

974007 2

DIAGNOSTICO DE ANEMIA INFECCIOSA EQUINA EN COLOMBIA POR LA
PRUEBA DE INMUNODIFUSION DE COGGINS.

T E S I S

Presentada al Programa de Estudios para Graduados
Universidad Nacional - Instituto Colombiano Agropecuario

POR

JAIME RAMIREZ JAUREGUI

Como requisito parcial para optar al grado de

MAGISTER SCIENTIAE

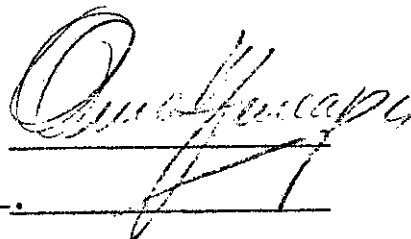
BOGOTA - COLOMBIA

1974

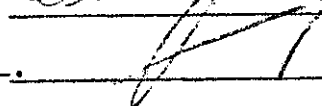
TESIS APROBADA POR

COMITE CONSEJERO:

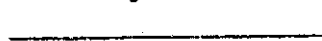
DR. OMAR HINCAPIE N.



DR. GUSTAVO MANRIQUE L.



DR. OTTO SANCHEZ F.



El Presidente de tesis y el consejo examinador de grado, no serán responsables de las ideas emitidas por el candidato.

(Artículo 217 de los Estatutos de la Universidad Nacional)

A mi querida esposa
y a mis hijos
A mi madre

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), a la Escuela para Graduados UN-ICA y al Comité Consejero por sus valiosos aportes en la realización del trabajo.

MICROBIOGRAFIA

Jaime Ramírez Jáuregui nació en Bogotá en el año de 1.943. Terminó sus estudios de bachillerato en el Colegio San Simón de Ibagué en el año de 1.962. Ingresó a la Universidad del Tolima y allí recibió el título de Médico Veterinario Zootec_unista en el año de 1.968.

Fué profesor de la Universidad del Tolima en la Cátedra de Enfermedades Infecciosas y en el año de 1.970 ingresó al Instituto Colombiano Agropecuario, donde desempeñó el cargo de Veterinario del Centro de Diagnóstico de Ibagué, cargo en el cual permaneció hasta su ingreso a la escuela para graduados en ciencias agrarias.

CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCION.....	1
1.1. Naturaleza del problema	1
1.2. Objetivos	2
2. REVISION DE LITERATURA	3
2.1. Historia	3
2.2. Susceptibilidad	3
2.3. Mecanismo de infección	4
2.4. Formas clínicas	4
2.5. Inmunidad	5
2.6. Mecanismo de aparición de anemia	6
2.7. Caracterización y cultivo	7
2.8. Diagnóstico	9
2.8.1. Fijación del complemento	9
2.8.2. Neutralización	10
2.8.3. Prueba de precipitación	11
2.8.4. Anticuerpos fluorescentes	11
2.8.5. Presencia de sideroleucocitos	12
2.8.6. Cambios en proteína y lípidos del suero.....	13
2.8.7. Hemaglutinación	14
2.8.8. Inmuno-adherencia	14
2.8.9. Hemaglutinación indirecta	14
2.8.10. Inmunodifusión de Coggins	15
2.9. Patología	16
2.10. Inmunización	19
3. MATERIALES Y METODOS	20
3.1. Preparación del antígeno	20
3.2. Montaje de la prueba	20
3.3. Obtención del antígeno Wyoming	23
3.4. Obtención de los sueros	23

	Página
4. RESULTADOS Y DISCUSION	24
4.1. Antígeno	37
4.2. Sueros	39
4.3. Resultados	40
4.3.1. Lesiones macroscópicas	41
4.3.2. Lesiones histopatológicas	41
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	50
6. RESUMEN	52
7. SUMMARY	53
BIBLIOGRAFIA	54

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Equino 5 primer animal inoculado con virus de AIE dosis 50 ml.....	25
2.	Equino 11 inoculado con 50 ml. de suero virulento de AIE	26
3.	Equino Alazan inoculado con 50 ml. de suero virulento de AIE.....	27
4.	Equino 2 J. inoculado con 20 ml. de suero virulento de AIE.....	28
5.	Equino 378 inoculado con 20 ml. de suero virulento de AIE.....	29
6.	Equino 377 inoculado con 20 ml. de suero virulento de AIE.....	30
7.	Equino 379 inoculado con 20 ml. de suero virulento de AIE.....	31
8.	Equino 1683 inoculado con 20 ml. de suero virulento de AIE.....	32
9.	Equino B Coggins inoculado con 6 ml. de suero virulento de Coggins	33
10.	Prueba de Inmunodifusión de Coggins con los sueros controles positivos y sueros de campo positivos	34
11.	Prueba de Inmunodifusión montada con 2 sueros controles positivos los sueros restantes son negativos	35

12.	Prueba de Immunodifusión con sueros positivos e inespecíficos negativos	36
-----	--	----

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Relación de muestras tomadas en el Departamento de Antioquia	42
2.	Relación de muestras tomadas en el Departamento de Córdoba	43
3.	Relación de muestras tomadas en el Departamento de Cundinamarca	44
4.	Relación de muestras tomadas en el Departamento del Meta	45
5.	Relación de muestras tomadas en el Departamento de Santander	46
6.	Relación de muestras tomadas en el Departamento del Tolima	47
7.	Relación de muestras tomadas en el Departamento del Valle	48

1. INTRODUCCION

1.1. NATURALEZA DEL PROBLEMA

La Anemia Infecciosa Equina (AIE) es una enfermedad infecciosa que afecta los equinos convirtiendolos en portadores de por vida gracias a la formación de complejos inmunes.

Esta enfermedad ha merecido poco interés en el ámbito agropecuario; parece ser que éste desacato se debe a la poca ilustración que se tiene, lo cual hace que la AIE en virtud de su sintomatología poco peculiar, sea confundida con toda clase de enfermedades hemolíticas. Si bien es cierto que hoy día el caballo ha sido desplazado por artefactos mecanizados en casi todas las latitudes, en Colombia por su singular topografía no puede ser remplazado ni a corto ni a largo plazo.

La AIE esta diseminada por todo el mundo y produce pérdidas considerables en casi todos los continentes, de suerte, que es imperativo su estudio en nuestro medio donde el ganado caballar es imprescindible como medio de transporte. Como las técnicas de diagnóstico empleadas no han rendido óptimos resultados para ser utilizadas en forma confiable, no existen datos precisos que indiquen su grado de infecciosidad y zonas de incidencia.

El control y erradicación de la AIE en el mundo ha sido difícil, debido a la falta de métodos seguros y específicos para el diagnóstico. En Colombia el Instituto Colombiano Agropecuario ha practicado juiciosos estudios histopatológicos, pero como es obvio, ésta técnica adolece de ciertas limitaciones que se reflejan en la lentitud del diagnóstico y la dificultad de emplearla en forma masiva puesto que se realiza principalmente post-mortem o por biopsias que no siempre resultan viables.

Hoy con el perfeccionamiento de nuevas técnicas se está en mora de efectuar los diagnósticos requeridos para conocer exactamente la infecciosidad.

dad de la enfermedad y su distribución en el país.

Se ha empleado por mucho tiempo el cuadro hemático para el diagnóstico de la AIE, pero ocurre que no es patognomótico de la enfermedad, algo similar ocurre con la investigación del número de siderositos que solo es confiable en países como el Japón donde no existen enfermedades como tripanosomiasis y piroplasmosis.

Los anticuerpos fluorescentes otorgan óptimos resultados, pero presentan el inconveniente de que requieren el cultivo de leucocitos y en algunos animales estos degeneran rápidamente.

La técnica más efectiva y que se utilizó en éste trabajo, es la prueba de inmunodifusión de Coggins (2), desarrollada en 1.969. El material usado es el suero sanguíneo cuyos anticuerpos precipitantes persisten por tiempo indefinido.

1.2. OBJETIVOS

1. Producir un antígeno para el diagnóstico de AIE a partir de reactores positivos de nuestro medio.
2. Realizar un estudio comparativo de eficiencia entre el antígeno local y el antígeno derivado de la cepa Wyoming utilizado por Coggins con los sueros obtenidos en las distintas regiones del país.
3. Precisar algunas zonas de incidencia de AIE en el territorio Nacional.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1. HISTORIA

La AIE o fiebre del pantano fué descrita por primera vez en Francia en 1.843. En ese tiempo se consideró como una carencia nutricional. Más tarde, en 1.589 Anginiard citado por Ishii (13), confirmó que se trataba de una enfermedad infecciosa, y Vallé y Carré citados por el mismo autor demostraron experimentalmente en 1.904 que se trataba de una enfermedad causada por un virus (13).

En Colombia la enfermedad se diagnosticó por primera vez en la Guajira en 1.948. Este diagnóstico se hizo en base a estudios hematológicos. Después, en el año de 1.965, el Instituto Colombiano Agropecuario inició estudios de esta enfermedad en el Laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias (LIMV), con animales pertenecientes a la policía Nacional, de los cuales se aisló el virus responsable y se reprodujo la enfermedad.*

2.2. SUSCEPTIBILIDAD

Se reconoce generalmente que solo los equinos son susceptibles a la infección, se han hecho intentos de producir la enfermedad en gatos, ovejas, cabras, conejos, curies y micos sin obtener resultados precisos (28).

Miura et al citados por Moreman y Smith (28), detectaron el virus en el bazo de ovejas, 77 días después de inoculadas con sangre de equinos infectados.

Sakaki et al citados por Moreman y Smith (28), inocularon cerdos recién nacidos con suero infectado de caballo, el virus fué aislado del bazo cinco días más tarde pero ello no ha sido sustentado.

Según Ishitani (14), los cerdos han sido considerados como los más susceptibles después de los équidos, pero el virus solo fué detectado durante cinco días.

* Comunicación personal Dr. Omar Hincapié N.

2.3. MECANISMO DE INFECCION

Ishii (13), observó que las especies de insectos más importantes en la difusión de la enfermedad son Aedes togonii, Anopheles maculipennis, Psorophora columbiae, Stomoxys calcitrans y la familia Tabanidae. Las agujas hipodérmicas y el instrumental quirúrgico son también responsables de la infección.

2.4. FORMAS CLINICAS

La AIE presenta cuatro formas clínicas: aguda, subaguda, crónica y portadores latentes, aunque es posible que el animal pase de un cuadro clínico a otro. La enfermedad se caracteriza básicamente por fiebre, anemia, depresión, edema y emaciación (28, 39). De acuerdo con Pearson (39), el período de incubación es de 8-21 días, pero se han observado períodos de 61 días. El tiempo de incubación no parece estar correlacionado con la severidad de la enfermedad. Los animales rara vez mueren antes de los 14 días en la fase aguda, a no ser que se complique con infecciones secundarias bacteriales o parasitismo. Después de la primera exacerbación los caballos permanecen deprimidos, si la forma aguda continúa, se presenta debilidad creciente, anemia, hemorragias en las submucosas, hemorragias profundas de las heridas y edema de las partes declives. La reacción febril puede continuar hasta la muerte o bien puede retornar a lo normal y la enfermedad revierte a la forma subaguda o crónica por algún tiempo. En la forma subaguda presenta ataques febriles similares a la anterior pero la muerte ocurre con menos frecuencia. Se presenta depresión y anorexia.

En la forma crónica el animal presenta ataques febriles aproximadamente cada treinta días. Es común no detectar otros signos clínicos diferentes del alza de temperatura. El intervalo entre dos episodios febriles puede ser de años o revertir a la forma aguda especialmente después del stress (39).

En la forma latente los signos clínicos regularmente no aparecen, o bien, pueden ser provocados por otras enfermedades infecciosas, por la cirugía, el trabajo excesivo o la mala nutrición (15).

2.5. INMUNIDAD

En la AIE como en otras enfermedades virales, el virus persiste en los tejidos por largo tiempo y con un título relativamente alto sin producir síntomas. Este grupo de enfermedades ha sido llamado por Sidgurson citado por Hincapié (12), enfermedades de virus lentos. El virus de la AIE como el virus de la coriomeningitis linfocitaria, el complejo visna-maedi, la enfermedad del Visón Aleusiano y el virus de la deshidrogenasa láctica, están en éste grupo. Los animales que desarrollan esta enfermedad permanecen portadores por largo tiempo y poseen una viremia permanente, además, poseen complejos antígeno-anticuerpo persistentes. Los estudios tienden a indicar que el virus no es destruido por los leucocitos, y la constante asociación de virus con leucocitos y macrófagos sugiere que esas células pueden ser muy importantes en la patogenesis de la enfermedad (12).

Se han hecho muchos estudios sobre la naturaleza auto-inmune de la AIE. La teoría del antígeno secuestrado sobre auto-inmune, postula que todos los antígenos sobre la superficie celular durante la vida embrionaria se ponen en contacto con linfocitos circulantes y posteriormente siempre son reconocidos como propios, pero los antígenos que están bajo la superficie celular o no son accesibles a los linfocitos a causa de la vascularización vedada de un órgano dado, no son reconocidos en el embrión y por lo tanto no quedan impresos en los linfocitos. Si tal antígeno secuestrado es más tarde expuesto por infección o trauma, los linfocitos reaccionan como a una proteína extraña y se producen anticuerpos autoinmunes. Esos anticuerpos ocurren en altos títulos y aparecen rápidamente en las infecciones agudas (41). Así, los animales que llevan el virus en forma crónica son altamente susceptibles a enfermedades autoinmunes porque el virus destruye las células y libera antígenos ocultos. En animales que sufren traumas ó un stress fuerte que destruyen las células, puede desencadenar la enfermedad autoinmune, pero aún no se sabe si los anticuerpos son los responsables o no de esta enfermedad o concomitantes a ella (41).

Existe evidencia de que se presenta una respuesta inmune directamente contra el virus en animales infectados con AIE, pero no hay prueba de que algu

nos animales desarrollen una sólida inmunidad aunque presenten períodos de aviremia. Así que la respuesta inmune es ineficaz en neutralizar o inactivar el agente in vivo a diferencia de lo que sucede en otras enfermedades virales (41).

2.6. MECANISMO DE LA APARICION DE LA ANEMIA

Algunos estudios tienden a indicar que los eritrocitos de caballos infectados tienen una vida más corta que los normales, además, se afirma que el virus de AIE se adhiere a los eritrocitos y posteriormente a los anticuerpos y a la fracción C'3 del complemento. Matthias *et al.* citados por Henson y *et al* (10), han reportado que los eritrocitos lavados de caballos infectados, transmiten AIE a caballos probados como negativos. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que las aglutininas frías, inmunoglobulina M son probablemente responsables de la unión de la fracción C'3 del complemento a los eritrocitos. La relación de ésta inmunoglobulina y el virus no está claro (10).

Los caballos infectados con AIE desarrollan viremia que persiste de por vida, anemia hemolítica por acción de la fracción C'3 del complemento adherido a los eritrocitos, depresión de la eritropoyesis, hipergamaglobulinemia, depósito del complejo virus-anticuerpo y la fracción C'3 del complemento en glomérulos y disminución de los niveles circulantes de ésta fracción. Se afirma que el virus circula como un complejo con la gamaglobulina y que posteriormente se deposita en el glomérulo. No se sabe si el antígeno viral representa viriones intactos u otro antígeno viral. La importancia cardinal de la infección con el complejo virus anticuerpo, en la persistencia del virus en AIE y otras infecciones virales es materia de estudio. Parece razonable pensar que la infección con el complejo virus-anticuerpo asegura la persistencia viral proporcionando una fuente de anticuerpos que protegen al virus al infectar células susceptibles (24).

De acuerdo con Ishii (13), la anemia que se presente en AIE no es causada por la acción directa del virus sobre el eritrocito, sino por la activación de células reticuloendoteliales que han sido inducidas por la estimulación del virus de AIE cuyo resultado es el incremento en la habilidad para fago-

citar eritrocitos, producir hemorragias en vísceras y conformar una sustancia productora de anemia. Esta sustancia ha sido demostrada en el suero de animales infectados en el estado fébril y además, actúa sobre los nervios vasomotores, produciendo parálisis del bazo, hígado y otros órganos. Se observa también que la proliferación de células redondeadas basofílicas grandes en la medula de los caballos infectados produce declinación de la actividad eritropoyética por degeneración y atrofia del tejido hematopoyético.

2.7. CARACTERIZACION Y CULTIVO

La caracterización del agente causal se había demorado debido a la falta de un método adecuado para inducir el crecimiento del virus. Recientemente, sin embargo, se estableció la técnica de cultivo en leucocitos y con ello ha sido posible establecer ensayos cuantitativos in vitro (16, 23).

El virus fué demostrado cuantitativamente en cultivo de leucocitos empleando el efecto citopático como indicador. También, se probaron diferentes cepas exhibiendo todas ellas efecto citopático como la cepa Wyoming, la cepa Goshun, la cepa New Hampshire y la cepa German (16,19,23).

Moore (26), posee una técnica de implantación de leucocitos que presenta algunas variaciones. Este método es mucho más eficiente (100 ml de sangre completa producen 200 ml de cultivo utilizable, mientras los Japoneses solo obtienen 10 ml con la misma cantidad de sangre). Las células desarrolladas por el método de Kobayashi (16), crecen bien pero son menos numerosas que las obtenidas por el método de Moore. Ambas técnicas mostraron una adaptación lenta necesitando de seis a siete pasajes antes de obtener títulos altos.

Las células en las cuales se multiplican el virus son de la serie linfocítica. Al colorearlas con Wright se encontró que se producía una rápida degeneración de la serie granulocítica a excepción de los eosinófilos. Las células de la serie linfocítica crecían con más citoplasma que los linfocitos naturales (26).

El aislamiento del virus se produce a partir del cultivo de leucocitos (26,27).

Se han encontrado tres fracciones diferentes al purificar el virus en columna de Sefadex G-200. La fracción I cuyo tamaño es de 30-50 mm es sensible al éter y posee DNA. La fracción II de tamaño variable se presenta en gran concentración, produce hemaglutinación de células rojas de pollo que pueden ser inhibidas específicamente por antisueros preparados en conejos u ovejas. La fracción III no ha sido muy bien estudiada, se presenta en cultivos infectados y no infectados. No es antigénica al inocularla en animales experimentales (26).

Se han hecho numerosos intentos para cultivar el virus de AIE en varios tipos de células. Kono y Yokomizo (21), trataron de propagar dos líneas de virus de la cepa Wyoming; el virus fué probado en cultivo de células de riñón de caballo, células de médula ósea, leucocitos peritoneales, células de riñón de animales de laboratorio, células de embrión de pollo, células Hela, células KB y células BHK'21. El virus de las dos líneas no creció en ninguno de los sistemas culturales empleados. El virus de las dos líneas Wyoming fué adaptado a leucocitos de caballo por 50 pasajes y así logró propagarse en células de riñón de caballo. Se presume que el virus crece en cultivo de células de medula ósea (32).

El - Zein et al (5), estudiaron el comportamiento del virus en células de testículo de conejo, células de testículo de caballo, células de carcinoma uterino (Hela), células de carcinoma oral (KB), células de médula ósea de ratón (MBM). El virus no produjo efecto citopático en los sistemas empleados. La replicación viral en algunos de los sistemas celulares fué demostrada por interferencia viral, empleando virus de estomatitis vesicular. La actividad de interferencia fué mantenida por pocos pasajes en cultivo de células.

Nakajima et al (32) concluyeron que el virus mide de 90-140 mm. El tipo de ácido nucléico del virus de AIE fué determinado empleando la técnica de isótopos. En esta investigación el virus se cultivó en leucocitos de caballo en presencia de H^3 Thymidina o H^3 Uridina y se observó cual precursor se incorporaba. El virus se purificó de cada cultivo infectado por procedimientos combinados de ultracentrifugación, cromatografía por columna de DEAE y equilibrio con cloruro de Cesio por gradientes de densidad. Se encontró que el H^3 Uridina se incorporaba dentro del virus

mientras que el H^3 Thimidina no se detectó dentro del virus. Se concluye que el virus posee RNA. Por las características fisicoquímicas y biológicas el virus de AIE se establece que es similar al RNA que contienen los virus de los tumores y visna -maedi virus (32). Moore et al (27), sugieren que el virus de la AIE es probablemente un virus pequeño DNA.

El virus de la AIE es resistente a la tripsina. Esto significa que no hay probablemente cadenas de péptidos de los aminoácidos básicos arginina y tripsina o de otros aminoácidos en la superficie del virus (31).

El virus es sensible al éter, y la densidad se considera que está entre 1,14 - 1,20 g/ml. y la proteína contaminante está localizada en una densidad de 1,28 g/ml. (29,30).

2.8. DIAGNOSTICO

2.8.1. Fijación del complemento.

Los anticuerpos fijadores de complemento se presentan aproximadamente 18 días después de la exposición, pero como ha sido observado con el antígeno cultivado en leucocitos, éstos anticuerpos persisten solo por un corto período y no se aumentan con el progreso de la enfermedad, como a menudo ocurre en otras infecciones. Además, la reacción no reaparece después de una descarga con material virulento (9,17,18).

El hecho de que esta reacción se demuestre con un extracto salino de hígado y bazo de caballos normales, sugiere que no debe haber interacción del antígeno de AIE con los correspondientes anticuerpos. En consecuencia existe en el suero un factor pasajero que actúa como un anticuerpo que fija el complemento de curi en presencia de un antígeno inyectado o tejido normal de caballo. Este puede ser un anticuerpo anti-tejido que se desarrolla en el caballo después de la primera exposición a la infección (1,11).

La utilidad de la prueba de fijación de complemento en el diagnóstico de AIE es limitado, debido a la corta duración y la ausencia de éstos anticuerpos en casos avanzados de la enfermedad. Sólo tiene valor como indicador

de presencia de enfermedad en caballo experimentalmente inoculados con material sospechoso. Las características del antígeno fijador del complemento en AIE se estudió en relación a la infectividad del virus por la técnica de gradientes de centrifugación en sucrosa (24). El virus infectante se demostró principalmente en la tercera porción de las cinco fracciones logradas. Esta fracción solo fué antigénica cuando se usó en la prueba de fijación de complemento, previo tratamiento con éter. Con ello se concluye que el antígeno fijador del complemento no está localizado en la superficie de la partícula viral, sino que forma parte de ésta partícula. Se presume que el antígeno tratado con éter sea soluble pues no puede ser precipitado por ultracentrifugación a 100.000 g. por 2 horas (20).

2.8.2. Neutralización

La prueba de neutralización ha sido generalmente empleada en estudios de numerosas enfermedades virales pero no es frecuente en el estudio de AIE (42). Dregus y Lombard citados por Tenaka y Sakaki (42), obtuvieron resultados negativos en la prueba de neutralización empleando el suero de portadores recuperados de AIE.

Stein y Gates citados por Tenaka y Sakaki (42), indican que sí hay neutralización entre portadores recuperados infectados con cepa Wyoming, esto ocurrió cuando se mezcló virus y suero en proporción de 1:10 ó 1:40 y se calentó a 30°C por 24 horas, pero, el antisuero de un portador que se había recuperado de la infección producida con cepa California, falló en inhibir la acción del virus cuando éste pertenecía a la Cepa Wyoming o New Hampshire. De acuerdo a esto, el hecho de que el suero de un portador que se hubiera recuperado de la infección con el virus California fallara en neutralizar el virus perteneciente a la cepa Wyoming, sugiere la ausencia de anticuerpos específicos en el suero del portador. Es muy posible que exista alguna diferencia inmunológica entre las cepas del virus.

Según Nakajima y Ushimi (33), los anticuerpos neutralizantes se encuentran aproximadamente un mes después de iniciada la pirexia y persisten por largos períodos, estos anticuerpos reaccionan con el virus de tipo específico y no

con el virus de grupo específico, a diferencia de los anticuerpos precipitantes que reaccionan con el grupo específico. Los anticuerpos neutralizantes, precipitantes y fijadores de complemento se encuentran en la fracción 7 S de gamaglobulina.

2.8.3. Prueba de precipitación

La prueba de precipitación usada corrientemente, se basa en la producción de un antisuero en oveja empleando leucocitos infectados de caballo como agente inmunizante. Este antisuero se usa en pruebas de precipitación capilar empleando suero de caballos sospechosos como antígeno. La desventaja de ésta prueba consiste en que no detecta antígenos circulantes en caballos infectados antes de los ataques febriles. Además las muestras recolectadas y transportadas defectuosamente presentan falsos positivos. La mayor desventaja es la inhabilidad para detectar portadores con éste método (4,34).

Los estudios electroforéticos indican que la prueba de precipitación para AIE mide las proteínas anormales del suero. Esta proteína tiene una alta afinidad por las cargas positivas de los eritrocitos debido probablemente a la carga negativa de las proteínas. La naturaleza de ésta proteína no ha sido determinada, pero los estudios están encaminados hacia su identificación. Esta prueba puede mostrar reacciones negativas en el comienzo de la enfermedad. Un caballo positivo que se encuentre muy debilitado puede resultar negativo a la prueba de precipitación pocos días antes de la muerte (25).

Los anticuerpos precipitantes aparecen una a dos semanas después de iniciada la fiebre y son parecidos a los anticuerpos fijadores de complemento, sin embargo, los anticuerpos fijadores de complemento permanecen solo por un corto período después de la respuesta febril lo cual indica que no hay relación entre ellos (33).

2.8.4. Anticuerpos fluorescentes

Ushimi et al (43), emplean suero positivo de caballos infectados para la prueba de neutralización y gamaglobulina anti-equino marcada con fluores-

ceina, preparada en conejo para detectar células infectadas con virus de AIE producidas en cultivo de leucocitos, por la técnica indirecta de anticuerpos fluorescentes. En el cultivo inoculado con virus de AIE las células presentan una fuerte fluorescencia que está aumentada en los periodos más avanzados de la enfermedad. Esta fluorescencia fué observada exclusivamente en el citoplasma. Una fluorescencia no específica en algunas células del cultivo control se ha presentado pero generalmente es diferente de la fluorescencia específica.

2.8.5. Presencia de sideroleucocitos

El uso de siderocitos en el diagnóstico de AIE se ha empleado por muchos años. Sin embargo, la prueba no es específica puesto que aparecen en otras enfermedades hemolíticas como piroplasmosis y tripanosomiasis. El origen de los siderocitos no es claro, Ishii citado por Henson et al (9), establece que la presencia de éstos concurre con la proliferación de histiocitos.

Sakamoto citado por Henson et al (9), indica que los siderocitos probablemente se derivan de los histiocitos liberados por los tejidos y por las células circulantes.

Oki citado por Henson et al (9), observa que hay un incremento en la circulación de ferritina libre en caballos afectados con AIE y que el aumento de sideroleucocitos y ferritina aparecen simultáneamente. También se ha observado eritrofagocitosis por leucocitos circulantes. Es posible que todos estos factores jueguen un papel importante en la producción de siderocitos, pero su relativa importancia es desconocida (9).

Según Granzien y Newton (6), los sideroleucocitos aparecen en la sangre periférica 6 días después de la elevación de temperatura inicial. En otros casos fué de 2 - 3 días.

Sakamoto citado por Granzien y Newton (6), considera que los siderocitos se originan de neutrófilos, monocitos, células retículo-endoteliales tipo II,

fagocitos y pequeñas células linfoides. El las clasifica de acuerdo a la naturaleza del contenido de hemosiderina, en granular, difusa y mixta. Los neutrófilos son de tipo granular los monocitos de tipo difuso o mixto. Los fagocitos de tipo difuso o mixto, y los pequeños linfocitos de tipo difuso.

Los sideroleucocitos no se detectan en animales normales, aunque el procedimiento tiene limitaciones en la interpretación de hallazgos en animales negativos, el examen de los siderocitos de la sangre de la vena yugular ofrece una guía rápida en el diagnóstico de AIE. Los resultados sugieren que la presencia de sideroleucocitos en la proporción de 4 en 10,000 es indicativa de la enfermedad. Los siderocitos se detectan unos días después del alza inicial de temperatura y en algunos animales existen largos períodos entre reacciones febriles ausentes de siderocitos. Por ello, aunque el encuentro de éstos es indicativo de AIE los resultados negativos no excluyen necesariamente la enfermedad (6,7).

2.8.6. Cambios en proteína y lípidos del suero

Se ha conocido por mucho tiempo que los caballos hiperinmunizados con varios antígenos bacteriales responden con la producción aparente de "nuevas" proteínas en el suero. Se trata de anticuerpos directos contra el agente, que pueden ser visualizados por electroforesis y por el método de Tiselius. Tales anticuerpos (Gama, Beta), han sido llamados "T" y tienen un peso molecular de 1 millón. Caballos que sufren AIE ocasionalmente tienen componentes anormales en el suero altamente parecidos a los componentes "T". Esto es más común en infecciones crónicas de AIE. Estos anticuerpos después de ser separados del suero infectado son usados en las pruebas de inmuno-adherencia y hemaglutinación (6).

Otro hallazgo interesante en AIE es el aumento inusitado de los lípidos del suero. Su etiología no es conocida parece ser que los lípidos se derivan de las células rojas destruidas o de otras células del cuerpo (6).

En AIE se presenta incremento en los valores de la deshidrogenasa láctica,

aumento de la actividad de la colinesterasa del suero y ligeros incrementos en la concentración de alpha 2 y gamaglobulina (38).

2.8.7. Hemaglutinación

Dregus y Lombard, citado por Ditchfield (4), afirman que las células rojas de la sangre derivadas de pollitos, se aglutinaban en presencia de sueros de caballos infectados. Saurino y asociados (40), también encontraron aglutinación en eritrocitos humanos tipo O, pero se ha comprobado que caballos con la forma aguda de la enfermedad o animales portadores, poseen el mismo nivel de hemaglutininas que en caballos normales.

2.8.8. Inmuno-adherencia

La inmuno-adherencia es un fenómeno inmunológico de aglutinación de células rojas de primate en presencia del complejo antígeno - anticuerpo - complemento, originalmente descrita por Nelson citado por Ditchfield (4). La prueba ha sido empleada por Saurino et al. (40), en el diagnóstico de AIE, puesto que la sangre de caballos infectados contiene el complejo antígeno - anticuerpo por todo el curso de la enfermedad. El suero de caballo puede contener hemaglutininas para células humanas tipo O empleadas en esta prueba, aunque los niveles de esas hemaglutininas pueden ser drásticamente reducidas por absorción con sangre humana tipo O, antes de la prueba. La técnica es laboriosa y produce falsos positivos (4).

2.8.9. Hemaglutinación indirecta

El antígeno y el anticuerpo pueden ser cubiertos con eritrocitos de oveja después de tratados con ácido tánico. Cuando tales eritrocitos son expuestos al antígeno correspondiente los anticuerpos son aglutinados. Esta prueba ha sido usada por Saurino et al. (40).

2.8.10. Inmunodifusión de Coggins

El desarrollo de una técnica de diagnóstico satisfactoria ha sido el esfuerzo de muchos investigadores. Prácticamente todas las pruebas y técnicas concebidas han sido experimentadas. En los estudios de Coggins y Norcross (2), se inocularon ponies susceptibles con cepa Wyoming que había sido cultivada en leucocitos de caballo por nueve días. El animal resultó febril cinco días después de la inoculación con temperatura de 106°F y moribundo a los diez días tiempo en el cual fué sacrificado. El bazo reaccionó en prueba de inmunodifusión en agar gel formando una línea de precipitación con el suero procedente de un pony sobreviviente a varias descargas con virus Wyoming. El suero de éste animal antes de la inoculación no presentó reacción de precipitación.

La especificidad de los anticuerpos se determinó por la prueba siguiente: se probaron sueros de ponies normales que no poseían anticuerpos detectables cuando se enfrentaron en la prueba de inmunodifusión, la mayoría de esos sueros contenían anticuerpos neutralizantes contra virus de aborto equino. La línea de identidad en la prueba de inmunodifusión no formó banda de precipitación con el virus de aborto equino. Un caballo con síntomas de fiebre recurrente, con disminución de peso y con edema presentó anticuerpos de AIE en el suero. El diagnóstico de AIE en éste caso fué confirmado por inoculación de un pony susceptible con sangre de animales sospechosos. También se presentó una línea de precipitación con sueros de ponies infectados con cepa Texas y con cepa New York. Se presentaron fuertes reacciones de precipitación en animales descargados repetidamente con virus de AIE (2,3).

De estas observaciones se deduce que para la preparación del antígeno es importante seleccionar animales que reaccionan severamente una semana después de la infección y extraer el bazo después de tres a cinco días de fiebre alta. Antígenos preparados de bazo tomado más tarde son muy débiles quizás debido a que existen demasiados anticuerpos que toman el antígeno (2,3).

Se han descrito casos de inmunodifusión con antígenos preparados a partir del páncreas pero parece que presentan bandas difusas tanto los derivados de páncreas normales como de páncreas infectados (2).

Hart y Broussard II (8), idearon una técnica para concentrar el antígeno utilizando ciertas sustancias que lo hacen más soluble (8).

Nakajima et al (36), afirman que no existe diferencia antigénica entre el virus de AIE purificado a partir de cultivo de leucocitos de caballo y un antígeno extraído de bazo de animales infectados. Los resultados indican que la sustancia antigénica derivada del bazo de caballos infectados es idéntica al virus de AIE y se concluye por lo tanto que cada reacción detecta los mismos anticuerpos en caballos infectados con esta enfermedad (35,36).

La reacción de inmunodifusión es una prueba de valor para el diagnóstico de AIE porque es altamente específica para AIE. Los anticuerpos precipitantes ordinariamente aparecen una o dos semanas después de iniciada la enfermedad y permanecen por largo tiempo; el antígeno viral purificado reacciona con el suero de caballos infectados con cuatro cepas diferentes de AIE (26).

Los viriones intáctos no entran en la reacción de inmunodifusión por los siguientes aspectos: el virus parece ser bastante frágil y el antígeno tratado con éter o por congelación y descongelación no producen cambios marcados en la reacción y las bandas de precipitación se forman a las 24 horas. Además, el antígeno reacciona con el suero de caballos infectados con diferentes cepas de AIE. Se deduce que el antígeno envuelto en la reacción no está en la superficie del virus y se trata más bien de un componente interno del virión que reacciona con el grupo específico (8, 37).

2.9. PATOLOGIA

En el estado inicial de la enfermedad las células basofílicas

juegan un papel importante en la lesión proliferativa del bazo y nódulo linfáticos. Esto es particularmente cierto con el tipo subagudo de la enfermedad. La observación al microscopio electrónico demostró que esas células podían dividirse en tres tipos de acuerdo a su estructura: tipo I, tipo II y tipo III. Las células Tipo I están relacionadas con células plasmáticas, plasmoblastos o sus derivados, con retículo endoplásmico de aspecto rugoso, aparato de Golgi bien desarrollado y distribución de cromatina nuclear. La lesión proliferativa en el bazo y nódulos linfáticos era de células tipo I en el caso subagudo. La lesión proliferativa de los tejidos linfáticos contenía unas pocas células del Tipo II y III (46).

Las células Tipo II están relacionadas con una forma primitiva de Tipo I, con retículo endoplásmico de superficie rugosa y la presencia de un aparato de Golgi moderadamente desarrollado y con dos o tres nucléolos. Las células de Tipo III se relacionan como células linfáticas inmaduras con gran cantidad de proteínas ribonucleicas formando rosetas, retículo endoplásmico con escasa superficie rugosa y nucléolos de forma irregular. Se puntualiza además, que al microscopio electrónico las células de los tipos antes descritos muestran la misma estructura de las células productoras de anticuerpos (46).

Los hallazgos histopatológicos descritos en la médula ósea vertebral, esternal y femoral son los siguientes: En los caballos infectados se presenta aumento de la médula ósea por una proliferación celular. Las células hematopoyéticas de la médula ósea, sin embargo, generalmente muestran una reducida formación que es particularmente notable en los tipos agudos y subagudos de la enfermedad, de manera que, en el caso de la enfermedad aguda, la hiperplasia de las células hematopoyéticas en la médula ósea se acompaña de edema severo del estroma y degeneración celular. La proliferación de células en la médula ósea se agrupa histológicamente en 3 formas: células reticulares derivadas del sistema reticuloendotelial, células blasto (grandes células basófilas redondas) y pequeñas células redondas. En la primera fase de la enfermedad, las células reticulares y células blasto son notables. Las peque

ñas células redondas son abundantes y acompañadas por células hemato - poyéticas en el caso crónico. En los casos agudos y crónicos las células proliferativas están aumentadas (44).

En las formas aguda y subaguda de la enfermedad, la cápsula de Glisson del hígado generalmente está infiltrada de linfocitos, células plasmáticas y algunos histiocitos. También se observa degeneración, grasa , atrofia y necrosis de las células de los cordones hepáticos. Además es frecuente encontrar necrosis, colapso o desaparición de las células hepáticas alrededor de las venas centrales. Los sinusoides hepáticos se hallan dilatados y las células de Kupffer están hiperplásicas y contienen hemosiderina. Las áreas portales están consistentemente infiltradas por linfocitos, monocitos y a veces por macrófagos con hemosiderina (13).

Durante las formas agudas y subaguda de la AIE la pulpa roja del bazo se encuentra hemorrágica, congestionada y muy aumentada de volumen. Este aumento se debe a la hiperplasia de las células reticuloendoteliales, a la infiltración de los sinusoides y de los cordones de Bilioth con células mononucleares. Los corpúsculos de Malpighi muestran reducción de su tamaño y están constituidas por linfoblastos y células reticulares (13).

Los cambios microscópicos de los ganglios linfáticos son similares a los del bazo. En los riñones es frecuente observar glomerulitis que se manifiesta por un aumento anormal de la célula debido a la proliferación endotelial y por adhesión de las láminas visceral y parietal de la cápsula de Bowman. Se ha reportado miocarditis intersticial en la forma aguda y subaguda y menos frecuente en la forma crónica y se caracteriza por degeneración hialina y granular de las fibras cardíacas (13).

Las lesiones del sistema nervioso central corresponden a una Meningoencefalomielitis y son consideradas como una extensión de la reacción general del organismo hacia la enfermedad y no como una manifestación de neurotropismo viral específico. En el ganglio de Gasser se ha obser

vado infiltración de linfocitos e histiocitos con o sin implicación del tejido nervioso. Se ha reportado degeneración y corpúsculos de inclusión en las células de Purkinge, hemorragia y edema en el cerebro (13).

2.10. INMUNIZACION

De acuerdo con Kono et al. (22) los animales inoculados con virus V - 26, una cepa Wyoming no patógena y descargados 200 días después con virus V - 70, cepa Wyoming patógena, resistieron a la infección pero al ser descargados con cepas diferentes desarrollaron la enfermedad.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. PREPARACION DEL ANTIGENO

Para la preparación del antígeno se utilizaron 9 equinos clínicamente sanos (7 machos 2 hembras de diferentes edades), negativos a la prueba de inmunodifusión de Coggins. Los animales se alojaron en unidades de aislamiento que impiden el acceso y tránsito de mosquitos; se controló temperatura dos veces diarias por tres días consecutivos y se elaboró hematocrito.

El virus empleado en éste trabajo fué aislado de un caso de campo y con él se reprodujo la enfermedad en el Laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias (LIMV), en el año de 1.965, y permaneció conservado a menos 20°C. desde entonces. Este suero virulento se descongeló e inoculó sucesivamente a los cuatro primeros caballos clínicamente sanos hasta que presentó un grado de virulencia aceptable. Los 4 equinos iniciales se inocularon con 50 ml. de suero virulento vía endovenosa en pases sucesivos de animal a animal (Figuras 1,2,3,4). Cuando la temperatura ascendió a 40°C. o más, los equinos se sangraron en cantidad de 250 - 300 ml. por animal de la vena yugular utilizando tubos al vacío (vacutainer) de 20 ml. de capacidad sin anticoagulante y agujas BD Nº 20. Todos los animales se sacrificaron en períodos comprendidos entre los 14 y 22 días post-inoculación, por electrocución con corriente de 110 voltios. Los electrodos siempre se dispusieron en la base de la oreja y la región perianal.

Una hora antes del sacrificio los caballos se inyectaron con clorhidrato de adrenalina 1:1.000 en dosis de 6 ml. por animal lentamente en la vena yugular. Esta droga provoca contracción del bazo haciendo que desaloje gran cantidad de sangre de manera que se presenta mayor concentración viral.

La necropsia se practicó en todos los animales sobre el lado izquierdo. Acto seguido se les hizo extracción aséptica del bazo. Se enviaron a histopatología cortes de hígado, riñón, cerebro, bazo, medula y ganglios linfáticos.

Los animales restantes disponibles se inocularon vía endovenosa con 20 ml. de suero procedente de los animales antes descritos. Se controló temperatura dos veces al día. Previamente a la inoculación se montó la prueba de Inmunodifusión de Coggins resultando negativa.

El antígeno se preparó de acuerdo a la técnica de Coggins y Norcross (2) a partir del bazo de animales inoculados con virus de AIE y sacrificados después de 4-5 días de poseer fiebre alta (40-41°C). Del bazo extraído asépticamente y dividido en cubos de 1 c.c., se pesaron 60 gr. después de haber sido congelado y descongelado cinco veces consecutivas. Se le adicionó 60 ml de solución buffer boratada preparada de la siguiente manera: 2 gr. de NaOH, 9 gr de H_3BO_3 para 1.000 ml de agua destilada y ajustada a un pH 8.6. Se sometió a enérgica maceración en un aparato mezclador OWNI MIXER * a fin de provocar el máximo de liberación viral.

Para precisar más las bandas de precipitación el antígeno fué concentrado cuatro veces por liofilización de la manera siguiente: después de mezclar el antígeno en el OWNI MIXER con igual cantidad de solución boratada, se llevó a la centrifuga refrigerada a 4.340 g. durante 20 minutos. Se eliminó el precipitado y el sobrenadante se distribuyó en viales (2 ml en cada vial) y se sometió a liofilización, luego se reconstituyó el liofilizado en 0.5 ml de agua destilada.

El antígeno se concentró también utilizando thyocianato de acuerdo con la técnica de Hart y Broussard (8). Esta técnica se basa en el empleo de sustancias chaotrópicas, cuya finalidad es aumentar la solubilidad del antígeno.

* Iván Sorwall, Inc. Norwalk, Conn. USA.

También se empleó en la concentración del virus, la dialisis en polietilenglicol a 4°C después de precipitado con sulfato de amonio al 50%.

3.2. MONTAJE DE LA PRUEBA

Para el montaje de la prueba se utilizaron cajas de Petri nuevas de vidrio de 100 mm conteniendo agar noble boratado pH 8.6. Sobre la caja de Petri se pusieron dos capas de agar, la primera, 10 ml, con una concentración del 2%. Después de solidificada ésta capa se colocó una segunda capa de agar noble al 1% en cantidad de 15 ml. Una vez solidificada la segunda capa se elaboraron las celdillas para el depósito del antígeno y los sueros respectivos. Estas celdillas tenían 7 mm de diámetro y 3 mm de separación entre ellas. El número total de celdillas fué de 7 y en cada caja de Petri se dispusieron 4 de éstas series.

Los orificios se perforaron mediante plantillas, con un sacabocado de 3 mm de diámetro. El sacabocado en ningún momento perforó la capa de agar noble al 2% para evitar la diseminación del antígeno o los sueros por la superficie de vidrio de la caja de Petri. La disposición de las celdillas fué de tipo concéntrico. El antígeno se depositó en el centro y los sueros controles positivos y sueros a probar en la periferia (ver figura 10).

El montaje siempre se preparó con dos controles positivos (ver figura 11) para observar la identidad de las bandas de precipitación. Cualquier incongruencia entre la banda de precipitación del suero control positivo y el suero sospechoso se consideró como una reacción inespecífica. (Figura 12)

Las pruebas fueron leídas a las 48 horas después de montadas, con una luz fuerte procedente de una bombilla Carl Zeiss ref.380177 de 6 voltios 15 amperios; las cajas montadas permanecieron en cámara húmeda a temperatura de laboratorio.

3.3. OBTENCION DEL ANTIGENO WYOMING

Para obtener antígeno derivado de la cepa Wyoming se inoculó un equino negativo a la prueba de inmunodifusión y clínicamente sano , con virus virulento de la cepa Wyoming gentilmente proporcionado por Leroy Coggins de la Universidad de Cornell. Esta cepa llegó liofilizada. El animal se inoculó con 6 ml de antígeno. Esta dosis fué mayor que la utilizada por Coggins.

3.4. OBTENCION DE LOS SUEROS

Los sueros para el estudio se obtuvieron mediante punción en la vena yugular de animales escogidos al azar procedentes de 7 departamentos: Antioquia, Córdoba, Cundinamarca, Meta, Santander, Tolima y Valle, teniendo en cuenta el mayor grado de concentración equina. Las muestras se colectaron en tubos estériles al vacío (vacutainer) de 20 ml y agujas BD Nº 20. Los sueros se trabajaron en las dependencias del LIMV y fueron mantenidos en congelación a menos de 20°C. antes y después de procesados.

El número de sueros colectados fué de 1.000 en total. Para determinar el número de muestras por departamento no se siguió ninguna norma y sólo dependió de las facilidades para su obtención y disponibilidad del Laboratorio.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

La preparación del antígeno presenta ciertos inconvenientes todos ellos fáciles de obviar si se cuenta con los recursos necesarios.

En el presente trabajo el principal problema estribó en la crítica disponibilidad de recursos. Si bién, las técnicas descritas para la obtención del antígeno son sencillas, no ocurre lo mismo con la fuente de multiplicación viral. Es un hecho comprobado por numerosos investigadores que no todos los equinos resultan adecuados para la preparación del antígeno, porque existe cierta individualidad para ello.

Coggins y Norcross (2) emplean para la obtención del antígeno, animales altamente susceptibles, ponies Shetland jóvenes, cuyo número habitual por descarga es de 12-15 equinos simultáneamente. Generalmente dos o tres bazos y a veces ninguno de ellos presentan una concentración viral apropiada y confiable.

En éste trabajo se emplearon equinos de diferentes edades, generalmente adultos de baja calidad que mostraron una resistencia inusitada al virus a pesar de resultar negativos a la prueba de Coggins. Además, su número resultó muy limitado por la dificultad para obtenerlos, dado el alto valor de los mismos y la falta de recursos disponibles.

Es de anotar, que el virus debió ser refrescado por inoculación reiterada en 4 animales y sólo se dispuso de 5 para la obtención del antígeno.

En las Figuras (1,2,3,4,5,6,7,8 y 9), se pueden apreciar las temperaturas de los animales inoculados. Se observa que el período de incubación disminuye discretamente a medida que aumenta el número de pases. En los animales inoculados inicialmente, el primer ataque febril se

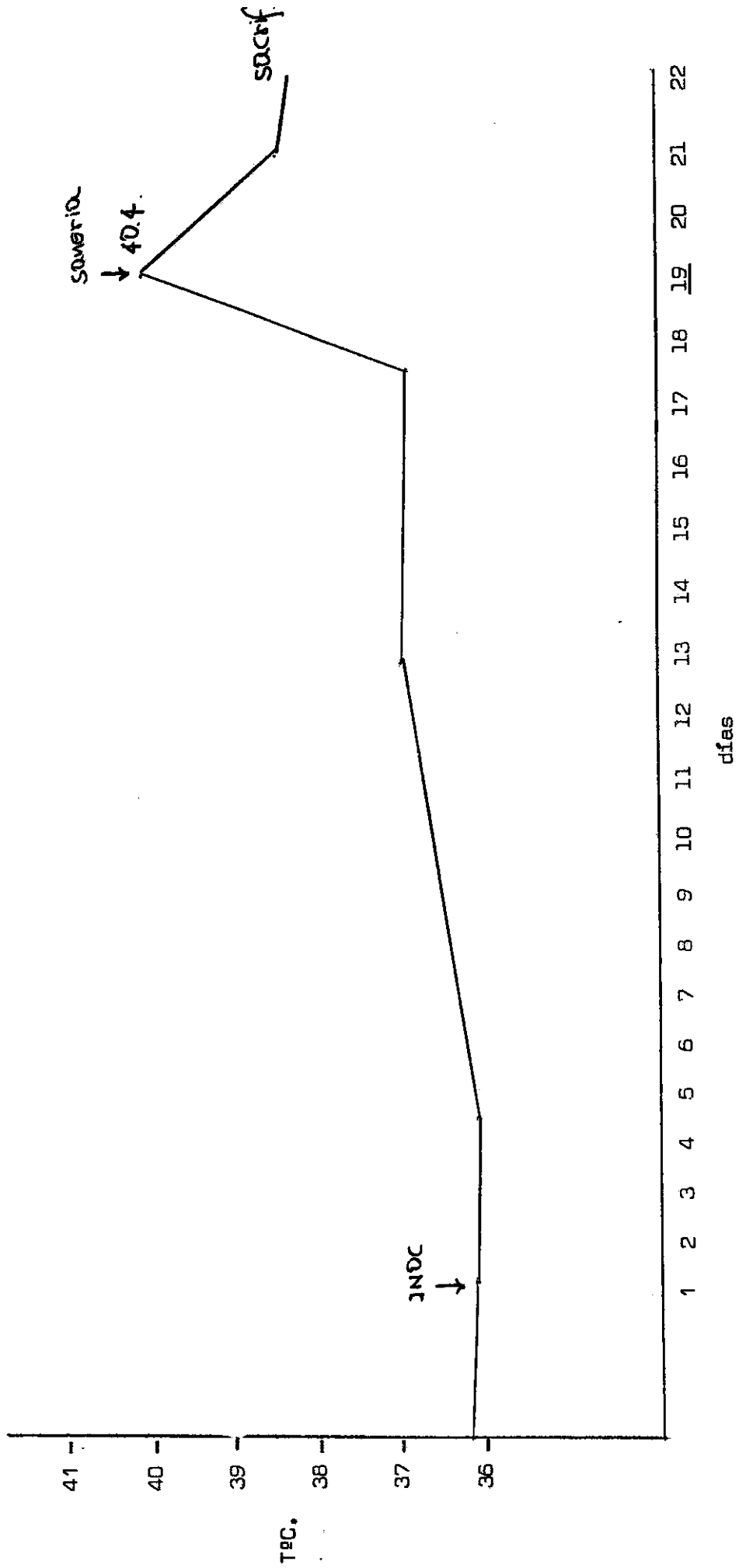


FIGURA 1. Equino 5 inoculado con 50 ml de suero virulento de AIE.

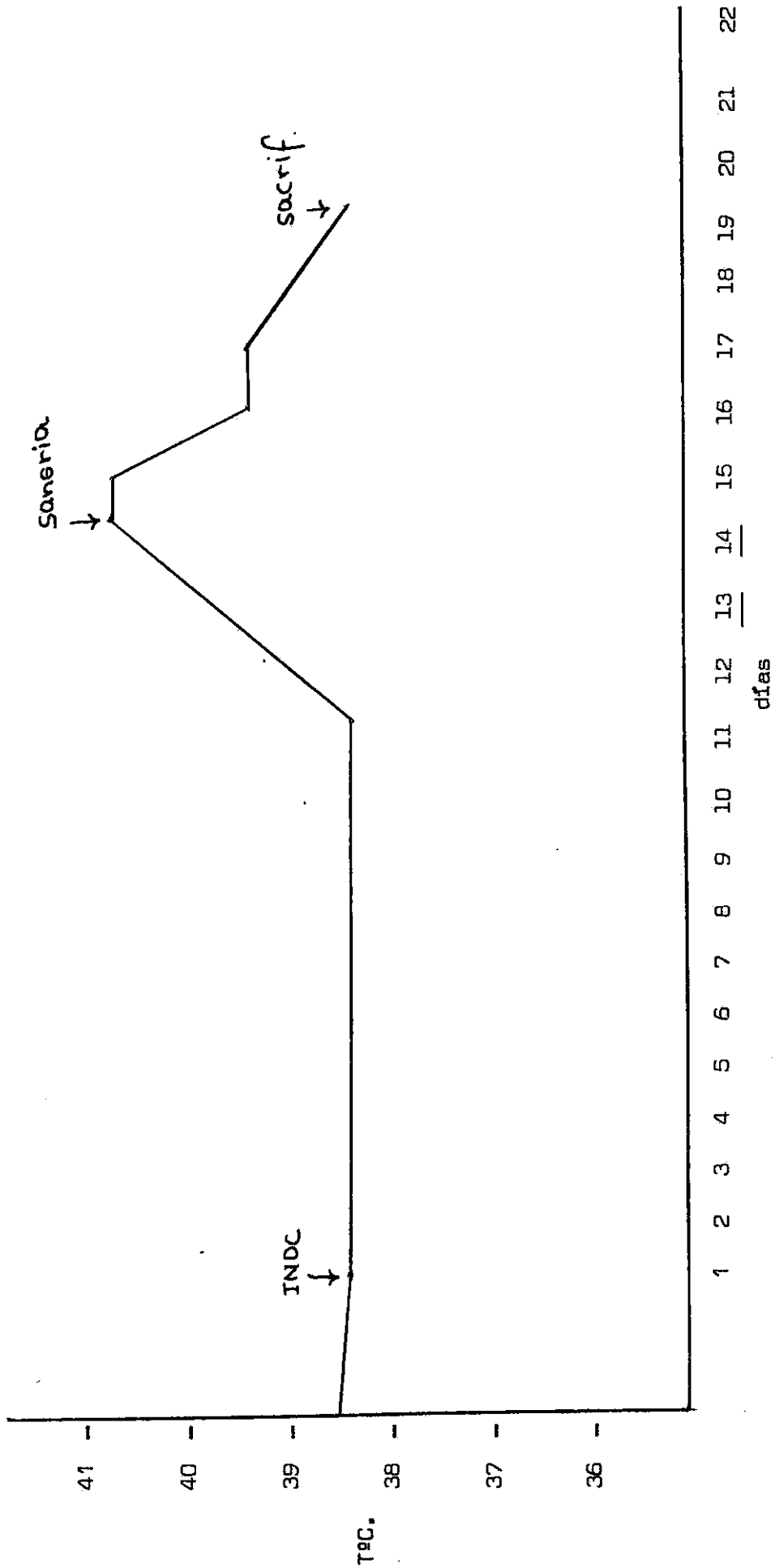


FIGURA 2. Equino 11 inoculado con 50 ml. de suero virulento de AIE.

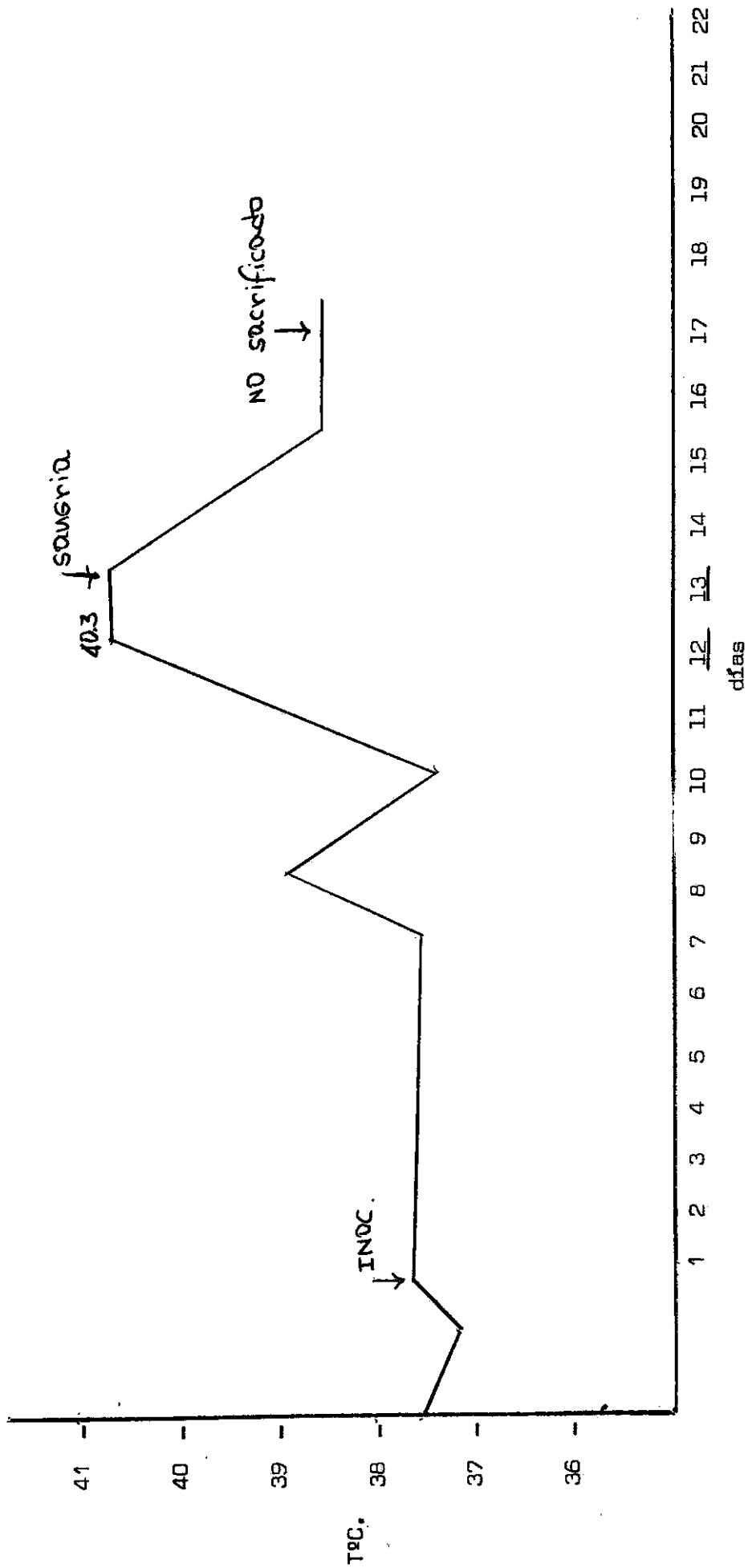


FIGURA 3. Equino Alazán inoculado con 50 ml. de suero virulento de AIE.

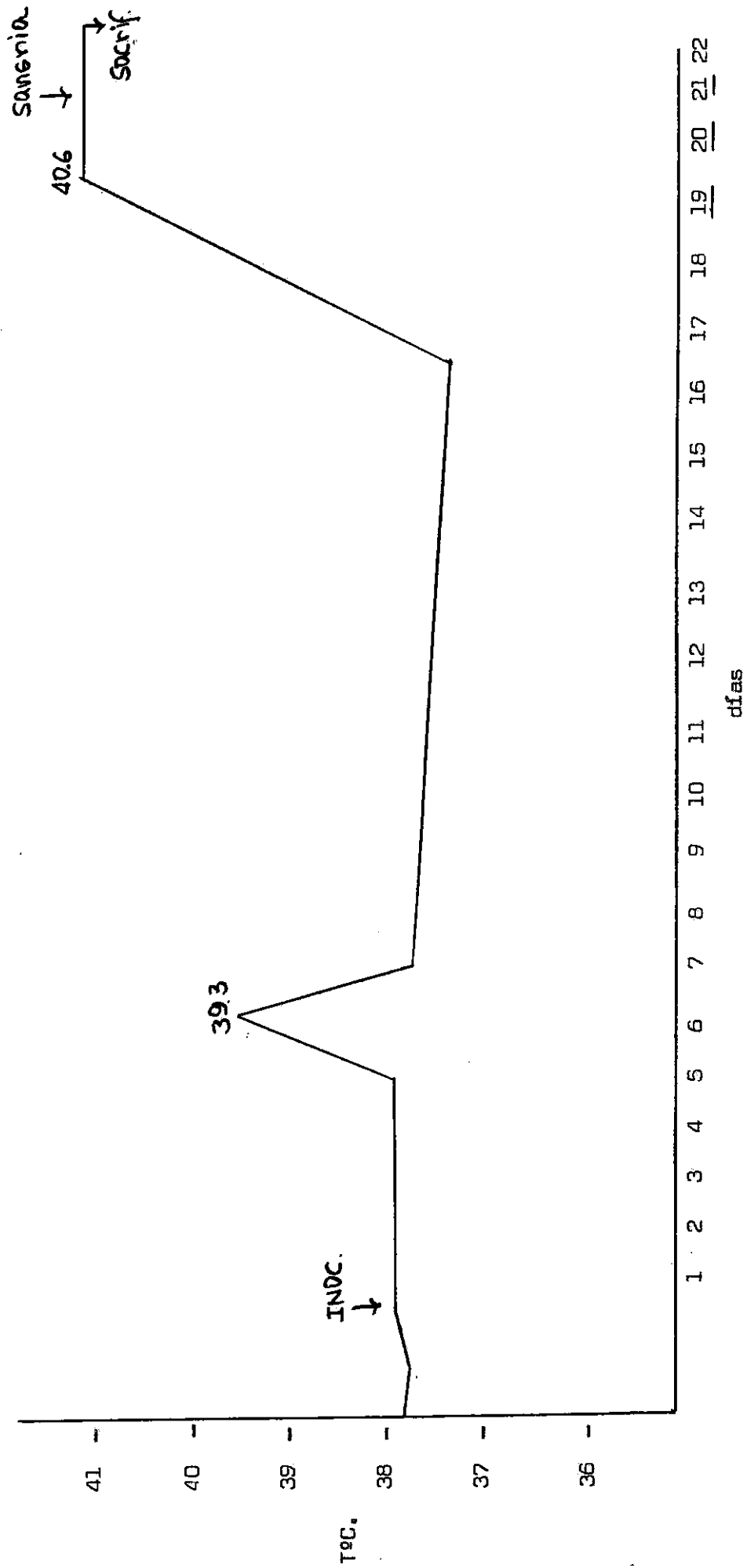


FIGURA 4. Equino 2 J. inoculado con 50 ml. de suero virulento de AIE.

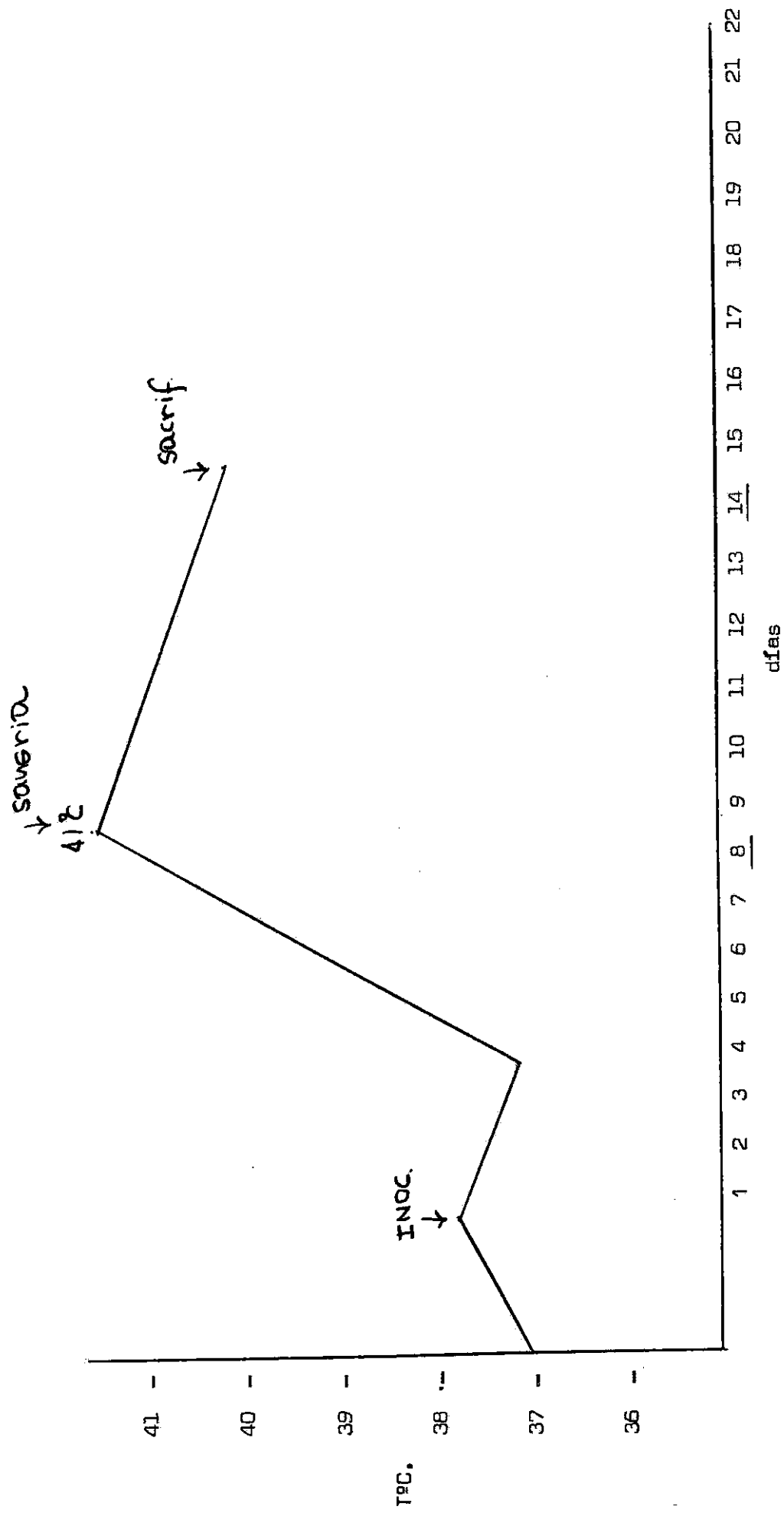


FIGURA 5. Equino 378 inoculado con 20 ml. de suero virulento de AIE.

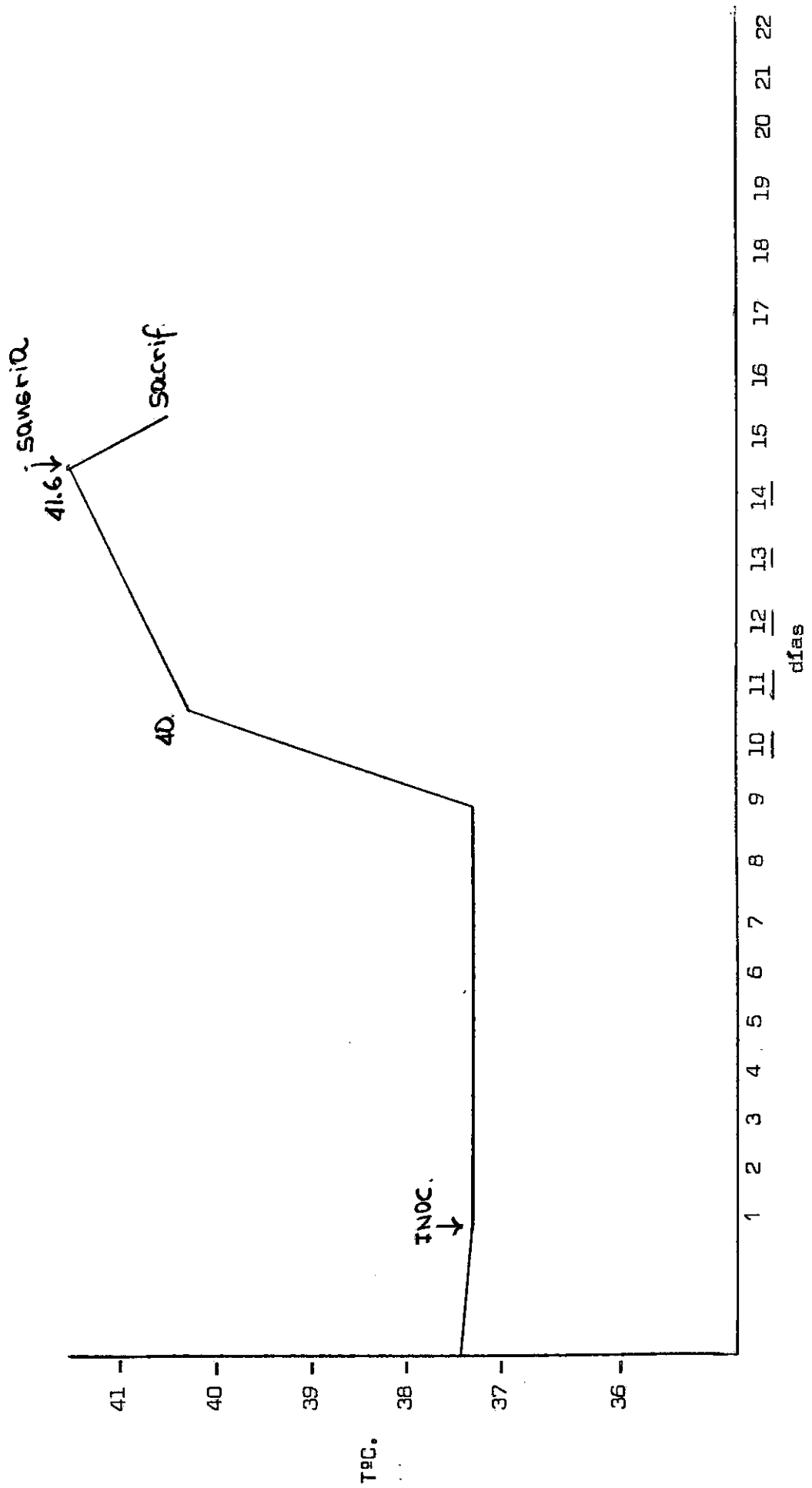


FIGURA 6. Equino 377 inoculado con 20 ml. de suero virulento de AIE.

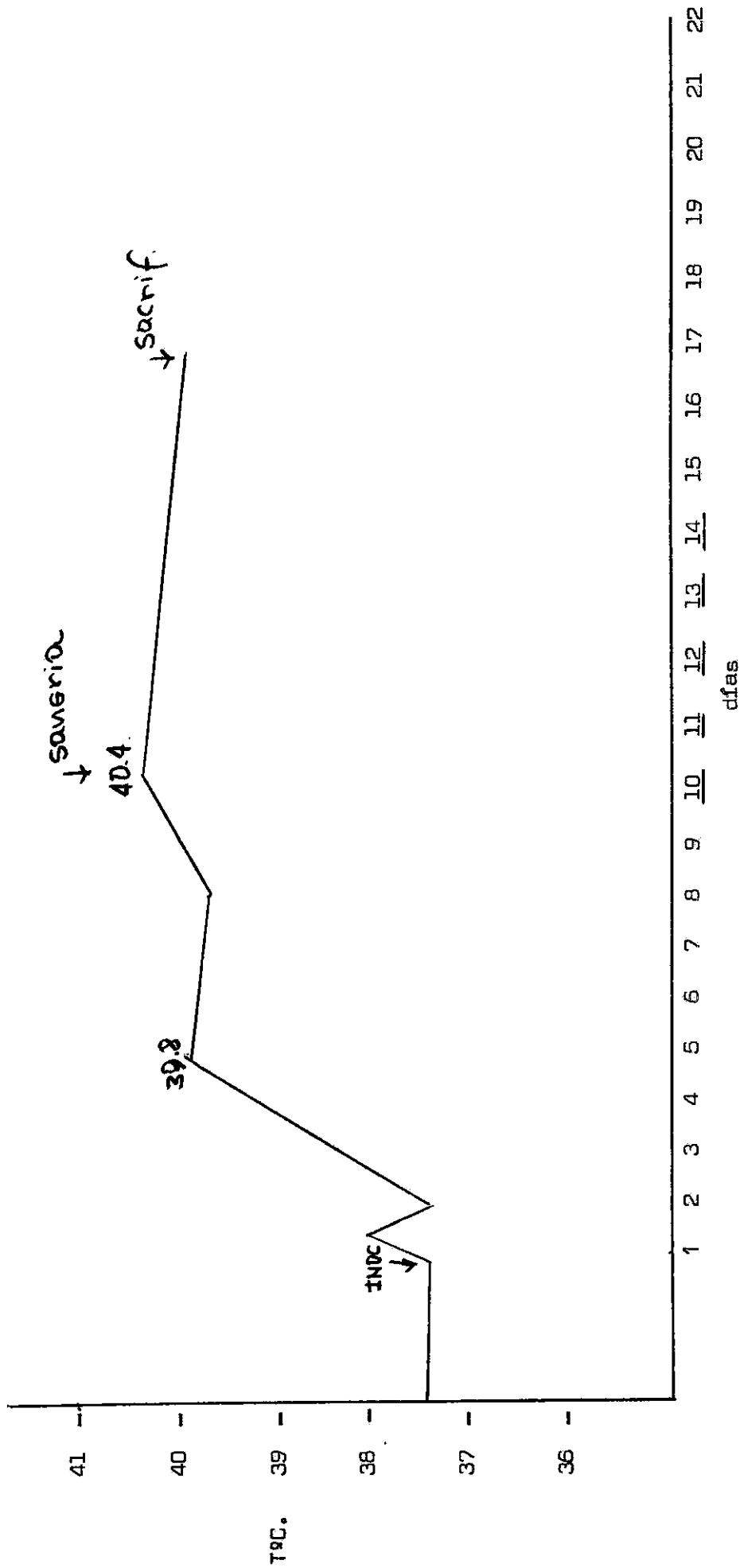


FIGURA 7. Equino 379 inoculado con 20 ml. de suero virulento de AIE.

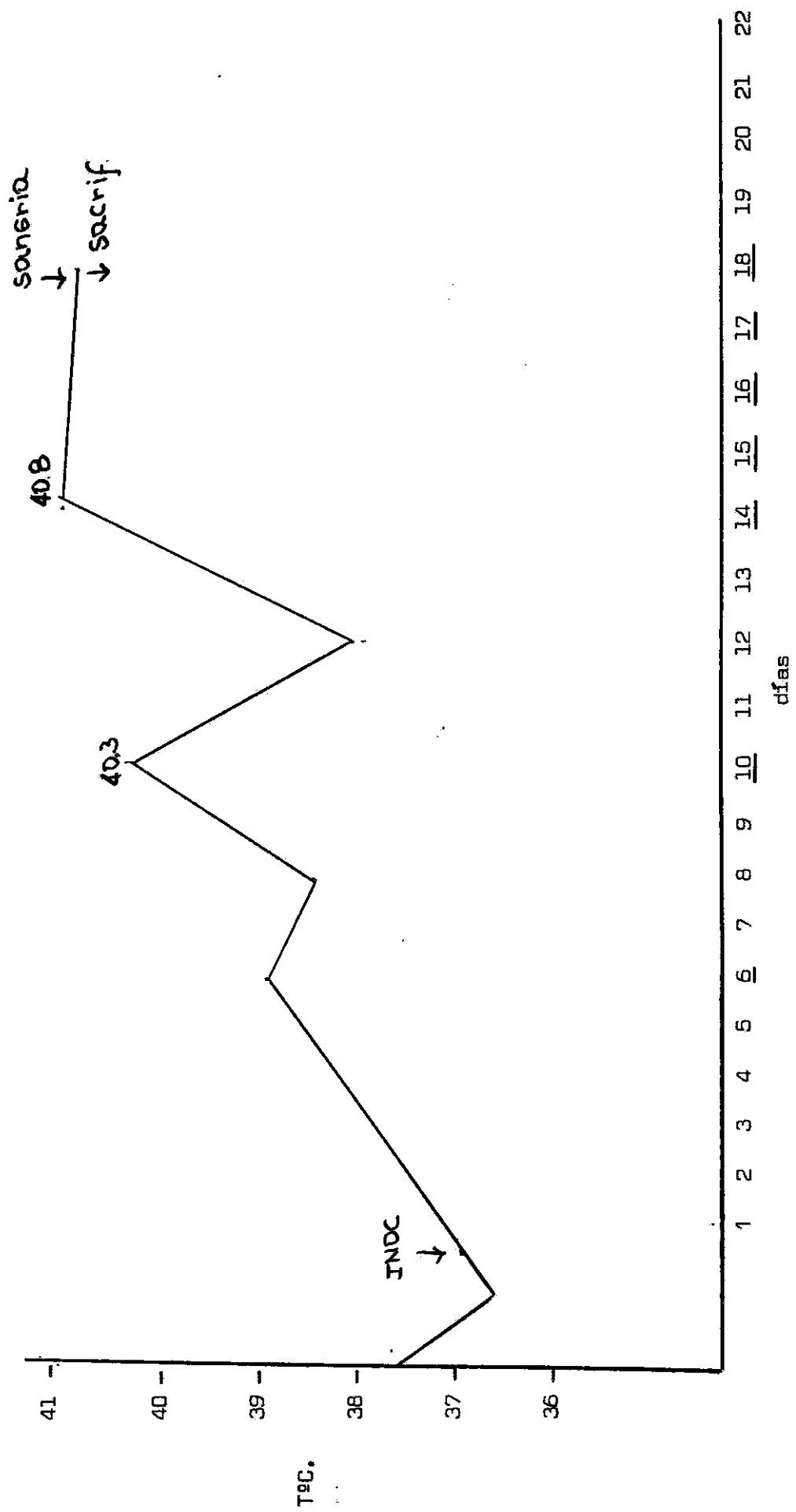


FIGURA 8. Equino 1663 inoculado con 20 ml. de suero virulento de AIE.

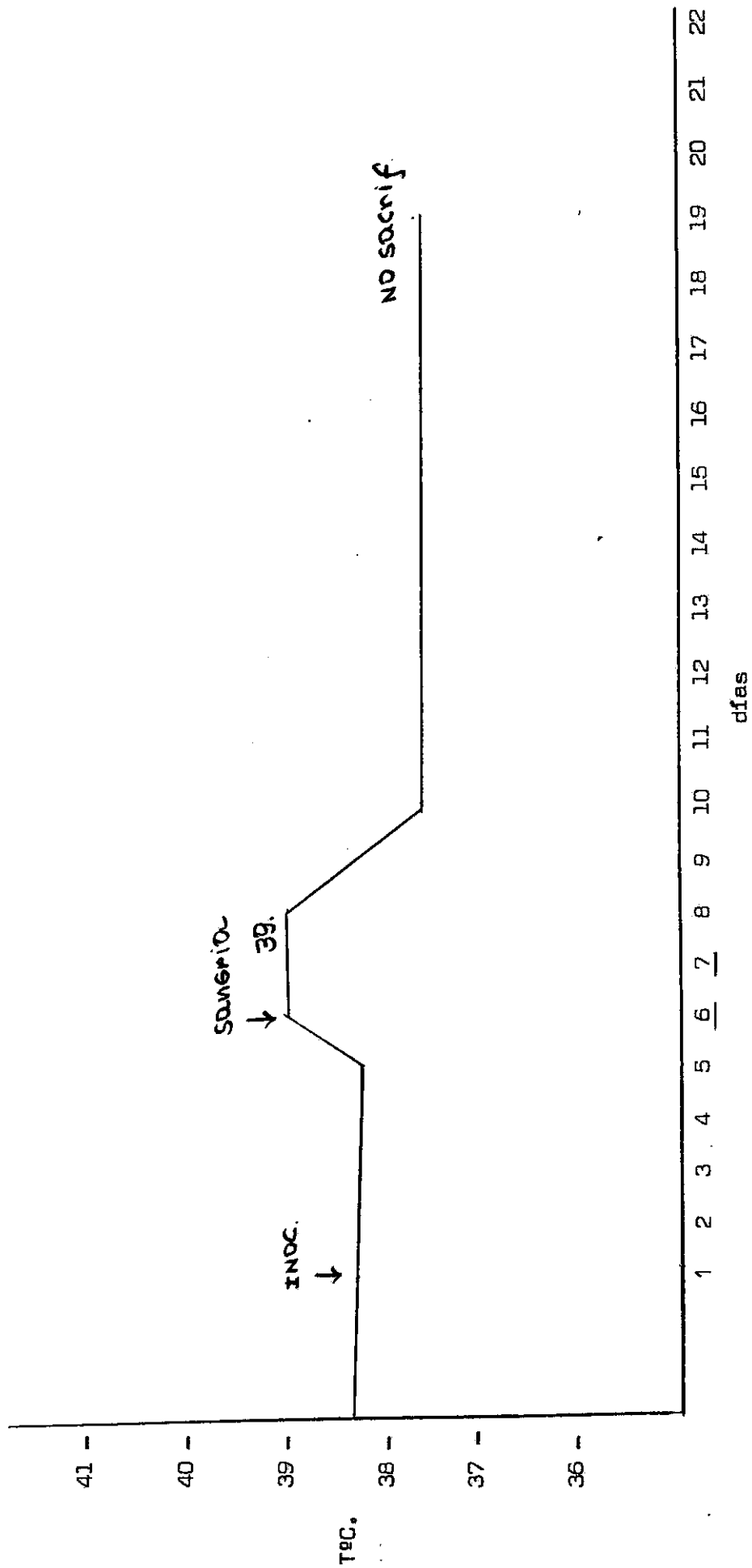


FIGURA 9. Equino B. Coggins inoculado con 6 ml. de suero virulento de Coggins cepa Wyoming.

FIGURA 10. Prueba de Inmunodifusión de Coggins con los sueros controles positivos y sueros de campo positivos.

FIGURA 11. Prueba de Inmunodifusión montada con 2
sueros controles positivos los sueros
restantes son negativos.

FIGURA 12. Prueba de Inmunodifusión con sueros positivos e inespecíficos negativos.

presentó a los 18 días, luego descendió a 15 y así se sostuvo por varios pases. Más tarde, en los últimos equinos inoculados el período de incubación disminuyó sensiblemente hasta estabilizarse en 5-8 días, es decir, casi el óptimo a pesar de la apreciable disminución en la dosis de inoculación (50 ml a 20 ml). Al mismo tiempo se observó que temperaturas de 40°C. o más permanecían constantes por 4 a 5 días (Figuras 6,7,8), mientras que los animales inoculados inicialmente solo sostenían temperaturas de 40°C por 1 a 2 días consecutivos.

En relación con la variación de temperatura se observa cierta contradicción al respecto. Coggins y Norcross (2) aseguran que solo los animales cuyo período de incubación esté comprendido entre 3 a 5 días, con temperaturas superiores a 40°C, por espacio de 5 días o más, resultan adecuados para la obtención del antígeno.

De otro lado Henson et al. (11), afirman que animales cuyos períodos de incubación fué de 10 días y sacrificados a los 13-23 días después de inoculados, resultan buenos antígenos aún utilizando la pulpa sin ningún tratamiento.

Todo parece indicar que los factores más importantes en la obtención del antígeno son los ataques febriles severos y el sacrificio del animal lo más rápido posible, para evitar la presencia de anticuerpos neutralizantes que suelen aparecer a los 20 días aproximadamente.

Los bazos que se procesaron en éste trabajo, generalmente se recolectaron tardíamente dada la extremada duración del período de incubación. La pulpa de éstos bazos al ser enfrentada en la prueba de inmunodifusión de Coggins, dió resultados negativos, mientras que las pulpas de animales cuyo período de incubación fué más corto, mostraron cierta reacción con los sueros contrales positivos.

4.1. ANTIGENO

El antígeno se preparó de los bazos extraídos a los animales de acuerdo con la técnica de Coggins y Norcross (2) después de inoculados,

pero falló al ser enfrentado a sueros controles positivos extranjeros y sueros derivados de caballos infectados de distintas regiones del país en la prueba de inmunodifusión. La pulpa esplenica de los últimos caballos sacrificados (números 377, 378, 1683), mostraron reacción al enfrentarse a sueros positivos en la placa de inmunodifusión pero se consideró débil y poco confiable.

Las bandas que se formaron con los antígenos preparados localmente difirieron básicamente de las observadas con los antígenos extranjeros. Fueron más gruesas y difusas y su formación fué más rápida que las formadas con antígenos extranjeros aunque desaparecían también más rápidamente. Además, acontece que éstas bandas se formaron con ciertos sueros, pero, al ser enfrentados éstos con el antígeno derivado de la cepa Wyoming no produjeron ningún tipo de precipitación. Este resultado induce a pensar que las bandas formadas con la pulpa de los bazo extraídos localmente, no fueron específicas y bien pudieron corresponder a otros padecimientos comunes tanto al productor del antígeno como al donador del suero.

Las pulpas concentradas por liofilización, precipitación con sulfato de amonio al 50%, diálisis en polietilenglicol y tratados con sustancias chaotrópicas (8), usadas como antígeno no reaccionaron con los sueros controles en la prueba de inmunodifusión.

Es importante, además, reiterar en la falla del antígeno la baja calidad de los animales utilizados. Se trató de caballos de avanzada edad, algunos de ellos ya habían sido empleados experimentalmente en otros menesteres, específicamente inoculados con virus de Encefalitis Equina Venezolana. Es posible que éste tratamiento en alguna forma alteró la respuesta inmunológica de los animales haciéndolos más resistentes a la acción del virus de AIE.

Esta teoría se vió reforzada al inocular un equino con virus virulento de la cepa Wyoming en dosis de 6 ml. El animal no reaccionó como era de esperarse (Figura 9). Solo presentó ligera fiebre por 2 días y luego

se recuperó permaneciendo como portador.

Analizando los factores antes descritos se concluye que el éxito en la preparación del antígeno de AIE estriba en, 1º selección de animales jóvenes y sanos, 2º en la inoculación simultánea de 12-15 caballos, 3º en la utilización de virus fresco de gran virulencia y 4º en el empleo de técnicas de concentración para purificación del antígeno evitando así que se produzcan bandas no específicas o bandas demasiado gruesas.

4.2. SUEROS

La utilización de sueros controles positivos también registró inconvenientes. Ciertos sueros muestran en la prueba de inmunodifusión un halo causado por el exceso de lípidos presentes en el suero. Estos halos enmascaran la prueba dificultando su lectura. También se observó que muchos sueros presentan en la prueba de inmunodifusión una banda muy tenue, mientras que otros, como los procedentes de la Mesa (Cundinamarca), Córdoba y Valle (Tablas 2,3,7), arrojan una gran cantidad de bandas inespecíficas. Se anota que puede tratarse de una entidad patológica presente en la zona posiblemente de origen viral virtualmente parecida al virus de AIE.

En este trabajo los mejores sueros positivos procedieron de Alvarado (Tolima), por lo cual se conservan como sueros controles positivos. Es posible que ésta diferencia entre los distintos sueros sea debida a la presencia de cepas diferentes, o quizás al estado de cronicidad de la enfermedad. Estos animales aparentemente parecían normales y trabajaban con eficiencia.

En la ejecución de la prueba se emplearon las normas establecidas por Coggins y Norcross (2) en la preparación de los medios y tamaño de las celdillas, pero existen varias modalidades de acuerdo con el investigador. Nakajima (35) utilizó celdillas más pequeñas sin afectar los resultados.

4.3. RESULTADOS

De acuerdo a los resultados obtenidos se observa un porcentaje relativamente alto de animales positivos a AIE. En 1.000 muestras procesadas se encontraron 171 positivas que arrojan un porcentaje de 18,4%. Los Departamentos más afectados fueron Santander y Meta con 33,3% y 24,8% respectivamente. El número inusitado de sueros positivos en Santander posiblemente obedece a la escasez de la muestra. De 45 sueros obtenidos 15 resultaron positivos.

La enfermedad no acusó variaciones especiales en relación con el se xo. Los machos presentaron una reacción de 19,5% frente a un 17,4% de reacción positiva de las hembras.

Todo parece indicar que tanto los machos como las hembras poseen la misma posibilidad de infección. También, de este estudio se desprende que la utilización de ambos sexos en el trabajo es similar; de las 1.000 muestras tomadas 493 corresponden a los machos y 507 a las hembras.

El Departamento del Meta parece ser el más importante en presentación de AIE con 24,8% de animales reactores positivos. Es posible, que en éste Departamento exista más de una cepa de AIE por la diversa presen tación de las bandas de precipitación. Muchas de ellas son tenues y difusas, mientras que otras son claras y precisas. Quizás corresponden a cepas diferentes.

La edad promedio en años no sufrió variaciones especiales en los Depar tamentos de Antioquia, Cundinamarca, Meta, Santander y Tolima con valores de 5,6 - 5,7 - 6,7 - 5,5 y 6 años respectivamente.

Los Departamentos de Córdoba y Valle arrojaron un promedio más alto con valores de 8 y 9 años respectivamente.

La relación de los resultados se consignan en las Tablas 1,2,3,4,5, 6 y 7. Cada Tabla corresponde a un Departamento y en ellas se especifica la procedencia de la muestra, número de sueros recolectados, la edad promedio en años, el número de machos y hembras, número de animales positivos discriminados de acuerdo con el sexo, número de reacciones específicas e inespecíficas y total de muestras positivas. Una vez obtenidos los totales se extrajeron los porcentajes correspondientes.

4.3.1. Lesiones macroscópicas

Todos los animales presentaron a la necropsia lesiones macroscópicas compatibles con AIE. El bazo se presentó aumentado de tamaño con petequias y hemorragias en la superficie, a excepción de un equino que duró enfermo 8 meses y cuyo bazo presentó atrofia marcada. El corazón se observó dilatado e hipertrófico en todos los animales. Los ganglios acusaron aspecto tumoral, hemorrágicos y aumentados varias veces su tamaño. La medula ósea femoral acusó invasión de la zona roja a la porción medular amarilla. En ninguno de los casos se observaron petequias ni en el tabique nasal, ni debajo de la lengua pero siempre se notó marcada ictericia especialmente en la fascia abdominal y arteria aorta.

4.3.2. Lesiones histopatológicas

En el hígado se observó degeneración grasa, necrosis de las células de los cordones hepáticos, necrosis de las células hepáticas alrededor de las venas centrales y la cápsula de Glisson presentó infiltración de linfocitos.

La pulpa roja del bazo estaba aumentada de volúmen, hemorrágica y presentó infiltración de los sinusoides y de los cordones de Bilotroth con células mononucleares. Los corpúsculos de Malpighi mostraron reducción de su tamaño. Los riñones presentaron infiltración mononuclear y glomerulitis. Se observó miocarditis intersticial con in -

TABLA 1. Relación de muestras tomadas en el Departamento de Antioquia.

Región	Nº. muestras	Edad promedio en años	Sexo		Positivos		Reacciones no especí- ficas	Total Posi- tivos.
			Machos	Hembras	Machos	Hembras		
Cáceres	7	5	4	3	1	-	-	1
Caucasia	17	5	7	10	-	2	-	2
Medellin	104	7	56	48	6	6	2	12
Totales	128	5.6	67	61	7	8	2	15

Machos Positivos 10%
Hembras Positivas 13%
Total Positivos 11.7%
Reacciones Inespe-
cificas 1.5%

TABLA 2. Relación de muestras tomadas en el Departamento de Córdoba.

Región	Nº.muestras	Edad promedio en años	Sexo		Positivos		Reacciones no especif- cas	Total Positi- vos
			Machos	Hembras	Machos	Hembras		
Montería	40	8	18	22	5	2	10	7

Machos Positivos	27.7%
Hembras Positivas	9 %
Total Positivos	17.5%
Reacciones Inespe- cíficas	25 %

TABLA 3. Relación de muestras tomadas en el Departamento de Cundinamarca.

Región	Nº. muestras	Edad promedio en años	Sexo		Positivos		Reacciones no especif- cas	Total Positi- vos
			Machos	Hembras	Machos	Hembras		
Bogotá	109	7.7	59	50	13	10	-	23
Facatativá	70	9.2	22	48	8	17	6	25
La Florida	11	6.3	4	7	1	3	1	4
Guedes	10	7	6	4	3	2	-	5
La Mesa	48	7.7	30	18	-	-	5	-
Tocaima	17	1	10	7	1	-	-	1
Ricourte	21	5.2	3	18	-	-	-	-
Girardot	20	0.7	4	16	-	-	-	-
Totales	306	5.7	138	168	26	32	12	58

Machos Positivos 18.7%
Hembras Positivas 19 %
Total Positivos 18.8%
Reacciones Inespe-
cificas 3.9%

TABLA 4. Relación de muestras tomadas en el Departamento del Meta.

Región	Nº. muestras	Edad promedio en años	Sexo		Positivos		Reacciones no especí- cas	Total Positi- vos
			Machos	Hembras	Machos	Hembras		
Cumará	22	5.8	9	13	2	5	1	7
San Martín	20	5.7	13	7	1	1	-	2
Pto. Gaitán	7	7.5	6	1	2	-	-	2
Villavicencio	19	7.5	8	11	3	1	-	4
Pto. Lleras	68	8	37	31	6	14	-	20
La Libertad	30	6	12	18	3	3	4	6
Totales	166	57	85	81	17	24	5	41

Machos Positivos 20%
 Hembras Positivas 29.6%
 Total Positivos 24.8%
 Reacciones Inespe-
 cíficas 3%

TABLA 5. Relación de muestras tomadas en el Departamento de Santander.

Región	Nº. muestras	Edad promedio en años	Sexo		Positivos		Reacciones no especí- ficas	Total Positi- vos
			Machos	Hembras	Machos	Hembras		
Bucaramanga	33	6	16	17	6	4	-	10
Carita Blanca	12	5	10	2	3	2	-	5
Totales	45	5.5	26	19	9	6	-	15
Machos Positivos	34.6%							
Hembras Positivas	31.5%							
Total Positivos	33.3%							
Reacciones Inespe- cíficas	-							

TABLA 6. Relación de muestras tomadas en el Departamento del Tolima.

Región	Nº. muestras	Edad promedio en años	Sexo		Positivos		Reacciones no especif- cas	Total Positi- vos
			Machos	Hembras	Machos	Hembras		
Alvarado	74	9	34	40	7	6	-	13
Ibegué	75	5.9	35	40	2	2	-	4
Melgar	56	4.3	31	25	2	2	6	4
Totales	205	6.0	100	105	11	10	6	21

Machos Positivos 11%
 Hembras Positivas 9.5%
 Total Positivos 10.2%
 Reacciones Inespe-
 cificas 2.9%

TABLA 7. Relación de muestras tomadas en el Departamento del Valle.

Región	Nº. muestras	Edad promedio en años	Sexo		Positivos		Reacciones no especí- cas	Total Positi- vos
			Machos	Hembras	Machos	Hembras		
Cali	83	10	46	37	4	1	10	5
Cartago	27	8	13	14	4	5	2	9
Totales	110	9	59	51	8	6	12	14

Machos Positivos 13.5%
 Hembras Positivas 11.7%
 Total Positivos 12.6%
 Reacciones Inespe-
 cíficas 10 %

filtración focal de células mononucleares a lo largo de los vasos sanguíneos.

En el cerebro se observó infiltración perivascular por células mononucleares. En medula ósea se observaron hemorragias, edema, hemosiderosis y aumento del número de células reticuloendoteliales.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La AIE es una enfermedad esencialmente crónica que ataca a los equinos. Esta enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en Colombia y de acuerdo con el muestreo realizado las regiones más afectadas fueron los Departamentos de Santander, Meta y Cundinamarca.

La AIE se diagnostica en Colombia tanto en animales puros como en mestizos y criollo y no se aprecia resistencia específica de raza.

La mayoría de los animales afectados no mostraron signos que indujeran a sospechar la presencia de la enfermedad. Posiblemente se trataba de portadores crónicos o inaparentes. Los casos agudos espectaculares fueron muy escasos como se deduce de las historias clínicas.

La formación de diversos tipos de bandas en la prueba de inmunodifusión según el lugar de origen, puede interpretarse como derivados de cepas diferentes.

La preparación del antígeno a pesar de su facilidad resultó infructuosa dadas las precarias condiciones de disponibilidad en la adquisición de animales adecuados, pero, se recomienda que su producción sea emprendida rápidamente puesto que el volumen de desplazamiento de equinos es alto y con obstáculos en la adquisición del antígeno no es posible ofrecer un relativo control a la invasión de animales infectados. Además, el precio comercial es alto y existen tropiezos para obtenerlo oportunamente.

En el planteamiento de la política de control a seguir en Colombia con los animales infectados se suscitan dos interrogantes: 1. Como se trata de una enfermedad muy abundante en el país con un 18% aproximadamente (se advierte que no es dato estadístico) y una cantidad apreciable de los animales labora normalmente, quizás por tratarse de casos de enfermedad inaparente, es lógico pensar, que si se aplica fusil

sanitario sin compensación se presenta gran resistencia por parte de los propietarios con el agravante de que la población equina se vería peligrosamente diezmada dada la gran cantidad de animales infectados.

2. Podría pensarse en convivir con la enfermedad, declarando zonas libres basadas en el diagnóstico de Coggins, evitando el acceso de animales de las zonas infectadas, e iniciar estudios de tipificación de cepas como base esencial en investigaciones ulteriores.

6. RESUMEN

Desde hace mucho tiempo se han presentado en Colombia gran cantidad de casos de enfermedad hemolítica cuyo síndrome anémico era compatible con AIE. Como no existía un método confiable de diagnóstico no se conocía exactamente el grado de prevalencia de la enfermedad.

Hoy día con la introducción de la técnica de inmunodifusión de Coggins se emprendió un muestreo a nivel nacional que una vez estudiado arrojó un sorprendente porcentaje de positividad, 18.4%. Los Departamentos estudiados fueron: Antioquia 128 muestras, Córdoba 40, Cundinamarca 306, Meta 166, Santander 45, Tolima 205 y Valle 110 para un total de 1.000 muestras.

Para el diagnóstico se puso en práctica la inmunodifusión de Coggins empleando el antígeno preparado por éste investigador, quien gentilmente lo remitió liofilizado al laboratorio.

También se preparó un antígeno a partir de cepas nacionales, pero, debido al escaso número de animales disponibles, y, a que habían sido inoculados con virus de encefalitis equina en grandes dosis, alterando posiblemente la respuesta inmunológica al virus de AIE, se fracasó en el intento, pues el antígeno producido de estos animales, nunca alcanzó el título requerido para el montaje de la prueba y las bandas formadas fueron muy débiles y difusas.

7. SUMMARY

Since many years ago it has been the presentation of many hemolytic diseases with anemie symptoms in Colombia which are very similar to EIA. Due to absence of a safety method for diagnosis, the prevalence of this disease is unknown.

To day, with the Coggins immunodiffusion technique a survey was made in the country to see the prevalence, and an 18.41% was detected.

Samples were taken from Antioquia 128, 40 from Cordoba, 306 from Cundinamarca, 45 from Santander, 205 from Tolima and 110 from Valle.

All samples were tested using an antigen sended by Coggins. Antigens with national strains were prepared but the low number of animals and besides that they were used before for Venezuelan equine encefalitis assays good results wen not obtained, because reactions given by these antigens were very weake.

BIBLIOGRAFIA

1. BOULANGER, P. et al. 1969. Equine infectious Anemia: Preliminary investigation of the complement fixation test for the demonstration of antibodies and antigen. Canadian Jour. Comparative Medicine. 33 (2):148-153.
2. COGGINS, L. and L. NORCROSS. 1970. Immunodiffusion reaction in Equine infectious Anemia. Cornell Vet. (EE.UU) 60 (2): 330 -335.
3. _____, and V. PATTEN. 1970. Immunodiffusion test for Equine Infectious Anemia. U.S. Animal Health Ass. Proc. 74:568-571.
4. DITCHFIELD, J. 1967. Equine Infectious Anemia; a review of the disease and diagnostic test. Canadian Vet. Jour. 8:273-278.
5. EL - ZEIN, A.; W. L. MYERS and D. SEGRE. 1968. Behavior of Equine Infectious Anemia virus in cell culture and development of a diagnostic test for the disease. Jour. Inf. Dis. 118: 473-480.
6. GRANZIEN, C. K. and L. G. NEWTON. 1968. Sideroleucocytes as a diagnostic aid in Equine Infectious Anemia. Australian Vet. Jour. 44:406 -412.
7. GORET, P.; C. MICHEL and B. TOMA. 1967. Le diagnostic de L' anemie Infectieuse du cheval. Les cahiers de Medicine Veterinaires. N. 5. pp. 1-15.
8. HART, L. T. and E. A. BROUSSAR II. 1973. Extraction of Equine Infectious Anemia Immunodiffusion antigen with the aid of the chaotropic agent, tyocyanate. Appl. Microb. (EE. UU.) 25 (2):190 -194.

9. HENSON, J. B. et al. 1967. The diagnosis of Equine Infectious Anemia using the complement fixation test, siderocyte count, hepatic biopsies and Protein alterations. Jour. Amer. Vet. Med. Ass. 151:1830-1839.
10. _____, et al. 1969. Immunity in Equine Infectious Anemia. Jour. Amer. Vet. Med. Assoc. 155:336-343.
11. _____. et al. 1969. Recent research on the virology, serology and pathology of Equine Infectious Anemia. Proc. 2nd. Int. Conf. Equine Infectious Disease (France), pp. 178-199.
12. HINCAPIE, O. 1971. Detection of Equine Infectious Anemia virus by immunofluorescence in leucocyte cultures from infected Horses. M.S. Thesis, New York, Cornell University. 50 h.
13. ISHII, S. 1963. Equine Infectious Anemia of swamps fever. Advances in Vet. Science (EE.UU) 8:263-296.
14. ISHITANI, R. 1970. Equine Infectious Anemia. Nat. Inst. Anim. Hlth, Quart. (Japan)10:1-28 (Suppl.)
16. JOHNSON, A. W. 1969. Equine Infectious Anemia. Annotation Vet. Bull. (England)36:465-469.
16. KOBAYASHI, K. and J. KONO. 1966. Serial Passages of Equine Infectious Anemia virus in horse leukocyte culture. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. (Japan)7:1-7.
17. KONO, Y. and K. KOBAYASHI. 1966. Complement fixation of Equine Infectious Anemia; I. Specificity of the test. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. (Japan)6:194-203.

18. KONO, Y, and K. KOBAYASHI. 1966. Complement fixation test of E.I.A. II. Relationship between C. F. antibody response and the disease. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. (Japan)6:204-207.
19. _____, and K. KOBAYASHI. 1967. Specificity of assay of Equine Infectious Anemia virus in horse leukocyte culture. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. (Japan)7:138-144.
20. KONO, Y. 1968. Characteristics of complement fixing antigen of Equine Infectious Anemia. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. (Japan)8:117-121.
21. _____, and YOKOMIZO Y. 1968. Attempts to cultivate Equine Infectious Anemia virus in various types of cells. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart (Japan)8:182-186.
22. _____; KOBAYASHI and Y. FUKUNAGA. 1970. Immunization of horses against Equine Infectious Anemia, with virus attenuate of E.I.A. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. (Japan)10:113 -122.
23. _____; T. TOSHINO and Y. FUKUNAGA. 1970. Growth characteristics of Equine Infectious Anemia virus. Archiv. ges virus-forsch. Germany. 30:252-256.
24. McGUIRE, T. C.; T. B. CRAWFORD and J. B. HENSON. 1972. Equine Infectious Anemia; Detection of Infectious virus, antibody complexes in the serum. Immunol. com. (EE.UU) 1(6):545-551.
25. MOORE, R. W.; C. W. LIVINGTON and H. REDMON. 1966. Preparation and preliminary investigation of a precipitinogen for Equine Infectious Anemia. South-Western. Vet. (EE.UU) 19 (3):187-191.
26. _____. 1969. Immunologic properties associated with Equine Infectious Anemia; Findings. Jour. Amer. Vet. Med. Assoc. 155:331-335.

27. MOORE, R. W. KATADA and H. REDMON. 1970. A method for the continuous culture of peripheral horse leukocytes. Amer. Jour. Vet. Res. 31(3):463-467.
28. MOREMAN, D. E. and H. A. SMITH. 1966. A review of Equine Infectious Anemia. South western Vet. (EE.UU)19(3):183-186.
29. NAKAJIMA, H.; S. TANAKA and C. USHIMI. 1968. Fractionation of Equine Infectious Anemia Virus by diethylamine ethyl cellulose chromatography and sucross density gradient centrifugation. Nat. Inst. Anim. Hlth Quart. (Japan) 8:57-63.
30. _____; TANAKA and C. USHIMI. 1969. Phisicochemical studies of the Equine Infectious Anemia Virus. I. Buoyant density of the virus. Archiv. ges. Virus-Forch. Germany, 26:389-394.
31. _____; TANAKA and C. USHIMI. 1969. Phisicochemical studies of the Equine Infectious Anemia Virus. II. Sensivity of the virus to trypsin. Archiv. ges Virus-Forch. Germany. 26:395 -397.
32. _____; TANAKA and C. USHIMI. 1970. Phisicochemical studies of the Equine Infectious Anemia virus. IV. Determination of the nucleic acid type in the virus. Archiv. ges virus-Forch. Germany. 31:273-280.
33. _____; and USHIMI. 1970. Characterization of precipitating antibody in Equine Infectious Anemia. Jour. Immunol. (EE.UU) 107(3):889-894.
34. _____; Y. KONDO and C. USHIMI. 1971. Characterization of precipitating antibody in EIA. Jour. Immunol. (EE.UU)107(3):889-894.
35. _____; and C. USHIMI. 1971. Immunodiffusion studies of purified Equine Infectious Anemia virus. Infection an Immunity (EE.UU) 3(3):373-377.

36. _____; N.L. NORCROSS and L. COGGINS. 1972. Demonstration of antigen identity between purified E.I.A. virus and antigen extracted from infected horses spleen. Infection and Immunity (EE.UU)6(3):416-417.
37. _____; and C. USHIMI. 1972. Detection of precipitating antibody in E.I.A. by concentrated virus antigen. Nat. Inst. Hlth. Quart. (Japan)12:47-53.
38. OSBOLDISTON, G. W.; J. R. COFFMAN and S. M. KRUCKENBERG. 1970. Biochemical differentiation of Equine Anemias. Jour. Amer. Vet. Med. Ass. 157:336-343.
39. PEARSON, J. E. 1972. Equine Infectious Anemia diagnosis and prevention. Io. State Univ. Vet. (EE.UU) 34(2):79-84
40. SAURINO, V. R. et al. 1966. Immuno-diagnostic relations of three clinical types of Equine Infectious Anemia. Jour. Amer. Vet. Med. Ass. 149(11):1416-1422.
41. _____. 1969. The immunologic response to Equine Infectious Anemia. Jour. Amer. Vet. Ass. 155:345-349.
42. TANAKA, K. and K. SAKAKI. 1962. Neutralization test on serum from horses infected with the virus of Equine Infectious Anemia. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. (Japan) 2(3):128 -139.
43. USHIMI, C.; H. NAKAYIMA and S. TANAKA. 1970. Demonstration of Equine Infectious Anemia viral antigen by immunofluorescence. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. (Japan) 10:90-91.
44. YAMAMOTO, H. and S. KONNO. 1967. Phatological studies on bone marrow in Equine Infectious Anemia. II. Histopathology of vertebral, sternal and femoral bone marrow. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. (Japan)7:40 -53.

45. YAMAMOTO, H. and S. KONNO. 1967. Pathological studies on bone marrow in Equine Infectious Anemia. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. (Japan)7:81-97.

46. YOSHINO, T; H. YAMAMOTO and A. OKANIWA. 1970. Fine structure of basophilic round cells of the spleen and lymph nodes in Equine Infectious Anemia. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. (Japan) 10:11-25.