciola hepatica* antigen during liver fluke infection of cattle. *Curr. Trop. Vet. Med. Anim. Sci.*, 22:57-71, 1982.
17. **Pappas, M. G.; Hajkowski, R.; Hockmeyer, W. T.** Dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA): a microtechnique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis, *J. Immunol. Methods*, 64:205-214, 1983.
18. -----, **Hajkowski, R.; Diggs, C. and Hockmeyer, W.** Disposable nitrocellulose filtration plates simplify the Dot-ELISA for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Med. Hyg.*, 79, 136, 1985.
19. -----, **Rapid serodiagnosis of parasitic infection by dot-ELISA using "dipsticks".** *Trns. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 80, 1006, 1986.
20. -----, **Recent applications of the dot-ELISA in immunoparasitology.** *Vet. J. parasitol.*, 29:105-129, 1988.
21. **Roberts, F. H. S.; O'Sullivan, J. P.** Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. *Aust. Agric. Res.* 1,99,1950.
22. **Sinclair, I. J. and Wassal, D. A.** Serodiagnosis of *Fasciola hepatica* infection in cattle. *Vet. Parasitol.*, 27:283-290, 1988.
23. **Tenter, A. M.** Comparison of Dot-ELISA, ELISA, and IFAT for the detection of IgG antibodies to *Sarcocystis muris* in experimentally infected and immunized mice. *Vet. Parasitol.*, 29:89-104, 1988.
24. **Wanduralaga, L.; Kakoma, Y.; Clabough, G. W.; Abeygunawardene, I.; Levy, M. G. and Ristic, M.** Development of dot-enzyme immunoassay for diagnosis of canine babesiosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 36:20-21, 1987.
25. **Wescott, R. B.; Farrel, C. J.; Shen, D. T.** Diagnosis of naturally occurring *Fasciola hepatica* infections in cattle with an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Vet. res.*, 45:178-179, 1984.
26. **Whelen, A. C., George, J. E.; Osburn, R. L. and Wikel, S. K.** Dot-ELISA to examine serologic responses of *Bos taurus* and *Bos indicus* to ixodid tick infestation. *Fed. Proc.*, 43:1628, 1984.
27. -----, **Richardson, L. K. and Wikel, S. K.** Dot-ELISA assessment of guinea pig antibody responses to repeated *Derma-centor andersoni* infestation. *J. Parasitol.*, 72:155-162, 1986.
28. **Zimmerman, G. L.; Jen, L. W.; Cerro, J. E.; Fransworth, K. L. and Wescott, R. B.** Diagnosis of *Fasciola hepatica* in sheep by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Vet. Res.*, 43:2097-2100, 1982.
29. -----, **Nelson, M. and Clark, C.** Diagnosis of ovine fascioliasis by a dot-enzyme-linked immunosorbent assay: A rapid microdiagnostic technique. *Am. J. Vet. Res.*, 46(7), 1513-1515, 1985.

Aprobado para su publicación:  
4/4/95



# Estrategias de control del síndrome de Tristeza en un establecimiento ganadero

Fuentes, J. J.\*

## INTRODUCCION

En un establecimiento agrícola ganadero, ubicado en el depto. de Río Negro, paraje Averías Chico, 8<sup>a</sup> Sección Policial, se constató la aparición de bovinos adultos afectados por el síndrome de Tristeza Parasitaria Bovina (TPB).

El mismo está ubicado en un área enzótica para *Boophilus microplus* y por desarrollarse allí un seguimiento veterinario desde hace 14 años, se cuenta con referencias y datos anamnésicos respecto a los problemas sanitarios que han ido apareciendo y a los cuales se les ha tratado de encontrar solución viable.

Con este marco de referencia, el presente artículo pretende relatar los resultados obtenidos en cuanto al control de los hemoparásitos y garrapata, aplicando una estrategia de trabajo discutida y diseñada conjuntamente con los colegas de la División de Parasitología, DILAVE "Miguel C. Rubino".

### Caracterización parasitaria del establecimiento

Al inicio de las actividades en ese predio (1982), se encontró un alto porcentaje de ganado vacuno parasitado por garrapata, con aparición errática de casos de TPB causando pérdidas económicas significativas para el productor.

Se realizó una vigilancia integral

de la situación de estos parásitos, recurriendo al servicio de la División de Parasitología, DILAVE "Miguel C. Rubino". Estos estudios se basaron principalmente en la tipificación de la garrapata (*B. microplus*), análisis de concentración de baños, manejo del mismo, diagnóstico serológico de prevalencia e incidencia de los hemoparásitos, así como seguimiento de los casos clínicos. El baño en uso presentaba defectos tales como reflujo del específico en la zambullida, sin

parasitosis y de reducir el perjuicio económico.

### Alternativa planteada de prevención/control

Dicho esquema, principalmente se basó en:

1) disminuir las poblaciones de garrapatas. Se modificó la estructura del bañadero existente, se cubicó, se determinó qué producto usar y por último se estableció una frecuencia lógica de

Cuadro 1

Categoría	B. bovis	B. bigemina	Anaplasma spp.
Vacas	-	50%	25%
Novillos	9%	82%	9%
Vaquillonas	7%	100%	14%

techo, grietas en el fondo, ubicación incorrecta. Los tratamientos se realizaban únicamente cuando era evidente la presencia de garrapatas.

Durante el primer invierno, se actuó ante un brote clínico provocado por *Anaplasma marginale*, presentándose los animales enfermos, vacas de cría, alternadamente en el tiempo (goteo).

Al principio la serología presentó los resultados del cuadro 1.

Ante este espectro parasitario fue diseñado un esquema de trabajo, a los efectos de poder controlar estas

balneaciones a todo el ganado, poniendo énfasis en comenzar temprano (agosto) con el objeto de bloquear la primer generación de garrapata.

2) proteger gradualmente a todo el ganado contra la TPB (estabilidad enzótica artificial). Se inmunizó anualmente a toda la ternera, buscando de este modo un efecto acumulativo en el rodeo. Se utilizó la hemovacuna elaborada por la DILAVE "Miguel C. Rubino". Esta actividad fue factible desde el punto de vista práctico y económico.

\* Ejercicio independiente, Municipio 567/003, Las Piedras

3) estricto control en el aislamiento del establecimiento respecto a los predios linderos, mediante revisión y reparación de los alambrados perimetrales evitando el pasaje de animales entre establecimientos.

### **Evolución del estado parasitario del ganado**

Durante 5 años de dicha práctica se logró erradicar el problema, manifestándose con la presencia nula de garrapata y desaparición de los casos de TPB.

En una segunda etapa, dada la buena situación sanitaria alcanzada se resolvió suspender la premunición y disminuir la frecuencia de bañeaciones. Estas acciones se acompañaron con el encare de otras actividades empresariales productivas, que en cierto modo llevaron a desatender el esquema de trabajo vigente. Los tratamientos acaricidas realizados fueron insuficientes, quedando diseminados en el tiempo, lo que perjudicó la frecuencia lógica entre baños. A fines de otoño y durante el invierno del año 1994, comienzan a aparecer nuevamente, casos clínicos que hacen sospechar la presencia de hemoparásitos.

Los animales afectados surgieron en goteo, con marcada ictericia y debilidad unido a un cuadro febril. La enfermedad se presentó en dos rodeos de vacas preñadas (300) que pastoreaban en dos potreros linderos entre sí, de las cuales murieron 14, encontrándose garrapatas en diferentes estadios evolutivos.

Se encaró un tratamiento de síndrome TPB, utilizando diazaminobenceno diacetato y oxitetraciclina por vía intramuscular a los animales que iban apareciendo afectados. Si bien esta metodología permitió un cierto control de los casos clínicos, para nada fue satisfactorio, ya que ocurrían desfasajes entre el encuentro del

enfermo y la institución oportuna del tratamiento. En muchos casos ocurrió recuperación pero en estos surgieron abortos, que se sumaron al problema como factor de pérdida.

De acuerdo a los resultados de laboratorio, el agente causal de este brote fue *A. marginale*, y del estudio serológico de la totalidad del rodeo afectado, se constató que el único parásito presente era anaplasma (40%), no existiendo reacción correspondiente a babesias.

### **Alternativa de solución en brote**

Evaluando pérdidas y costo terapéutico, considerando que afortunadamente el área afectada sólo comprendía dos potreros, con 300 vientres vacunos y de común acuerdo con la administración del establecimiento, se decidió atacar al enemigo antes de que se manifestara. Se instruyó al personal de campo para que inyectara en forma masiva al ganado de los potreros problema, con oxitetraciclina\* siguiendo las indicaciones del fabricante. Se intentó tratar de bloquear el daño provocado por el parásito en el período de incubación, antes de la aparición de síntomas clínicos visibles que ya auguraban una respuesta magra al tratamiento. El resultado fue la detención inmediata del brote.

### **Discusión y Conclusiones**

Las dos alternativas de control aplicadas en este caso concreto, han logrado el éxito esperado. Dichos logros ameritan la intención de transmitir una experiencia de campo. Con respecto a la alternativa prevención-control, lamentablemente no se cuenta con los datos actualizados de pérdida y costos de los tratamientos, pero se destaca la minimización global del riesgo. Si consideramos los datos del brote de

1994, con 14 muertes (US\$ 180/vaca, total estimado US\$ 2500) y si calculamos el costo de hemovacuna para la totalidad del rodeo afectado (300 vacas US\$ 2,5/dosis, total estimado US\$ 750) apreciamos en principio el beneficio de esta actividad.

De la serología se infiere que han sido erradicadas las babesias, ya que en el comienzo se presentó como una situación de inestabilidad enzootica y a los 12 años se encontró serología negativa a estos hemoparásitos.

La detención de aparición de nuevos casos tuvo un costo aproximado de US\$ 180. Si se confronta con el valor del ganado afectado, equivaldría a la muerte de un animal, sensiblemente inferior a la cifra esperada, además de la tranquilidad que otorgó esta actividad (manejo, disponibilidad de personal, pérdida por la recuperación del estado general de los convalecientes).

De esta experiencia, se concluye que es importante evaluar objetivamente los problemas sanitarios para establecer esquemas de control (fortalecimiento de la relación Laboratorio-Veterinario de campo).

La no existencia de planes zonales de lucha contra el *B. microplus*, relativiza la efectividad de los esquemas de control adoptados en forma individual. Esta afirmación se debe a que si bien se aplicó racionalmente un plan estratégico de control, existió una reinfección que puede haber tenido origen en otro establecimiento de la zona. Por lo que es importante el encare de lucha en forma multipredial.

**Agradecimiento:** a los Dres. Herculano Cardozo, Armando Nari y María A. Solari.

*Aprobado para su publicación:*  
26/9/95

\*OTC 50, Compañía Cibeles

# La sanidad animal y el comercio global agropecuario



Dr. Raúl Casas Olascoaga

Académico Titular de la Academia Nacional de Veterinaria del Uruguay

Académico de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de España

## I. INTRODUCCION

En un futuro próximo, el libre movimiento de animales y productos de origen animal será un principio básico de los tratados y acuerdos que conforman los grandes bloques económicos, como la Unión Europea (UE), el Tratado de Libre Comercio de América del Norte (NAFTA), el Mercado Común del Conosur (MERCOSUR), el Pacto Andino, el Mercado Común de Centro América, la Comunidad Económica del Caribe (CARICOM), etc.

Un gran mercado libre y dinámico es un requisito esencial para el desarrollo de un sistema balanceado de producción de alimentos en explotaciones ganaderas modernas, competitivas y eficientes, destinadas a proveer los alimentos para el desarrollo y el consumo humano.

Cada bloque económico deberá disponer de un sistema de comercio externo de animales y productos de origen animal conectado con los demás países del mundo, en un escenario que caracteriza al mundo contemporáneo, de comercio global altamente competitivo y diversificado, que tenderá a moderar las fluctuaciones que ocurren en la

producción animal y a satisfacer las demandas de las poblaciones en cantidad, calidad y precios competitivos.

La armonización del mercado intere intrarregional y del consumo doméstico para alcanzar una mayor equidad social, es una meta que los bloques económicos regionales deberán conquistar en el medio y largo plazo, ya que existen diferencias considerables en los sistemas de producción incluida la salud animal, comercialización y distribución, así como en los intereses de los productores agrarios y los consumidores. En este ámbito es necesario acelerar y concretar las decisiones políticas para hacer posible el desarrollo y ejecución de programas sanitarios integrados y sostenibles contribuyan a disminuir y evitar los riesgos de introducir y propagar enfermedades animales de alta peligrosidad y a mejorar y mantener los altos estándares de salud animal que han adquirido muchos países del mundo.

La ganadería de América Latina y el Caribe tiene una heterogeneidad notable en las estructuras, sistemas y formas de producción y comercialización. Por consiguiente los factores específicos de riesgo

son también diferentes y las acciones sanitarias que puedan aplicarse y resultar eficientes en algunos sistemas y estructuras de producción no resuelven el problema en otros o resultan, por razones de costo, de difícil aplicación.

La aceptación de un programa sanitario por parte del sector productivo agropecuario posee tanta o más importancia que la definición tecnológica del plan. En este sentido las acciones programadas deben demostrar un beneficio económico real para la actividad pecuaria y adecuar su aplicación a las costumbres y características de la formación del productor rural.

Los servicios veterinarios deben analizar las implicaciones económicas que generarán los programas sanitarios para empresarios, productores rurales, campesinos y para el país. La decisión política y estratégica sobre un programa sanitario debe basarse en un análisis metódico de los aspectos sociales, económicos, epidemiológicos y tecnológicos.

El análisis de las características sociales, económicas y tecnológicas de las explotaciones ganaderas se utiliza para lograr un diagnóstico

adecuado de los impactos de orden socio-económico. La estrecha relación entre las características económicas y sociales de las formas de producción ganadera y el ámbito geográfico y social en que estas se establecen, determinan la estructuración de ecosistemas en los que los agentes infecciosos y parasitarios y su interrelación con los huéspedes son característicos. Cada forma de producción tiene, entonces, un perfil sanitario que le es propio y que depende de las características estructurales de la organización de la cría y manejo del ganado y sus relaciones comerciales.

En América del Sur en el caso de la fiebre aftosa se ha demostrado que sus modalidades de comportamiento están relacionadas con las formas que presenta la organización productivo-económica de la ganadería predominante en un área o región.

La íntima relación epidemiológica y comercial entre países vecinos ha sido determinante para considerar que acciones aisladas, de un solo país, difícilmente se verían coronadas por el éxito de lograr la erradicación de una enfermedad con las características de la fiebre aftosa.

Fue y es, entonces, imprescindible, establecer la regionalización de la lucha antiaftosa cuando se tienen como metas el control avanzado y luego la erradicación de esta virosis. Los programas nacionales debían ser complementados por una coordinación e integración entre países.

Durante la Reunión Hemisférica sobre Fiebre Aftosa y Comercio Internacional de Animales y Productos de Origen Animal, celebrada en 1978 en Buenos Aires, Argentina, por iniciativa del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, los Ministros de Agricultura

de los países de las Américas declararon de la mayor prioridad la creación de áreas libres de fiebre aftosa en los países de América del Sur.

En 1980 en la VII Reunión Ordinaria de la COSALFA en Río de Janeiro se estableció para los países de América del Sur afectados por fiebre aftosa el principio de la regionalización con "el compromiso de desarrollar programas cuyo objetivo a corto plazo sea lograr la ausencia de la enfermedad en importantes áreas, como parte de un proceso que debe encaminarse hacia la erradicación de la fiebre aftosa en el continente".

Esas áreas libres deberían estar situadas en regiones de vasta e intensa producción pecuaria y con un gran potencial de crecimiento productivo, económico y comercial. Serían, además, ejemplos propulsores de expansión de los programas de erradicación para diferentes áreas de América del Sur.

Un área libre de enfermedad, puede comprender un país, un área definida dentro de un país o un área comprendida por dos o más países limítrofes o vecinos. El Convenio de Erradicación de la Fiebre Aftosa en la Cuenca del Río de la Plata es un ejemplo de extraordinario valor y efectividad en la afirmación del concepto de regionalización.

Uno de los principios aprobados por la Ronda Uruguay del GATT fue el de la regionalización. Se reconocieron los beneficios de la regionalización y la existencia de diferencias espaciales en la distribución de las enfermedades dentro de los territorios de un país, permitiendo diferenciar áreas según la prevalencia y otros factores de riesgo. Las enfermedades no respetan fronteras o límites políticos sino que son otros, los factores de

importancia en su distribución y diseminación, como los huéspedes, la densidad de la población ganadera, manejo y los flujos comerciales y otros factores de riesgo.

Los medios de transporte contemporáneos son variados, numerosos, veloces y capaces de transportar en corto tiempo enormes cargas de productos y mercancías así como movilizar miles de seres humanos y animales. La frecuencia y rapidez del transporte de seres humanos, animales y productos de origen animal y mercaderías aumenta los desafíos relacionados con la introducción de agentes exóticos, uno de los cuales es la fiebre aftosa para un número creciente de países -en la actualidad, 95- que se encuentran libres de fiebre aftosa o que no han registrado la enfermedad en los últimos años. Aún los países con aftosa enzoótica, deben protegerse de la introducción de otros serotipos o cepas "nuevas o emergentes" de virus exóticos, diferentes a las autóctonas.

## II. ACUERDO GENERAL DE ARANCELES Y COMERCIO (GATT=GENERAL AGREEMENT FOR TARIFFS AND TRADE) Y LA ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE COMERCIO (OMC)

El GATT se inició en 1947 con la firma del acuerdo original por 23 países y en 1994 lo integraban 125 países signatarios. Han habido siete rondas de negociaciones, siendo la última la Ronda Uruguay que comenzó en 1986 en Punta del Este, Uruguay cuyo acuerdo final fue firmado el 15 de Abril de 1994 en Marruecos, luego de siete años de negociaciones. Este acuerdo se puso en ejecución el 1° de enero de 1995.

El GATT tenía como objetivo

reducir y eliminar las barreras al comercio, inversión y servicios entre los países integrantes del Acuerdo.

La nueva Organización Mundial de comercio (OMC), creada por el Acuerdo para sustituir al GATT tiene como objetivo propender a la expansión del comercio y garantizar que los acuerdos se adopten como "un todo único". La OMC debe facilitar la aplicación, administración y funcionamiento del Acuerdo, sea el foro para las negociaciones entre países miembros acerca de las relaciones comerciales multilaterales y administrar el entendimiento relativo a las normas y procedimientos por los que se rige la solución de diferencias.

La Ronda Uruguay incluyó por primera vez en las negociaciones el tema de la agricultura. Hasta entonces la producción y comercialización de alimentos había sido considerada un asunto de seguridad nacional innegociable. En la actualidad muchos países desean exportar y/o importar alimentos y hay numerosas distorsiones y restricciones que necesitan ajustes y armonizaciones. Además de la eliminación de barreras tradicionales como las cuotas y aranceles que limitan, cohiben o impiden el comercio, el Acuerdo de la última ronda, tratará de controlar la aplicación y uso de barreras no arancelarias como es el caso de las aplicaciones de estándares técnicos y medidas sanitarias y fitosanitarias injustificables que han sido usadas con frecuencia con propósitos proteccionistas.

El desafío para la agricultura es liberalizar el comercio con riesgos mínimos de introducción de enfermedades animales y pestes agrícolas. Debe buscarse un equilibrio, entre la liberalización del

comercio de los animales y productos de la agropecuaria y el derecho de las naciones para autoprotgerse contra la introducción de males que afecten la agricultura y la salud pública.

El acuerdo reconoce ese derecho e introduce un conjunto de principios destinados a fomentar y liberalizar el comercio manteniendo los estándares de seguridad sanitaria y fitosanitaria con base en los principios y conocimientos científicos.

En el circuito libre de fiebre aftosa la tradición entre países que comercian activamente animales, productos de origen animal y productos agrícolas ha sido basada, desde el punto de vista sanitario, en el Smoot-Hawley TARIFF ACT de la sección 1306 (a) del 17 de Junio de 1930 de E.E.U.U. que prohibía el comercio de animales y productos de origen animal no tratados procedentes de países afectados por la fiebre aftosa y/o la peste bovina. La estrategia política de defensa sanitaria exigía la declaración de un país como "libre de enfermedad" o como "infectado" aplicándose el criterio de país como una unidad. Se basaba en el riesgo cero; sin embargo la condición de riesgo cero es inalcanzable. Científicamente nunca se puede probar indefinidamente un negativo; la probabilidad cero es una construcción teórica, y no práctica, un camino dicotómico del todo o nada, del si o no. Se trataba de evitar el riesgo sin evaluarlo ni administrarlo.

El TARIFF ACT de 1930 restringía la capacidad para reconocer zonas libres de una enfermedad dentro de las fronteras de un país. Canadá y EEUU liberalizaron hace más de dos décadas la importación de animales

en pie y material genético disponiendo para ello de la aplicación de un eficiente diagnóstico y de medidas cuarentenarias estrictas en el país de origen (exportador) y en estaciones cuarentenarias de seguridad de sus propios países. Los acuerdos del GATT y NAFTA exigieron la modificación de este instrumento legal de gran poder en la historia del comercio mundial agropecuario, para adecuarlo al cumplimiento de los acuerdos a fin de introducir el concepto de regionalización y el reconocimiento de áreas libres y de baja prevalencia de enfermedades y pestes dentro de un país o una región.

Se reconoce como principio fundamental que las medidas sanitarias destinadas a proteger la salud humana y animal y las medidas fitosanitarias de preservación vegetal deben basarse en la ciencia.

La información usada para evaluar la aceptabilidad de una importación debe estar basada en los conocimientos e información científica y es obligación considerar la nueva información y conocimientos científicos que surjan en el proceso de aceptación de una importación, de una manera flexible y bien documentada.

La documentación debe ser transparente, es decir precisa, entendible y veraz para todas las partes involucradas en la negociación. Esta nueva apertura del comercio internacional en el sector agricultura impone compartir los documentos y conocimientos para la toma de decisiones sobre la aceptabilidad o rechazo de una exportación propuesta.

El Acuerdo promueve la armonización a través del amplio

uso de estándares internacionales y la creación de un sistema de ajuste y liquidación de disputas que surjan entre los países miembros.

Están contenidos en el Acuerdo las previsiones siguientes:

### 1. Derechos básicos.

Las medidas para proteger la salud de los animales y plantas deben:

- a) estar basadas en la ciencia
- b) ser transparentes en su desarrollo e instrumentación, y
- c) no discriminar arbitraria o injustificadamente entre productos y mercaderías similares de la otra parte cuando son idénticas o predominan condiciones similares y presentan riesgos similares o idénticos.

### 2. Valoración o evaluación del riesgo.

Se requiere un análisis del riesgo basada en metodologías y datos científicos a fin de identificar, cuantificar y documentar un riesgo determinado. El análisis del riesgo requiere:

- a) determinar la magnitud del riesgo
- b) establecer cómo se controla o administra el riesgo
- c) utilizar metodologías, técnicas y estándares internacionales.

### 3. Equivalencia.

Debe demostrarse con documentación científica que un procedimiento o sistema sanitario provee el mismo grado de protección que el sistema o procedimiento aplicado en el país importador. En este caso los países

miembros de la OMC deben aceptarlo como equivalente y el país exportador debe demostrar objetivamente esa equivalencia.

### 4. Estándares internacionales.

El acuerdo recomienda a los países que, siempre que sea posible, deben basar sus medidas sanitarias y fitosanitarias sobre estándares internacionales. Estos estándares deben ser desarrollados por la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) para el área de salud animal y por la Convención Internacional de Protección de las Plantas (CIPP) para la salud vegetal y por el Codex Alimentarius para las normas sobre alimentos y prácticas equitativas en el comercio de alimentos. Siempre que sea posible deben usarse los estándares y guías internacionales. La meta es la búsqueda de la armonización de los estándares sanitarios y fitosanitarios entre los países miembros de la Organización Mundial de Comercio. Si bien los países no tienen obligación de utilizar los estándares internacionales deberán, en caso de no hacerlo, justificar su actitud. El uso de los estándares internacionales trata de reducir las variaciones innecesarias o impropias entre los estándares técnicos de salud, los cuales a menudo causan disputas comerciales.

### 5. Regionalización

La Ronda Uruguay del GATT insta a los países a reconocer áreas libres de enfermedades o pestes, así como áreas de baja prevalencia de las mismas. Es un reconocimiento a las fronteras epidemiológicas. Las evidencias necesarias para reconocer áreas libres y de baja

prevalencia se basan en la evaluación o valoración del riesgo. El país exportador debe demostrar que un área es libre y tiene condiciones de mantenerse libre.

El proceso de valoración del riesgo debe ser transparente y científico, incluyendo criterios para evaluar la infraestructura veterinaria del país exportador, su capacidad de prevenir y controlar enfermedades; los sistemas de información y vigilancia epidemiológica y constante monitoreo; la legislación y reglamentos de exportación e importación de animales. Estas evaluaciones son necesarias para contribuir a la verificación de un área libre o de baja prevalencia y asegurar al país importador que la integridad del área especificada puede ser adecuadamente mantenida y preservada.

Los países que tengan una infraestructura veterinaria más desarrollada y eficiente, serán los más beneficiados por este principio de regionalización, mientras que los que tengan servicios veterinarios ineficientes estarán en situación de desventaja en la competitividad comercial.

Los EEUU a través del Servicio de Inspección de Salud Animal y Vegetal (APHIS- Animal & Plant Health Inspection Service) ha propuesto un enfoque de descarte de la noción de área libre o no libre, reemplazándolo por el concepto de niveles de riesgo. APHIS ha identificado seis grados de riesgo con un rango de: Riesgo Cero (RO) como el más bajo nivel de riesgo, R1, R2, R3, R4 con graduales aumentos de riesgo y RU, el más alto nivel. APHIS ha enunciado los factores de riesgo considerados en el desarrollo del perfil de estas clases

o grados de riesgo, los cuales incluyen:

- 1) Proximidad del área o áreas infectadas;
- 2) incidencia histórica de la enfermedad dentro del área;
- 3) regulaciones y prácticas de las vacunaciones dentro del área;
- 4) tipo de separación física de áreas de más alto riesgo;
- 5) tipo de importación de animales y productos animales desde áreas de más alto riesgo;
- 6) vigilancia de enfermedades dentro del área;
- 7) políticas de control de enfermedades y recursos de la infraestructura veterinaria y otros recursos para la prevención y control de la enfermedades animales;
- 8) demografía, población animal e infraestructura (científica, técnica y de servicios) dentro del área.

Este enfoque del APHIS, EEUU de reconocimiento de categorías de riesgo o estados de salud animal es consistente con los conceptos de regionalización de la Ronda Uruguay del GATT y del NAFTA que requieren que los países reconozcan no solamente "áreas libres de enfermedades" sino también "áreas de baja prevalencia de enfermedades".

## 6. Transparencia

El Acuerdo incorpora previsiones destinadas a alentar la mayor transparencia en el proceso de legislación doméstico relacionado con el comercio. Se requiere que los países provean notificación adelantada de manera que otros países puedan acceder a la información y documentación relativas a los procedimientos,

decisiones y otras informaciones vinculadas al establecimiento de medidas sanitarias y fitosanitarias.

Este principio de transparencia, exige a los países notificar con antelación la instrumentación de nuevas regulaciones que afectarán al comercio, con excepción de las situaciones de emergencia. Este plazo da tiempo a los países a comentar y provee una oportunidad o apertura para el análisis del riesgo y otros aspectos del comercio que las medidas propuestas pudieran afectar.

## 7. Comisiones Sanitarias y Fitosanitarias

El Acuerdo convoca a la formación de Comisiones Sanitarias y Fitosanitarias cuya función principal es vigilar (inspeccionar) y hacer el monitoreo de la instrumentación del acuerdo.

Estas Comisiones juegan un papel vital en:

- 1) facilitar las consultas en problemas sanitarios y fitosanitarios específicos que surjan en el comercio,
- 2) promover la cooperación técnica,
- 3) resolver los problemas que se presenten sobre los estándares sanitarios y fitosanitarios.

## 8. Consultas sobre ajustes o liquidación de disputas

Las disputas deben tratar de resolverse en la primera instancia con conversaciones entre dos o más países involucrados en el diferendo. Si no hay acuerdo la negociación prosigue, en un segundo paso que corresponde a la consulta a Comisiones sanitarias y fitosanitarias que deben basar sus informes en evidencias y

conocimientos científicos, en estándares internacionales y en los principios de la OMC. Las Comisiones de expertos tienen carácter asesor y no es obligatorio aceptar sus recomendaciones, no obstante su papel es fundamental en la liquidación de disputas. Si la disputa no se resuelve en el nivel técnico de las Comisiones, el país que ha presentado la queja puede elevarla, invocando el proceso de liquidación o ajuste formal de la OMC. El desafío formal se eleva y se define en el Organismo de Solución de Diferencias de la Organización Mundial del Comercio.

## III. CODEX ALIMENTARIUS

El Codex Alimentarius (CA) fue establecido en 1963 y actualmente está integrado por 138 países miembros. El Programa Común es ejecutado en forma conjunta por la FAO y la Organización Mundial de la Salud (OMS) y su Comisión del Codex Alimentarius.

El CA tiene como propósito promover la coordinación de las Normas Alimentarias, proteger la Salud de los consumidores y velar por las prácticas leales en el comercio alimentario. La protección de los alimentos es una de las acciones esenciales que deben desarrollar los países para mejorar la nutrición humana y facilitar el comercio internacional de los alimentos en forma más segura y confiable.

El componente de Salud del Codex Alimentarius ha sido incorporado en el Acto Final de la Organización Mundial de Comercio (OMC) del Acuerdo sobre Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias (Acuerdo SPS), en el que se citen específicamente normas, directrices y recomen-

daciones del Codex para proteger la Salud humana de los peligros transmitidos por los Alimentos.

En marzo de 1995 se celebró en la Sede de la OMS, Ginebra, una consulta mixta FAO/OMS de Expertos en la Aplicación del Análisis de Riesgos sobre asuntos de Normas Alimentarias. Se acordó un modelo de evaluación de riesgos en relación con la inocuidad de los alimentos constituidos por cuatro componentes:

- 1) identificación de los peligros,
- 2) caracterización de los peligros,
- 3) evaluación de la exposición,
- 4) caracterización de los riesgos.

En este inicio del análisis del riesgo se trataron los productos biológicos y químicos que hay en los alimentos.

#### IV. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Centro Panamericano de Fiebre Aftosa.** 1984. Río de Janeiro, Brasil. Manual de Procedimientos para preservar, ampliar y lograr áreas libres de fiebre aftosa en América del Sur. Serie de Manuales Técnicos N°7, ISSN 0101-6970, pp 1-70.
2. **Casas Olascoaga, R.; Estupeñan, J.; Saravia, V.** 1989. Importancia de la creación, ampliación y preservación de áreas libres de fiebre aftosa en las Américas. Presentado en la reunión del 15° Aniversario del Programa de Cooperación Técnica ICA-Colombia/USDA, USA, realizada en Medellín, Colombia.
3. **Casas Olascoaga, R.; Rosenberg, F.J.; Astudillo, V.M.; y Zottele, A.C.** 1988. Perspectivas para la aplicación de nuevas tecnologías para combatir y erradicar enfermedades infecciosas. Consulta de Expertos sobre el Fomento de la Producción Ganadera en América Latina y el Caribe. FAO, Montevideo, 26-28 setiembre. AGA:PLP/LA/88/7.
4. **Casas Olascoaga, R.** 1991. Estrategia continental en la lucha contra la Fiebre Aftosa, En: XXIV Congreso Mundial de Veterinaria, Rio de Janeiro, Brasil, 18-23 de agosto.
5. **Hathaway, S.C.** 1991. The application of risk assessment methods in making veterinary public health and animal health decisions. Rev. Sci. Tech. Off. int. Epiz., 10 (1), 215-231.
6. **USDA:APHIS:VS.** 1994. Centers for Epidemiology and Animal Health, Fort Collins, Colorado, Foot and Mouth Disease; Sources of Outbreaks and Hazard Categorization of Modes of Virus Transmission.
7. **Ahl, A.** 1994. Regionalization, Risk Analysis, and Exotic Agents. Proceedings Ninety-eight Annual Meeting of the United States Animal Health Association. Grand Rapido, Michigan, pp 125-128.
8. **Sheesley, D.J.,** 1994. GATT and NAFTA: Impact on USDA and Agriculture Proceedings Ninety-eight Annual Meeting of the United States Animal Health Association. Grand Rapido, Michigan, pp 129-137.
9. **Acuerdo sobre Medidas Sanitarias y Fitosanitarias,** 1994. Ronda Uruguay del GATT, Marruecos.
10. **Animal and Plant Health Directorate.** 1994. Food Production and Inspection Branch, Agriculture and Agri-Food Canada. Risk Assessment Models of the Animal and Plant Health Risk Assessment network.
11. **Animal and Plant Health Risk Assessment Network,** 1994. Research Division. Animal and Plant Health Directorate Food Production and Inspection Branch. Agriculture and Agri-Food Canada, A general Model for Animal Health Risk Assessment.
12. **Consulta Mixta FAO/OMS,** 1995. Aplicación del análisis de riesgo a cuestiones de Normas Alimentarias WHO/FNU/FOS/95,3. Ginebra, Suiza.