

01672



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

13

ISOERITROLISIS NEONATAL EN MULAS.

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN PRODUCCION ANIMAL:
REPRODUCCION

PRESENTADA POR:
MVZ. RUBEN VAZQUEZ ROCHA

58822

DIRECTORES DE TESIS: MVZ. MSc. MARIA MASRI DABA
MZV. PhD. LUIS ZARCO QUINTERO
MVZ. MSc. JILL JOHNSON McCLURE



MEXICO, D. F.

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



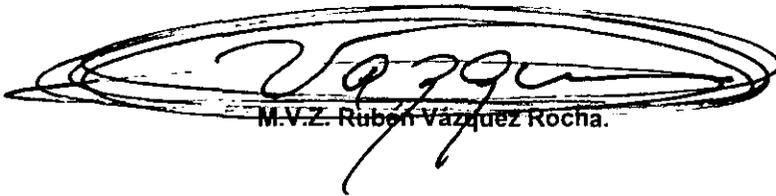
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El autor da el consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, para que la tesis este disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.



M.V.Z. Ruben Vázquez Rocha.

Dedicatorias.

A mi dios.

Por permitirme llegar hasta este día, tan deseado e importante para mí, con buena salud y con deseos de seguir preparándome.

A la memoria de mis padres.

Margarito Vázquez Torres. †

María Rocha Hernández. †

A ustedes quienes con todo su amor y ejemplo, me supieron dar en cada uno de los momentos de mi vida los consejos y ayuda necesaria para que me pudiera formar no solamente como hombre, sino también como profesionista.

A mi esposa e hijos.

María del Pilar Zavala Perales.

Blanca Margarita Vázquez Zavala.

Rubén Sebastián Vázquez Zavala.

Que al lado mío, han sabido soportar las penurias y apoyarme en los esfuerzos que se han requerido para poder llegar al término de una más de mis metas.

A mis hermanos.

A la memoria de Rodolfo † e Isidro †, y a Francisco, Antonio, Juana Guadalupe y María del Rosario Vázquez Rocha.

Quienes a través de toda mi vida y cada cual en su momento, me han dado aliento para seguir en la conquista de mis ideales.

A mi General de División D.E.M.

Antonio Riviello Bazan.

Por haberme apoyado y darme así la oportunidad de prepararme académicamente para poder servir un poco mejor a mi Instituto Armado, y a la vez, a nuestro México.

Agradecimientos.

Al Ejercito Mexicano y especialmente al Criadero Militar de Ganado, Santa Gertrudis, Chih. por haber permitido realizar la toma de muestras para desarrollar esta tesis.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M., y en especial al Departamento de Reproducción y a la Clínica de Equinos, por los conocimientos obtenidos a través de ellos en mis estudios de Maestría en Producción Animal: Reproducción.

A mis directores de tesis.

MVZ. MSc. María Masri Daba.

MZV. PhD. Luis Alberto Zarco Quintero.

MVZ. MsC. Jill Johnson McClure.

Por su enorme y desinteresada ayuda.

A mi jurado.

MVZ. MSc. María Masri Daba.

MZV. PhD. Luis Alberto Zarco Quintero.

MZV. PhD. Francisco Trigo Tavera.

MVZ. Dr. en C. Joel Hernández Ceron.

MVZ. M.PA. Carlos Esquibel Lacroix.

A todos por su apoyo recibido y sus importantes observaciones.

A mis familiares y compañeros Médico Veterinarios que de alguna forma me brindaron su apoyo en la realización de este estudio.

Isoeritrólisis neonatal en mulas.

Resumen.

Los potros mulas recién nacidos son afectados por la Isoeritrólisis neonatal (IN), y el "Antígeno burro" es el responsable. Debido a este antígeno, existe reportado un 100% de incompatibilidad en estas gestaciones, un 8-10% de muletos afectados y un 50% de mortalidad. Los objetivos del presente trabajo fueron conocer: a) el porcentaje de yeguas sin gestación y gestantes sensibilizadas contra el "Antígeno burro"; b) en cual momento de la gestación se detecta esta sensibilización; c) el comportamiento de la producción de anticuerpos contra éste antígeno en yeguas sin gestación, durante la gestación y después del parto; d) el tipo de reacción de los anticuerpos producidos; e) el comportamiento de la producción de anticuerpos contra el "Antígeno burro" en las yeguas posparto; y f) la prevalencia e incidencia de IN, así como la tasa de mortalidad de los muletos.

El trabajo de campo se realizó en el Criadero Militar de Ganado, Santa Gertrudis, Chih., de diciembre de 1992 a diciembre de 1993, realizando cuatro muestreos cada cuatro meses en 245 potrancas. En cada muestreo se obtuvieron de cada yegua, dos muestras sanguíneas, determinándose los títulos de anticuerpos por las pruebas de Hemólisis mediada por complemento de conejo y Aglutinación salina estándar, en el Laboratorio de Inmunogenética Equina del Departamento de Ciencias Clínicas de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Estatal de Luisiana, EUA.

Los resultados son: a) 96 yeguas fueron positivas, representando un 39.2% de las 245. La proporción de yeguas positivas no fue significativamente diferente en las yeguas sin gestaciones previas (35.4%) contra las de una o más gestaciones (41.10%); ($p > 0.05$) b) en las yeguas de primera gestación el rango de días en ser positiva a hemólisis y aglutinación fue de 237 a 280 y para las de segunda gestación de 53 a 224. Existiendo diferencia significativa entre ambas; ($p < 0.05$) c) con el método de hemólisis nosotros encontramos 42 yeguas que fueron positivas en el primer muestreo, las cuales se hicieron negativas en los subsecuentes muestreos, después se detectaron otras 24 yeguas pero que fueron positivas en segundo muestreo, presentando un comportamiento similar en los muestreos posteriores; con el método de aglutinación se detectaron 6 yeguas que fueron positivas en el primer muestreo, las cuales también se hicieron negativas en los muestreos subsecuentes, así mismo, se detectaron 15 yeguas que fueron positivas en el segundo muestreo, que también se hicieron negativas en los demás muestreos. Encontrando una diferencia estadísticamente significativa en todos los casos; ($p < 0.05$) d) la mayoría de los casos positivos 68 (70.80%) se comportaron como hemolisinas, 23 (24.00%) como hemolisinas y aglutininas, y 5 (5.20%) como aglutininas. Existiendo una diferencia significativa entre ellos; ($p < 0.05$) e) de las 38 yeguas que presentaron reacción positiva posparto, 15 (39.5%) estaban entre 1-90 días, 11 (28.9%) entre 91 y 180, 8 (21.1%) entre 180 y 270, y 4 (10.5%) de 271 o más días de paridas. Existiendo diferencia significativa entre el primero y el cuarto trimestre; ($p < 0.05$) f) nacieron 200 muletos (32 en 1922, 104 en 1993 y 62 en 1994), la tasa de fertilidad fue 27.21% y la mortalidad 3.00% ($91/92 = 1$, $92/93 = 2$ y $93/94 = 3$).

El porcentaje de yeguas productoras de híbridos sensibilizadas contra el "Antígeno burro" fue 39.2%, menor al esperado, ésta incidencia de sensibilización no aumenta con gestaciones posteriores y nunca alcanza el 50%. La causa probable para que una yegua no gestante (nuca presentó un muleto) se sensibilice, es una placentitis de una gestación que no finalizó con un potro vivo y que no fue detectada o una iatrogénica al contacto con agujas contaminadas con tejido extraño. La sensibilización en yeguas productoras de híbridos se presenta desde la primera gestación, y ésta sirve para montar una respuesta de "memoria". Esta sensibilización en yeguas gestantes puede ser detectada principalmente durante el tercer y cuarto trimestre. La respuesta positiva en las yeguas tiende a disminuir de intensidad o hacerse negativas en muestreos posteriores, lo que podría explicar la nula incidencia de IN en muletos, pero queda sin explicación la causa de esta supresión de la sensibilidad. En las yeguas gestantes de híbridos, los anticuerpos actúan principalmente como hemolisinas, después como hemolisinas y aglutininas y finalmente como aglutininas. La producción de anticuerpos en las yeguas paridas de muleto, se conserva durante meses. En el presente trabajo no se encontró un solo caso de IN detectable clínicamente, ni mortalidad por esta causa a pesar de la alta incompatibilidad en este tipo de gestaciones, por lo que otros factores diferentes de dicha incompatibilidad deben estar jugando una importante función.

Palabras claves: Isoeritrólisis neonatal, anticuerpo, antígeno burro, potros mulas.

Neonatal isoerythrolysis in mule foals.

Summary.

The mule foals are affected by neonatal isoerythrolysis (NI), the "Donkey factor" is the responsible. Has been reported in this gestation a 100% incompatibility, from 8-10% of affected mule foal with 50% of mortality. The objectives were: a) how many mares with the antigen were pregnant or non-pregnant; b) at which point of gestation the sensitivity was detected; c) the behavior of the production of antibodies against this antigen in non-pregnant mares, during the pregnancy and father pregnancy; d) type of reaction of the antibodies; e) behavior of production of antibodies of positives mares postpartum; and f) presence of NI and mortality of mule foals.

The study was developed in the military breeding cattle farm in Santa Gertrudis, Chihuahua, from December 1992 to December 1993, collecting four samples every 4 months in 245 mares bred to donkey. In every sampling, two vacutainer tubes were obtained. In order to obtain antibody titers by the method Hemolysis by rabbit complement and Standard saline agglutination. These samples were evaluated at the Immunogenetics Laboratory of Department of Clinical Sciences at Louisiana State University.

The results are shown as follows: a) ninety-six mares resulted positive to "Donkey factor", being the 39.2% of the total mares. There was no significant difference between pregnant mares (41.10%) and non-pregnant mares (35.4%); ($p > 0.05$) b) in the first pregnancy mares the presence of "Donkey factor" varied from 237 to 280 days and mares that had a second pregnancy varied from 53 to 224 days on both of the methods applied. There is significant difference among them; ($p < 0.05$) c) with the hemolysis method we found 42 mares were positive at first sampling and the behavior of the antigen became negative though out; 24 mares were positive at second sampling and the behavior was similar. With the agglutination method 6 were positive at the first sampling and the behavior was similar becoming negative at subsequent sampling; 15 mares were detected at second sampling and the antigen behavior was similar. There is significant difference among them; ($p < 0.05$) d) Most of the mares 68 (70.80%) were positive to hemolysis, 23 (24.00%) positive to hemolysis and agglutination and 5 (5.22%) just to agglutinins. The distribution was significant; ($p < 0.05$) e) Out of 38 mares that were positive postpartum, the antigen was detected on 15 (39.5%) between 1-90 days, 11 (28.9%) between 91 and 180 days, 8 (21.1%) between 180 and 270 days and 4 (10.5%) at least at 271 days. There is a significant difference between the first and second trimester; ($p < 0.05$) and f) Two hundred mule foals were born (32 in 1992, 104 in 1993 and 62 in 1994), the fertility rate was poor 27.21% and the mortality 3.00% (91/92=1, 92/93=2 and 93/94=3). NI was not detected as a cause of death.

The percentage of mares in contact with donkey, sensitized against "Donkey factor" was 39.2% less than expected because every pregnancy should be in incompatible. This prevalence of antigen does not increase with further pregnancies and never reaches 50%. The potential cause of a non-pregnant mare

to be sensitized to the antigen could be the presence of placentitis or abortion or iatrogenic causes due to contaminated needles. The positive mares cross to donkey were sensitized in the first pregnancy and the presence of antigen was later than in second pregnancies, therefore it is probable that second pregnancy has an earlier response due to memory. The presence of antigen in pregnant mares was commonly found during the third and fourth trimester. The positive reaction mares tend to decrease in concentration to become negative. This condition may explain the absence NI in mule foals but there is no explanation for the suppression of the "Donkey factor". In mares with donkey pregnancy the antibodies act as hemolysins then as hemolysins and agglutinins and finally as agglutinins. The antibody production in mares delivering mule foals is present for several months. This study we did not find a clinical case of NI neither mortality attribution to this cause, in spite of the high incompatibility of these pregnancies. Therefore, other factors may play a role.

Key word: Neonatal isoerythrolysis, antibody, donkey factor, mule foals.

Tabla de contenido (Indice).

	Pagina.
I._ Introducción.....	1.
II._ Objetivos.....	6.
III._ Revisión de literatura.....	7.
3.1. Historia de la enfermedad.....	7.
3.2. Definición y etiología.....	9.
3.3. Clasificación de los grupos sanguíneos de los eritrocitos de los caballos.....	10.
3.4. Antígenos importantes para la presencia de Isoeritrólisis neonatal en los potros equinos y potros mulas.....	16.
3.5. Formas de sensibilización en las yeguas madres.....	18.
3.6. Patogénesis.....	20.
3.7. Epidemiología.....	22.
3.8. Prevalencia.....	26.
3.9. Incidencia.....	28.
3.10. Curso de la enfermedad y signos clínicos.....	30.
3.11. Diagnóstico diferencial de laboratorio y serológico.....	33.
3.12. Examen posmortem.....	36.
3.13. Pruebas serodiagnósticas.....	38.
3.14. Terapia y manejo.....	48.
3.15. Pronóstico.....	60.
3.16. Prevención y control.....	61.
IV._ Material y métodos.....	70.
V._ Resultados.....	78.
VI._ Discusión.....	89.
VII._ Conclusión.....	87.
VIII._ Literatura citada.....	99.

Lista de cuadros.

Página.

Cuadro 1._	Grupos, antígenos sanguíneos y sus alelos correspondientes.....	12.
Cuadro 2._	Actividad de los anticuerpos en los caballos.....	13.
Cuadro 3._	Frecuencia de los antígenos sanguíneos en cinco razas de caballos.....	17.
Cuadro 4._	Probabilidad de que las yeguas tengan un potro con Isoeritrólisis neonatal en diferentes razas de caballos Americanas.....	24.
Cuadro 5._	Un ejemplo de como los resultados de tipificación sanguínea son reportados.....	38.
Cuadro 6._	Ejemplo de un reporte de tipificación sanguínea para compatibilidad del semental con la yegua.....	41.
Cuadro 7._	Interpretación de los resultados de tipificación sanguínea y recomendaciones respecto del potro.....	44.
Cuadro 8.-	Problemas más comunes causados por la transfusión sanguínea.....	57.
Cuadro 9.-	Características del tamaño de muestra incluida en el estudio distribuida por edad.....	71.
Cuadro 10._	Yeguas con reacción positiva y negativa de acuerdo al número de gestaciones..	78.
Cuadro 11._	Yeguas detectadas en estado de gestación de acuerdo al número de días en que dieron resultados positivos (hemólisis y/o aglutinación).....	79.
Cuadro 12._	Diferencia entre las yeguas de primera y segunda gestación en dar resultados positivos.....	79.
Cuadro 13._	Incidencia de resultados positivos utilizando la prueba de hemólisis en diferente trimestre de la gestación.....	80.
Cuadro 14._	Incidencia de resultados positivos utilizando la prueba de aglutinación en diferente trimestre de la gestación.....	81.
Cuadro 15._	Yeguas que presentaron resultados positivos a hemólisis en el primer muestreo en comparación con los resultados de los muestreos subsecuentes.....	82.
Cuadro 16._	Yeguas que presentaron resultados positivos a hemólisis en el segundo muestreo en comparación con los resultados de los muestreos subsecuentes....	83.
Cuadro 17._	Yeguas que presentaron resultados positivos a aglutinación en el primer muestreo en comparación con los resultados de los muestreos subsecuentes...	84.
Cuadro 18._	Yeguas que presentaron resultados positivos a aglutinación en el segundo muestreo en comparación con los resultados de los muestreos subsecuentes...	85.
Cuadro 19._	Clasificación de las yeguas positivas de acuerdo a la prueba mediante la cual fueron diagnosticadas.....	86.
Cuadro 20._	Yeguas que presentaron reacción positiva a hemólisis y/o aglutinación según el número de días posteriores al parto de un potro mula.....	87.
Cuadro 21._	Número de nacimientos y defunciones de muletos registrados por año.....	87.
Cuadro 22._	Datos generales de los muletos que murieron en el periodo 92-94.....	88.

I. Introducción.

El potro recién nacido pasa en un instante de un medio estéril y protegido hacia un mundo contaminado y hostil, por lo cual debe ser protegido. ^(1,75,78) Aunque en otras especies, como los primates y los roedores, se produce la transferencia transplacentaria de anticuerpos maternos al feto antes del nacimiento, en los equinos, el tipo de placentación (epiteliocorial difusa) actúa como una barrera impermeable, evitando el paso de anticuerpos. Por esta razón los anticuerpos maternos solamente pueden llegar al recién nacido a través de la denominada "transferencia o inmunidad pasiva". ^(1,65,74,76,81,84)

El potro recién nacido es esencialmente agamaglobulinémico, por lo que los anticuerpos obtenidos del calostro son muy importantes para él, debido a que lo protegen contra los microorganismos que encuentre durante las primeras semanas de vida, mientras su sistema inmune madura para ser funcional. ^(37,106,141) Existen tres pasos importantes para que se realice una transferencia o inmunidad pasiva adecuada de la yegua al potro: a) selección, concentración y secreción de anticuerpos en el calostro por la madre; b) ingestión del calostro (inmunoglobulinas) por el potro hacia su intestino; y c) transferencia o absorción de éstas inmunoglobulinas hacia su torrente sanguíneo. ^(3,65,74,84)

El calostro contiene inmunoglobulinas dirigidas contra una amplia variedad de microorganismos, a los cuales la yegua madre ha sido previamente expuesta. La concentración de anticuerpos en el calostro es mayor que en el suero, siendo las IgG e IgM la clase de anticuerpos predominantes. Antes del parto la glándula mamaria concentra selectivamente grandes cantidades de estos anticuerpos, que no son sintetizados por ella, sino tomados de la circulación materna. El mecanismo preciso de selección y concentración de los anticuerpos por la glándula mamaria se desconoce, pero se cree que el cambio de los niveles hormonales (estrógenos y progesterona) durante las cuatro últimas semanas de gestación, ejercen una influencia en su control. La secreción del calostro por parte de la madre es de vida corta, y los niveles de anticuerpos declinan a niveles insignificantes aproximadamente a las 24 horas después del parto. ^(2,3,10,54,66,71,72,95,96,97,99,121)

Después de la ingestión del calostro, el proceso de absorción de los anticuerpos maternos por el recién nacido es complejo, ya que participan células especializadas del revestimiento epitelial del intestino delgado, las que adquieren los anticuerpos a partir de la luz intestinal por medio de pinocitosis, proceso que al no ser selectivo permite que otro tipo de grandes moléculas también pasen al torrente sanguíneo, aunque no tengan actividades inmunológicas (proteínas de la leche producidas por la glándula mamaria: Pt-Lactoglobulina y β -Lactoalbúmina). Estas células especializadas colectan tantas proteínas como sea posible, las cuales se mueven hacia su base hasta que son liberadas hacia el espacio intracelular, y posteriormente pasan hacia los conductos linfáticos, para llegar al sistema circulatorio vía el conducto torácico. (3,6,7,8,52,60,65,82,84,101)

Este complejo mecanismo de absorción pasiva de los anticuerpos es eficiente inmediatamente después del nacimiento, por lo que las concentraciones de anticuerpos en la circulación del potro se elevan dentro de las primeras seis horas posteriores al nacimiento, aproximándose a los niveles de los caballos adultos desde las doce horas. Hacia las 24 horas de edad la absorción intestinal de anticuerpos se reduce dramáticamente, por lo que estas primeras horas son de gran importancia para que el potro adquiera los anticuerpos requeridos. Esto se debe a que después de las 24 horas la concentración de IgG en el calostro se ha reducido al 10% de los niveles preparto, y solamente las IgA se incrementan para ayudar a prevenir las infecciones entéricas; además, las células especializadas que absorben el calostro mueren, y son reemplazadas por células maduras del intestino, las cuales son incapaces de transferir inmunoglobulinas. (2,3,8,65,66,67,73,84,98)

Las IgG de origen materno que se absorben a partir del calostro tienen una vida media de aproximadamente 23 días. Estas dan protección contra las enfermedades microbianas durante las primeras semanas de vida del potro y son catabólicamente eliminadas cuando combaten a los microorganismos patógenos, siendo retiradas de la circulación sanguínea inmediatamente. Esta protección es proporcionada hasta que el sistema inmune del potro gradualmente responde al encontrarse con varios antígenos, y se van estableciendo las células de "memoria",

capaces de reaccionar rápidamente en presencia de subsecuentes exposiciones al mismo antígeno. ⁽⁷¹⁾

En algunas ocasiones se presenta un desorden de la inmunidad pasiva en el potro, consistente en la presencia de anticuerpos dañinos en el caostro, lo que ocasiona la enfermedad llamada "Isoeritrólisis neonatal o Anemia hemolítica inmunomediada del recién nacido". ^(1,3,6,7,30,54,65,73,82,84)

Esta enfermedad ha sido referida con muchas sinonimias, tales como: a) Ictericia del potro; ⁽⁵²⁾ b) Ictericia hemolítica del potro; ⁽⁶⁷⁾ c) Enfermedad hemolítica del potro recién nacido; ⁽⁷⁾ y d) Ictericia neonatal del caballo; ⁽⁵²⁾ sin embargo, para establecer que este desorden es una enfermedad distinta se propuso el nombre de **Isoeritrólisis neonatal equina (IN)**. ⁽⁵⁵⁾ La IN, aunque no es comúnmente encontrada en la práctica equina, es una enfermedad importante del recién nacido, ya que puede resultar en una crisis hemolítica fatal. ^(30,64,82,102,118)

Un gran descubrimiento de la investigación veterinaria fue determinar la causa de la IN en el potro recién nacido. Los primeros estudios demostraron que en los potros la enfermedad es causada por anticuerpos producidos durante la gestación por la yegua en contra de los antígenos eritrocíticos que el potro heredó del padre y que son diferentes a los presentes en la madre, lo que causará que posteriormente éstos eritrocitos sean destruidos por los anticuerpos. ^(3,5,6,7,20,26,30,41,65) Caroli y Bessis, (1947) ⁽¹²³⁾ describieron la enfermedad en los potros mulas recién nacidos y demostraron que también se produce una inmunización, debido a la cual, la yegua madre es capaz de reaccionar contra los eritrocitos del burro semental.

La ictericia es causada básicamente por la destrucción de los eritrocitos del potro debido a una alteración de la forma de la membrana celular. ⁽⁸⁴⁾ Weed y Reed, (1966) ⁽¹⁰⁰⁾ demostraron que la fijación de los anticuerpos a los antígenos que se encuentran en la pared celular de los eritrocitos incrementa la rigidez de dicha membrana, reduciendo su habilidad para salir por las pequeñas aberturas dentro de los vasos terminales y membranas basales del bazo. Esto provoca que al pasar a través de la circulación esplénica, ocurra la lisis porque los eritrocitos son atrapados y fagocitados. Aunque la médula ósea eritroide trata de responder e iniciar la

producción de eritrocitos, esta requiere de tres a cinco días, por lo que usualmente no es lo suficientemente rápida para compensar la severa eritrólisis, y algunos potros afectados mueren por hipoxia durante la fase aguda de la enfermedad. ⁽⁸⁴⁾ Debido a que en los caballos no existe una transferencia de anticuerpos via placentaria, la enfermedad ocurre solamente por ingestión y absorción por parte del recién nacido de los anticuerpos antieritrocíticos maternos presentes en el calostro. ^(3,29,38,64,67,84,111)

En caballos los antígenos incompatibles entre la madre y el potro involucrados en la mayoría de los casos de IN son principalmente dos: Aa y Qa, siendo éstos dos de los más de treinta antígenos de sus diferentes grupos que están comúnmente asociados con esta enfermedad en potros hijos de caballo y yegua. ^(6,38,54,64,82,84,115) En contraste, aunque se conoce desde hace mucho (1863) que la IN ocurre en potros mulas, ⁽²³⁾ el antígeno específico responsable no habían sido identificado plenamente hasta que McClure, *et al*, (1994) ⁽¹⁴⁾ lo identificaron en los eritrocitos de los burros y mulas, para lo cual usaron anticuerpos encontrados en el suero de yeguas que habían producido potros mulas afectados con IN, y lo llamaron "Antígeno burro".

Este "Antígeno burro" no corresponde a ninguno de los antígenos conocidos de los eritrocitos de los caballos, por ésta razón, McClure, *et al*, (1994) ⁽¹⁴⁾ concluyen que para los caballos se trata de un xenoantígeno (un antígeno ajeno). Por otra parte, sus resultados también sugieren que todas las gestaciones de mulas (padre burro y madre yegua) son incompatibles en lo que respecta a éste antígeno, dado que todos los burros y mulas probados poseen este antígeno, mientras que todos los caballos carecen de él; por lo que el potencial para desarrollar el síndrome de IN se presenta en todas las gestaciones de éste tipo, incluyendo las yeguas primíparas. En las cruzas de caballo con yegua, las gestaciones incompatibles van desde un 3 a un 66%, dependiendo de la raza y del antígeno comprendido, y solo de un 0.5 a 2% de los potros equinos son afectados por IN. ^(2,14,38,42,84,102) En cambio, las cruzas de burro con yegua, la incompatibilidad es del 100%, con un 8 a 10% de los potros mulas afectados y una mortalidad de aproximadamente 50%. ⁽¹⁵⁾

La existencia de antígenos incompatibles en los eritrocitos del potro no es suficiente para que se presente la IN, ya que para que se desarrolle el síndrome es necesario que las yeguas gestantes con un potro incompatible se vean expuestas a sus eritrocitos durante la preñez, lo cual puede ser causado por: a) una placentitis; b) una exposición durante el parto; c) como resultado de una transfusión sanguínea previa; y d) por la exposición a agujas hipodérmicas con tejido extraño. Cualquiera que sea la forma de exposición, ésta inmuniza a las yeguas contra el "Antígeno burro" y los anticuerpos producidos como resultado no tienen consecuencias para la yegua, pero cualquier potro mula que tome el calostro que los contenga puede sufrir la enfermedad. Aunque la IN en los muleros generalmente ocurre como resultado de la ingestión de calostro, en algunos casos se ha presentado aún sin dicha ingestión, lo que sugiere una posible transferencia intrauterina de los anticuerpos. ^(5,6,7,16,17,30,52,58,118) La alta prevalencia reportada de IN en muleros hace necesario estudiar más ésta enfermedad, para determinar entre otras cosas, cuándo la yegua preñada con burro se sensibiliza durante la gestación y conocer como es el comportamiento de la producción de anticuerpos contra el "Antígeno burro" durante éste periodo.

II. **Objetivos.**

1. **Objetivo General.**

Este trabajo pretendió determinar en qué momento se puede detectar serológicamente la presencia de anticuerpos contra el "Antígeno burro" en las yeguas servidas con burros, para así establecer programas preventivos contra la Isoeritrólisis neonatal en los potros mulas.

2. **Objetivos Específicos.**

- a) Determinar el porcentaje de yeguas sin gestación y gestantes sensibilizadas contra el "Antígeno burro" de los eritrocitos de los muletos en las yeguas dedicadas a la producción de híbridos.
- b) Conocer en cual momento de la gestación ocurre la sensibilización y producción de anticuerpos contra el "Antígeno burro"
- c) Conocer el comportamiento de la producción de anticuerpos contra el "Antígeno burro" en las yeguas sin gestación y gestantes.
- d) Conocer la forma en que actúan los anticuerpos formados contra este antígeno.
- e) Conocer el comportamiento de la producción de anticuerpos contra el "Antígeno burro" en las yeguas posparto.
- f) Realizar un estudio retrospectivo para determinar la prevalencia e incidencia de IN en potros mulas, así como la tasa de mortalidad debido a ésta enfermedad.

III. Revisión de la literatura.

3.1. Historia de la enfermedad.

La condición clínica de ictericia grave del neonato equino ha sido reconocida por largo tiempo en medicina veterinaria. El término isoeritrólisis implica lisis o destrucción de los eritrocitos debido a la acción de anticuerpos, mientras que el término neonatal indica que está restringida a los neonatos solamente, siendo en general una de las enfermedades más devastadoras en ésta etapa del desarrollo. (40,54)

Como todas las enfermedades, la IN ofrece una historia fascinante, iniciando con que el nombre de Isoeritrólisis neonatal, es una denominación nueva para una enfermedad vieja tanto en potros equinos como en potros mulas, que ha sido reconocida desde el siglo XVIII, (23,54) recibiendo varios nombres en las diferentes regiones en donde se producían mulas como fueron: Francia, Italia y España. De acuerdo a Doll, (1952) (12) el nombre de IN fue usado por primera vez por Hagan y Bruner, (1951) al referirse a esta enfermedad en los caballos, y es usada también actualmente para definir la enfermedad en otros animales domésticos.

Durante mucho tiempo la etiología de la enfermedad no se conocía, y se realizaron muchos esfuerzos para describir a un microorganismo como agente causal de la enfermedad. (54) Brumpt, (1947) (15) rechazan y descarta la teoría de que la ictericia en los potros mulas puede ser debida a la infección con el parásito Babesia equi, la cual había sido propuesta por Danatien y Lestoquard, (1924), así como Barnet, (1930) y Carpano, (1932). Dimock, *et al*, (1947) (83) observaron la similitud entre la condición encontrada en los potros ictericos y la observada en la "Eritroblastosis infantil humana", sugiriendo la posibilidad de que los caballos lleven un antígeno en los eritrocitos, comparable con el antígeno Rh en el hombre. Todos estos investigadores junto con otros tales como Caroli y Bessis, (1947); (123) Darraspen y Godfrain, (1947); (18) Dimock, *et al*, (1947); (83) Saint-Martin, (1948) (47); Bruner, *et al*, (1948); (5) y Coombs, *et al*, (1948) (7) confirman que la enfermedad hemolítica del potro equino y mula se debe a una inmunización de la madre por los

antígenos que están presentes en los eritrocitos del feto. Cabe mencionar que este tipo de anticuerpos está ausente o son muy escasos en yeguas que no han sido servidas con burros, y en las madres de potros mulas normales, pero presentes en gran cantidad en las madres de potros mulas afectados por IN. También que existe "memoria" en este tipo de inmunidad, ya que la inyección de eritrocitos provenientes de burros a la madre de un potro mula afectado hace que rápidamente se produzcan una gran cantidad de anticuerpos, lo que no ocurre en las yeguas que no han sido servidas con burros. ⁽⁴⁷⁾ Posteriormente Parry, *et al*, (1949); ⁽⁴⁰⁾ Bessis y Millot, (1949); ⁽²³⁾ Saint-Martin, (1949); ⁽⁴¹⁾ Brion y Garet, (1949); ⁽⁵⁸⁾ y Bruner, (1950) ⁽¹²²⁾ describen los aspectos serológicos y discuten respecto de los métodos de laboratorio usados en el diagnóstico de la ictericia hemolítica, mencionando además que la enfermedad puede ser diagnosticada serológicamente al demostrar la sensibilización "*in vivo*" de los eritrocitos del potro por medio de una prueba de antiglobulinas. En estos estudios, es en donde por primera vez se usa la serología (aplicando los procedimientos empleados en la investigación de la enfermedad hemolítica de infantes recién nacidos), y se concluye que los procedimientos serológicos para el diagnóstico de la enfermedad en potros Pura Sangre Inglés recién nacidos son adecuados para el diagnóstico de la misma condición en los potros mulas neonatos.

3.2. Definición y etiología.

Las anemias hemolíticas mediadas por anomalías inmunológicas incluyen entre otras a la Isoeritrolisis neonatal. ⁽³¹⁾ La IN del recién nacido es una enfermedad en donde los antígenos sanguíneos juegan un papel importante. Se presenta en los primeros días de vida y consiste en el daño a los eritrocitos del neonato, causado por anticuerpos producidos por la madre, los cuales están dirigidos contra los antígenos heredados del padre y que se encuentran en las paredes de los eritrocitos del potro. Existe una marcada diferencia entre las especies vertebradas con respecto al momento y a la ruta de adquisición de los anticuerpos; los primates los adquieren antes del nacimiento por vía placentaria, en conejos es en la misma forma pero la principal vía es el saco vitelino más que por la placenta; en gatos, perros, ovinos, borregos, cabras, cerdos y equinos, son adquiridos después del nacimiento vía la glándula mamaria, la cual concentra grandes cantidades de anticuerpos durante los dos últimos meses de gestación y al momento del parto son secretados en grandes cantidades en el calostro. Cuando el potro equino o mula toma el calostro, absorbe los anticuerpos hacia su circulación sanguínea, dando inicio a una rápida eliminación de éstas células por medio de una hemólisis intravascular mediada por anticuerpos y complemento, hasta que una destrucción total extravascular se presente como resultado de la opsonización (proceso por el cual los eritrocitos se alteran de tal modo que son fagocitados con mayor facilidad, rapidez y eficacia). Realizando así la limpieza de las células por medio del sistema fagocítico mononuclear. ^(2,7,23,28,30,39,54,67,82,118,132)

3.3. Clasificación de los grupos sanguíneos de los eritrocitos de los caballos.

Todos los antígenos celulares que están implicados en la producción de Isoeritrolisis neonatal, son heredados por medio de genes dominantes; sin embargo, los anticuerpos de origen materno solamente pueden reaccionar en contra de antígenos heredados del padre y que no están presentes en la madre. Las membranas celulares de los eritrocitos tienen numerosos antígenos llamados aloantígenos (antígenos que aparecen en algunos miembros de la misma especie, pero no en otros, a veces se usa el término de isoantígenos), lo que permite la clasificación de los individuos dentro de diversos grupos sanguíneos. ^(3,11,54,80) Los antígenos de los eritrocitos no son parecidos a los antígenos de histocompatibilidad; sin embargo, están íntimamente ligados a la habilidad de montar una respuesta inmune por parte del animal si son administrados a un receptor que carezca de ellos, ya que estimularán la producción de anticuerpos, también llamados aloanticuerpos (anticuerpos específicos para un aloantígeno, a veces se usa el término de isoanticuerpos). ⁽¹²⁴⁾

Hay muchos y diferentes antígenos en la superficie de los eritrocitos de los animales, y con ello varía su antigenicidad, siendo algunos más potentes, y por lo tanto, más importantes que otros. Existen en cada sistema de los grupos sanguíneos un número variable de alelos alternativos o fenogrupos (un fenogrupo es un juego de alelos heredados en un grupo de dos o más), y como resultado su complejidad puede variar grandemente. ^(3,32,44,57,62,86,87,114,119,125) Sus rangos van desde sistemas simples como el sistema L de los bovinos, que consiste de dos alelos controlando un solo sistema de antígenos, hasta el sistema B también de los bovinos, que es altamente complejo ya que tiene varios cientos de alelos; tales antígenos tienen importancia en la aplicación clínica para el diagnóstico de la IN, y en la determinación de la incompatibilidad sanguínea entre el donador y el receptor de la transfusión. ^(3,30) Stormont, (1979), citado por Becht, (1983) menciona que el número de las posibilidades teóricas de los posibles tipos sanguíneos de los

eritrocitos, definidos por los reactivos y procedimientos actuales, es de aproximadamente 400,000. ⁽⁸⁴⁾

La enfermedad hemolítica en los caballos y mulas es una manifestación natural de la existencia de diferencias individuales entre los grupos sanguíneos para el primer caso, ^(2,3,11,22,30,39,48,62,84) y para el segundo de un antígeno que no existe en las yeguas, y que por lo tanto se considera un xenoantígeno para ellos, llamado "Antígeno burro". ^(14,118) Los antígenos causantes de IN son los mismos implicados en la formación de los grupos sanguíneos, consecuentemente, el conocimiento de éstos y de los procedimientos de tipificación son esenciales para el desarrollo de pruebas serodiagnósticas que ayuden en lo que respecta al pronóstico, tratamiento y prevención de la enfermedad. ⁽⁵⁴⁾ Además, el conocimiento de los grupos sanguíneos puede explicar porque solamente en algunos casos los potros producen inmunización en las yeguas. ⁽⁵⁸⁾

La nomenclatura usada para nombrar a los antígenos de los eritrocitos ha variado, los resultados presentados en la literatura y las comparaciones de las pruebas de tipificación sanguínea hacen evidente la existencia de muchos más antígenos en los eritrocitos que los que actualmente están reconocidos por la Sociedad Internacional de Investigación de los Grupos Sanguíneos de los Animales. Esta organización tiene como función la comparación cada dos años de las pruebas de tipificación sanguínea de los caballos realizadas en el ámbito mundial, para que todos los laboratorios en el mundo dedicados a esto puedan estandarizar la nomenclatura y dar un reconocimiento universal a las nuevas especificaciones, las cuales han sido determinadas por lo menos por un par de los laboratorios participantes. Esta sociedad adoptó una nomenclatura universal en 1974 para los antígenos de los eritrocitos, basándose en la utilizada en los grupos sanguíneos de los porcinos. ^(43,46,84) Cada antígeno es designado por una letra mayúscula, indicando el sistema o grupo al cual pertenece, seguido por una letra minúscula en la parte de abajo indicando la presencia de un antígeno en particular o por una "-" indicando la ausencia de este, por ejemplo: Aa, A-. No a todos los antígenos que han sido notificados en la literatura se les ha dado una designación internacional. ⁽⁴⁶⁾ De estos estudios se desprende que los tipos sanguíneos son tan diversos que si la

incompatibilidad entre la yegua y el potro (equino o muleto) fuese por si misma una causa suficiente, entonces virtualmente todos los recién nacidos se enfermarían, por lo que deben existir algunos factores que reducen sustancialmente esta probabilidad. ⁽⁴³⁾ Desde agosto de 1994 el Comité Permanente Equino de las Sociedad Internacional de Genética Animal y la Sociedad Internacional de Investigación de los Grupos Sanguíneos de los Animales reconoce a 34 tipos de antígenos de los eritrocitos, que comprenden siete grupos o sistemas sanguíneos identificados en el caballo. El cuadro 1, enumera: a) los sistemas sanguíneos o grupos genéticos "loci", independientes y responsables de la heredabilidad de los antígenos sanguíneos frecuentemente involucrados en la IN; ⁽³⁾ b) los antígenos más potentes de los eritrocitos; c) sus alelos que controlan la heredabilidad identificados para los caballos; y d) la nomenclatura oficial reconocida internacionalmente por la Sociedad Internacional de Investigación de los Grupos Sanguíneos de los Animales. ^(3,11,32,33,43,46,53,57,85,103,107,108,109,110,112,113,116,117) Estos antígenos son detectados en la superficie de los eritrocitos por medio del análisis con anticuerpos. ⁽³³⁾

Cuadro 1. Grupos, antígenos sanguíneos y sus alelos correspondientes.

Grupos sanguíneos	Antígenos sanguíneos	Alelos reconocidos
A	a,b,c,d,e,f,g	A ^a , A ^{adr} , A ^{adg} , A ^{adg} , A ^{abdr} , A ^{abdg} , A ^b , A ^{bc} , A ^{bce} , A ^c , A ^{cd} , A ^{ce} , A ^e , A-
C	a	C ^a , C-
D	a,b,c,e,f,g,h,i, ,k,l,m,n,o,p,r	D ^{adr} , D ^{adnr} , D ^{adir} , D ^{bcmq} , D ^{ceigmq} , D ^{cegimq} , D ^{ctgkm} , D ^{ctmqr} , D ^{cgm} , D ^{cgmp} , D ^{cgmq} , D ^{cgmqr} , D ^{cgmr} , D ^{deklr} , D ^{deloq} , D ^{delq} , D ^{dfklr} , D ^{dghmp} , D ^{dghmq} , D ^{dghmqr} , D ^{dkl} , D ^{dlnq} , D ^{dlnqr} , D ^q , D-
K	a	K ^a , K-
P	a,b,c,d,	P ^a , P ^{ac} , P ^{acd} , P ^{ad} , P ^b , P ^{bd} , P ^d , P-
Q	a,b,c,	Q ^{abc} , Q ^{ac} , Q ^a , Q ^b , Q ^c , Q-
U	a	U ^a , U-

Adaptado de Bowling, A.T. (1997) Parentage testing of horse. In: *Horse genetics*, 2/a. Edición, Ed. Cab. International, E.U.A. pp 83. ⁽³³⁾ Otros investigadores incluyen un octavo grupo el cual denominan T y a su antígeno Ta. ⁽²⁾

Cada antígeno se segrega siguiendo el patrón de herencia Mendeliana simple, en contraste con su ausencia; en otras palabras, ellos se manifiestan en los

eritrocitos de un individuo únicamente cuando están presentes en los eritrocitos de uno o de ambos padres, aunque también hay antígenos que tienden a heredarse en grupo de dos o más (fenogrupos).^(2,3,11,44,88) Esta es la base de la prueba del parentesco.^(3,44) El número de alelos que controlan la heredabilidad de cada uno de los antígenos se encuentra especificado en el cuadro anterior.

Cada sistema sanguíneo representa un gen diferente en los cromosomas del núcleo de las células precursoras de los eritrocitos en la médula ósea, estos genes codifican para la expresión de un par de antígenos (uno heredado de cada uno de los padres). De este modo, los pares de alelos controlan su heredabilidad, lo cual ocurre en los siete sistemas o grupos de los eritrocitos de cada animal.^(3, 11) El análisis de los anticuerpos presentes en el suero es determinado por medio de la absorción, las pruebas empleadas incluyen la prueba de solución salina conducida en forma paralela con las pruebas hemolíticas, que usa complemento de conejo o cobayo.^(32,87) Los reactivos son preparados de un suero autoinmune producido en el caballo y un suero hiperimune de conejo.⁽⁸⁷⁾ El cuadro 2, muestra el mecanismo de acción de los anticuerpos en los eritrocitos equinos.

Cuadro 2. Actividad de los anticuerpos en los caballos.

Antígenos	Hemólisis	Aglutinación
A1	+	+
A2	+	-
A'	+	+
H	+	+
C	+	+
D	-	+
J	-	+
K	+	+
P1	+	+
P2	+	+
P'	+	+
Q	+	-
R	+	-
S	+	-
T	+	-
U	+	+

Adaptado de Becht, L.J. (1983). Neonatal Isoerytholysis in the Foal. Part I. Background, Blood Group Antigens, and Pathogenesis. The Compendium Continuing Education, Vol. 5 (No.11), pp S591-S599.⁽⁸⁴⁾

Becht, (1983) ⁽⁸⁴⁾ hace notar que los antígenos actúan primero como hemolisinas y después como hemoaglutininas; por lo tanto, la pruebas serológicas para IN en el potro deben enfatizarse más en la hemólisis que en la aglutinación.

Por otro lado, los anticuerpos contra algunos otros antígenos pueden o no ocurrir en forma natural, pero son raros y de poco significado clínico. ^(30,128) La presencia de anticuerpos que ocurren naturalmente en la yegua y su implicación en la causa de IN ha sido investigada. ⁽⁹⁰⁾ Suzuki, *et al*, (1975) ⁽³²⁾ estudiaron el plasma normal de 679 muestras de caballos, y encontraron que noventa y cuatro poseían anticuerpos de presentación natural. En diecinueve de los noventa y cuatro caballos, los anticuerpos reaccionaron como aglutininas y cuatro fueron hemolisinas. Más de la mitad de las aglutininas fueron muy débiles para ser identificadas con especificidad, pero las que se identificaron fueron clasificadas como, anti-A, H, C, D y J; las cuatro hemolisinas fueron todas de especificidad anti-C. Del estudio realizado se concluyó que las hemolisinas equinas naturales ocurren raramente y posiblemente son limitadas a anti-C, y que las aglutininas tienen una actividad muy débil. Por lo tanto, la IN por anticuerpos naturales es muy rara o casi no existe. ⁽⁸⁴⁾

Stormont, *et al*, (1975) ⁽⁵⁴⁾ observaron que los anticuerpos anti-C producen una hemólisis que ocurre naturalmente. Weiner, (1951), citado por Bailey, *et al*, (1987) ⁽¹⁰²⁾ menciona que los anticuerpos anti-C al parecer son producidos naturalmente en los caballos como resultado de una exposición a epítomos similares o idénticos (antígenos heterófilos) que comúnmente ocurren en la naturaleza y están presentes en el alimento o el polen, los cuales son similares a los antígenos de los eritrocitos, por lo que se produce una reacción cruzada. Así mismo, muchos antígenos son estructuras comunes de un gran número de organismos, incluyendo: virus, bacterias, protozoarios y helmintos. La presencia o ausencia de esos anticuerpos naturales, no es sin embargo un fenómeno uniforme, y no todos los antígenos de los grupos sanguíneos están acompañados por la producción de anticuerpos naturales. ⁽³⁰⁾

Estos anticuerpos naturales pueden suprimir la producción de anticuerpos contra los antígenos de otros grupos sanguíneos, ésta supresión es llamada

"Inmunosupresión mediada por anticuerpos". ^(2,14,38,126) En donde los anticuerpos anti-C en las yeguas en riesgo se desarrollan espontáneamente sin una exposición conocida a los eritrocitos del potro, tales como gestación incompatibles o una transfusión sanguínea. Estos anticuerpos al parecer suprimen la producción de anticuerpos específicos contra otros antígenos por ejemplo: Aa o Qa, presumiblemente debido a que los anticuerpos anti-C están activamente removiendo los eritrocitos extraños conteniendo estos antígenos antes de que la sensibilidad ocurra. Al igual que en las mujeres con anticuerpos produciéndose naturalmente contra los antígenos de los grupos sanguíneos ABO, en donde al parecer producen menos anticuerpos para los antígenos Rh de los grupos sanguíneos durante su gestación. ⁽³⁸⁾

3.4. Antígenos importantes para la presencia de Isoeritrólisis neonatal en los potros equinos y potros mulas.

Se ha observado una considerable diferencia en la frecuencia de algunos de los antígenos de los eritrocitos entre distintas razas de la especie equina. ^(3,88) Por ejemplo, la raza de los Ponny Shetland demuestra más heterogeneidad con respecto de los antígenos sanguíneos que cualquiera de las otras razas estudiadas, lo que sugeriría que una alta incidencia de IN debe ocurrir en esta raza; ^(3,43) sin embargo, la enfermedad no ha sido documentada en sus potros, mientras que los PSI muestran la mayor homogeneidad de los grupos sanguíneos, y aun así es la raza más afectada por esta enfermedad. ⁽²⁾

Los datos de la incidencia promedio de la IN indican que el antígeno Aa en el sistema A y el Qa en el sistema Q, son en la mayoría de los casos (90%), los responsables en la producción de IN. ^(54,86,87,129)

Aunque varias fuentes citan a otros anticuerpos como causantes de Isoeritrólisis neonatal en los potros equinos, tales como: los anticuerpos anti-Pa; ^(2,11) anti-E2; ⁽⁴⁵⁾ anti-Ua; ⁽¹³⁾ anti-Ab; ⁽⁴⁶⁾ o los anti-C. ⁽⁵⁴⁾ El cuadro 3, enlista la frecuencia observada de la mayoría de los antígenos definidos entre varias razas, debiendo observarse que el antígeno D, no ocurre en los PSI y en los Arabes, siendo también raro que ocurre en los Cuartos de Milla. ⁽³²⁾

Cuadro 3. Frecuencia de los antígenos sanguíneos en cinco razas de caballos.

Sistema genético	Antígenos sanguíneos	Ponny Shetland	Pura Sangre Inglés	Arabe	Cuarto Milla	Standardbred
A	A1	0.534	0.924	0.983	0.728	0.829
	A2	0.869	0.924	0.983	0.896	0.993
	A'	0.853	0.052	0.094	0.362	0.54
	H	0.181	0.007	0.028	0.052	0.050
C	C	0.879	0.921	0.972	0.872	0.886
D	D	0.250	0.000	0.000	0.152	0.050
	J	0.227	0.251	0.171	0.346	*
K	K	0.327	0.113	0.005	0.076	0.350
P	P1	0.567	0.351	0.552	0.479	0.271
	P2	0.621	0.497	0.569	0.186	0.257
	P'	0.094	0.170	0.028	0.090	0.057
Q	Q	0.519	0.742	0.398	0.262	0.029
	R	0.911	0.609	0.860	0.920	0.973
	S	0.354	0.633	0.744	0.123	0.720
T	T	0.698	0.892	0.819	0.843	0.633
U	U	0.534	0.248	0.354	0.490	0.429
Total		391	407	1	290	140

Adaptado de Suzuki, Y.; Stormont, C. and Trommerhausen-Smith, A. (1975). Alloantibodies: the blood groups they define.

Proc.Int.Symp. Equine Hematol., Vol. 1, pp 33-41. (32)

3.5. Formas de sensibilización de las yeguas madres.

Para que la Isoeritrolisis neonatal se presente deben existir varios factores: a) los eritrocitos de la madre deben ser negativos para él o los antígenos (factor inmunizante) que se encuentran en los eritrocitos del potro en cuestión; ^(102,126) que en esta investigación es el xenoantígeno llamado "Antígeno burro"; ^(14,118,126) b) el potro de la actual gestación debe heredar de su padre él o lo(s) antígeno(s) contra los cuales la yegua madre ha sido sensibilizada; ^(14,30,126) y c) aunque el mecanismo preciso de inmunización de las yeguas no ha sido bien determinado, la inmunización o estimulación para la producción de anticuerpos por parte de la madre, puede ser en forma natural o iatrogénica. ^(2,31)

En la primera forma (natural), la sensibilización ocurre por el acceso de los antígenos fetales a la circulación materna durante la labor de parto (probablemente ésta es la forma donde existe el paso más grande de eritrocitos fetales hacia la madre o a causa de hemorragias fetomaternales que permiten el cruce de la capa epiteliochorial de la placenta durante la gestación. ^(5,3,29) Aunque existe controversia en cuanto a si efectivamente este tipo de hemorragias es una ruta común o solamente lo es en forma excepcional. Por ejemplo Doll y Hull, (1951) ⁽⁹³⁾ sugirieron que el daño o defecto en la placenta permite un aumento en el paso de antígenos de los eritrocitos del feto, pero algunos investigadores como Cronin, (1955) ⁽⁴²⁾ dice lo contrario, al establecer que se encontraron numerosas placentas con áreas anormales de tejido cicatrizado, necrótico o con áreas desnudadas de vellosidades, sin que se presentaran evidencias de IN en los potros.

La segunda forma (iatrogénica) puede resultar de transfusiones sanguíneas que contengan eritrocitos con antígenos extraños a la yegua o ante una exposición a una vacuna de tejido de origen equino. Varios investigadores reportan que la vacunación conteniendo sangre o tejido es la responsable de la mayoría de los casos de producción de una IN iatrogénica. ^(39,61,67,82,84)

Cuando una yegua ha sufrido inmunización por cualquiera de las formas antes mencionadas con antígenos ajenos a ella y estos están presentes en los eritrocitos de su hijo, existe una posibilidad significativa de que los anticuerpos

maternales dirigidos contra los antígenos del potro aparezcan en el calostro, y si subsecuentemente son ingeridos y se absorben por el potro, pueden causar un problema hemolítico. Entre más elevados sean los títulos antieritrocitos el riesgo será más mayor, los mayores títulos se producen en yeguas previamente sensibilizadas en respuesta a los mismos antígenos poco antes del parto. Estas responden a la inmunización con eritrocitos desde los 56 días posconcepción; sin embargo, el paso más grande de eritrocitos del feto hacia la madre ocurre en el último mes de gestación y durante el parto, como resultado del rompimiento de los vasos sanguíneos de la placenta. La sensibilidad inicial durante la primera gestación incompatible usualmente ocurre sin complicaciones adversas para el potro, siendo la presentación de ésta enfermedad muy rara en potros nacidos de yeguas primíparas debido a que la inmunización primaria ocurre muy tarde en la gestación, por lo que la cantidad de anticuerpos contra los eritrocitos que alcanzan a concentrarse en el calostro es insuficiente para desencadenar la IN. (2,5,6,36,38,42,58,65,66,67,82,84,94,102,118,126)

En estos casos, la primera gestación únicamente sirve para generar una respuesta inmune primaria, resultando en información que será guardada en la "memoria" de las células. Pero en futuras gestaciones, pueden ocurrir estimulaciones antigénicas subsecuentes que desencadenan una reacción inmune, la cual resulta en una elevación mucho más rápida de los anticuerpos que la ocurrida durante la inmunización primaria, con un aumento marcado de anticuerpos antieritrocitos durante las últimas 4 semanas de gestación, por lo que el mejor momento para probar si la yegua gestante está produciendo anticuerpos contra los antígenos de los eritrocitos, es el último mes de dicha gestación. Esos anticuerpos pueden ser aglutininas y hemolisinas, las hemolisinas están usualmente presentes en títulos altos y son los indicadores de un inminente problema hemolítico. Los mismos anticuerpos que median la enfermedad pueden ser utilizados "*in vitro*" como reactivos para la detección de la presencia de antígenos, sirviendo como base para la tipificación sanguínea. (3,5,30,36,38,39,54,57,64,66,67,84,94,102,108)

3.6. Patogénesis.

3.6.1. Incompatibilidad del sistema A. Para que ocurra Isoeritrolisis neonatal involucrando a este sistema, debe existir una yegua Aa⁻, que sea montada por un semental Aa⁺ y que éste antígeno sea heredado por la cría. Entonces el potro expresará el antígeno Aa en la membrana celular de sus eritrocitos, por lo que será él y la yegua serán incompatibles a causa de éste antígeno en el sistema A. Si la yegua es sensibilizada por los eritrocitos de la cría con el antígeno Aa de sus eritrocitos, producirá anticuerpos contra éste antígeno antes del parto. Durante la gestación, esta incompatibilidad es de poca consecuencia tanto para el feto como para la madre, a menos que por ejemplo, se le haya practicado a esta última una transfusión sanguínea con eritrocitos Aa⁺. Después de esto los anticuerpos antieritrocitos Aa estarán presentes entre las inmunoglobulinas en el calostro, y si el potro los ingiere y absorbe y estos anticuerpos son de suficiente calidad y cantidad para dañar a los eritrocitos, la IN puede ocurrir. ^(30,126)

3.6.2. Incompatibilidad del sistema Q. El antígeno Qa es también completamente inmunogénico, las yeguas Qa⁻ expuestas a eritrocitos Qa⁺ serán sensibilizadas, y una producción de anticuerpos anti-Qa se iniciará. La secuencia de eventos alrededor de la IN asociada con Qa es idéntica a los mostrados con Aa, y únicamente el nombre del antígeno es el que es diferente. ⁽³⁰⁾

3.6.3. Incompatibilidad de otros sistemas. La IN ha sido reportada que ocurre en al menos unos casos con los antígenos Ua, ^(13,45) Dc ^(13,89) y Pa. ^(2,11,39) Por otro lado, el sistema C tiene únicamente dos alelos Ca y C⁻ (nulo). Casi cada caballo que es C⁻ (genotipo C-/C⁻) naturalmente produce anticuerpos anti-Ca. ^(13,43) Estos anticuerpos no están asociados con la producción de IN, ⁽³⁸⁾ y sirven únicamente para dificultar el diagnóstico cuando se usan pruebas no específicas (Prueba de aglutinación del potro icterico), ya que producen reacciones falso-positivas. Por lo tanto, los veterinarios que llevan a cabo este tipo de pruebas utilizando calostro de la madre y eritrocitos del potro, deben tomar en cuenta que los anticuerpos anti-Ca

pueden causar este tipo de reacción. ⁽¹⁰²⁾ También debemos recordar como ya se mencionó que la presencia de anticuerpos anti-C en las yeguas en riesgo, pueden provocar la llamada "Inmunidad mediada por anticuerpos". ⁽³⁸⁾

3.6.4. Incompatibilidad con el "antígeno burro". Para el caso de los potros mulas la presencia de la IN, se debe a la ausencia en la madre y la presencia en el padre de un antígeno llamado "Antígeno burro" que es heredado por la cría. Siendo la secuencia de eventos alrededor de la IN igual a la asociada con los antígenos Aa o Qa. ^(14,118,126)

3.7. Epidemiología.

La Isoeritrólisis neonatal afecta a un gran número de potros equinos de diferentes razas entre las que tenemos: Pura Sangre Inglés, Standardbred, Arabes, Morgan, Cuarto de Milla, Paso Fino, Caballos de tiro y Apaloosa; sin embargo, el potencial para el desarrollo y la observación de IN es dependiente de la raza. Dado que no es una enfermedad común, no es práctico realizar estudios a todas las yeguas que un determinado criador tenga en producción. ⁽²⁾ McClure, (1997) ⁽¹²⁶⁾ menciona que virtualmente todas las gestaciones equinas son incompatibles para alguno(s) antígeno(s) de los eritrocitos, debido a que las yeguas carecen de uno(s) antígeno(s) que los sementales tienen y que pueden heredar al potro. Considerando que todos los antígenos, por definición pueden estimular la producción de anticuerpos bajo algunas condiciones, entonces existe la posibilidad de que teóricamente cualquier antígeno de los eritrocitos puede provocar IN.

Bowling y Clark, (1985) citado por McClure, (1997) ⁽¹²⁶⁾ dice que "los porcentajes de yeguas en riesgo de sensibilización contra los antígenos más comunes para la producción de IN en la descendencia equina (Aa y Qa) varían entre las razas, y depende de la frecuencia en que cada gen que codifica para esta proteína (antígeno) esté representado en la población, indicando que un mayor número de yeguas en riesgo en la población no necesariamente se traduce en un alto número de casos de IN, ya que en la misma población también habrá una alta proporción de sementales que no poseen el antígeno en cuestión y por lo tanto, no lo heredan a su descendencia".

Esta frecuencia genética ha sido determinada para varias razas equinas en algunos grandes estudios de tipificación sanguínea. Por ejemplo, Scott, (1978) ⁽⁴³⁾ en su estudio realizado en Inglaterra respecto de la frecuencia del gen que codifica para los antígenos de los eritrocitos Aa y Qa y Qrs en relación a la proporción de yeguas negativas para esos antígenos, encontró que el 3% de las yeguas PSI fueron Aa, 17% Qa y 3% Qrs; de las yeguas Arabes ninguna fue Aa, 70% Qa y 3% Qrs, y de las yeguas Shire, 38% fueron Aa, 100% Qa y ninguna Qrs. El porcentaje para las montas con potencial de riesgo por incompatibilidad para esos tres

antígenos de los eritrocitos fue del 26.5% para los PSI, 13.5% para los Arabes y 14% para los Shire; aunque la incompatibilidad del antígeno Aa en los PSI en un estudio fue 21 (44.68%) de 47 casos clínicos. La estimación de estas frecuencias también fue realizada por Bowling y Clark, (1985) ⁽³⁴⁾ en siete razas de caballos en los Estados Unidos de Norteamérica (frecuencias citadas posteriormente en esta tesis). En otro estudio realizado también en los Estados Unidos de Norteamérica por Bailey, *et al*, (1987) ⁽¹⁰²⁾ se determinó la frecuencia genética y el polimorfismo de los grupos sanguíneos en algunas razas equinas, encontrando que el porcentaje de yeguas en riesgo debido a que ellas son Aa- es del 2% para las razas PSI, 22% para los Standardbred de paso, 3% para los Standardbred trotadores, 25% para los Saddlebred y Cuarto de Milla, 18% para los Morgan, y 3% para los Arabes. La estimación del porcentaje de yeguas en riesgo debido a que son Qa- es del 16% para la raza PSI, 68% para los Cuarto de Milla, 72% para los Arabes, y casi un 100% para los Saddlebred . (cuadro 4)

Esta información necesita ser acoplada con dos aspectos importantes: a) la probabilidad de que el potro herede determinado antígeno de su padre; y b) la frecuencia en que los anticuerpos se desarrollan en contra de ese antígeno en las gestaciones incompatibles. La probabilidad de que el potro herede el antígeno de su padre está inversamente relacionado al número de yeguas en riesgo. ⁽¹²⁶⁾ Por ejemplo, pocas yeguas PSI están en riesgo por ser Aa- (2%), aunque esto significa que el 98% de los PSI (incluyendo los sementales) son Aa+ . La probabilidad de que la yegua sea montada con un semental Aa+ y de que su potro herede el antígeno Aa es por lo tanto muy grande (se estima que es cerca del 85% en los PSI). Por otro lado, virtualmente todas los equinos de la raza Saddlebred carecen del antígeno Qa, y en una primera observación parecería que todas las yeguas de esta raza están en riesgo al ser Qa- (lo cual es cierto); sin embargo, el antígeno Qa no se presenta tampoco en los sementales Standardbred. La probabilidad de que el potro herede el antígeno y sea incompatible con la yegua es por lo tanto nula. ⁽¹⁰²⁾ (cuadro 4) Además de la probabilidad de heredar el antígeno de su padre, y por lo tanto, de que el potro sea incompatible con la madre, existe una diferencia importante en la frecuencia con la cual las yeguas con gestaciones incompatibles producen

anticuerpos, lo cual depende sobre todo del antígeno sanguíneo y de la raza. La razón para esto no está completamente comprendida, se estima que solamente el 50% (del 2%) de las yeguas PSI y el 17% (del 22%) de las yeguas Standardbred de paso que están en riesgo por ser Aa-, producen anticuerpos anti-Aa, y únicamente el 3% (del 16%) de las yeguas PSI que están en riesgo por ser Qa-, producen anticuerpos contra este antígeno. ⁽¹⁰²⁾ (cuadro 4)

Cuadro 4. Probabilidad de que las yeguas tengan un potro con Isoeritrólisis neonatal en diferentes razas de caballos Americanas.

Raza*	Antígenos	Porcentaje de yeguas en riesgo de producir el antígeno	Probabilidad del potro	
			Porcentaje de yeguas que produjeron el antígeno**	Probabilidad de que el potro herede el antígeno
PSI	Aa	2%	2/4 (50%)	85%
PSI	Qa	16%	2/65 (3%)	60%
STB paso	Aa	22%	46/266 (17%)	44%
STB trote	Aa	3%	2/3 (66%)	82%
SB	Qa	-	-	0%
SB	Aa	25%	ND***	50%
SB	Qa	88%	ND	12%
CM	Aa	25%	ND	49%
CM	Qa	68%	ND	18%
Morgan	Aa	18%	ND	57%
Morgan	Qa	-	ND	0%
Arabe	Aa	3%	ND	82%
Arabe	Qa	72%	ND	20%

Adaptado de Bailey E., Conboy, S.H. and McCarthy, F.P. (1987). Neonatal isoerythrolysis of foals; an update on testing. Proc. Am. Ass. Equine Practice. 33, pp 341-353. ⁽¹⁰²⁾

* El cálculo para los caballos Cuarto de Milla (CM), Arabe y Morgan, están basados en los datos de la frecuencia de los genes reportados por Bowling y Clark. ⁽²⁴⁾ El cálculo para los Pura Sangre Inglés (PSI), Standardbred (STB) y Saddlebred (SB), está basado en los datos de frecuencia de los genes generados por Bailey, *et al.* ⁽¹⁰²⁾

** Yeguas con anticuerpos y yeguas en riesgo para ese factor en éste estudio.

*** ND, datos no disponibles.

Respecto de las muías, McClure, *et al.*, (1994) ⁽¹⁴⁾ concluyen de los resultados de su investigación que todas las gestaciones de mulas (padre burro y

madre yegua) son incompatibles en lo que respecta al "Antígeno burro", ya que existe una incompatibilidad del 100% entre el padre y la madre, dado que todos los burros y mulas probados poseen éste antígeno, mientras que todos los caballos carecen de él. Por lo que el potencial para desarrollar el síndrome de IN también es en la misma proporción en todas las gestaciones de éste tipo.

3.8. Prevalencia.

La prevalencia de Isoeritrósis neonatal puede estar influida por varios factores tales como: a) una incompatibilidad mayor o menor entre el padre y la madre; b) el antígeno incompatible heredado al potro por el padre; c) la exposición de la madre al antígeno de incompatibilidad de los eritrocitos de la cría; d) una adecuada transferencia pasiva de anticuerpos al potro; y e) una buena absorción de estos anticuerpos por parte del potro. ^(2,29,38,39,58,84)

La prevalencia de IN en las razas Pura Sangre Inglés, Standardbred, Árabe, Cuarto de Milla, Paso Fino y Appaloosa ha sido bien documentada por Stormont, (1975); ⁽⁵⁴⁾ Scott y Jeffcott, (1978); ⁽²⁾ Bailey, (1982); ⁽¹³⁾ Morris, (1986); ⁽³⁵⁾ Becht, (1987); ⁽⁶⁾ y Bailey, *et al*, (1987). ⁽¹⁰²⁾ En los equinos esta prevalencia es baja, siendo más comúnmente encontrada en PSI (0.5-1%) ⁽¹⁰³⁾ y en los Standardbred (2%). ⁽¹³⁾ La enfermedad está casi enteramente restringida a la raza Árabe y a otras razas que tienen descendientes directos o indirectos de ésta raza, ^(2,54,84) siendo afectados del 1-2%. ^(13,39) Sin embargo, para los Ponnys Shetland, la prevalencia es casi nula. ^(2,54,127)

Es posible que existan diferencias entre las razas equinas en su habilidad para iniciar una respuesta inmune a estos antígenos, citando como ejemplo: a) la no presencia de IN en la raza Pony Shetland, en donde basados en la frecuencia de los genes, debería de ocurrir; y b) un bajo porcentaje de reportes de la enfermedad en esta raza. ^(2,3,102) Concluyendo Sahapell y Lock, (1986) ⁽²⁹⁾ que la enfermedad puede ser mucho más prevalente que lo sugerido en la literatura, y esta siendo pasada por alto en los potros que tienen signos clínicos poco notorios.

Usando la frecuencia de los genes que codifican para los antígenos Aa y Qa en diferentes razas equinas, se puede identificar la probabilidad del número de yeguas en riesgo de cada raza (cuadro 4). Los otros antígenos causantes de IN tales como: Ab, Pa, Dc y Ua, han ocurrido poco, y no es práctico considerar yeguas que no tengan estos antígenos en riesgo. Aproximadamente una de cada 2,000 yeguas producirán anticuerpos para algunos otros antígenos que no sean Aa o Qa, los cuales causaran IN. ^(2,45,57,102)

Por otro lado, la prevalencia reportada de IN en mulas es mucho más alta que en los caballos, siendo generalmente de un 8-10%, con una mortalidad del 25 al 50%. ⁽¹⁵⁾ Las razones para esto son desconocidas, pero pueden ser reflejo del alto porcentaje de incompatibilidad de las gestaciones de mulas comparadas con las gestaciones del caballo. ^(13,102,118)

3.9. Incidencia.

Algunos grupos sanguíneos son más inmunogénicos bajo ciertas condiciones de exposición, como por ejemplo: parto o transplacentaria, al igual que varios antígenos de esos mismos grupos sanguíneos. ^(3,29,36,82,84) McClure y Parish, (1990) ⁽³⁶⁾ reportan que la incompatibilidad de algunos grupos sanguíneos entre la madre y el potro es la norma más que la excepción; sin embargo, la incidencia de sensibilización de la madre y ocurrencia de la IN es relativamente baja en los potros equinos, no ocurriendo lo mismo en lo referente a potros mulas. ^(14,15,19,118) Esta baja incidencia de manifestaciones clínicas es interesante, ya que como se ha visto existe una gran incompatibilidad entre los grupos sanguíneos de las yeguas y los sementales. ⁽⁴³⁾ Influyendo en su presentación algunos factores tales como: a) la probabilidad de que las razas de caballos, así como también de que los animales (individualmente), difieran con respecto a la cantidad y frecuencia de su respuesta inmune; b) la probabilidad de que las razas y líneas de caballos, así como también de individuos difieran considerablemente con respecto a la ocurrencia de hemorragias retroplacentales, ya que ambos aspectos están marcadamente influenciados por el genotipo; c) un número significativo de casos de IN no es detectado si la anemia es ligera y con muy pocas manifestaciones clínicas o en los casos en los cuales hay alguna muerte, la causa específica no puede ser determinada; d) la cantidad de anticuerpos antieritrocitos absorbidos así como también la hemólisis potencial de esos anticuerpos determina la severidad de IN, por lo que las manifestaciones clínicas son entonces dependientes sobre todo de la cantidad de calostro ingerido, la concentración calostrual de anticuerpos, el tipo de anticuerpos antieritrocitos responsables, y la habilidad del potro para absorber esas proteínas. Ya que la falla total o parcial de la transferencia pasiva de anticuerpos calostrales en el potro, reducirán la aparente incidencia de IN; y e) aunque no es comúnmente aceptado, muchos caballos producen anticuerpos antieritrocitos en forma natural y en concentraciones bajas, esos anticuerpos pueden proteger a la yegua contra la sensibilización por la rápida eliminación de los eritrocitos fetales cuando ocurren pequeñas hemorragias, por lo tanto, la cantidad

de este tipo de patologías puede ser un factor importante para determinar el proceso de sensibilización. ^(38,42,54,64,66,84,102)

Por estas razones, y dado que la IN no es una enfermedad contagiosa y que ocurre esporádicamente, el número actual de los casos nuevos en potros equinos y potros mulas que se presentan en cualquier año es muy difícil de determinar. Siendo importante también mencionar la posibilidad de que cierta cantidad de gestaciones las cuales pueden producir potros con IN, pueden terminar en un aborto, y la relación entre la causa de muerte del feto y la ictericia del mismo no ser reconocida. ^(4,42)

3.10. Curso de la enfermedad y signos clínicos.

Los reportes de los signos clínicos de la Isoeritrólisis neonatal, abarcan varias décadas y básicamente describen la patogénesis posnatal de la ictericia hemolítica en el potrillo e híbrido, habiendo sido descritos inicialmente por Brumpt, (1947); ⁽¹⁵⁾ y posteriormente por Coombs, *et al*, (1948); ⁽⁷⁾ Parry, *et al*, (1948); ⁽⁴⁰⁾ Bruner, *et al*, (1948); ⁽⁵⁾ Bruner, *et al*, (1948); ⁽⁵²⁾ Saint-Martin, (1948); ⁽⁴⁷⁾ Saint-Martin, (1949); ⁽⁴¹⁾ Bruner, *et al*, (1950); ⁽⁶⁷⁾ Doll, (1952); ⁽¹²⁾ Priouzeau, (1952); ⁽¹⁶⁾ Saint-Martin, (1952); ⁽¹⁹⁾ Cronin, (1955); ⁽⁴²⁾ Robert y Archer, (1966); ⁽¹¹¹⁾ Rossdale, (1972); ⁽⁶⁸⁾ Stormont, (1975); ⁽⁵⁴⁾ Trommershausen, *et al*, (1975); ⁽⁸²⁾ Scott y Jefcott, (1978); ⁽²⁾ Gary y Joseph, (1983); ⁽³¹⁾ Christine, *et al*, (1984); ⁽⁶⁴⁾ Becht y Semrad (1985); ⁽³⁾ Trommershausen y Clark, (1985); ⁽³⁴⁾ Shappell y Lock, (1986); ⁽²⁹⁾ Becht, (1987); ⁽⁶⁾ McClure y Parish, (1990); ⁽³⁶⁾ McClure, (1991); ⁽³⁰⁾ Zabury, *et al*, (1992); ⁽³⁹⁾ Traub-Dargatz, *et al*, (1995); ⁽¹¹⁸⁾ y McClure, (1997). ⁽¹²⁶⁾ Excepto por los casos complicados por una infección bacteriana prenatal, parto retardado o distócico, generalmente los potros que después sufren IN nacen normales y completamente saludables, mostrándose activos y con buen instinto de amamantarse, comenzando a mostrarse ictericos y débiles después de varias horas, por lo que la mayoría de las veces escapa a la observación. Pero conforme pasa el tiempo después del nacimiento (usualmente de las 8 a 12 horas), precipitados por el estrés y el ejercicio, se presenta un aumento del ritmo respiratorio y cardíaco, con temperatura normal, muriendo antes del cuarto día después del nacimiento. ^(2,5,7,29,39,47,64,68,84,128,141)

Los signos mostrados son muy parecidos entre los potros equinos y los potros mulas pero con ausencia de signos neurológicos en estos últimos. ^(7,47) Las proteínas calostrales, incluyendo los anticuerpos, pueden ser demostrados en el suero del potro desde las seis horas después del primer amamantamiento, por lo que los signos de IN animales severamente afectados pueden ocurrir desde este momento. ^(6,67)

Los signos clínicos de la IN varían de acuerdo con el porcentaje y grado de destrucción de los eritrocitos. Existen cuatro formas básicas de presentación de esta enfermedad: a) en la forma lenta, el daño a los eritrocitos no es rápido, los signos

pueden pasar inadvertidos o en algunos casos consistir solamente en una debilidad temporal y falta de interés por alimentarse, el diagnóstico es confirmado sólo por pruebas serológicas; b) en la forma moderada, los signos comienzan a presentarse desde varias horas hasta varios días después del nacimiento, en donde la palidez puede ser el signo primario, que es rápidamente acompañada por ictericia cuando los eritrocitos dañados son metabolizados. Inicialmente los potros afectados están alertas, pero conforme avanza la enfermedad exhiben cansancio, debilidad, taquicardia, taquipnea, anemia, depresión y después sobreviene el problema metabólico secundario, el cual incluye acidosis e hiper o hipoglicemia, además de una alteración de la función renal asociada con pigmenturia, por lo que la orina puede ser oscura y positiva para hemoglobina y bilirrubina. Durante los estados terminales el equino puede presentar convulsiones, posiblemente causadas por la anemia severa y los productos tóxicos del desdoblamiento de los productos eritrocíticos (bilirrubina), llegando al estado comatoso; c) en la forma aguda, se presentan casos más severos de la enfermedad, con un curso clínico de horas, iniciándose entre las 12 y 36 horas después del nacimiento, progresando la letargia hasta que el potro es incapaz de pararse, pudiendo presentar hemoglobinuria, palidez de las membranas mucosas y signos indicativos de una disminución de la oxigenación, tales como debilidad, taquipnea, taquicardia y postración. Los potros permanecen mucho tiempo en recumbencia lateral o en posición esternal, descansando el mentón en la tierra, tienen dificultades para pararse y se alimentan en forma poco frecuente (por lo que la ubre de la madre está llena), estando incluso renuentes a alimentarse por mucho tiempo. Debido a la anemia severa, la disminución en el transporte de oxígeno puede provocar signos del sistema nervioso central. Usualmente, estos potros tienen un mal pronóstico y mueren en corto tiempo, pudiendo no haber tiempo de que se presente la ictericia; y d) en la forma hiperaguda, los signos iniciales se presentan en las primeras horas de vida (6 o 7). La micción y la defecación generalmente se mantienen sin cambio, aunque en algunos casos se presenta algo de constipación, siendo la orina oscura parecida al color del vino tinto por la gran cantidad de pigmentos biliares, y sobreviene el colapso con implicaciones nerviosas, que al parecer son resultado de

una reacción parecida a un shock anafiláctico, la cual puede ser mediada por la reacción antígeno-anticuerpo, con una inminente muerte poco después.

Los signos bioquímicos de la hemólisis están relacionados con la liberación y desdoblamiento de la hemoglobina, la cual es liberada después de la hemólisis hacia el plasma. Parte de esta hemoglobina es unida primero a la haptoglobina, y el complejo es después rápidamente eliminado del plasma por el sistema retículo endotelial, mientras que la hemoglobina restante libre en el plasma es eliminada a través del riñón (hemoglobinuria) o es metabolizada a bilirrubina, la cual resulta en ictericia cuando se incrementa.

Una profunda anemia, hemoglobinemia y hemoglobinuria son consistentemente encontradas en los neonatos severamente enfermos, mientras que los potros menos afectados pueden presentar un diagnóstico más difícil. Por lo que indudablemente los dos signos más importantes de la IN son la ictericia y la hemoglobinuria con ausencia de fiebre, y aunque no son patognomónicos de esta enfermedad, sugieren isoeitrólisis cuando son potros nacidos principalmente de yeguas multiparas, y entre más pronto se presenten los síntomas, el pronóstico es más pobre. ^(3,5,6,7,29,30,40,47,54,59,64,67,68,84,118,128)

Existe mucha variación en cuanto a la edad de las yeguas antes de que se presente la enfermedad en alguno de sus potros (6 a 22), el tiempo que una yegua lleva en la reproducción antes de producir un potro con IN (1 a 18), y la cantidad de gestaciones previas, en donde en promedio se presenta en la segunda o tercera gestación, pero se han diagnosticado casos tan tardíos como en la décima segunda gestación. Existiendo algunos reportes de inmunización durante la primera gestación de la yegua. ^(12,29,42,64,118) En definitiva tenemos que el conocimiento y aplicación de las pruebas serológicas se requieren para realizar un diagnóstico más eficiente de isoeitrólisis, y el conocimiento de la base de tales pruebas es vital para entender la patogénesis, diagnóstico, y manejo apropiado de los potros afectados. ⁽⁸⁴⁾

3.11. Diagnóstico diferencial de laboratorio y serológico.

Aunque algunos casos de Isoeritrolisis neonatal pueden ser diagnosticados tentativamente en base a los signos clínicos, es importante tratar de conseguir un diagnóstico definitivo, ya que la ictericia y otros signos clínicos pueden indicar un gran número de enfermedades específicas que pueden producir una anemia hemolítica clínicamente significativa, por lo que en un diagnóstico diferencial en casos de ictericia y anemia, tanto fisiológica como infecciosa en los caballos y mulas, se deben considerar los siguientes padecimientos: Septicemia, Anemia hemolítica autoinmune, Anemia infecciosa equina, Reacción a transfusiones sanguíneas, Exposición a toxinas (mordedura de víbora, fenotiazinas, hojas de maple rojo o cebolla) e Impactaciones por meconio. Requiriendo estas condiciones un régimen terapéutico diferente. ^(2,4,7,13,29,39,40)

La ayuda del laboratorio facilita enormemente el diagnóstico clínico, y proporciona además, valiosa información referente a la severidad de la enfermedad, permitiendo tomar una mejor decisión respecto de la terapia a implementar. Entre los exámenes más utilizados están el hematológico y el volumen del paquete celular (VPC), los cuales son de poca ayuda diagnóstica para conocer el origen de la anemia; sin embargo, deben ser aplicados para poder determinar la severidad de la misma y decidir el tratamiento. ^(2,5,6,7,39,51,66,102)

Algunos de los principales hallazgos hematológicos que se presentan son: a) aumento de la hemoglobina; b) disminución de los eritrocitos conforme avanza la anemia, recordando que la presentación de estos signos tiene una relación muy cercana con el progreso de la IN; c) los reticulocitos han sido observados muy pocas veces aún en los casos de recuperación temprana sin presentarse la reticulocitosis; y d) los eritrocitos generalmente son uniformes y de tamaño normal, y la poiquilocitosis, anisocitosis, formas esféricas y células nucleadas están ausentes. Se presenta un aumento en su rango de sedimentación, así como de su fragilidad y una marcada tendencia a hemolizarse. ^(39,40)

Ahora bien, en lo que respecta a los estudios del paquete celular, el potrillo recién nacido normalmente tiene un VPC de 40% y una cuenta eritrocítica (CE) de

10.5×10^6 x ml, y se considera anémico cuando el VPC es menor del 25 a 30% y/o la CE es menor de 6×10^6 x ml. Los potros con IN severa usualmente tienen una rápida anemia progresiva, con un VPC menor de 6 a 10%, una CE de menos de 3×10^6 x ml, las concentraciones de hemoglobina son de 2.0 gr/dl, el índice de ictericia es generalmente de 100, y la bilirrubina puede estar marcadamente elevada (20 a 30 mg/dl); además, la aglutinación y la hemólisis de los eritrocitos pueden ser evidentes en los frascos de colección o frotis sanguíneos. ^(6,12,40,67,68,111) Pero aunque exista una historia compatible con IN (anemia, debilidad, ictericia, hemoglobinuria y un incremento en los parámetros de los signos vitales), el diagnóstico definitivo de IN puede ser hecho únicamente por medio de la serología, mediante la aplicación de pruebas hemolíticas y de aglutinación, en donde el suero de la madre es probado para demostrar la presencia de anticuerpos contra los antígenos de los eritrocitos de un panel de caballos con antígenos conocidos, incluyendo los padres del potro afectado; pudiéndose utilizar también su calostro y su leche. Básicamente, las pruebas confirman el diagnóstico al demostrar hemólisis y aglutinación de los eritrocitos del potro, en donde el margen de error es casi nulo; ya que como se mencionó los anticuerpos contra los eritrocitos de los potros equinos y potros mulas están ausentes o raramente detectables en las yeguas no apareadas y en las madres de un potro normal. El diagnóstico serológico para IN se puede dividir en dos tipos: a) las pruebas en donde todo el procedimiento se lleva a cabo en un laboratorio: tipificación o serología; y b) las pruebas de aglutinación que se llevan a cabo en el campo, como la Prueba de aglutinación para el potro icterico (JFA, con sus siglas en inglés). ^(6,7,30,54,68,102,111,118)

Como ya sabemos los anticuerpos responsables de la producción de IN la mayoría de las veces actúan más como hemolisinas que como aglutininas, por lo que las pruebas más efectivas para la identificación de la enfermedad son los ensayos hemolíticos. ⁽⁸⁴⁾ Además, una ventaja de las pruebas hemolíticas comparadas con las de aglutinación es la facilidad de interpretación; la hemólisis es rápidamente interpretable como una coloración del sobrenadante parecida al vino tinto en el tubo que contiene los eritrocitos sensibilizados, mientras que la formación

de un anillo de estos eritrocitos, a veces interfiere con la interpretación de las pruebas de aglutinación. ^(3,6)

Las pruebas hemolíticas mezclan los eritrocitos del potro, el suero de la yegua y la fuente de complemento exógeno (la prueba requiere de una fuente de complemento exógeno), y se consideran positivas si el suero tiene anticuerpos que actúan como hemolisinas contra los antígenos presentes en los eritrocitos del potro. ⁽²⁹⁾ Estas pruebas son superiores cuando son comparadas a las que detectan la presencia de aglutininas, tales como la Prueba convencional de reacción cruzada (Prueba de antiglobulinas o Prueba directa de Coombs), en donde el método emplea antiglobulinas anti-caballo producidas en conejos, para producir aglutinación en eritrocitos que han sido sensibilizados por el suero o calostro de la yegua. ^(32,102,111)

Las pruebas de aglutinación son más utilizadas por los médicos veterinarios en el campo, y pueden ayudar en el diagnóstico, pero se debe recordar que una prueba de aglutinación puede proporcionar resultados falsos-negativos cuando las hemolisinas, y no las aglutininas, son las responsables de la destrucción de los eritrocitos. ^(3,29,120)

3.12. Examen posmortem.

Cuando el tratamiento falla y el potro muere, los hallazgos patológicos encontrados están en función de varios factores: a) el tiempo que el potro dure enfermo; y b) el tipo de presentación (evolución) de la enfermedad (hiperaguda, aguda, moderadas o lenta). ^(12,64) Desde hace mucho tiempo Doll y Hull, (1949) ⁽⁵⁰⁾ mencionan que excepto por la anemia y la ictericia, se encuentran muy pocas lesiones en los potros muertos por IN.

El examen posmortem revela todas las características asociadas con la destrucción anormal de los eritrocitos, mostrándose pocos cambios tanto macroscópicos como microscópicos. Los principales hallazgos son: a) una marcada ictericia evidente en la mayoría de los órganos y tejidos; b) la sangre parece diluida en agua y pálida o puede estar coagulada en los grandes vasos; c) parte de la destrucción de los eritrocitos puede llevarse a cabo directamente en el sistema circulatorio, pero otra puede ocurrir en el bazo o el hígado, ya que estos órganos tienen la habilidad de retener y destruir selectivamente a una parte de los eritrocitos que tienen en su membrana citoplasmática alguna anomalía (anticuerpos fijados), por lo que los eritrocitos son colectados y destruidos, mostrándose estos órganos aumentados de volumen, además de oscuros en la necropsia; d) el tracto biliar y la médula ósea están amarillos o anaranjados en los casos hiperagudos; e) hay algo de líquido en las cavidades; f) el corazón casi siempre se mantiene normal, mostrando algunas veces hemorragias subepicales y subendocardiales, sin signos de magulladura, al igual que el cerebro y las meninges, los cuales pueden algunas veces mostrar una coloración ictericia; y g) la vejiga puede contener orina teñida con hemoglobina.

Los hallazgos microscópicos más comunes son: a) el conteo de eritrocitos es demasiado bajo, estableciendo la presencia de una severa anemia en el potro enfermo, y aunque no se observa el incremento de formas inmaduras de los eritrocitos en la circulación, los estudios de la médula ósea de los potros muertos muestran un incremento en la regeneración de los eritrocitos; b) el fluido cerebroespinal presenta algunas veces una coloración parecida a la biliar, sin evidencia de

daño cerebral (formación sanguínea extramedular o trombos) por aglutinación en los pequeños vasos; c) los pulmones generalmente no muestran anormalidades microscópicas; d) la eritrofagocitosis en el bazo es evidente histológicamente; e) las lesiones del hígado incluyen vacuolación de los hepatocitos; y f) el riñón presenta necrosis centrolobular, acumulación de pigmentos biliares y cambios fibróticos tempranos, además de una degeneración de los túbulos, los cuales contienen los pigmentos biliares y hemosiderina. El daño hemático y renal son resultado de la anemia prolongada, así como también los efectos tóxicos del proceso hemolítico. (12,51,54,64) A pesar de que la IN es un proceso hemolítico, en la sangre periférica se observan muy pocos reticulocitos y ningún eritroblasto. (7)

3.13. Pruebas serodiagnósticas.

Stormont, *et al.* (1964)⁽⁵⁷⁾ señalaron hace más de 30 años que las pruebas serodiagnósticas eran una herramienta muy útil para la identificación de los antígenos de los grupos sanguíneos más comúnmente involucrados en la enfermedad hemolítica de los potros recién nacidos, y que eventualmente se podrían usar para evitar lo que se llamaba "montas incompatibles".

Estas pruebas están basadas en la habilidad de los antígenos que se encuentran en la membrana de los eritrocitos para estimular la producción de anticuerpos en los animales que no los poseen en sus eritrocitos. Por lo que los anticuerpos producidos correspondientes para cada antígeno pueden ser usados para visualizarlos "*in vitro*". En esta forma una batería de reactivos es desarrollada y cada uno de ellos contiene un anticuerpo específico, tales reactivos son generalmente designados como: anti-A, anti-B, anti-C, etc., en donde la letra A, B, C y demás, son para referir a los antígenos específicos o sitios de combinación en la superficie de los eritrocitos. (cuadro 5) La mayor parte de las técnicas están basadas en lo descrito por Stormont, *et al.* (1964).⁽⁵⁷⁾

Cuadro 5. Un ejemplo de como los resultados de tipificación sanguínea son reportados.

Antígenos de los grupos sanguíneos								
Antígenos detectados	A: adf / b	C:a	D: bcmq / dkl	K: a	P: ad	Q: - bc	U: -	T: TV
Antígenos reconocidos	A: abcde fg	C:a	D:aabcdsfghik lmnopqr	K: a	P: abcd	Q: abc	U: a	T: TV

En este ejemplo, los sistemas son señalados por letras mayúsculas, los antígenos por letras minúsculas, y un "-", indica que ninguno de los antígenos probados en ese sistema fue detectado. Algunas veces una lista de antígenos reconocidos es incluida dentro del formato para que el revisor pueda reconocer cuales pruebas fueron realizadas. En este ejemplo también se uso un "r", para indicar el genotipo asignado basado en cuales antígenos fueron detectados. Este caballo es positivo para el antígeno Aa y es negativo para el antígeno Qa.

Adaptado de McClure, J.J. (1997). Strategies for prevention of neonatal isoerythrolysis in horses and mules. *Equine Veterinary Education*. Vol. 9, No. 3, pp 118-122. ⁽¹²⁶⁾

El principal objetivo de las pruebas serodiagnósticas es determinar: a) si el suero, calostro o ambos de las yeguas, contiene anticuerpos específicos contra los eritrocitos del semental que se está usando como reproductor; y b) si los eritrocitos de cualquier animal que está siendo afectado por IN están sensibilizados o marcados con anticuerpos. Para determinar si los eritrocitos están sensibilizados, uno puede emplear el procedimiento de tipificación que ha sido usado para dar claridad en lo que se refiere a los grupos sanguíneos. Se debe aclarar que la dificultad aquí es que los anticuerpos usualmente no hacen su aparición hasta que la gestación está avanzada, y que además pueden mostrar una rápida caída en sus títulos (24 a 72 horas posparto).^(3,11,54,57,66,67,82,108,126) Franks, (1962), citado por Stormont, *et al*, (1964)⁽⁵⁷⁾ señaló que "el periodo crítico para la obtención de la muestra de la yegua es de siete días preparto y no más de 24 horas posparto; sin embargo, en las yeguas que previamente han producido potros con IN, el periodo puede ser más largo en ambos sentidos, y que en la ausencia de muestras de suero de los potros que han muerto por IN, se recomienda comparar los tipos sanguíneos de la yegua con los del semental, para poder determinar cuales antígenos pudieron estar envueltos en la producción de la enfermedad".

Para la tipificación sanguínea de los caballos se han usado procedimientos hemolíticos y de aglutinación, y como se ha mencionado reiteradamente, la mayoría de los anticuerpos usados en ésta tipificación exceptuando a los usados en el sistema D actúan mejor como hemolisinas que como aglutininas, por lo que el énfasis debe por lo tanto ser dado a usar procedimientos líticos. Sin embargo, se debe aclarar que estas pruebas serológicas para IN son más difíciles de desarrollar en la práctica debido a que: a) los eritrocitos usados para la prueba diagnóstica deben ser lavados para dejarlos libre de proteínas del suero y otro tipo de células sanguíneas, que pueda afectar adversamente los resultados; b) es necesaria la incubación de los eritrocitos por al menos 30 minutos, la cual es usualmente requerida antes de que algunos resultados importantes sean obtenidos; c) es necesario el uso de algunos reactivos especiales, los cuales incluyen suero de conejo (complemento); y d) los reactivos también requieren de un almacenamiento especial (refrigeración).^(3,54,56,67,76,82,84)

Estas pruebas se pueden dividir básicamente en tres categorías: a) las pruebas que se realizan antes de la monta (para selección de los reproductores compatibles con las yeguas) y comprende la tipificación sanguínea que detecta incompatibilidad de los grupos sanguíneos entre el semental y la yegua; b) las pruebas que se realizan antes del parto para detectar anticuerpos prenatales en el suero de la madre en riesgo; y c) las pruebas que realizan después de parto (para detectar la presencia de anticuerpos en dicho calostro), en donde el calostro de las yeguas es probado con los eritrocitos del potro para asegurarse de que ningún antígeno está presente, sobre todo en las yeguas con historia de producción de potros con IN. ⁽¹²⁶⁾

3.13.1. **Prueba para selección de los sementales compatibles con las yeguas.**

En el contexto de IN, un semental compatible con determinada yegua es aquel que carece del mismo antígeno de esa yegua en particular, la cual esta en posibilidad de producir anticuerpos que están involucrados en la presentación de la enfermedad; por lo tanto, si la yegua carece de los antígenos Aa y/o Qa, así como el semental, entonces se puede decir que son compatibles. (cuadro 6) El porcentaje de sementales compatibles es paralelo a los porcentajes de yeguas en riesgo, la proporción de la población que tiene un antígeno específico difiere entre las razas; por ejemplo, entre los PSI, el antígeno Aa es el antígeno más común, siendo el 98% de los animales de esa raza positivos para este antígeno, por lo que el 2% de las yeguas en riesgo y sementales son Aa-, y por lo tanto, son "compatibles". ⁽¹⁰²⁾ Bailey, *et al*, (1987) ⁽¹⁰²⁾ citan que la probabilidad de encontrar un semental PSI compatible para una yeguas Aa- es únicamente uno de 50 sementales PSI; así mismo, el 16% de las yeguas PSI están a riesgo debido a son Qa-; por lo tanto, el 16% de los sementales son compatibles al ser también Qa-.

Estas pruebas pueden ser hechas de dos formas: a) los eritrocitos del semental pueden ser probados para determinar si tiene el antígeno correspondiente a los anticuerpos que la madre tiene en su suero; y b)

comparando específicamente los anticuerpos de la madre contra el tipo sanguíneo del semental.

Una vez realizadas estas pruebas, los criadores pueden usar esto de dos maneras: a) antes de la decisión de la monta (yegua no gestante), esto es cuando ya se sabe que una yegua no es productora de anticuerpos contra los eritrocitos de determinado semental, éste puede ser seleccionado por no tener un antígeno que pase al potro. En la práctica, sin embargo, esto provoca una gran dificultad ya que los antígenos Aa y Qa son comunes en las razas, y encontrar un semental que el propietario de una yegua desea usar, con un tipo de sangre compatible, puede ser muy difícil; y b) después de la decisión de la monta (yegua gestante), aquí los eritrocitos del semental deben ser probados contra el suero de la yegua antes de su parto, ya que los únicos antígenos que el potro tendrá serán los heredados por la madre y el padre. Si no hay una reacción con los eritrocitos del semental, entonces tampoco habrá una reacción con los eritrocitos del potro, ya que si el semental no tiene los antígenos correspondiente, su descendencia no tendrá riesgo de IN. ⁽¹⁰²⁾ (cuadro 6)

Cuadro 6. Ejemplo de un reporte de tipificación sanguínea para compatibilidad del semental con la yegua.

	Antígenos sanguíneos						
Yegua	A: <u>abcdefg</u>	C: <u>a</u>	D: <u>abcdefghijklmnpqrs</u>	K: <u>a</u>	P: <u>abcd</u>	Q: <u>abc</u>	U: <u>a</u>
Sistemas	-bc--	a	Bcd-f-- k m--	-	----	abc	a
Semental 1	A: <u>abcdefg</u>	C: <u>a</u>	D: <u>abcdefghijklmnpqrs</u>	K: <u>a</u>	P: <u>abcd</u>	Q: <u>abc</u>	U: <u>a</u>
Sistema	a- -d	a	- - -de-- k - -o	-	- b - -	abc	a
Semental 2	A: <u>abcdefg</u>	C: <u>a</u>	D: <u>abcdefghijklmnpqrs</u>	K: <u>a</u>	P: <u>abcd</u>	Q: <u>abc</u>	U: <u>a</u>
Sistemas	-bc -	a	- bcd-f - - k m - -	-	a - -d	---	a

Un semental compatible con la yegua por carecer del antígeno Aa es el semental 2, mientras que el semental 1 no lo es, por tener este antígeno. Por otra parte la yegua en este ejemplo no tiene ningún riesgo en lo que respecta al antígeno Qa, ya que ella lo tiene, así como el semental 1, y el semental 2 no lo presenta, por lo que no lo podrá heredar a su descendencia.

Adaptado de McClure, J.J. (1997). Strategies for prevention of neonatal isoerythrolysis in horses and mules. Equine Veterinary Education. Vol. 9, No. 3, pp 118-122. ⁽¹²⁶⁾

Finalmente podemos concluir que la tipificación sanguínea es de mucha importancia y utilidad en: a) la determinación de las yeguas en riesgo para la producción de anticuerpos contra los antígenos más comúnmente involucrados en la presentación de IN; b) para la selección de sementales compatibles con la yegua que se va gestar; y c) para la evaluación del suero de la yegua en la fase tardía de la gestación. ⁽¹²⁶⁾

Respecto de las mulas, McClure, *et al*, (1994) ⁽¹⁴⁾ y McClure, (1997) ⁽¹²⁶⁾ mencionan que en términos de IN no hay ningún semental compatible con ninguna yegua para la producción de mulas, debido a que todos los sementales burros tiene el "Antígeno burro", el cual esta ausente en todos los equinos, y por lo tanto, todas las yeguas están a riesgo cuando son gestadas por un burro. Siendo dichas gestaciones predeciblemente incompatibles, por lo que todas las estrategias para la prevención de esta enfermedad en ellos deben ser posparto.

3.13.2. Prueba para detectar anticuerpos hemolíticos en el suero de las yeguas gestantes contra los antígenos de la membrana celular de los eritrocitos del potro.

La presencia de anticuerpos en el suero de las yeguas preñadas en la fase tardía de la gestación sugiere fuertemente que la IN se presentará, por lo que se deben realizar pruebas posnatal para determinar si éstos anticuerpos reaccionan contra los eritrocitos de su cría. ^(54,57,102,126) La metodología de los procedimientos hemolíticos en términos generales es la siguiente:

1. Se requieren de dos tubos de sangre completa del potro, uno conteniendo un mínimo de 5 ml con anticoagulante (EDTA, ACD o solución de citrato isotónico), y el otro conteniendo un mínimo de 3 a 5 ml sin anticoagulante, sirviendo estos como fuente de eritrocitos y suero respectivamente.
2. Una pequeña mezcla de sangre no coagulada es usada para preparar una suspensión al 2.5% de eritrocitos en solución dextrosa salina (2% dextrosa en 9.0% de solución de cloruro de sodio), siendo recomendado lo anterior

- para reducir la tendencia de las células del equino para autolizarse en solución salina isotónica.
3. Dos gotas de suero diluido (1:4) son puestas en un tubo de ensayo de 10 x 75 mm.
 4. Se adiciona una gota de los eritrocitos en suspensión.
 5. Posteriormente, se agrega una gota del suero de conejo (complemento). Un control negativo es puesto de la misma manera usando eritrocitos obtenidos de un caballo o potro sano, mientras que un control positivo asegura determinar que el complemento está activo; empleando cualquier antisuero (antieritrocitos de caballo, el cual se diluirá a 1:100 o más), hemolizará efectivamente los eritrocitos del caballo en presencia de complemento de conejo. El control positivo es puesto usando dos gotas del antisuero diluido, una gota de una suspensión al 2.5% de los eritrocitos lavados de un donador sano y una gota de suero de conejo (complemento).
 5. Los tubos son agitados e incubados de 32 C a 37 C.
 6. La hemólisis es registrada después de 0.5, 1 y 1.5 horas, cualquier grado de hemólisis de los eritrocitos del potro claramente mayor del que puede ser observado en el control negativo está indicando casos de IN. El fundamento para el procedimiento lítico es asegurar que el complemento de conejo ha sido absorbido en el momento cuando el procedimiento hemolítico de los eritrocitos se ha llevado a cabo (1.5 horas). En la ausencia de complemento de conejo, el complemento a utilizarse es el de suero de cobayo.
 7. Si los eritrocitos de los potros están sensibilizados y se desea averiguar la especificidad de los anticuerpos que están sensibilizándolos, entonces los eritrocitos pueden ser probados contra un conjunto de eritrocitos de caballos de tipos sanguíneos conocidos. Debe la solución producir lisis únicamente de los eritrocitos que posean un antígeno A, cuando son utilizados únicamente anticuerpos anti-A, y si ningún anticuerpo es detectado en el plasma o suero del potro, entonces debe ser de la misma especificidad a los de la solución. Si el complemento reconoce a los

anticuerpos unidos a los eritrocitos y esas células son destruidas, las pruebas son consideradas positivas. La fuerza de la reacción es usualmente medida como 0 (sin reacción), 1 (arriba del 25% de lisis), 2 (arriba del 50% de lisis), 3 (de 50 a 80% de lisis) y 4 (hemólisis completa). El suero es probado a una gran variedad de diluciones, y los resultados son expresados en términos de la última dilución en la cual la hemólisis ocurre.

8. Las recomendaciones con respecto a si el potro recién nacido debe o no amamantarse con el calostro de su madre dependen de la forma de reacción del suero. (cuadro 7)

Cuadro 7. Interpretación de los resultados de tipificación sanguínea y recomendaciones respecto del potro.

Anticuerpos	Títulos	Reacción*	Recomendación
A	1/16	1	Se alimenta y se monitorea para aumento.
A	1/16	3-4	Retirar el calostro y prueba de reacción cruzada
Ca	1/16	1-4	Se alimenta.
Qa	1/2	2	Se alimenta y se monitorea para aumento.
Qa	1/16	2	Retirar el calostro.
R y S	1/2	1	Retirar el calostro.
Otros	1/16	2	Se alimenta y se observa al potro.
Otros	1/16	4	Riesgo no conocido y se retirar el calostro.

* 1 = < 25% de hemólisis; 2 = < 50% de hemólisis; 3 = < 100% de hemólisis; 4 = 100% de hemólisis.

Adaptado de Bailey E.; Conboy, S.H. and McCarthy, F.P. (1987). Neonatal Isoerythrolysis of foals; an update on testing. Proceedings of the American Association of Equine Practice, Vol. 33, pp 341-353. ⁽¹⁰²⁾

Esencialmente para los potros equinos, los anticuerpos hemolíticos Aa y Qa, son encontrados causando una completa hemólisis desde una dilución de 1:2, por lo que se recomienda retirar el calostro de los potros, excepto en el caso de la presencia de Ca. ⁽¹⁰²⁾ Existen otras metodologías un poco diferentes de la descrita, ⁽⁸²⁾

3.13.3. Pruebas de reacción cruzada o Prueba de aglutinación del potro icterico.

La presencia de anticuerpos en el suero de una yegua en la fase tardía de su gestación requiere de la toma de precauciones antes de que el potro nazca y tome el calostro de su madre. Este tipo de pruebas se realizan en el momento del parto para determinar si el calostro de la madre contiene anticuerpos contra los eritrocitos de su cría, con la finalidad de que si estos anticuerpos son detectados en dicho calostro antes de su ingestión por el potro, esta pueda ser impedida, y así prevenir definitivamente la IN. Esta prueba tiene algunas características importantes tales como: a) puede ser desarrollada en pocos minutos después del parto y antes de que el potro mame; b) su metodología es muy simple, sin la necesidad de reactivos especiales; requiere únicamente una centrífuga, tubo de ensayo, solución salina y pipetas, además de las muestras de calostro de la madre y sangre del potro; c) se puede realizar fácilmente en condiciones de campo; y d) es más o menos confiable, pero su utilidad es limitada. La prueba detecta la reacción de aglutinación entre el calostro y los eritrocitos del potro, sin especificar cual antígeno está presente, pero puede confirmar el problema potencial al estar los anticuerpos antieritrocitos presentes. ^(102,126) La metodología del procedimiento de esta prueba en términos generales es la siguiente:

1. Colectar calostro de la yegua.
2. Colectar sangre del potro con anticoagulante (EDTA) antes de que se alimente.
3. Etiquetar 8 tubos con la leyenda: control y solución salina (1:2), (1:4), (1:8), (1:16), (1:32), (1:64) y (1:128). Adicionar a cada uno de los 8 tubos 1 ml de solución salina (0.9% de Cloruro de Sodio).
4. Hacer diluciones en serie del calostro en: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 y 1:128. Adicionar 1 ml de calostro (o suero) en el tubo etiquetado con la leyenda 1:2 y mezclarlo, tomar 1 ml de ese tubo y adicionarlo al segundo tubo etiquetado con la leyenda 1:4 y mezclar; después tomar 1 ml de ese tubo y adicionarlo al tercer tubo etiquetado con la leyenda 1:8, y continuar así hasta hacerlo con la totalidad de los tubos. Descartar 1 ml del último tubo

etiquetado con la leyenda 1:128 para que el total del volumen de cada uno de los tubos sea de aproximadamente 1 ml.

5. Adicionar 1 gota de la sangre completa del potro a cada uno de los ocho tubos y mezclar.
6. Centrifugar los tubos por 2 o 3 minutos a una velocidad promedio de 300 a 500 gravedades.
7. Eliminar el sobrante e invertir cada uno de los tubos, observando el estado del botón formado por los glóbulos rojos en el fondo del tubo.
 - La aglutinación completa (4+), causa que los eritrocitos se mantengan completamente aglutinados y empaquetados en el fondo.
 - Una fuerte aglutinación (3+), forma un coágulo.
 - Para una débil aglutinación (1+ a 2+), los eritrocitos forman pequeños coágulos que pueden desplazarse por las paredes de los tubos.
 - Cuando no hay aglutinación (-), los eritrocitos también se deslizan pero con mucha más facilidad. Esto debe ser el caso del tubo control, si en este tubo se forman coágulos, entonces los resultados deberán ser tomados con poca credibilidad.

Algunas otras recomendaciones que se deben considerar son: a) si hay una reacción positiva con los eritrocitos del potro, entonces la prueba (el calostro) debe ser corrido con los propios eritrocitos de la madre para asegurarse que no es una condición de la prueba o que la viscosidad del calostro es la que está causando la falsa aglutinación; b) la titulación es definida como la dilución más alta a la que se produce una fuerte aglutinación. Si la reacción de titulación del calostro por medio de ésta prueba es positiva a una dilución de 1:16 o mayor en los caballos y 1:64 o mayores en las mulas, cuando es probado contra los eritrocitos de potro antes de que se haya amamantado, tiene entonces una buena correlación con el ensayo estándar hemolítico; por lo que se debe evitar que el potro tome este calostro, suplementándolo por medio de una fuente alterna (banco de calostro u otra madre), hasta que la titulación en el calostro disminuya. En diluciones menores de 1:16 ésta correlación no es buena, y se registrarán más falsos positivos; c) la prueba también es de utilidad para monitorear el decline en el nivel de anticuerpos dañinos en el

calostro, y determinar cuando es seguro permitirle al potro alimentarse de su madre. La evaluación seriada de los títulos del calostro por medio de la Prueba del potro icterico contra los eritrocitos del potro antes de que se amamante y hasta que éste nivel sea menor de 1:16 para los potros equinos y 1:64 para los potros mulas, puede permitir que el potro regrese con seguridad para amamantarse de su madre, inclusive desde las 4 a 8 horas. Es importante señalar el uso de eritrocitos del potro antes de que este se alimente de su madre, ya que cuando esto sucede los eritrocitos del potro pueden llegar a cubrirse con anticuerpos, por lo que la reacción de aglutinación de la prueba, se puede presentar aún cuando los anticuerpos en el calostro y/o en la leche no están presentes en cantidades significativas; y d) otros factores tales como la viscosidad del calostro hacen que la muestra sea menos diluida y por lo tanto más difícil de leer a bajas diluciones con calostro muy grueso, además de la tendencia del calostro para inducir la formación de grumos, los cuales simulan la aglutinación. En suma, la prueba JFA es efectiva, simple y utilizable con las reservas ya mencionadas, y su uso permitirá la detección de casi todo el calostro que contenga los anticuerpos causantes de IN. ^(36,57,102,126) Recordando finalmente que estas pruebas son dependientes sobre todo de la cantidad de antígenos en los eritrocitos y anticuerpos en el calostro, por lo tanto son inadecuadas y algunas veces falsas o engañosas, ya que no indican la presencia de anticuerpos con más precisión que los procedimientos hemolíticos. Se recomienda de acuerdo a las posibilidades del criadero, que éstas pruebas sean realizadas rutinariamente para tipificar tanto al semental como a las yeguas reproductoras. ⁽⁹²⁾

3.14._ **Terapia y manejo.**

Los principales problemas de los potros con Isoeritrólisis neonatal son: la anemia hemolítica, hipovolemia, shock, hipoglicemia, acidosis metabólica e infección bacteriana secundaria, además los efectos de la severa hemólisis intravascular en donde tenemos en primer lugar que si la anemia es severa y prolongada puede causar daño irreparable a la circulación y al sistema nervioso central, y segundo, varios órganos entre ellos el riñón y el hígado pueden sufrir daños por el proceso de la enfermedad y la degradación de los productos de los eritrocitos hemolizados; debiendo considerarse todos estos factores si se quiere tener un tratamiento y manejo médico exitoso. La determinación de la terapia más apropiada requiere una combinación de la evaluación de los aspectos clínicos, clínico patológicos, conteo de la sangre completa, química sanguínea y urinalisis. Una vez que ha sido establecido que el potro se encuentra en riesgo de desarrollar o ya presenta la enfermedad, el tratamiento y el manejo son esenciales. ^(7,9,12,29,40,64) Siendo la meta principal el apoyo durante la crisis hemolítica e hipovolémica, que incluye algunas cuestiones importantes como:

3.14.1._ **Prevención de la ingestión de más anticuerpos dañinos.**

Uno de los aspectos que más llama la atención en cuanto al tratamiento del potro con IN, es la prevención de futuras ingestiones de anticuerpos por parte del potro, por lo que se propone que: a) la alimentación sea realizada por una yegua nodriza. Considerando que es una decisión riesgosa ya que por un lado la concentración de anticuerpos dañinos en el calostro de la madre es paralela a la concentración de anticuerpos de protección y otras sustancia tales como minerales y vitaminas, y que esta medida profiláctica privará al potro de estos constituyentes, poniéndolo en riesgo considerable para que desarrolle infecciones neonatales por la "Falla de la transferencia pasiva" inducida; b) evitar al máximo la separación del potro de su madre, tomando en cuenta que esta acción tenderá a someter al potro a un estrés tal vez innecesario y que realmente lo compromete más; y c) proporcionar alimentación suplementaria al potro por el tiempo

necesario. Si el potro tiene menos de 24 horas se le puede alimentar con suplemento de leche de una preparación comercial, y si se consigue calostro de otra yegua que no represente ningún peligro para él o de un banco de calostro se recomienda proporcionar de 1 a 2 litros de calostro tibio (para suplementar anticuerpos de protección). El cual debe ser dado por medio de un bote o una sonda estomacal dentro de las primeras doce horas de vida, y dado que los intestinos del potro llegan a ser impermeables a los anticuerpos del calostro en un promedio de 24 de edad, ésta medida deberá extenderse por el mismo tiempo; por lo que se recomienda que se realicen pruebas a la leche (o calostro) que se le va a proporcionar para estar informados de cual es la calidad y cantidad de los anticuerpos de protección que se le están dando al potro, permitiendo que regrese a alimentarse de su madre hasta que no exista más peligro para él. Durante este periodo la yegua madre debe ser ordeñada con intervalo de 1 a 2 horas durante las primeras 24 a 48 horas para asegurarse que la producción de leche continuará y reducir la cantidad de hemoaglutininas contenidas en él. ^(3,5,9,30,64) Sin olvidar lo que reportó Bruner, *et al*, (1955) ⁽⁶⁷⁾ quien dijo "las aglutininas contra los eritrocitos continúan produciéndose aunque a bajas concentraciones en la leche de la yegua por algún tiempo después del parto (13 días), y pueden producir una ligera sensibilización de los eritrocitos como lo demuestran las pruebas aplicadas, pero no se presentan signos clínicos de IN, manteniéndose los niveles de hemoglobina y el conteo de eritrocitos normales". Es posible considerar también la alimentación del potro con leche de otro tipo de animales, como por ejemplo, leche de vaca que es la que se aproxima más a la composición de la leche de la yegua, aunque se deben hacer ajustes a este tipo de leche, como es agregar glucosa. ^(27,40)

3.14.2. **Terapia a base de corticosteroides.**

En los potros con IN, esta terapia no ha sido adecuadamente diseñada, no obstante, la administración de corticosteroides puede ser de ayuda en la disminución del proceso hemolítico. ^(6,64)

3.14.3. Protección contra una infección de agentes oportunistas.

Una terapia a base de antibióticos de amplio espectro como, trimetropin-sulfa, penicilina o ampicilina, también ayudan en la prevención de infecciones bacterianas secundarias. Además se debe considerar la aplicación de una dosis de antitoxina tetánica. ^(6,39,40,64,67)

3.14.4. Reemplazo de una porción del volumen del plasma (remoción de anticuerpos antieritrocitos sueltos y administración de anticuerpos de protección).

Si el calostro no puede ser utilizado, entonces se recomienda proporcionar de 2 a 3 litros de plasma de un donador, cuyo plasma esté libre de anticuerpos antieritrocitos, el cual debe ser administrado por vía intravenosa dividido en pequeñas dosis, para proveer al potro de cantidades adecuadas de anticuerpos de protección. Por otro lado, algunos investigadores han sugerido la administración de 6 litros o más de plasma por vía estomacal dentro de las primeras 12 a 24 horas para poder suplir los anticuerpos necesarios; sin embargo, este procedimiento no es más efectivo que la ruta de administración intravenosa.

(64)

3.14.5. Reemplazo del déficit de los eritrocitos hasta que la médula ósea responda a la anemia (transfusión sanguínea para la corrección de la anemia).

Es importante considerar que durante el proceso de esta enfermedad, se presenta en forma invariable una disminución considerable del volumen sanguíneo del potro afectado, por lo que se debe mantener por medio de eritrocitos que puedan realmente ser transferidos de un animal a otro. La suplementación con eritrocitos es un importante auxilio en el manejo exitoso del potro con IN, y la sola terapia de transfusión simple provoca una dramática mejoría. El tratamiento de esta enfermedad, desde su descubrimiento hasta la

actualidad, se ha enfocado principalmente a tratar de resolver el problema de la destrucción de los eritrocitos por medio de las transfusiones sanguíneas (de preferencia exconsanguíneas), las cuales se realizan como un medio de aumentar rápidamente los niveles de hemoglobina. Los diferentes autores varían en sus recomendaciones sobre: a) el momento ideal de realizar las transfusiones; b) el procedimiento; c) el tiempo en realizarla; d) la cantidad de sangre administrada; e) el tipo de animales utilizados como donadores (considerando con esto que tanto los caballos, yeguas o mulas pueden ser utilizadas, sin existir algunas ventajas o desventajas de una sobre las otras); y f) que animales son los que necesitan la transfusión. Habiendo reportado que la variación de los porcentajes de recuperación es alto, llegando incluso hasta un 58%. ^(6,29,30,40,44,51,68,108,111,133)

3.14.6. Selección del donador ideal.

El problema básico en la transfusión sanguínea es la rapidez en la selección de un donador. El objetivo de la transfusión es proveer al potro con eritrocitos que no sean destruidos por los anticuerpos maternos absorbidos en el calostro. Cabe mencionar nuevamente que el potro recién nacido es inmunológicamente nulo, por lo que no hay anticuerpos autólogos dirigidos contra ningún eritrocito que pueda provocar un efecto inmediato con la transfusión. La clave es seleccionar un donador adecuado, poniendo especial atención con la reacción del suero o calostro de la yegua con el suero del potro. Si no es posible usar a la madre se pueden seleccionar otros donadores, los cuales deben carecer de los antígenos para los que están dirigidos los anticuerpos de la madre, y dado que no es posible la tipificación sanguínea de los donadores en corto tiempo, es importante tener previamente identificados algunos caballos en los que se haya determinado por tipificación sanguínea que son Aa- y Qa- principalmente. Este tipo de animales es adecuado para que se les utilice como donadores debido a que la mayoría de los casos de IN están asociados principalmente con estos dos antígenos. La probabilidad de que al azar se seleccione un donador al cual le falten los dos antígenos dañinos (Aa y Qa), y pueda por lo tanto ser utilizable

como donador, varía significativamente con la raza. Por ejemplo, la probabilidad de encontrar un PSI Aa- puede ser de 1 a 2 en 10 animales, mientras que en los caballos de la raza cuartos de milla es de 1 en 2. Y la probabilidad de que se presenten reacciones de la sangre cuando se selecciona al azar es de 15%. El padre de los potros no es un buen donador, ya que comparte los mismos antígenos que el potro, y sus eritrocitos reaccionarán con los anticuerpos maternos presentes, además de adicionar más carga para el sistema retículo endotelial cuando son destruidos. (2,5,30,36,40,52,64,111,120,133)

3.14.7. Necesidad de transfusión.

En cuanto a la necesidad de suplir a los eritrocitos, ésta debe estar basada en su conteo y en el volumen del paquete celular, aunque no únicamente estos valores son los importantes, sino también la rapidez con la cual estos parámetros estén declinando. En los potros sospechosos de IN es recomendable garantizar las determinaciones del VPC por lo menos dos veces diarias hasta la que progresión de la anemia pueda ser caracterizada. Una transfusión sanguínea está indicada cuando: a) el hematocrito es de menos del 15%; b) el VPC a menos del 10%, c) los eritrocitos han caído a menos 3×10^6 x ml; d) la concentración de la hemoglobina es menor a 5 mg/dl; e) hay evidencia de una continua y progresiva disminución de estos parámetros; y f) la apariencia clínica del potro continúa deteriorándose; ya que a esos niveles la capacidad acarreadora de oxígeno por parte de la sangre esta severamente comprometida. Considerando también la recomendación de otros investigadores en el sentido de que a menos que el volumen del paquete celular baje de 15% a 10%, las transfusiones pueden no ser necesarias si el reposo es forzado, pero si, si la anemia comienza a ser más severa. (6,29,30,40,51,69,111)

3.14.8. Obtención de la sangre del donador.

Los glóbulos rojos de la madre son obviamente perfectos, en términos de que los anticuerpos producidos por ella no reaccionarán contra sus propias células; sin embargo, para evitar administrar más anticuerpos dañinos al potro, el suero de la yegua (conteniendo anticuerpos contra los eritrocitos del potro) debe ser removido por medio del lavado antes de administrarse exclusivamente el paquete celular. Para hacer esto, de 6 a 8 litros de sangre pueden ser colectados en una solución de citrato de sodio al 3.8% (poniendo 1 parte de la solución de citrato de sodio por 9 partes de sangre), aunque 3 o 4 litros usualmente proveen suficientes glóbulos rojos. Posteriormente, la sangre se deja reposar de 1 a 2 horas, después el plasma es asépticamente drenado, y en forma también aséptica se añade un gran volumen de solución salina estéril (0.9% de Na Cl), mezclándose y dejando reposar otra vez, la solución salina es después drenada y descartada. En este punto los glóbulos rojos pueden ser resuspendidos en un volumen igual de solución isotónica para su administración o el procedimiento de lavado puede ser repetido. La sedimentación es menos deseable que la centrifugación porque es más lenta y no remueve adecuadamente los anticuerpos. Por otro lado los eritrocitos lavados y resuspendidos pueden mostrar un considerable aumento de la hemólisis dentro de las 12 horas, aún cuando se almacenen a 4 C; por lo que se recomienda que la sangre del donador sea almacenada mientras se lava, después de este procedimiento y hasta un poco antes de que sea usada.

Si se realiza una transfusión que reaccione con los anticuerpos maternos, esto significa que se están introduciendo células incompatibles dentro del sistema sanguíneo del potro, los cuales probablemente no sobrevivirán por largos periodos de tiempo en la circulación. Tales transfusiones deben ser consideradas como medidas de relleno temporales; además, pueden sensibilizar al potro para futuras transfusiones (tal vez no dentro de pocas horas o días, pero potencialmente dentro de pocas semanas). Esto debe ser considerado cuando se calculen las ventajas y desventajas de este tratamiento. (2,29,36,40,47,64,68,111,120)

3.14.9. Volumen y rango de la transfusión.

Respecto a la cantidad de sangre a transfundir, esto depende de la severidad de la anemia y sobre todo de la concentración de hemoglobina, siendo el mayor de los problemas el aumentar el porcentaje de esta última en la sangre, ya que entre más abajo estén sus niveles, los signos de la enfermedad en los potros serán más severos, cuidando siempre de no sobre cargar la circulación.

Existen varios protocolos que varían en cuanto a la cantidad de sangre que debe ser administrada y la que se debe de retirar, pero en general se recomienda retirar e introducir un volumen de aproximadamente 200 ml en cada paso, con un total de 1, 4 o hasta 6 litros de eritrocitos lavados, lo que es usualmente adecuado para producir un mejoramiento clínico. La transfusión se debe realizar a una velocidad de 80-180 gotas por minuto, tanto para introducir como para sacar (ésta cantidad es soportada aún por los potros más severamente afectados). Una transfusión más lenta es mejor si el potro se mantiene quieto especialmente en el inicio de la transfusión de los casos severamente afectados, tomando de 20 minutos a una hora para reemplazar 1 litro, haciendo un total de 1 a 6 horas para realizar el trabajo de transfusión completa. Cuando la transfusión ha aliviado la mayoría de los signos cardiovasculares en casos los severos y la frecuencia cardíaca está abajo de 120 por minuto, es posible incrementar la transfusión a un ritmo un poco mayor. La cantidad a transfundir casi siempre es más grande que la que se retira, con una diferencia aproximada de 500 ml entre ellas; también se recomienda que cuando se retire más de 1 litro ésta debe ser acompañada por 5 ml de gluconato de calcio para contrarrestar los efectos del exceso del citrato. Se pueden requerir repetidas transfusiones si la anemia continúa progresando. En los potros severamente afectados, en los cuales el contenido de hemoglobina en la sangre es muy bajo, es recomendable dar una transfusión inicial de 500 ml de la sangre del donador inmediatamente antes de comenzar el procedimiento de sangrado. (30,40,64,69,111,120)

3.14.10. Precauciones durante del proceso de transfusión.

La transfusión sanguínea no deja de tener algunos peligros que deben ser tomados en cuenta, ya que puede causar congestión del sistema circulatorio con consecuencia en los pulmones, en los cuales puede causar edema. Para reducir los riesgos del incremento muy rápido del volumen de la sangre circulando, se puede concentrar la que se va a transfundir siguiendo las recomendaciones mencionadas con anterioridad.⁽⁴⁰⁾ Se deben considerar las determinaciones tentativas del volumen del plasma y sangre realizadas por Cronin, (1954)⁽⁷⁷⁾ en donde determina que en el caballo son, 5.237% y 8.114%, respectivamente.

3.14.11. Técnica de transfusión de sangre en el potro.

El intercambio de sangre puede ser realizado administrando la sangre a través de una de las venas yugulares y retirando simultáneamente sangre de la yugular opuesta o bien utilizando la técnica descrita por Parry, *et al*, (1949);⁽⁴⁰⁾ Farrelly, *et al*, (1950);⁽⁶⁹⁾ o la técnica mejorada de Cronin, (1953)⁽⁷⁰⁾ que permite la administración de grandes volúmenes de sangre sin sobrecargar el sistema vascular evitando el colapso. No hay evidencias de que éste sea el método más efectivo y lo que simplemente se quiere es proveer una cantidad determinada de eritrocitos que no sean afectados por los anticuerpos maternos. Se debe realizar ésta maniobra estando de preferencia el potro en compañía de su madre y sujetado por algunos ayudantes; sin embargo, la necesidad de incremento en la manipulación del potro tratando de evitar al máximo cualquier clase de ejercicio, hace posible considerar necesaria una sedación.^(6,40,69,70)

3.14.12. Resultados de la transfusión.

Se ha encontrado que los mejores resultados con las transfusiones sanguíneas han sido obtenidos cuando éstas son administradas tan rápidamente

como sea posible después de que el problema de IN ha sido reconocido, ya que el retardo en la aplicación de éste procedimiento disminuye grandemente la oportunidad de sobrevivencia de los potros críticamente enfermos. Los potros tratados con transfusión han procedido a amamantarse por sí solos a los pocos minutos después de que ésta se ha realizado. Algunos estudios limitados en caballos adultos han sugerido que las transfusiones de glóbulos rojos no sobreviven por largos periodos de tiempo en la circulación (2 a 4 días), y no se sabe si en los potros ocurre el mismo fenómeno. El volumen del paquete celular en potros con IN lógicamente se incrementa después de una transfusión, para declinar gradualmente después; ésta reducción no es probablemente de consecuencias graves si es gradual, dado que el volumen del paquete celular del potro generalmente se corrige cuando los anticuerpos maternos dañinos son metabolizados. Sin embargo, la sobrevivencia aún por poco tiempo de los eritrocitos es de beneficio en potros severamente afectados y puede permitirles sobrevivir hasta que los títulos de las inmunoglobulinas antieritrocitos declinen en la circulación. Se deben tomar muestras sanguíneas para monitorear el grado de anemia, recordando que tomará varias semanas antes de que los niveles puedan retornar a lo normal.

Debemos recordar que aparte de los beneficios mencionados, este procedimiento no es inocuo y debe ser aplicado solamente cuando la vida del potro esté comprometida, tomado siempre en cuenta los riesgos. Su implementación deberá basarse no solamente en los datos de laboratorio, sino también en la meta que se quiera lograr al realizarla, considerando que algunos animales pueden compensar bastante bien la pérdida gradual de un número importante de eritrocitos, por lo que la transfusión puede no ser requerida.

Por otro lado, aunque el cuerpo es capaz de eliminar un pequeño número de eritrocitos viejos en forma continua, la rápida destrucción de un gran número de eritrocitos extraños después de una transfusión incompatible puede causar el desarrollo de una severa reacción patológica. Las reacciones a las transfusiones generalmente son eventos muy raros, los cuales pueden ser causados tanto por antígenos sanguíneos como no sanguíneos. ^(2,29,40,64,70,78,111) El cuadro 8, enlista

los problemas más comunes que se pueden presentar en los potros como consecuencia de una transfusión sanguínea.

Cuadro 8. Problemas más comunes causados por la transfusión sanguínea.

Causas inmunológicas de problemas en las transfusiones sanguíneas.
Antígenos de los eritrocitos, antígenos de los leucocitos, antígenos de las plaquetas, antígenos de histocompatibilidad, isotipos de las proteínas plasmáticas e inmunosupresión.
Causas no inmunológicas de problemas en las transfusiones sanguíneas.
Rápida administración (volumen sobrepasado), hipocalcemia (exceso de citrato), hipercalemia (sangre almacenada), infección (técnica de transfusión mal aplicada). hemólisis de la sangre (técnica mal realizada), microagregados (sangre almacenada).
Signos clínicos de las reacciones a las transfusiones sanguíneas.
Taquipnea, taquicardia, colapso, disnea, cólico, diarrea, defecación, micción, arritmia cardíaca, pirexia, urticaria, prurito, ictericia y hemoglobinuria.

El tratamiento para las reacciones debidas a las transfusiones consiste en suspenderlas inmediatamente y mantener el flujo de orina con diuréticos, debido a que la acumulación de hemoglobina puede dañar el riñón, lo que provoca una destrucción de los túbulos renales. La recuperación puede ocurrir después de eliminar todos los eritrocitos extraños.

La presentación de estas reacciones pueden ser prevenidas por la realización de pruebas al suero del receptor para detectar anticuerpos contra los eritrocitos del donador. Las pruebas de compatibilidad son conocidas como pruebas de reacción cruzada y son desarrolladas con la mezcla del suero del receptor con eritrocitos del donador y después incubada a 37 C por 30 minutos; si los eritrocitos del donador son lisados o aglutinados por el suero del receptor, entonces la

transfusión no se debe realizar con esas células. Ocasionalmente se encuentra que el suero del donador que no fue removido adecuadamente puede ser capaz de reaccionar con los eritrocitos del receptor, pero esto no tiene mayor significado clínico, ya que los anticuerpos del donador dados intravenosamente son rápidamente diluidos dentro del receptor. ⁽³⁶⁾

3.14.13. Almacenaje.

Todos los productos derivados de la sangre deben ser usados frescos, aunque el almacenamiento de los componentes sanguíneos es posible. Los eritrocitos se mantienen en refrigeración con anticoagulante (dextrosa), entre 3 y 4 semanas, y si el plasma es refrigerado inmediatamente después de la colección, los factores de coagulación se mantendrán estables por cerca de dos meses, y la albúmina y la globina por casi un año. ⁽¹²⁰⁾

3.14.14. Conclusiones respecto de la transfusión sanguínea.

La transfusión sanguínea es un procedimiento que aunque no muy comúnmente empleado, tiene importantes aplicaciones en el manejo terapéutico, ya que la técnica no es costosa por no requerir de equipo especializado, y su uso adecuado puede ser el factor más importante en la sobrevivencia de los casos fatales potenciales. Así mismo, es fácil de desarrollar en la práctica y además de los efectos benéficos del reemplazo de los eritrocitos, proporciona también un recambio en lo que respecta a leucocitos, plaquetas, factores de coagulación, albúmina, globina y otros componentes menos importantes. Las transfusiones sanguíneas son potencialmente de gran ayuda, requiriendo una selección cuidadosa del donador y una buena técnica para minimizar el riesgo de una reacción adversa.

Debido a la poca aplicación de las pruebas serológicas en nuestro campo, debe verse que una prueba de pretransfusión apropiada puede ser un método adecuado, consistiendo en transfundir una pequeña cantidad de sangre (50 ml) hacia el receptor, y posteriormente monitorear los signos vitales del receptor (pulso,

respiración, temperatura corporal) antes de proseguir con la totalidad del procedimiento, ya que se ha reportado que una pequeña cantidad de sangre transfundida (200 ml) puede desencadenar en una reacción fatal.

Otras consideraciones que se deben tomar en cuenta para el tratamiento de IN son: a) minimizar el estrés y el ejercicio, colocando al potro en lugares cerrados, calientes y secos; b) aplicación de fluidos intravenosos para mantener el volumen sanguíneo y los niveles de energía; c) promover la diuresis y minimizar los efectos de grandes cantidades de hemoglobina en los riñones, tratando de eliminar el daño al riñón (nefrosis por hemoglobina); y d) evitar la constipación por medio de la aplicación de enemas a base de jabón o aplicación de supositorios de parafina. Si el potro no se ha alimentado bien, el balance ácido-base debe ser monitoreado y corregido con agentes alcalinos apropiados tales como bicarbonato de sodio (de 200 a 400 ml de fluidos: solución salina normal con 4% de glucosa y 3% de bicarbonato de sodio), los cuales se le darán por medio de sonda estomacal dos veces al día. El tiempo de convalecencia después del periodo hemolítico puede ser determinado por el monitoreo de la regeneración de los eritrocitos, periodo que variará dependiendo de la severidad de la anemia que presentó. ^(3,27,29,40,64,68,102,120) Bruner, *et al*, (1950) ⁽⁶⁷⁾ demuestran por medio de sus estudios que esta puede tomar de 1 a 2 meses.

3.15. Pronóstico.

El pronóstico de Isoeritrólisis neonatal depende de cuatro factores principales: a) la naturaleza y cantidad del anticuerpo involucrado; b) la rapidez del inicio de los signos; c) el grado de anemia; y d) el tiempo en que se tarda en implementar el tratamiento. Como se mencionó anteriormente el antígeno Aa casi siempre produce anticuerpos muy potentes, por está razón los potros equinos en los cuales la enfermedad es debida a un anticuerpo anti-Aa, frecuentemente presenta casos hiperagudos o agudos en un tiempo de 12 a 15 horas después de mamar el calostro, mientras que los casos causados por el anticuerpo anti-Qa tienden a ser menos agudos (24 horas) al igual que los provocados por los anticuerpos anti-R y anti-S, que generalmente son de término medio en su inicio, teniendo también un pobre pronóstico.

En los casos hiperagudos los potros pueden morir antes de que el problema sea reconocido, sin ninguna oportunidad para la administración de la terapia. En estos casos, la transfusión sanguínea es esencial y urgente o el potro rápidamente morirá de extenuación debido a la anemia, las transfusiones sanguíneas pueden no ser necesarias en los casos que se consideran como de tipo medio, teniendo que realizar una evaluación constante de él. Mientras que los potros que desarrollan la enfermedad muy lentamente pueden responder bien a los cuidados de sostén. En general los potros hemolíticos tienen una buena oportunidad de sobrevivir si se les realiza una transfusión de eritrocitos lavados, con tal de que las condiciones hayan sido reconocidas antes de que el potro esté en un estado irreversible de extenuación. ^(2,6,36-39)

3.16. **Prevención y control.**

La prevención de la Isoeritrólisis neonatal depende de la detección temprana del problema en las yeguas preñadas y de su detección inmediata en el potro. Dado que la yegua está siendo inmunizada por su propio potro es posible detectar la presencia en su circulación sanguínea de los anticuerpos producidos. Se pueden utilizar varias estrategias para su prevención, como es la aplicación del conocimiento actual de la serología en los grupos sanguíneos, así mismo, unos buenos conocimientos inmunogenéticos, pueden proveer un mejor control de la IN; aplicándose en la identificación de sementales compatibles con las yeguas problemas o bien de crías en riesgo, para así evitar la producción de potros con ésta enfermedad. ^(2,5,7,39,64,108,126) Dentro de los aspectos más importantes que nosotros podemos llevar a cabo para prevenir y controlar la presencia de la enfermedad, tenemos:

3.16.1. **Primero.** Identificar a las yeguas en riesgo "Aa- o Qa-" (en caso de un apareamiento desconocido pero potencial incompatible o un caso completamente incompatible con o sin antecedentes de producción de IN), por medio de la tipificación sanguínea, así como identificar específicamente a los anticuerpos Aa o Qa (que son los más frecuentes productores de IN en los potros equinos). Esto puede ser hecho mediante la remisión de unas muestras de sangre con anticoagulante y suero a los laboratorios correspondientes. Se debe tener precaución con las yeguas negativas para cualquiera de los antígenos anteriormente mencionados, ya que ello significa que pueden potencialmente desarrollar anticuerpos contra dichos antígenos.

3.16.2. **Segundo.** Dar monta a las yeguas en riesgo (Aa- o Qa-) con sementales también negativos (monta basada en la tipificación sanguínea), para evitar que la descendencia herede del padre los antígenos incompatibles. Sin embargo, en las razas en las que una baja proporción de la población es negativa para esos

antígenos, como por ejemplo los PSI, la identificación de un semental que sea negativo y utilizable en base a otros criterios puede ser difícil.

Se puede concluir específicamente al respecto que algunos pasos cruciales para el control de IN, son: a) todas las yeguas reproductoras deben ser tipificadas; b) todas las yeguas preñadas ya tipificadas y negativas (Aa-, Qa-, R- o S-), deben seguirse estudiando para detectar un aumento de los niveles de anticuerpos; y c) realizar un estudio al azar de los individuos que se encuentran en reproducción para detectar alguna incompatibilidad. Concluyendo Stormont, (1975) ⁽⁵⁴⁾ que cuando las montas apropiadas son hechas, el plan reproductivo puede llevarse a cabo con seguridad y la probabilidad de que se presente IN en los potros es casi cero.

3.16.3. **Tercero.** Si los anticuerpos antieritrocitos son detectados en el suero de la yegua antes del parto (títulos de hemolisinas fuertemente positivos en una dilución de 1:4), es recomendable que al potro no se le permita amamantarse de su madre y el calostro debe ser checado para actividad contra los eritrocitos de su cría antes de permitir que éste lo ingiera; ya que Bruner, *et al*, (1948) ⁽⁵⁾ demostraron que la concentración de anticuerpos antieritrocitos en el suero de una yegua gestante preparto, se presenta también en el calostro, siendo incluso demostrado por otros investigadores que el calostro de las yeguas inclusive contiene una concentración más alta de anticuerpos que los encontrados en el suero. Aunque Genco, *et al*, (1969) ⁽⁷²⁾ reportan que tanto el calostro como el suero contienen anticuerpos en forma similar y que las tres cantidades mayores de inmunoglobulinas séricas son IgG, IgE, e IgM. En condiciones de campo la Prueba de aglutinación del potro icterico, ha mostrado una buena correlación con las pruebas de laboratorio (Prueba hemolítica y de Aglutinación standard) para detectar anticuerpos; por esta razón, se debe considerar el estudio del calostro por medio de esta prueba antes de permitir la alimentación de los potros, pudiéndose, como lo demuestran algunos estudios, usar la sangre del cordón umbilical contra el calostro para realizar los estudios. Teniendo mucho cuidado como ya se mencionó ya que se conoce la tendencia del calostro de formar grumos, resultando esto en diagnósticos falsos-positivos (intensa formación de pequeñas hebras de las células del potro en presencia del calostro),

provocando que el calostro, que es tan importante para la cría, le sea retirado con riesgo de un daño posiblemente mayor. La severidad de la IN en los potros está relacionada con los títulos de anticuerpos en el suero y calostro de la madre, existiendo controversia al respecto, pues otros investigadores mencionan lo contrario. En algunas yeguas, el suero y el calostro contienen tanto hemoaglutininas como hemolisinas, mientras que en otras únicamente las hemoaglutininas son demostradas, pero las hemolisinas sin hemoaglutininas no han sido observadas. Los potros de las yeguas cuyos sueros tuvieron títulos de hemolisinas de 1:100 a 1:1000, usualmente estuvieron severamente afectados con hemoglobinemia y hemoglobinuria, los potros de yeguas que tuvieron títulos de hemoaglutininas de 1:16 a 1:32 o más altos, pero tuvieron títulos de hemolisinas de menos de 1:10, usualmente desarrollaron una severa anemia tempranamente pero sin hemoglobinuria. Sin embargo, los potros de yeguas que tenían unos títulos altos en el suero de hemoaglutininas han presentado casos de mediana categoría de isoeritrolisis. ^(5,67)

El calostro de la madre debe ser ordeñado cada hora o menos y congelado, pero una pequeña cantidad (10 ml) enviada al laboratorio para su análisis. Si se comprueba que contiene anticuerpos contra los eritrocitos de la cría, el resto que está congelado se puede enviar al laboratorio y darle un mejor fin como es el de la investigación o definitivamente desecharse; pero si las pruebas muestran que no contiene nada peligroso para el potro, puede ser dejado en el congelador hasta que pueda ser utilizado por otro potrillo que lo necesite, con la certeza de que es completamente inocuo. ^(54,64)

3.16.4. **Cuarto.** Es de primordial importancia la prevención de la "Falla de la transferencia pasiva" de la inmunidad calostrala. El tiempo que se debe de retirar al potrillo la alimentación de su madre se basa en dos aspectos importantes como son: a) la pérdida de la habilidad por parte del potro para absorber los anticuerpos a través de su tracto intestinal que es de aproximadamente 24 horas, debido a la sustitución de las células que realizan esta labor en el epitelio intestinal; y b) la manipulación que se hace con las yeguas para retirar el calostro de su glándula

mamá, la cual se debe de realizar cada hora, ya que esto reduce marcadamente la concentración de los anticuerpos. La acción de retirar al potrillo de su madre para eliminar la ingestión de anticuerpos dañinos para él, también provoca que éste no adquiera inmunoglobulinas que le permitan tener defensas contra los microorganismos patógenos que le pueden provocar alguna otra enfermedad, y por lo tanto, se puede hablar de una "Falla de la transferencia pasiva" provocada. Numerosos reportes indican que esto predispone a que el neonato equino sea presa fácil de las infecciones. (9,67,84,134,135,136)

La inmunidad contra las infecciones depende de la respuesta humoral (anticuerpos) y celular (linfocitos B y T, en general).⁽¹³¹⁾ Banks y McGuire, (1989) citado por Stoneham, (1991)⁽¹³⁸⁾ mencionan que "aunque los componentes del sistema inmune están presentes en el potro desde el momento de su nacimiento, no se considera que tienen un nivel de competencia inmunitaria como los adultos hasta que el potro tiene una edad de al menos 30 días. Las concentraciones totales con respecto al adulto en el potro recién nacido no están bien conocidas pero varían desde el 12 al 60%. Dependiendo el potro de los anticuerpos obtenidos vía el calostro, debido a que los niveles de IgG son mínimos al momento de su nacimiento."

Las concentraciones de IgG dan una medida de la inmunidad humoral específica, el rango de esta especificidad en los neonatos es determinada por la fuente de ellas (usualmente el calostro de la madre). Es aquí en donde radica la importancia de la medición rutinaria de las concentraciones de inmunoglobinas (IgG) en el suero del potro cuando este tiene entre 12 y 72 horas de edad. Constituyendo este simple acto una parte importante de la medicina preventiva, además de que ayuda a identificar los potros en riesgo. (104,105,106,130,137,139)

En casos de una posible "Falla de la transferencia pasiva" sin duda la mejor política es la alimentación del potrillo con otro calostro hasta que sea posible utilizar el de la madre, implementándose algunas técnicas de manejo las cuales pueden ser usadas para maximizar la ingestión de calostro de alta calidad por parte del potro durante el periodo crítico, cuando la absorción por parte su intestino delgado es más alta. Este manejo comprende varias posibilidades y circunstancias, como

por ejemplo: a) cuando se tiene una yegua que con anterioridad ha tenido una "Falla de la transferencia pasiva" en forma inexplicable, en este caso se puede utilizar el calostro de otras yeguas o de un banco de calostro. En cualquiera de los casos el potrillo debe ser alimentado con 500 ml, 1 o hasta 1.5 litros de calostro (oral o por medio de sonda estomacal), cuando éste tarda tres o más horas en amamantarse después del nacimiento; después, se debe dar de dos a cuatro veces alimento a base de sustituto de leche. Aquí definitivamente es necesario considerar la creación de un banco de calostro, este puede ser construido con el que es obtenido de otras yeguas multiparas por medio de la colección de pequeñas cantidades durante las primeras horas después del parto, en donde aproximadamente dos "onzas" de calostro pueden ser colectadas de cada yegua a un intervalo de 2 horas, dado que esto al parecer no induce una falla en la transferencia de anticuerpos al potro, a cuya madre se le está substrayendo. ⁽²⁴⁾ Sin embargo, se recomienda que al potro hijo de esta, se le hagan estudios para detectar una posible "Falla de la transferencia pasiva", asegurándose que el desorden no esta presente. Esto puede ser confirmado con más seguridad si una pequeña cantidad del calostro obtenido es enviada a un laboratorio de tipificación sanguínea para detectar la cantidad de inmunoglobulinas en él; b) cuando se tiene un potro con "Falla en la transferencia pasiva", pero no se tiene un banco de calostro, ni una donadora de calostro, y además se presume o definitivamente existe la presencia de una lactación prematura en dicha yegua, en este caso es forzoso utilizar el calostro de la madre del potro, en donde un mínimo de 500 ml de su calostro debe ser ordeñado y administrado al potro en la misma forma que la anterior; recordando siempre que: cuando la calidad del calostro de las madres es considerada pobre. Se debe medir la concentración de IgG en el calostro de todas las yeguas y debe darse únicamente si este tiene una concentración de IgG de 70 g/litro o una gravedad específica de al menos 1.09; c) cuando el potro es más grande (de 18 a 24 horas), el tratamiento y manejo para estos casos es la suplementación de anticuerpos oralmente de una donadora compatible por medio de suero o plasma (6-9 litros), lo que provee una adecuada cantidad de niveles de protección; y d) si definitivamente la cría es todavía más grande (mayor de 24 horas) el suplemento pasivo de anticuerpos, debe

ser dado en forma de plasma administrado intravenosamente. Otra vez el donador del plasma debe ser escogido basándose en la tipificación sanguínea, debiendo estar libre de anticuerpos para los eritrocitos del potro. Si la tipificación sanguínea no ha sido hecha para identificar a los posibles donadores, un potro de un año o un semental que nunca haya recibido alguna transfusión es el que se puede escoger o bien, se recomienda usar algún animal de la raza Ponny Shetland debido a la baja frecuencia de los antígenos Aa y Qa. Es importante asegurarse que el plasma a transfundirse esta libre de eritrocitos ya que de otra manera, algunos antígenos extraños pueden ser introducidos dentro del receptor al realizarla, lo que puede resultar en una sensibilización del potro a esos antígenos extraños con lo que se incrementa el riesgo por la predisposición de una reacción del potro cuando se realiza una segunda transfusión, haciendo posible la presencia de IN. Aunque existe controversia respecto de la eficacia de las transfusiones de plasma en la reducción de la probabilidad de septicemia o infecciones.

Para maximizar la eficacia de este tratamiento, el plasma debe tener una concentración de IgG mínima de 15 g/litro, y si es posible, el plasma debe ser de la madre, pero si otros donadores son requeridos debido a una incompatibilidad sanguínea con su cría o a una baja concentración de IgG, entonces el donador de preferencia debe haber estado expuesto al mismo medio ambiente al que el potro se encontrará después de su nacimiento. Un donador es seleccionado después de la aplicación de algunas pruebas para detectar incompatibilidad con el receptor, además de una adecuada concentración de IgG; la metodología en términos generales es la siguiente: a) la piel sobre la vena yugular es rasurada y preparada con jabón quirúrgico y una pequeña inyección de anestésico local es colocado subcutáneamente; b) la sangre es colectada en bolsas de colección de 450 ml, conteniendo un anticoagulante como dextrosa o el citrato. Cuatro bolsas de este tipo proveen 1 litro de plasma; c) las bolsas llenas o son centrifugadas en una centrífuga a 200 gravedades por 12 minutos o se les ponen fijas en reposo por un buen tiempo, hasta que se separe el plasma del paquete celular sanguíneo; d) posteriormente, este plasma es drenado hacia una bolsa de las que se utilizan para transfusión sanguínea, el tiempo para retirar el plasma para la transfusión debe ser

mínimo (menos de dos horas) con el fin de aumentar la cantidad de complemento y otras sustancias inestables en los componentes del plasma; e) el potro debe ser sujetado en una posición de descanso, y también se debe realizar una preparación de la zona de su yugular; posteriormente, un catéter adecuado para el potro (aguja del 16 y dos pulgadas de largo) es colocado en su vena y el plasma administrado vía sanguínea manteniendo una filtración de la misma. El rango de transfusión al inicio debe ser lento (cerca de 60 gotas por minuto) y el ritmo cardíaco y respiratorio, así como las membranas mucosas monitoreadas constantemente. Si ninguna reacción adversa ocurre el rango de transfusión puede ser aumentado a cerca de 1 litro cada 20 minutos. Si se presentan signos de una reacción adversa, por ejemplo, aumento inexplicable en el ritmo cardíaco y/o respiratorio, tremor muscular o signos de estrés, entonces la transfusión debe ser suspendida hasta que estos signos terminen. La transfusión debe ser iniciada a un ritmo más lento. La colección de muestras sanguíneas repetidas debe ser hecho para medir la concentración de IgG en el potro, hasta que esta sea la deseada. ^(2,3,6,8,9,23,49,50,130,140) McGuire, *et al*, (1977) ⁽⁷⁷⁾ considera que una concentración de 4 g/litro es adecuada, aunque un nivel de 8 g/litro es considerado más aceptable en un potro enfermo o de alto riesgo. Sin embargo, esta es una decisión arbitraria, la cual varía de acuerdo a la opinión clínica y a la experiencia. Cuando se presentan eventos de una reacción anafiláctica, se debe administrar epinefrina en una dosis de 0.01 mg/kg de peso corporal a una dilución de 1:1000 subcutáneamente o 0.01 mg/kg de peso corporal de una dilución de 1:10,000, intravenosa. También se debe aplicar profilácticamente flumixin meglubine a una dosis de 0.25 mg/kg de peso, para reducir la incidencia de efectos colaterales. ⁽¹³⁰⁾

La incidencia de los eventos de la "Falla de la transferencia pasiva" es posible reducirla con un manejo cuidadoso. El uso de plasma de un donador cuidadosamente seleccionado para ser transfundido es un buen tratamiento, aunque su eficacia requiere de otras evaluaciones. ⁽¹³⁰⁾

3.16.5. Inmunosupresión mediada por anticuerpos.

Las mujeres generalmente desarrollan anticuerpos contra los antígenos ABO ubicados en la membrana celular de los eritrocitos de sus esposos, siendo mucho menos probable que lleguen a ser sensibilizadas por el antígeno Rh, (antígeno más importante) responsable de la "Eritroblastosis fetal" de los infantes. ^(102,127) Thomson, *et al*, (1990) citado por McClure, (1997) ⁽¹²⁶⁾ menciona que "a las mujeres que desarrollan anticuerpos contra el factor Rh, estos les son dados profilácticamente para acelerar la remoción de cualquier eritrocito fetal incompatible. El procedimiento consiste en administrar a la madre Rh-, un anti-D (el anticuerpo Rh más comúnmente encontrado y preparado en voluntarias), tan rápidamente como sea posible inmediatamente después del parto de un feto Rh⁺, por lo cual cualquier eritrocito de origen fetal presente en la circulación será destruido, estando la madre prevenida para iniciar una isoimmunización". Esta vacuna ha eliminado efectivamente muchos nuevos casos de esta enfermedad en los infantes. Pero este procedimiento no puede ser aplicado en los caballos, ya que el feto no es afectado en el útero. ^(2,102)

Con respecto a los animales (yeguas) como anteriormente se mencionó, cuando los anticuerpos anti-Ca, estuvieron presentes en el suero de las yeguas Aa-, éstas fueron menos propensas a formar anticuerpos anti-Aa (causantes de IN), que las yeguas sin anticuerpos anti-Ca (3.8% contra 15.8%). ⁽¹⁰²⁾ Este y otros estudios sugieren que es posible desarrollar una inmunización en las yeguas (Aa-) que se prevé formarán anticuerpos contra algunos antígenos (Aa). Siguiendo el modelo realizado en los humanos, es probable que los casos de IN debidos a una sensibilización por el antígeno Aa, puede ser prevenida usando una inmunización en las yeguas con un concentrado de antiglobulinas contra el antígeno Aa, inmediatamente después del parto. Por otro lado, los estudios recientes de la ocurrencia de producción de anticuerpos anti-Ca naturales sugieren que tal estrategia puede ser aplicada en los caballos sobre todo en las gestaciones de yeguas que están en alto riesgo por ser Aa- o en las gestaciones de yeguas para la producción de mulas, donde la proporción de gestaciones incompatibles es total. Esta inmunización

prevendrá que las yeguas monten una respuesta inmune primaria respondiendo al antígeno. Aunque finalmente esta estrategia de "Supresión mediada por anticuerpos" en los caballos no se ha implementado, por lo que hasta entonces, el programa de pruebas descrito anteriormente, ayudará al veterinario a identificar las yeguas que se encuentran en riesgo y prevenir que el potro desarrolle IN. ^(38,102,126)

IV. **Material y métodos.**

4.1. **Localización.** El trabajo de campo de esta investigación se realizó en el Criadero Militar de Ganado en Santa Gertrudis, Chihuahua, localizado en el kilómetro 32 de la carretera Delicias-Naica, en el Municipio de Saucillo, Chihuahua. La latitud es 27° 41' y longitud es 105° 10', con una altura sobre el nivel del mar de 1,250 metros. El criadero pertenece al Ejército Mexicano, y colinda al norte con el Municipio de Rosales, al este con los Municipios de Saucillo y San Francisco de Conchos, al sur con el Municipio de Valle de Zaragoza, y al oeste con el Municipio de Rosales y Valle de Zaragoza; la orografía que presenta es principalmente grandes llanos y pequeñas lomerías; el clima es representativo del Estado, que va desde el seco templado, pasando por semiseco templado hasta muy seco semicálido; la temperatura anual varía mucho a lo largo del año, la mínima puede ser de menos de 0 C, la media de 19.4 C y la alta de 40.3 C; la precipitación promedio anual es de 363.5 mm, con 252 días libres de heladas; la infraestructura para el transporte está representada por una carretera asfaltada y por caminos rurales y vecinales compuesta principalmente por caminos de terracería de tercer orden, los cuales comunican al poblado de Naica con el casco de la hacienda en el primer caso, y esta con cada una de las diferentes estancias en el segundo caso.

En cuanto a la población humana constante, el criadero presenta un asentamiento humano de aproximadamente 2000 personas. Actualmente tiene divisiones internas para la construcción de praderas denominadas "Estancias" contando con 18 de ellas, cuya extensión va desde 8,000 hasta 15,000 hectáreas. La colecta de muestras se realizó en la Estancia "El Soldado", la cual cuenta con corrales de manejo, bebedero, comederos y sombreaderos.

4.2. **Desarrollo del trabajo.** El trabajo de campo se inició en diciembre de 1992 y se terminó en diciembre de 1993, realizándose 4 muestreos con un intermedio de tres meses entre cada muestreo. Para los muestreos se utilizó una manada de 245 potrancas nacidas en este criadero, por lo cual se les ha denominado "criollas", de las cuales se tiene la certeza de que nunca habían tenido contacto sexual con

burros, ni habían parido algún potro equino. Cabe mencionar que la totalidad de estas yeguas fue dedicada exclusivamente a la reproducción con burros desde el principio de su etapa reproductiva en el año de 1991. Estos animales están identificados por medio de unas marcas hechas con un fierro caliente en dos regiones anatómicas: a) el número del herradero en la región de los glúteos (punta del anca) y b) el año de nacimiento en la región masetérica del lado izquierdo. Al iniciar el trabajo las potrancas tenían una edad aproximada de 4.5 años, con 380 a 450 kg de peso, diferentes pelajes y una alzada promedio de 1.55 mt. (cuadro 9) Las potrancas fueron montadas y gestadas por un grupo de 10 burros, de raza catalana, con un peso de 350-400 kg y una edad promedio de 4 años. Este ganado se encontraba en su totalidad en estado de libre pastoreo, permaneciendo durante todo el año en un potrero de aproximadamente 9,000 hectáreas. La extensión del terreno y la cantidad de semovientes hicieron que un manejo adecuado fuese imposible, provocando con esto muy poca mansedumbre, lo cual exigió un trabajo más intenso para trabajar con ellas. En este lugar se llevó a cabo todo el ciclo reproductivo (monta, gestación, parto, crianza, hasta el destete de la cría), para nuevamente iniciar el ciclo reproductivo del año siguiente. Como se observa en el Cuadro 9, la muestra de estudio quedó conformada por 245 yeguas, de estas, la mayoría (68.2%) tenía cuatro años de edad, casi una cuarta parte (25.3%) contaban con cinco años, y el resto (1.2 y 5.3%) de tres o menos y de seis o más años de edad respectivamente. El promedio de edad de toda la muestra fue de 4.47 años con una desviación estándar de 1.16.

Cuadro 9. Características del tamaño de muestra incluida en el estudio distribuida por edad.

Edad en años	Número	Por ciento
< 3	3	1.2
4	167	68.2
5	62	25.3
≥ 6	13	5.3
Total	245	100.0

La alimentación de los animales fue exclusivamente por medio de pastoreo, en donde dominan los pastizales de zacates propios de la región: **toboso *Hilaria mutica***, **navajita *Boutelouca gracilis***, **banderilla *Boutelouca curtipendula***; además de contar con matorrales como: **Chamizo o costilla de vaca *Atriplex canescens***, **Guajillo *Acacia macrostachya***, y **mesquites *Prosopis laevis***, además de sus frutos. Contando con agua en forma permanente por medio de dos pozos. Se realizaron solamente 2 desparasitaciones en forma oral al año con 30 g de neguvón y 60 g de piperacina.

- A. **Antes de realizar el primer muestreo se abrió un registro de cada yegua donde en se anotó:**
- a. Identificación de la yegua.
 - b. Edad de la yegua.
 - c. Cantidad de preñeces previas.
 - d) Número de partos previos.
- B. **Durante el estudio al presentarse los partos se anotó:**
- a. Identificación del muleto.
 - b. Fecha y datos del nacimiento del muleto.
 - c. Presencia de ictericia, palidez o depresión dentro de los primeros días, y otros problemas clínicos neonatales.
- 4.3. **Método para probar los anticuerpos hemolíticos contra los eritrocitos del potro en el suero de las yeguas.**

Para la evaluación serológica se obtuvieron 4 muestreos sanguíneos en tubos "Vacutainer" al alto vacío por punción de la yugular del lado izquierdo, obteniéndose 10 ml de sangre sin anticoagulante de cada una de las yeguas, que sería usada como fuente de suero, y otros 10 ml de sangre completa con citrato de ácido-dextrosa (ACD) como anticoagulante, que sería usada como fuente de eritrocitos. Las muestras fueron guardadas en refrigeración en México hasta su

traslado al laboratorio del Inmunogenética Equina del Departamento de Ciencias Clínicas de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Estatal de Luisiana, EUA, en donde posteriormente de su llegada se refrigeraron de nueva cuenta. Al iniciarse las pruebas, la sangre sin anticoagulante fue dejada a temperatura ambiente y se separó el suero, el cual se mantuvo en congelación a -20 C, hasta la realización de las pruebas, las muestras con anticoagulante fueron centrifugadas para la separación del plasma, refrigerándose también hasta su examen. Por la dificultad del manejo de los animales (yeguas y crías), como son: grandes extensiones de tierra (para llegar al corral se requería un recorrido de aproximadamente 15 km), casi nula domesticación, sequía prolongada, pobre estado fisiológico (demasiado delgadas), además de que algunas se encontraban con crías demasiado pequeñas para caminar, no siempre fue posible realizar los cuatro muestreos a cada uno de los animales durante todo el año de muestreo.

A. Los procedimientos inmunológicos para la determinación de los títulos de los anticuerpos contra el “Antígeno burro” comprendieron glutinación y hemólisis, usando las pruebas de “Aglutinación salina estándar” y la de “Hemólisis mediada por complemento de conejo”, descritas por Stormont, *at al*, (1964).⁽⁵⁷⁾ Ambas pruebas se desarrollaron a temperatura ambiente y en forma simultánea de la siguiente manera:

- a. Se hizo una solución salina buferada al 3% de los eritrocitos de las muestras (SSB).
- b. Se prepararon dos diluciones (1:2 y 1:16) del suero de cada una de las yeguas en solución (SSB).
- c. Se colocaron dos gotas de suero (cada gota era de aproximadamente 0.25 μ l, siendo adicionados todos los reactivos con pipeta Pasteur) de cada dilución por sextuplicado en placas de microtitulación; utilizando para ello una serie de 6 pozos consecutivos, por lo que las dos diluciones ocuparon una serie completa de 12 pozos. Las placas

tienen 96 pozos por lo que cada placa puede acomodar el suero de 8 yeguas, esta placa se utilizó para el ensayo de aglutinación y se preparó otra idéntica para ser utilizada en el ensayo hemolítico. Las placas fueron congeladas a -20 C , si no se utilizaban el día de la dilución. Se incluyó un control con solución salina sola para asegurarse que los eritrocitos eran aún viables y se agregó complemento de conejo, para comprobar que éste solo no hemolisa a los eritrocitos; también se incluyó un antisuero del cual se conoce que hemolisa algunos de los eritrocitos probados (tales como un antisuero anti-A), como un control positivo para asegurarse que el complemento está trabajando y que las condiciones de la prueba son las correctas.

- d. Para probar los anticuerpos contra el "Antígeno burro" de los eritrocitos, se utilizó un grupo de al menos 10 donadores utilizados para proveer los antígenos. La sangre de estos animales fue colectada por venopunción de la vena yugular y colocada en tubos "Vacutainer" al alto vacío con anticoagulante ácido-citrato-dextrosa (ACD). Cien μl de la mezcla de los eritrocitos fueron removidos del total de la muestra sanguínea y lavados 2 veces con solución salina buferada fosfatada (0.15 ml NaCl, pH 7.2), para remover los anticuerpos del suero. Los eritrocitos lavados fueron suspendidos en concentraciones de 0.2% para utilizarse en las pruebas de aglutinación y hemólisis.
- e. Para la prueba de hemólisis, se adicionó una gota de complemento de conejo a cada una de los pozos que tenía las dos gotas del suero, y posteriormente se agregó una gota de los eritrocitos proveniente de los donadores a cada uno de los pozos. La razón de agregar el complemento antes de los eritrocitos fue permitir a la lisis una mejor oportunidad de competir con la aglutinación, porque la mayoría de los antisueros y de los reactivos de tipificación sanguínea preparados de ellos, exhiben una actividad de aglutinación. Para la prueba de aglutinación no se adicionó complemento de conejo a uno de los

pozos que tenía las dos gotas del suero, agregando solamente una gota de los eritrocitos proveniente de los animales donadores a cada uno de los pozos.

- f. Posteriormente se agitaron las placas de microtitulación con las muestras, tratando de mezclar los eritrocitos, el suero y el complemento. Después de 60 minutos para hemólisis y de 120 minutos para aglutinación, las placas fueron evaluadas visualmente, para esto se leyó cada placa usando un espejo y se evaluó primeramente la cantidad de hemólisis que había ocurrido en cada uno de los pozos. La reacción es leída visualmente y estimada por el tamaño del botón de células separadas y el grado de hemólisis aparente en el sobrenadante. Nada de hemólisis es leído como cero; un 25% de hemólisis como 1; 50% de hemólisis como un 2; casi una completa hemólisis como un 3 y una completa hemólisis como un 4. La misma evaluación se hizo para la prueba de aglutinación.
- g. Después de la primera lectura, las placas de microtitulación se agitaron otra vez y se leyó una hora después.
- h. La presencia de títulos de anticuerpos contra el "Antígeno burro" de los eritrocitos de las donadores (yeguas dedicadas a la producción de híbridos) fue evidencia de previa sensibilización durante la preñez, en la ausencia de historias de transfusiones sanguíneas. Se consideró positivo (actividad hemolítica o de aglutinación) a una yegua cuando presentaba una reacción de 1:2 o más en ambas pruebas.

B. Para lograr los objetivos planteados en los respecta al análisis del porcentaje de yeguas sensibilizadas, momento de sensibilización y comportamiento de los anticuerpos contra el "Antígeno burro": se aplicó la siguiente metodología

- a. Se determinó el porcentaje de yeguas dedicadas a la producción de híbridos sin gestación y gestantes (de acuerdo al número de

- gestaciones) que presentaron reacción positiva en general (hemólisis, aglutinación y hemólisis o solamente aglutinación). Comparándose estos porcentajes por medio de la prueba estadística χ^2 .
- b. Se determinó el momento de sensibilización durante los cuatro muestreos en las yeguas gestantes (de primera y segunda gestación) de un potro mula. Comparándose las medias obtenidas por medio de la prueba estadística de χ^2 (con corrección de Yates). También se comparó entre sí la proporción de las yeguas gestantes a diferentes trimestre de gestación que mostraron reacción positiva a hemólisis y a aglutinación en ambas diluciones, por medio de la prueba estadística z.
 - c. Se determinó el comportamiento de la producción de los anticuerpos contra el "Antígeno burro" en las yeguas sin gestación y gestantes sensibilizadas. Para ello se identificaron e hicieron comparaciones entre todas las yeguas que durante el primer muestreo dieron resultados positivos a hemólisis y a aglutinación, y que en los subsecuentes muestreos dieron resultados diferentes (disminuyendo la concentración o dando negativos). Realizándose lo mismo con las yeguas que presentaron esta condición a partir del segundo muestreo. Para las comparaciones se utilizó la prueba estadística Análisis de varianza en dos direcciones por rangos de Friedman.
 - d. De las yeguas sin gestación y gestantes que presentaron reacción positiva, se determinó el comportamiento de los anticuerpos contra el "Antígeno burro", esto es si fue como hemólisis, aglutinación y hemólisis o solamente aglutinación. Para esto se utilizó la prueba estadística z.
 - e. Se detectó y comparó el porcentaje de yeguas que fueron positivas durante la gestación y continuaban positivas después del parto, para ver el tiempo en que desaparecía la sensibilización. Utilizándose también la prueba estadística z.

Nota. Para todas la pruebas estadísticas utilizadas, se estableció como diferencia significativa si $p < 0.05$.

C. Para lograr los objetivos planteados en los que a la presencia de Isoeritrólisis neonatal y mortalidad en los potros mulas, se aplicó la siguiente metodología:

- a. Se realizó un estudio retrospectivo para determinar la tasa de fertilidad de las yeguas de vientre y la tasa de mortalidad de los potros mulas por ciclo reproductivo y en total.
- b. Se realizó un estudio retrospectivo para detectar a las yeguas positivas o no, madres de los potros muertos. También los archivos clínicos de dichos fueron revisados para determinar la causa de su fallecimiento, así como la prevalencia e incidencia de Isoeritrólisis neonatal en los potros mulas que conformaban la muestra en estudio.

V. Resultados.

A. Porcentaje de yeguas dedicadas a la producción de híbridos sensibilizadas.

El Cuadro 10, muestra que un total de 96 yeguas fueron identificadas como rectoras positivas al "Antígeno burro" durante los cuatro muestreos, lo que representa un 39.2% de las 245 yeguas evaluadas. Como puede observarse, la proporción de yeguas positivas no fue significativamente diferente en las yeguas que nunca gestaron 29 de 82 (35.4%) con respecto de aquellas que tuvieron una o más gestaciones 67 de 163 (41.10%). [$p > 0.05$]

Cuadro 10. Yeguas con reacción positiva y negativa durante los cuatro muestreos.

Número de Gestaciones	Positivas		Negativas		Total	
	No.	%	No.	%	No.	%
Sin gestación	29	35.4	53	64.6	82	100
1	52	40.3	77	59.7	129	100
2	13	46.4	15	53.6	28	100
3	2	33.3	4	66.7	6	100
Total	96	39.2	149	60.8	245	100

Nota: Aquí se tomaron en cuenta a todas las yeguas que nunca presentaron una gestación, así como aquellas que alguna vez estuvieron gestantes y que mostraron sensibilización durante uno o más de los cuatro muestreos.

B. Momento de sensibilización de las yeguas gestantes de un potro mula.

En el Cuadro 11, observamos que en las yeguas que durante los cuatro muestreos fueron detectadas gestantes, el promedio general de días en que aparece la reacción positiva tanto a hemólisis como aglutinación es de 224.5 con una desviación estándar de 97.28 y un intervalo de 196 a 253 días. Para las

yeguas de primera gestación dicho intervalo fue de los 237 a 280 días, mientras que para las yeguas de segunda gestación pueden presentar sensibilización entre los 53 y 224 días de gestación, todo esto con un intervalo de confianza del 95%.

Cuadro 11. Yeguas detectadas en estado de gestación de acuerdo al número de días en que dieron resultados positivos (hemólisis y/o aglutinación).

	Número de gestación			
	Primera	Segunda	Tercera	Total
N	32	12	1	45
Promedio	258.75	138.50	161	224.51
Desv. est.	61.76	151.58	-	97.28
Moda	259	3	-	259
Mediana	259	121	-	247
Intervalo de confianza 95%	237 - 280	53 - 224	-	196 - 253

Nota: Aquí se tomaron todas las yeguas sensibilizadas que durante el momento exacto de alguno de los cuatro muestreos, específicamente se encontraban gestantes y se desecharon las yeguas sensibilizadas no gestantes.

En el Cuadro 12, se observa que las yeguas que cursaban con su primera gestación presentaron una media de 258.75 días en que se detectaron resultados positivos, mientras que las que cursaban con una segunda gestación fue de solo 138.5 días. Encontrando una diferencia estadísticamente significativa entre ellas.
($p < 0.05$)

Cuadro 12. Diferencia entre las yeguas de primera y segunda gestación en dar resultados positivos.

Valores	Primera gestación	Segunda gestación	Total
Sobre la mediana	19	2	21
Igual o menor a la mediana	13	10	23
Total	32	12	44

Nota: Aquí se tomaron en cuenta solamente a las yeguas sensibilizadas que durante el momento exacto de alguno de los cuatro muestreos, se encontraban gestantes y se desecharon las yeguas sensibilizadas no gestantes, así como la yegua de tercera gestación.

En el Cuadro 13, se observa que durante el primer trimestre de la gestación solamente el 7.69% de las yeguas dieron resultados positivos a la prueba de

hemólisis. La incidencia aumentó durante el segundo trimestre (9.75%), llegando a su máximo (17.39%) durante el tercer trimestre de la gestación, y en el cuarto trimestre, se mantuvo estable (16.66%). Independientemente del trimestre de la gestación, aproximadamente la mitad de las reacciones positivas se obtuvieron con una dilución de 1/2 y la otra mitad con una dilución de 1/16. Encontrando una diferencia estadísticamente significativa solamente entre el segundo y tercer trimestre de la gestación. ($p < 0.05$)

Cuadro 13. Incidencia de resultados positivos utilizando la prueba de hemólisis en diferente trimestre de la gestación.

Trimestre de gestación	Yeguas muestreadas	Negativas	Positivas a 1/2	Positivas a 1/16	Total positivas
1°. (1-90 días)	39	36	1	2	3 (7.69%)
2°. (91-180 días)	82	74	5	3	8 (9.75%)
3°. (181-270 días)	138	114	10	14	24(17.39%)
4°. (270 o más días)	42	35	4	3	7 (16.66%)
Total	301	259	20	22	42 13.95%

Nota: Aquí algunas yeguas se contabilizaron una o más veces por haber presentado una o más gestaciones durante el tiempo transcurrido entre los cuatro muestreos.

En el Cuadro 14, se observa que la incidencia detectada por medio de la prueba de aglutinación fue muy baja en todos los trimestres de la gestación, notándose solamente un ligero incremento en el cuarto trimestre. Encontrando una diferencia estadísticamente significativa entre el tercer y cuarto trimestre de gestación. ($p < 0.05$)

Cuadro 14. Incidencia de resultados positivos utilizando la prueba de aglutinación en diferente trimestre de la gestación.

Trimestre de gestación	Yeguas muestreadas	Negativas	Positivas a 1/2	Positivas a 1/16	Total de positivas
1 ^{er} (1-90 días)	36	34	1	1	2 (5.5%)
2 ^a (91-180 días)	82	80	2	-	2 (2.43%)
3 ^a (181-270 días)	129	128	1	-	1 (0.77%)
4 ^a (270 o más días)	51	46	3	2	5 (9.80%)
Total	298	288	7	3	10 (3.5%)

Nota: Aquí algunas yeguas se contabilizaron una o más veces por haber presentado una o más gestaciones durante el tiempo transcurrido entre los cuatro muestreos.

C. Comportamiento de los anticuerpos contra el “Antígeno burro” en las yeguas sensibilizadas.

En el Cuadro 15, podemos observar que con el objeto de determinar si una vez desarrollados títulos positivos estos se mantienen durante varios meses o se reducen rápidamente, se procedió a identificar a las yeguas que durante el primer muestreo dieron resultados positivos a hemólisis y en los subsecuentes muestreos presentaron resultados diferentes, ya sea disminuyendo la concentración o simplemente dieron resultados negativos, detectándose 42 yeguas. Encontrando que el comportamiento de los resultados positivos a hemólisis en el primer muestreo es diferente estadísticamente de los resultados observados en los subsecuentes muestreos, es decir que en su mayoría tendieron a dar resultados negativos en los posteriores muestreos. ^(p < 0.05)

Cuadro 15. Yeguas que presentaron resultados positivos a hemólisis en el primer muestreo en comparación con los resultados de los muestreos subsecuentes.

No.	Mat. yegua	1 ^{er} muestreo	2 ^o muestreo	3 ^o muestreo	4 ^o muestreo
1	2/80	1/16	-	-	-
2	9/88	1/16	1/2	1/16	-
3	10/88	1/16	-	-	-
4	16/88	1/16	-	-	-
5	22/88	1/16	-	-	-
6	25/88	1/16	-	1/2	-
7	27/88	1/16	-	-	-
8	34/88	1/2	-	-	-
9	43/88	1/16	-	1/2	-
10	53/83	1/16	-	1/16	-
11	65/88	1/16	-	-	-
12	70/88	1/16	-	-	-
13	71/87	1/16	1/2	-	-
14	71/88	1/16	-	-	-
15	79/88	1/16	-	-	-
16	80/87	1/16	-	-	-
17	87/88	1/16	-	-	-
18	89/88	1/16	-	-	-
19	109/88	1/16	-	-	-
20	114/88	1/16	1/16	-	-
21	116/88	1/16	1/16	-	-
22	129/87	1/16	-	-	-
23	147/87	1/16	-	-	-
24	149/86	1/16	-	1/2	-
25	188/88	1/2	-	1/16	-
26	207/88	1/2	1/2	1/2	1/2
27	213/88	1/2	1/16	-	-
28	220/88	1/2	-	-	-
29	235/88	1/16	-	-	-
30	236/88	1/16	-	-	-
31	237/88	1/16	-	-	-
32	282/88	1/16	-	-	-
33	286/87	1/16	-	-	-
34	288/88	1/16	-	-	-
35	290/88	1/2	-	-	-
36	291/87	1/16	-	-	1/2
37	337/88	1/2	-	1/2	-
38	335/87	1/2	-	1/16	-
39	355/87	1/2	-	1/16	-
40	372/88	1/2	-	-	-
41	391/88	1/16	-	-	1/16
42	400/88	1/2	1/16	1/2	-

Nota: Aquí se tomaron en cuenta a todas las yeguas sensibilizadas sin importar si estaban vacías, gestantes o su número de gestación.

En el Cuadro 16, tenemos que posteriormente se seleccionó otro grupo de 24 yeguas que dieron resultados negativos en el primer muestreo pero positivos a hemólisis en el segundo muestreo, pero que también en los restante muestreos presentaron resultados diferentes, ya sea disminuyendo la concentración o dando resultados negativos. Encontrando que también la tendencia es presentar resultados negativos en los muestreos subsecuentes. ($p < 0.05$)

Cuadro 16. Yeguas que presentaron resultados positivos a hemólisis en el segundo muestreo en comparación con los resultados de los muestreos subsecuentes.

No prog.	Yegua	2 ^º muestreo	3 ^º muestreo	4 ^º muestreo
1	20/87	1/16	-	-
2	110/88	1/16	-	-
3	119/88	1/2	-	1/16
4	123/87	1/2	-	1/2
5	172/88	1/2	-	-
6	198/87	1/2	-	-
7	216/88	1/2	1/16	-
8	266/88	1/16	-	-
9	267/88	1/16	-	-
10	268/88	1/16	-	-
11	275/88	1/16	1/2	-
12	285/88	1/16	-	-
13	298/88	1/16	-	-
14	300/87	1/16	1/16	-
15	308/88	1/16	1/2	1/2
16	302/88	1/16	-	-
17	327/88	1/16	-	-
18	347/88	1/2	-	-
19	364/88	1/16	-	-
20	375/88	1/2	1/2	-
21	377/88	1/16	-	-
22	378/88	1/2	-	-
23	387/88	1/2	1/2	-
24	399/88	1/16	1/2	-

Nota: Aquí se tomaron en cuenta a todas las yeguas sensibilizadas sin importar si estaban vacías, gestantes o su número de gestación.

En el Cuadro 17, observamos a que las yeguas que durante el primer muestreo dieron resultados positivos a aglutinación y en los subsecuentes muestreos presentaron resultados diferentes, ya sea disminuyendo la concentración o simplemente dieron resultados negativos, fueron solamente 6 yeguas. Encontrando que el comportamiento de los resultados positivos a aglutinación en el primer muestreo es diferente de los observados en los subsecuentes muestreos, es decir que también tendieron a dar resultados negativos en los posteriores muestreos. ($p < 0.05$)

Cuadro 17. Yeguas que presentaron resultados positivos a aglutinación en el primer muestreo en comparación con los resultados de los muestreos subsecuentes.

No.	Yegua	1 ^{er} muestreo	2 ^o muestreo	3 ^o muestreo	4 ^o muestreo
1	87/87	1/2	-	-	-
2	157/87	1/2	-	-	-
3	163/87	1/16	-	-	-
4	290/88	1/2	-	-	-
5	294/88	1/2	-	-	-
6	391/88	1/2	-	-	-

Nota: Aquí se tomaron en cuenta a todas las yeguas sensibilizadas sin importar si estaban vacías, gestantes o su número de gestación.

En el Cuadro 18, observamos que posteriormente se seleccionó un grupo de 15 yeguas que dieron resultados negativos en el primer muestreo pero positivos a aglutinación en el segundo muestreo, pero que en los restante muestreos presentaron resultados diferentes, ya sea disminuyendo la concentración o dando resultados negativos. Encontrando que también la tendencia es presentar resultados negativos en los muestreos subsecuentes. ($p < 0.05$)

Cuadro 18. Yeguas que presentaron resultados positivos a aglutinación en el segundo muestreo en comparación con los resultados en los muestreos subsecuentes.

No. prog.	Yegua	2 ^o muestreo	3 ^o muestreo	4 ^o muestreo
1	5/88	1/16	-	-
2	9/88	1/16	-	-
3	20/89	1/2	-	1/2
4	70/88	2	-	-
5	119/88	1/16	-	1/2
6	207/88	1/2	1/2	-
7	268/88	1/2	-	-
8	296/87	1/2	-	-
9	300/87	1/2	-	-
10	302/88	1/2	-	-
11	327/87	1/2	-	-
12	327/88	1/2	-	-
13	347/88	1/2	-	-
14	364/88	1/16	1/16	-
15	400/88	1/16	-	-

Nota: Aquí se tomaron en cuenta a todas las yeguas sensibilizadas sin importar si estaban vacías, gestantes o su número de gestación.

D. Hemólisis contra aglutinación.

Como se muestra en el Cuadro 19, la prueba de hemólisis resultó más sensible que la de aglutinación, ya que la mayoría 68 (70.8%) de los casos positivos fueron detectados por la prueba de hemólisis, mientras que 23 (24%) casos fueron por hemólisis y aglutinación, y solamente 5 (5.2%) de los casos positivos fueron detectados solamente por la prueba de aglutinación. Encontrando que hay una diferencia estadísticamente significativa al comparar estas proporciones. ($p < 0.05$)

Cuadro 19. Clasificación de las yeguas positivas de acuerdo a la prueba mediante la cual fueron diagnosticadas.

Número de gestación	Hemólisis		Hemólisis/Aglutinación		Aglutinación		Total	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Sin gestación	26	89.7	3	10.3	-	-	29	100
1	33	63.5	16	30.7	3	5.8	52	100
2	7	53.8	4	30.8	2	15.4	13	100
3	2	100	-	-	-	-	2	100
Total	68	70.8	23	24.0	5	5.2	96	100

E. Comportamiento de los anticuerpos contra el "Antígeno burro" en las yeguas paridas de una gestación con un potro mula.

En el Cuadro 20, observamos que se procedió a la detección de yeguas que durante su gestación fueron identificadas como positivas, para conocer si una vez paridas siguen presentando una reacción positiva (hemólisis, hemólisis y aglutinación o solamente aglutinación), y hasta cuando es el tiempo máximo de dicha presencia de anticuerpos, en caso de que estos se presenten. Encontrando a 38 yeguas que siguieron presentando reacción positiva después del parto, de las cuales 15 (39.5%) yeguas presentaron reacción positiva entre 1 y 90 días de paridas, 11 (28.9%) yeguas entre los 91 y 180 días, 8 (21.1%) yeguas entre 180 y 270 días, y solamente 4 (10.5%) presentaron reacción positiva a los 271 o más días después de paridas. Existiendo una diferencia estadísticamente significativa solamente entre el primero y el cuarto trimestre de paridas, ya que en los trimestres intermedios se presentó una disminución gradual no significativa entre ellos. $p < 0.05$)

Cuadro 20. Yeguas que presentaron reacción positiva a hemólisis y/o aglutinación según número de días posteriores al parto de un potro mula.

Días de parida	Reacción positiva						Total	
	Hemólisis		Aglutinación		Hemólisis y Aglutinación			
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
1 a 90	8	42.1	3	30	4	44.4	15	39.5
91 a 180	6	31.6	3	30	2	22.2	11	28.9
181 a 270	3	15.8	3	30	2	22.2	8	21.1
271 o más	2	10.5	1	10	1	11.1	4	10.5
Total	19	100	10	100	9	100	38	100

F. Presencia de Isoeritrólisis neonatal y mortalidad en los potros mulas.

En el Cuadro 21, tenemos que en lo referente a los 200 nacimientos de muletos registrados durante los tres ciclos reproductivos considerados (91/92, 92/93 y 93/94), se pudo observar que durante 1993 se presentó el mayor número de ellos con 104, en contraparte con los registrados en 1992 con 32 y los ocurridos en 1994 con 62 nacimientos. La tasa de fertilidad (número de nacimientos durante el periodo de estudio entre número de yeguas en edad fértil incluidas en el estudio) fue de 27.21% y la tasa de mortalidad en los muletos (número de muletos muertos entre el total de nacimientos durante los ciclos reproductivos mencionados), fue de 3.0%.

Cuadro 21. Número de nacimientos y defunciones de muletos registrados por año.

Año	Nacimientos	Tasa de fertilidad por 100	Mortalidad	Tasa de mortalidad por 100
1992	32	13.06	1	3.12
1993	104	42.44	2	1.92
1994	64	26.12	3	4.68
Total	200	27.21	6	3.00

El Cuadro 22, muestra lo que respecta a las causas de muerte de los potros mulas durante los tres ciclos reproductivos (91/92 = 1, 92/93 = 2 y 93/94 = 3), se pueden observar que ningún potro mula recién nacido murió a consecuencia de la enfermedad Isoeritrólisis neonatal, al menos durante este periodo, según del diagnóstico realizado por el personal médico veterinario del criadero, y avalado por el hecho de que la mayoría de las yeguas (matrículas 266/87, 147/88, 24/88 y 336/88) que parieron a estos potros mulas dieron resultados negativos a hemólisis y aglutinación, y solamente dos de ellas (matrículas: 198/87 y 336/88) dieron resultados positivos a hemólisis (1/2) durante el segundo muestreo, pero no continuaron con su sensibilización y producción de anticuerpos según lo muestran los resultados de las pruebas serológicas.

Cuadro 22. Datos generales de los muletos que murieron en el periodo 92-94.

Ciclo rep.	Mat. yegua	No. de la gest.	Reacción a hem. *	Reacción a aglut.*	Fecha del parto	Fecha de la muerte	Causa de la muerte
91-92	266/87	1	negativa	negativa	26/abr/92	8/jun/92	entallamiento de vísceras
92/93	147/88	1	negativa	negativa	5/4/93	9/8/93	mordedura de ofidio
	260/88	1	negativa	negativa	23/5/93	4/9/93	neumonía
93/94	24/88	2	positiva ½ solamente en el segundo muestreo	negativa en todos los muestreos	28/08/94	28/08/94	parto distócico
	198/87	2	positiva ½ solamente en el segundo muestreo	negativa en todos los muestreos	25/09/94	25/09/94	debilidad
	336/88	1	negativa	negativa	4/5/94	4/5/94	debilidad

* Reacción durante la gestación de la yegua.

VI. Discusión.

A. Porcentaje de yeguas dedicadas a la producción de híbridos sensibilizadas.

Traub-Dargatz, *et al*, (1995) ⁽¹¹⁸⁾ realizó un estudio con yeguas dedicadas a la producción de mulas que fueron montadas por un solo semental burro, en donde la totalidad de esas yeguas presentaron una producción de anticuerpos contra el "Antígeno burro". En el presente trabajo se encontró que de las 245 yeguas que representan el total de la muestra durante los tres ciclos reproductivos considerados (91/92, 92/93 y 93/94), solamente 96 (39.2%) yeguas presentaron sensibilización. La incidencia de sensibilización se mantuvo relativamente baja independientemente de si las yeguas eran de primera gestación (40.3%), de segunda gestación (46.4%) o de tercera gestación (33.3%). Cabe aclarar que aunque en esta investigación no se realizó ningún estudio para detectar la presencia del "Antígeno burro" en la población de sementales burros y potros mulas, de acuerdo a los trabajos previos de otros autores, teóricamente todos los potros mulas deben tener este antígeno, por lo que se esperaría una reacción de sensibilización en el 100% de las yeguas. ^(14,118) Por lo que los resultados sugieren que aunque el "Antígeno burro" está presente en las crías, no siempre produce una reacción de sensibilización en la yegua. Esto es confirmado por los resultados de trabajos con otros sistemas de antígenos, en los que se ha encontrado que solamente el 50% (del 2%) de las yeguas PSI y el 17% (del 22%) de las yeguas Standardbred de paso que están en riesgo por ser Aa- producen anticuerpos anti-A al estar gestantes de una cría Aa+. ⁽¹⁰²⁾ También en ésta investigación se presentó sensibilización en yeguas que aparentemente nunca estuvieron gestantes (no mostraron un potro vivo). Esto podría deberse a una exposición a eritrocitos incompatibles por una transfusión sanguínea previa o una exposición a agujas hipodérmicas contaminadas con tejidos de asnos, ya que ambas condiciones pueden inmuniza a las yeguas contra el "Antígeno burro", provocando la formación de anticuerpos. Otra posibilidad es que las yeguas hayan

tenido gestaciones no reconocidas debido a mortalidad y reabsorción del embrión o a un aborto. Es conocido el hecho de que la incidencia de mortalidad embrionaria y aborto en yeguas gestantes de burro es elevada. ⁽¹⁴²⁾ Además, las grandes extensiones en las que mantuvieron las yeguas en el presente trabajo, hacen difícil la identificación de un aborto. Debe recordarse que en el presente trabajo no se realizaron diagnósticos de gestación, sino que las fechas de gestación se calcularon retrospectivamente a partir del nacimiento. (cuadro 10)

B. Momento de sensibilización de las yeguas gestantes de un potro mula.

De acuerdo a diversos autores, los anticuerpos contra los antígenos de los eritrocitos de los caballos, usualmente hacen su aparición hasta que la gestación está avanzada. ^(3,57,66,67,126) Este incremento de los títulos de anticuerpos en el suero de una yegua inmunizada durante la última fase de la gestación, fue primero demostrada por Bruner, *et al*, (1948) ⁽⁵⁾ y Doll, *et al*, (1952). ⁽⁹⁴⁾ En el presente trabajo se confirma que la presencia de sensibilización contra el "Antígeno burro" puede presentarse desde la primera gestación en yeguas servidas con burro, tal como ha sido sugerido por otros autores, ⁽¹¹⁸⁾ y que la presencia de sensibilización es más frecuente durante el tercer y cuarto trimestre de la gestación, aunque en algunos animales se presentó desde el primer trimestre. (cuadros 11,12, 13 y 14)

C. Comportamiento de los anticuerpos contra el "Antígeno burro" en las yeguas sensibilizadas.

Tradicionalmente se ha considerado que una vez que las yeguas se han sensibilizado contra el "Antígeno burro", generalmente durante la primera gestación, esta sensibilización simplemente genera una respuesta inmune primaria, resultando en información que será guardada en la "memoria" de las células. Por lo que si en futuras gestaciones, ocurren estimulaciones antigénicas subsecuentes, estas desencadenan una reacción inmune más fuerte, la cual resulta en una elevación mucho más rápida de los anticuerpos que la ocurrida durante la inmunización

primaria, con un aumento marcado de anticuerpos antieritrocitos durante las últimas 4 semanas de gestación. ^(5,29,38,47,54,58,84,94,102) Howard y Cronin, (1955), ⁽⁶⁶⁾ hicieron una descripción de la concentración de anticuerpos en el suero de una yegua preparturienta sensibilizada por los antígenos de los eritrocitos del feto, el cual fue probado a los 20 y 12 días antes de su parto con los eritrocitos del semental que la cubrió para detección de títulos de anticuerpos, encontrando que la cantidad de anticuerpos aumentaba conforme se acercaba el momento del parto. Muchos autores han concluido que los mayores títulos de anticuerpos se producen en yeguas previamente sensibilizadas en respuesta a los mismos antígenos poco antes del parto, por lo que el mejor momento para probar si la yegua gestante está produciendo anticuerpos contra los antígenos de los eritrocitos es en el último mes de dicha gestación. ^(2,13,30,31,38,39,54,56,64,67,84,102,118,126) De la misma forma, la inyección de eritrocitos de burro a la madre de un potro mula afectado producirá una respuesta más rápida y más grande que en una yegua no servida por un burro, ya que la yegua iniciará una respuesta basada en su "memoria inmunológica". Una yegua puede responder con anticuerpos desde los 56 días posconcepción; sin embargo, el paso más grande de eritrocitos del feto hacia la madre ocurre en el último mes de gestación y durante el parto, como resultado del rompimiento de los vasos sanguíneos de la placenta. ^(5,7,15,18,47,65,66,82,83,102,123)

En el presente trabajo se encontró un resultado inesperado, ya que se observó que muchas yeguas que durante el primer muestreo dieron resultados positivos, en los subsecuentes muestreos presentaron resultados diferentes, ya sea disminuyendo la concentración o simplemente dando resultados negativos. En teoría, una vez presentada la sensibilización, esta debería mantenerse o inclusive aumentar mientras el "Antígeno burro" siga presente, como ocurre a lo largo de toda la gestación de un potro mula. La reducción o desaparición de los títulos de anticuerpos conforme avanza la gestación podría explicar el porque no se presentaron casos de IN en los potros a pesar de la relativamente alta incidencia de anticuerpos en algún momento de la gestación. (cuadros 15, 16, 17, y 18)

D. Hemólisis contra aglutinación.

Los resultados obtenidos de algunos estudios de los sistemas antigénicos en los caballos, concluyen que los anticuerpos responsables de la producción de la Isoeritrólisis neonatal en los potros equinos la mayoría de las veces actúan más como hemolisinas que como aglutininas. (3,13,32,48,54,67,67,84,87,90,91,102,120) En el presente trabajo se confirma también que las pruebas más efectivas para la identificación de la enfermedad son los ensayos hemolíticos. (cuadro 19)

E. Comportamiento de los anticuerpos contra el "Antígeno burro" en las yeguas paridas después de una gestación con un potro mula.

Respecto del comportamiento de la producción posparto de los anticuerpos contra el "Antígeno burro", según lo publicado por algunos autores los anticuerpos usualmente muestran una rápida caída en sus títulos (24 a 72 horas posparto). (3,57,66,67,126) Sin embargo, en el presente trabajo se encontraron que de las yeguas con esta característica (paridas), continuaron produciendo anticuerpos contra el "Antígeno burro", inclusive hasta el cuarto trimestre posparto (271 o más días). (cuadro 20)

F. Presencia de Isoeritrólisis neonatal y mortalidad en los potros mulas.

Los trabajos científicos publicados por una gran cantidad de investigadores, indican que en los caballos la Isoeritrólisis neonatal ocurre únicamente por ingestión y absorción de los anticuerpos contra los antígenos de los eritrocitos del recién nacido. (3,5,29,30,38,39,64,66,67,82,84,102,111) En el presente trabajo el porcentaje de mortalidad neonatal y perinatal fue muy reducido, ya que únicamente el 3 (1.5%) de los potros mulas murieron en las primeras 24 horas de vida, y otro 3 (1.5%) en los primeros tres meses de vida. Aunque en el presente estudio no se realizó ninguna prueba para determinar la concentración de inmunoglobulinas en la sangre de los potros recién nacidos, la baja mortalidad neonatal indica que en la población de

potros mulas objeto de este estudio se produjo una adecuada transferencia de inmunidad pasiva de las madres a las crías, lo que implica que el calostro tenía anticuerpos, que las crías ingirieron calostro y que la absorción de los anticuerpos fue adecuada, ya que de no haberse presentado una adecuada transferencia pasiva, el porcentaje de mortalidad en esta etapa de la vida del potro mula tan delicada, habría sido definitivamente mucha más grande que lo observado, independientemente de la patología. Destacando también el hecho de que a pesar de que cerca del 40% de las yeguas gestantes presentaron sensibilización contra el "Antígeno burro", en el presente trabajo no se presentaron casos de Isoeritrólisis neonatal. (cuadros 11, 21 y 22)

Por otro lado, generalmente se considera que la sensibilidad inicial durante la primera gestación usualmente ocurre sin complicaciones adversas para el potro, siendo la presentación de ésta enfermedad muy rara en los recién nacidos de yeguas primíparas debido a que la inmunización primaria ocurre muy tarde en la gestación, por lo que la cantidad de anticuerpos contra los eritrocitos que alcanzan a concentrarse en el calostro es insuficiente para desencadenar la IN. (18,29,30,31,34,36,39,54,58,64,82,84,102,111) Esto podría explicar la ausencia de Isoeritrólisis neonatal en los potros mulas de yeguas que se encontraban en su primera gestación. Sin embargo, en el presente trabajo tampoco se presentó la enfermedad en los potros mulas de yeguas sensibilizadas que se encontraban en la segunda o tercera gestación con potro mula. (cuadro 22)

En la literatura se reporta mucha variación en cuanto al número de años que una yegua lleva en la reproducción antes de producir un potro con Isoeritrólisis neonatal (1-18), la edad de las yeguas antes de que se presente la enfermedad (6 a 22), así como el número de gestaciones (en promedio se presenta en la segunda o tercera gestación, pero se han diagnosticado casos tan tardíos como en la décima segunda gestación; aunque algunos autores mencionan que la enfermedad puede ocurrir desde la primera gestación). (12,15,16,19,30,31,34,39,41,42,47,64,68,118,125) En el presente trabajo, tenemos que cuatro yeguas (matrículas: 266/87, 147/88, 260/88 y 336/88) de las cuales su potro mula murió, eran de primer parto y dos (matrículas: 24/88 y 198/87), de segundo parto.

Cabe destacar que únicamente en las yeguas de segundo parto se detectó una reacción positiva "½", (exclusivamente en el segundo muestreo); por lo que no es posible relacionar a la enfermedad de IN como la causa de la muerte de sus crías, apoyados en otros factores como lo es la historia y signos clínicos, además de los resultados de las necropsias. (cuadro 22)

Respecto de la dificultad de relacionar a los anticuerpos con la presencia o ausencia de la Isoeritrólisis neonatal, Noda y Watanabe, (1975) ⁽⁴⁵⁾ tuvieron problemas para determinar la relación entre los grupos sanguíneos y la presencia de ictericia en los potros, concluyendo que dicha predicción es más fácil si la ictericia presente en el potro es causada por hemolisinas que la yegua forma contra su cría. También Traub-Dargatz, *et al*, (1995), ⁽¹¹⁸⁾ presentan una investigación en donde son examinados cuatro potros mulas recién nacidos cuyo padre era el mismo, y que con anterioridad se le había practicado una evaluación para la identificación del "Antígeno burro", presentándolo. Llegando a la conclusión de que las razones para que dos de los cuatro potros no presentaran IN a pesar de que todas las madres habían desarrollado anticuerpos contra el antígeno de sus eritrocitos, son "desconocidas"; siendo posible que a pesar de la presencia de anticuerpos antiertrocitos en el suero de las yeguas, la concentración de ellos en el calostro pudo haber sido baja. Sin embargo, en dicho trabajo se determinó que los anticuerpos contra los eritrocitos de los potros si fueron detectados en el suero de las madres antes y después del parto, y que el nivel total de IgG en ambos potros fue mayor a 800 mg/dl, indicando una adecuada absorción. Por lo que al parecer lo que sucedió es que: 1) los potros no absorbieron anticuerpos específicos contra sus eritrocitos; 2) estos fallaron en atacarlos; y 3) los anticuerpos si atacaron a los eritrocitos pero fallaron en causar una lisis o aglutinación significativa. En el presente trabajo, a pesar de que los anticuerpos se comportaron más como hemolisinas que como aglutininas, no sé presentó ningún caso de IN; lo que concuerda con algunos investigadores en el sentido de que definitivamente existen otras causas aún no investigadas, que provocan que a pesar de la gran incompatibilidad entre estas dos especies no siempre se produce Isoeritrólisis neonatal. (cuadro 19 y 22)

La prevalencia reportada de IN en los potros mulas es de un 8 a 10%, con una mortalidad del 25 al 50%, siendo mucho más alta que en los caballos, en donde en forma general se puede considerar una prevalencia de 0.5 a 1 ó hasta 2%, y las razones para esto son desconocidas aún, pero pueden ser el reflejo del alto porcentaje de incompatibilidad de las gestaciones de mulas comparadas con las gestaciones del caballo. ^(2,13,15,19,30,84,102,118) Sin embargo, aunque en el presente trabajo el total de nacimientos fue de 200, únicamente se presentaron seis muertes y una tasa de mortalidad del 3.0%, en los tres ciclos reproductivos considerados en este estudio; con una prevalencia de IN en esta población de cero, no obstante que una gran cantidad de yeguas (39.20%) presentó una sensibilización (hemólisis, aglutinación y hemólisis y aglutinación) importante durante su gestación. (cuadros 10,21 y 22)

En lo referente a la incidencia de Isoeritrólisis neonatal, tenemos que en yeguas gestantes con caballo, los estudios genéticos de aloantígenos relacionados con la enfermedad indican que debería de ser de aproximadamente 14% de todos los potros nacidos de este tipo de gestaciones, pero por alguna razón la verdadera incidencia fue mucho menor, ya que la aloinmunización no ocurre en todas las gestaciones incompatibles. ⁽⁸⁴⁾ Cronin, (1955) ⁽⁴²⁾ y Scott y Jeffcott, (1978) ⁽²⁾ mencionan que en el Reino Unido la mayoría de los casos de IN han sido observados en los caballos Pura Sangre Inglés, y que la incidencia estimada es inferior al 1%. Esta baja incidencia de manifestaciones clínicas es interesante, ya que en más del 25% de las gestaciones existe incompatibilidad entre los grupos sanguíneos de las yeguas y los sementales. ⁽⁴³⁾ En el presente trabajo, la incidencia IN en la población, también fue de cero; sin embargo, debemos tomar en cuenta lo sugerido por Scott y Jeffcott, (1978) ⁽²⁾ quienes dicen "el número actual y verdadero de los casos de IN que ocurren, es muy difícil de medir, debido principalmente a un incorrecto diagnóstico, a la ocurrencia de casos subclínicos que no pueden ser detectados si la anemia es ligera y con pocas manifestaciones clínicas o en los casos en los cuales hay alguna muerte, la causa específica no pueda ser determinada", así como lo publicado por Traub-Dargatz, *et al.*, (1995) ⁽¹¹⁸⁾ quienes "observaron que las razones para la baja ocurrencia de IN severa en los potros

mulas a pesar de la producción de anticuerpos dirigidos contra los antígenos de sus eritrocitos, aún están bajo investigación, pero se puede deber a que el potro mula no desarrolla una verdadera anemia a la misma concentración de anticuerpos en el calostro como sucede en los potros equinos o aunque existe una incompatibilidad total entre los progenitores de un potro mula, con respecto al "Antígeno burro", no todos los potros mulas son diagnosticados con IN, debido que los signos clínicos que presentan estos animales no son reconocidos". (cuadro 22)

VII. Conclusiones.

En el presente trabajo es posible concluir lo siguiente:

- A. El porcentaje de yeguas dedicadas a la producción de híbridos que son sensibilizadas contra el antígeno burro es menor (39.2%) al esperado, y la incidencia de sensibilización no aumenta con las gestaciones posteriores, por lo que nunca llega a alcanzar el 50%.
- B. Tomando en cuenta las tres posibles causas por las cuales una yegua no gestante (nuca presentó un potro mula al final de la época reproductiva) se puede sensibilizar, la causa más probable es una placentitis de una gestación que no finalizó con un potro vivo, por lo que no fue detectada o una iatrogénica al tener contacto con agujas contaminadas con tejido extraño.
- C. La sensibilización contra el "Antígeno burro" en las yeguas dedicadas a la producción de mulas se puede presentar desde la primera gestación.
- D. Existe una diferencia respecto del tiempo requerido para dar un resultado positivo entre las yeguas de primera y segunda gestación, lo cual pone de manifiesto que la primera gestación sirve para montar una respuesta de "memoria".
- E. El aumento en la cantidad de anticuerpos que permite que las yeguas sensibilizadas sean detectadas por las pruebas inmunológicas, ocurre principalmente durante el tercer y cuarto trimestre de la gestación.
- F. Las yeguas con respuesta positiva tienden a disminuir la intensidad de la respuesta o hacerse negativas en muestreos posteriores, lo que podría explicar la nula incidencia de la condición clínica en los potros. Sin embargo, queda sin explicación la causa de supresión de la sensibilidad.
- G. El comportamiento de los anticuerpos formados contra el "Antígeno burro" en las yeguas gestantes de un semental burro, es muy parecido a los

anticuerpos formados contra los antígenos causantes de la IN en los potros equinos (Aa y Qa), esto es, la mayoría de ellos actúa como hemolisinas, después como hemolisinas y aglutininas y finalmente como aglutininas.

- H. Los anticuerpos producidos contra el "Antígeno burro" en las yeguas paridas después de una gestación de un potro mula, pueden conservarse durante muchos meses.
- I. A pesar de la elevada incidencia de sensibilización contra el "Antígeno burro" en las yeguas, en el presente trabajo no se encontró un solo caso de Isoeritrólisis neonatal detectables clínicamente, ni mortalidad por esta causa.
- J. Debido a que no todas las gestaciones de mulas a pesar de alta incompatibilidad en lo que se refiere al "Antígeno burro" de los eritrocitos resultan en la presencia de Isoeritrólisis neonatal, otros factores diferentes de dicha incompatibilidad deben estar jugando una importante función. Por lo que más investigación al respecto es necesaria.

VIII. Literatura citada.

1. McClure, J.J. (1992). The immune system. In: Equine Reproduction. Editors. Angus O. McKinnon and James L. Voss, 1/a. Edition, E.U.A., Ed. Lea & Febiger, pp 1003-1016.
2. Scott, A.M. and Jeffcott L.B. (1978). Haemolytic disease of the newborn foal. *The Veterinary Record*, Vol. 103, pp 71-74.
3. Becht, L.J. and Semrad, D.S. (1985). Hematology, blood typing and immunology of the neonatal foal. *Vet. Clinics of North America Equine Practice*, Vol.1, No.1, pp 91-115.
4. Vandeplassche, M. (1993). Dystocia. In: Equine Reproduction, Editors. Angus, O. McKinnon and James L. Voss, 1/a. Edition, E.U.A. Ed. Lea & Febiger, pp 578-587.
5. Bruner, D.W.; Hull, F.E.; Edward, P.R. and Doll, E.R. (1948). The relation of the blood factors of icterus in foals. *Am. J. Vet. Res.*, Vol. 9, No. 32, pp 237-242.
6. Becht, L.J. (1987). Neonatal Isoerythrolysis. In: Current therapy in equine medicine, Ed. N. Edward Robinson, Editor's. W.B. Saunders Company, 1/a. Edition, pp 244-247.
7. Coombs, R.R.A.; Crowhurst, R.C.; Day, F.T.; Heard, D.H.; Hinde, I.T.; Hoogstraten, J. and Parry, H.B. (1948). Haemolytic disease of newborn foals due to iso-immunization of pregnancy. *Jour. Hyg.*, Vol. 46, pp 403-418.
8. McCue, P.M. (1992). Lactation. In: Equine Reproduction, Editors. Angus, O. McKinnon and James L. Voss, 1/a. Edition, E.U.A. Ed. Lea & Febiger, pp 588-595.
9. L.C. Franz, *et al.* (1998). Oral and intravenous immunoglobulin therapy in neonatal foals. *Journal of Equine Veterinary Science*. Vol. 18 No. 11, pp 742-748.
10. LeBlanc, M.M.; Hurtgen, J.P. and Lyle S. (1990). A modified zinc sulfate turbidity test for the detection of immune status in newborn foals. *Equine Veterinary Science*. Vol.10, November 1, pp 36-39.

11. Scott, M.A. (1972). Red cell groups of horse. Proc. 3rd. Internat. Conf. Equine Infectious Diseases, Paris, pp 384-393.
12. Doll, E.R. (1952). Observations of the clinical features and pathology of hemolytic icterus of newborn foal. Am. J. Vet. Res., Vol. 13, pp 504-508.
13. Bailey, E. (1982). Prevalence of anti-red blood cell antibodies in the serum and colostrum of mares and its relationship to neonatal isoerythrolysis. Am.J.Vet.Res., Vol.43, No.11, pp 1917-1921.
14. McClure J.J.; Kocch C. and Traub-Dargatz J. (1994). Characterization of a red blood cell antigen in donkeys and mules associated with neonatal isoerythrolysis. Animal genetics, Vol 25, pp 119-120.
15. Brumpt, E. (1947). Consideration défavorables à l'hypothese de l'étiologie parasitaire de la jaunisse des muletons. [Jaundice in newly born mule foals not caused by babesia infections] Ann. Parasitol. Hum. Comp., Vol. 22, pp 5-10.
16. Priouzeau, M. (1952). Ictère hémolytique du muleton. [Haemolytic jaundice in mule foals]. Rec. Med. Vet., Vol. 128, pp 79-96.
17. Girard, O.; Podliachouch, L.; Eyquem, A. and Millot, P. (1956). Etude de la maladie hémolytique expérimentale du muleton. [Transmission par voie placentaire]. Ann. Inst. Pasteur, Vol. 90, pp 96-100.
18. Darraspen, E. and Godfrain, J.C. (1947). L' Etiologie et la thérapeutique de l'ictère des muletons nouveau-nés doivent-elles être révisées.? [Need for revision of the aetiology and therapeutics of jaundice in new-born mules] Res. Méd. Vét. Lyon et Toulouse, Vol. 98, pp 268-274.
19. Saint-Martin, A. (1952). Prophylaxie et traitement de l'ictère du muleton. [Prevention and treatment of haemolytic disease of mule foals.] Rev. Méd. Vét., Vol. 103, pp 263-268.
20. Berthelon, M. and Tournut, J. (1949). Sur l'étiologie de la maladie hémolytique du poulain nouveau-né. [Aetiology of haemolytic disease in new-born foals]. Rev.Méd.Vét., Vol. 103, pp 344-349.
21. Brion, A. (1949). Sur l'ictère hémolytique du poulain nouveau-né. Rev. Méd.Vét., Vol. 100, pp 29-35.

22. Hosada, T. and Kaneko, T. (1949). On the serological relations among horses, asses and mules. *J. Journal. Vet. Sci.*, Vol. 11, No. 5-6, pp 117-125.
23. Bessis, M. and Millot, P. (1949). A propos du rôle du lait et du colostrum dans la physiopathologie de l'ictère grave du mulet nouveau-né. [The role of milk and colostrum in the aetiology of jaundice in new-born mule foals]. *Bull. Acad. Vét. Fr.*, Vol. 22, pp 291-295.
24. Pigoury, L. And Charny, J. (1951). Reproduction expérimentale de l'ictère hémolytique du mulet. [Experimental haemolytic icterus in the mule foal]. *Bull. Acad. Vét. Fr.*, Vol. 24, pp 399-404.
25. Grootenhuis, G. (1952). Iso-immunisation tijdens de graviditeit van het paard. [Iso-immunisation of pregnancy in mare.] *Tijdschr Diergeneesk.*, Vol. 77, pp 291-296.
26. Dujarric de la Rivière R.; Eyquem A. and Podliachouk, L. (1953). Groupes sanguins des équidés (chevaux, ânes, mulets). [Blood groups in horses, donkeys and mules]. *Rec. Méd. Vét.*, Vol. 129, pp 629-644.
27. Koterba, A. (1991). Intravenous fluid therapy and nutritional support in the sick neonate. *Equine Veterinary Education*, Vol. 3, No. 1, pp 33-39.
28. Benjamin, M. (1978). Outline of veterinary clinical pathology. Ames, I.A. Iowa State University Press., pp 137-139.
29. Shappell, K.K. and Lock, F.T. (1986). Hematologic parameters after neonatal isoerythrolysis in a foal. *Compendium Equine*, Vol. 8, No. 11, pp 867-872.
30. McClure J.J. (1991). Equine Neonatal Isoerythrolysis. *Proceedings . 9th. ACVIM FORUM*, New Orleans, LA. 4, pp 463-466.
31. Gary, P.C. and Joseph, A.Z. (1983). Hemolytic anemia. In: Current therapy in equine medicine, Editors. N. Edward Robins, Editor's. W.B. Saunders Company, 1/a. Edition, pp 299-303.
32. Suzuki, Y.; Stormont, C. and Trommershausen-Smith, A. (1975). Alloantibodies: The blood groups they define. *Proc. Int. Symp. Equine Hematol.*, Vol. 1, pp 34-41.

33. Ann, T.B. (1997). Parentage testing of horse. In: Horse genetics, 2/a. Edición, Ed. Cab International, E.U.A. pp 95.
34. Bowling, T.A. and Clark, S.R. (1985). Blood group and protein polymorphism genes frequencies for seven breeds of horses in the United States. Animal Blood Groups and Biochemical Genetic., Vol. 16, pp 93-108.
35. Morris, D.D. (1986). Immunologic diseases of foal. Comp. Cont. Educ. Prac. Vet., Vol. 3, pp 139-148.
36. McClure, J.J; Steven, M. Parish and Melissa T. Hines. (1996). Immunologic disorders. In: Large animal internal. medicine. Editors. Mosby, 2/a Edition, E.U.A., Capítulo No. 49. pp. 1844-1873.
37. Adams, R. (1992). Neonatal disease: an overview. In: Equine Reprodución. (Editors. Angus O. McKinnon and James L. Voss), 1/a. Edition. E.U.A., Ed. Lea & Febiger, pp 1003-1016.
38. Bailey, E.; Darrilyn, G; Albright, B.S; Pamela, J. and Henney, M.S. (1988). Equine neonatal isoerythrolysis: Evidence for prevention by maternal antibodies to the Ca blood group antigen. Am. J. Vet. Res., Vol. 49, No. 8, pp 1218-1222.
39. Zaruby, J.F.; Hearn, P. and Colling, D. (1992). Neonatal isoerythrolysis in a foal, involving anti-Pa allantibody. Equine Veterinary Journal, Vol. 24, No. 1, pp 71-73.
40. Parry, H.B.; Day, F.T. and Crowhurst, R.C. (1948). Disease of new-born foals. [Haemolytic disease due to iso-immunisation of pregnancy]. Veterinary Record, Vol. 61, No.30, pp 435-441.
41. Saint-Martin, A. (1949). L'ictère hémolytique des muletons. [Haemolytic jaundice in mule foals.]. Rev. Méd. Vét. Lyon et Toulouse, Vol. 100, pp 236-244.
42. Cronin, M.T.I. (1955). Haemolytic disease of newborn foals. Veterinary Record, Vol. 67, No. 26 pp 479-494.
43. Scott, A.M. (1978). Principal red-cell antigens responsible for haemolytic disease of the newborn foal: Naturally occurring antibodies in thoroughbred. Proc. R. Soc. Med., Vol. 71, pp 581-585.

44. Podliachouk, L. (1972). Importance of blood groups for the determination of the origin and for the importance of horses. Proc. 3rd. Conf. Equine Infection Diseases, pp 407-709.
45. Noda, H., and Watanabe, Y. (1975). Relationships between blood groups and hemolytic disease of newborn foal. Jap. J. Zootech. Sci. Vol. 46, No. 3, pp 180-184.
46. Bell, K. (1983). The blood groups of domestic mammals. Red blood of domestic mammals. Edited by N.S. Agar and P.G. Board, Elsevier Science Publisher B.V., pp 142-163.
47. Saint-Martin, A. (1948). L'ictère hémolytique des muletons. [Haemolytic jaundice (Icterus neonatorum) in young mules.] Rev. Méd. Vét. Lyon et Toulouse, Vol. 99, pp 114-125.
48. Brion, A. (1951). Sur l'immunisation expérimentale de la jument contre l'antigène-baudet et son évolution. (Experimental immunization of mare against donkey blood antigen.) C. R. Soc. Biol. Paris, Vol. 145, pp 1537-1538.
49. Bailey, E. (1984). Usefulness of lymphocyte typing to exclude incorrectly assigned paternity in horse. Amm. J. Vet. Res., Vol. 45, pp 1976-1978.
50. Doll, E.R. and Hull, F.E. (1949). Laboratory diagnosis of hemolytic icterus in foals. Cornell Vet., Vol. 40, pp 11-16.
51. Easley, J.R. (1985). Erythrogram and red cell distribution with of equidae with experimentally induced anemia. Am. J. Vet. Res. Vol. 46, No. 11 pp 2378-2384.
52. Bruner, W.D., *et al.* (1948). Icteric Foal. Journal of American Veterinary Medical Association, Vol. 112, pp 440-441.
53. Gilman A.M., *et al.* (1960). Immunohematologic studies of the thoroughbred horse. American Journal Veterinary Res., pp 393-396.
54. Stormont, C. (1975). Neonatal isoerythrolysis in domestic animals: A comparative review. Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine, Vol. 19, pp 23-45.

55. Bruner W.A., and Doll E.R.. (1953). Blood groups in horses (Indian sistem): Their value in transfusions and neonatal isoerythrolysis. *Cornell Vet.*, Vol. 63, pp 217-222.
56. Franks, D. (1962). Horse blood groups and haemolytic disease of the new born foal. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, Vol. 97, pp 235-249.
57. Stormont C.; Suzuki Y, and Rhode A. (1964). Serology of horse blood groups. *Cornell Veterinarian*, Vol.54, pp 439-452.
58. Brion, A. and Goret, P. (1949). Ictère hémolytique du mulet et du poulain. (Haemolytic jaundice in young mules and foals). *Rev. Méd. Vét., Lyon et Toulouse*, Vol. 100, pp 337-343.
59. Eyquem A. (1948). L'atteinte du système nerveux central chez les jeunes animaux présentant une maladie hémolytique expérimentale. (Central nervous system disorders in haemolytic disease in newborn animal). *C. R. Soc. Biol. Paris*, Vol. 142, pp 585-587.
60. Brion A. (1950). Sur la disparition des anticorps anti-mulet dans le colostrum de la jument mulassière tachée de jaunisse, après le part. [The titter of anti-mule antibodies in the colostrum of the mare] *C. R. Soc. Biol. Paris*, Vol. 144, pp 1376-1378.
61. Brion A. (1949). Sur le mécanisme de l'immunisation de la jument mulassière par son produit, et le passage des anticorps anti-mulet chez son mulet. [Mechanism of isoimmunisation of mule-breeding mare] *C. R. Acad. Sci., Paris*, Vol. 228, pp 1614-1616.
62. Eyquem, A. and Podliachouk, L. (1952). Les groupes sanguins des équidés. I._ Les groupes sanguins des mulets. [Blood groups of mules.]. *Ann. Inst. Pasteur*, Vol. 83, pp 57-61.
63. Meridith Hodges. (1991). Mule Crossing. *Horse Sheets* . (8 de Abril, 1991).
64. Christine, L.W.; Gary, P.C. and Ann, T. B. (1984). Neonatal isoerythrolysis in foals: Management and prevention. *California Veterinarian*, Vol. 11, pp 21-34.
65. Jeffcott, L.B. (1975). Clinical aspects of passive immunity in foals. *Jl.S.Afr.Vet.Ass.*, Vol. 46, No. 1, pp 57.

66. Howard, F.A. and Cronin, M.T.I. (1955). Colostral transfer of anti-erythrocyte agglutinins from mare to foal. *JAVMA*, Vol. 126, pp 93-94.
67. Bruner, D.W.; Doll, E.R.; Hull, F.E. and Kinkaid, A.S. (1950). Further studies on hemolytic icterus in foals. *Am. J. Vet. Res*, Vol.11, No. 22, pp 22-25.
68. Rossdale, P.D. (1972). Differential diagnosis and treatment of equine neonatal disease. *The Veterinary Record*, Vol. 91, No. 24, pp 581-587.
69. Brendan, T.F.; Belonje, C.W.A. y Cronin, M.T.I. (1950). The technique of exchange transfusion in the new-born foal. *The Veterinary Record*, Vol. 62, No. 28, pp 403-405.
70. Cronin, M.T.I. (1953). Exchange transfusion in the foals. *The Veterinary Record*, Vol. 65, No. 8, pp 120-123.
71. Reilly, W.J. and Macdougall, D.F. (1973). The metabolism of IgG in the newborn foal. *Res.Vet.Sci.* Vol.14, pp 136-137.
72. Genco J.R.; Yecies, L. and Karush, F. (1969). The Immunoglobulins of equine colostrum and parotid fluid. *The Journal of Immunology*, Vol.103, No.3, pp 437-444.
73. McGuire, C.T.; Popies, J.M. and Banks, L.K. (1975). Hipogammaglobulinemia predisposing to infection in foals. *JAVMA*, Vol. 166, No. 1, pp 71-75.
74. McGuire, C.T.; Crawford, B.T.; Hallowell, L.A. and Macomber, E.L. (1977). Failure of colostral immunoglobulin transfer as an explanation for most infections and deaths of neonatal foals. *JAVMA*, Vol. 170, No.11, pp 1302-1304.
75. Rumbaugh, E.G. and Adamson, P.J.W. (1983). Automated serum chemical analysis in the foal. *JAVMA*, Vol. 183, No.7, pp 769-772.
76. Rumbaugh, E.G.; Ardans, A.A.; Ginno, D. B.A. and Trommershausen-Smith, A. (1978). Measurement of neonatal equine immunoglobulins for assessment of colostral immunoglobulin transfer: Comparison of single radial immunodiffusion with the zinc sulfate turbidity test, serum electrophoresis, refractometry for total serum protein and the sodium sulfite precipitation test. *JAVMA*, Vol. 172, No. 3, pp 321-325.

77. Cronin, I.T.M. (1954). The determination of plasma volume and the estimation of blood volume in the horse. *The Veterinary Record*, Vol. 66, No. 14, pp 197-200.
78. Kallfelz, A.; Whitlock, H.R. Ronald D; and Schultz, D.R. (1978). Survival of ⁵⁹Fe-Labeled erythrocytes in cross-transfused equine blood. *Amm. J. Res.*, Vol. 39, pp 617-620.
79. Byars, T.D. (1982). Septicemia in foals. *Modern Veterinary Practice*, November, pp 857-860.
80. McClure, J.J. and Horohov, W.D. (1994). Update on immunology. 40th. Annual Convention Proceedings: American Association of Equine Practitioners, pp 155-161.
81. Espinosa, R.O. (1996). *Inmunología (de memoria)*. 1/a Edición. México, D.F., Editorial Medica Panamericana, S.A. de C.V., pp 17-99.
82. Trommershausen, S.A.; Stormont, C. and Suzuki, Y.A.B. (1975). Alloantibodies: their role in equine neonatal isoerytholysis. *Proc. Int. Symp. Equine Hematol.*, pp 349-355.
83. Dimock, W.W.; Edwards, R. and Bruner, D.W. (1947). Infections observed in equine fetuses and foals. *Cornell Vet.*, Vol. 37, pp 89-99.
84. Becht, L.J. (1983). Neonatal isoerytholysis in the foal. Part I. Background, blood group antigens, and pathogenesis. *The Compendium on Continuing Education*, Vol.5, No.11, pp S591-S599.
85. Podliachouk, L.; Smith, A.T.; Sanberg, K., *et al.* (1974). Minutes of meeting of horse research section. *Proc. 14th ISABR. Int. Soc. Anim. Blood. Groups. Biochem. Genet.*, Vol. 5, pp 196-197.
86. Stormont, C. (1972). Current status of equine blood groups and their applications. *Proc. AAEP*, pp 401-410.
87. Stormont, C.J. (1982). Blood groups in animals. *JAVMA*, Vol. 181, pp 1120-1124.
88. Stormont, C.J. and Suzuki, Y. (1965). Paternity tests in horse. *Cornell Vet*, Vol. 55, pp 366-377.

89. Sanberg K. (1973). The D blood group system of the horse. *Anim. Blood Groups Biochem. Genet.* Vol. 4, pp 193-205.
90. Smith, A.T. (1975). Alloantibodies: Their role in equine neonatal isoerythrolysis. *Proc. First. International Symp. Equine Hematology*, pp 349-355.
91. Frank, D. (1959). The red cell antigens of the horse. *J. Comp. Pathol.*, Vol. 69, pp 353-366.
92. Becht J.L. and Page, E.H. (1979). Neonatal isoerythrolysis in the foal: An evaluation of predictive and diagnostic field tests. *Proc. 25th AAEP Meet*, pp 47-259.
93. Doll, E.R. and Hull, F.E. (1951). Observations on hemolytic icterus in newborn foals. *Cornell Vet.*, Vol. 41, pp 14-35.
94. Doll, E.R.; Richards, M.G.; Wallace, M.E., *et al.* (1952). The influence of an equine fetal tissue vaccine upon hemagglutination activity of mare serums: Its relation to hemolytic of newborn foals. *Cornell Vet.*, Vol. 42, pp 495-505.
95. Jeffcott, L.B. (1973). Passive immunity in the foal. In: Grunsell CSG, Hill FWG (eds): *The Veterinary Annual*, Bristol, John Wright and Sons, Ltd, pp 79-84.
96. Rejnek, J.; Prokesoua, L.; Steryl, J., *et al.* (1973). The presence of IgG and IgM in full term horse umbilical cord sera. *Immunochemistry*. Vol. 10, pp 397-399.
97. Rouse, R.T. and Ingram, D.G. (1970). The total protein and immunoglobulin profile of equine colostrum and milk. *Immunology*, Vol. 19, pp 901-907.
98. Simpson-Morgan, M.W. and Smeaton, T.C. (1972). The transfer of antibodies by neonates and adults. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, Vol. 16, pp 355-386.
99. Jeffcott L.B. (1974). Some practical aspects of the transfer of passive immunity to newborn foals. *Equine Vet.J.*, Vol. 6, pp 109.
100. Weed, R.I. and Reed, C.F. (1966). Membrane alteration leading to red cell destruction. *Am. J. Med.*, pp 681-685.

101. Jeffcott, L.B. (1974). Studies on passive immunity in the β -globulin and antibody variations associated with the maternal transfer of immunity and the onset of active immunity. *J. Comp. Path*, Vol. 84, pp 93.
102. Bailey E.; Conboy, S.H. and McCarthy, F.P. (1987). Neonatal isoerythrolysis of foals; an update on testing. *Proceedings of the American Association of Equine Practice*, Vol. 33, pp 341-353.
103. Bowling, A.T. and Williams, J.M. (1985). Expansion of the P blood group system of the horse. *Animal Blood Groups Biochemical Genetics*, Vol. 16, pp 145-148.
104. Pfeiffer, N.E., *et al.* (1977). Quantitation of bovine immunoglobulins: Comparison of single radial immunodiffusion, zinc sulfate turbidity, serum electrophoresis, and refractometer methods. *Ann. J. Vet. Res.*, Vol. 38, pp 693-698.
105. Reynolds C.R. Jr., *et al.* (1983). A new test for the detection of immunoglobulin level in the neonatal foal. In *Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, pp 415-418.
106. Rumbaugh, G.E. and Ardans, A.A. (1979). Field determination of the immune status of the newborn foal. *Equine Pract.*, Vol.1, pp 37-42.
107. Osterhoff, D.R.; LeGrange L. and Robinson, M. (1982). Genetic markers in South African thoroughbred stallions. *J. J. Afr. Vet. Assoc.*, Vol. 53, pp 33-36.
108. Gildman, A.M.; Schwarz, A. and Wallerstein H. (1960). Immunohematologic studies of thoroughbred horse. *Am. J. Vet. Res.*, Vol. 21, pp 393-396.
109. Bouquet, Y., *et al.* (1981). A contribution to the D system in horse. *Animal Blood Groups and Biochemical Genetics*, Vol.12, pp 187-192.
110. Podliachouk, L. and Meriaux, J.C. (1977). A new factor (Dg) of the D blood group system of the horse. *Animal Blood Groups and Biochemical Genetics*, Vol. 8, pp 179-181.

111. James, R.E. and Archer. R.K. (1966). Current methods for the diagnosis and treatment of haemolytic disease in the foal. *The Veterinary Record*, Vol. 79, No. 3, pp 61-67.
112. Report on the meeting of the horse section at the 16th International Conference on Animal Blood Groups & Biochemical Polymorphism in Leningrad. (16 August 1978). (1979). *Anim. Blood. Groups Biochem Genet.*, Vol. 10, pp 189-190.
113. Report on the meeting of the horse section of the 17th International Conference on Animal Blood Groups and Biochemical Polymorphism in Wageningen. (30 July 1980). (1981). *Anim. Blood. Groups Biochem Genet.*, Vol. 12, pp 225-226.
114. Bailey, E. and Henney, J. P. (1984). Comparison of ELY-2.1 with blood group and ELY-1 markers in the horse. *Anim. Blood. Groups Biochem Genet.*, Vol. 15, pp 117-122.
115. Mériaux, J.C. and Podliachouk, L. (1981). Additional factor Af and Ag in the A blood group system of the horse. *Anim. Blood. Groups Biochem Genet.*, Vol. 12, pp 75-77.
116. Report on the meeting of the horse section at the 15th ISABR in Dublin (15 July 1976). (1976). *Anim. Blood. Groups Biochem Genet.*, Vol. 7, pp 187-189.
117. StormonmT, C & Suzuky, Y. (1964). Genetic system of blood groups in horse. *Genetics*, Vol. 50, pp 915-929.
118. Traub-Dargatz J.L.; McClure J.J.; Koch C; and Schlipf, J.W. Jr. (1995). Neonatal isoerythrolysis in mule foals. *JAVMA*, Vol. 206. No. 1, pp 67-70.
119. Bell, K., Colling, D.T. (1996). Unequivocal identification of the equine Dcfmqr phenogroup. *Animal Genetics*, Vol. 27, pp 103-104.
120. Durham, E.A. (1996). Blood and plasma transfusion in the horse. *Equine Veterinary Education*, Vol. 8, No. 1, pp 8-12.
121. Bruner, D.W. Edwards, P.R. and Doll, E.R. (1948). Passive immunity in the newborn foal. *Am. J. Vet. Res.*, Vol. 9 pp 237-242.

122. Bruner, D.W. (1950). Laboratory diagnosis of hemolytic icterus in foals. *Cornell Vet.*, Vol. 40, pp 11-16.
123. Caroli, J. and Bessis, M. (1947). Sur la cause et le traitement de l'ictère gravé des muletons nouveaunés. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, Vol. 224, pp 969-971.
124. Stedman, L.T. (1993). *Diccionario de ciencias médicas ilustrado*. Tomo I y II. 25^a Edición, México. D.F., Ed. Médica Panamericana. S.A.
125. Suzuki, Y. (1978). Studies on blood groups of horses. *Memoirs Tokyo Univ. Agric.*, Vol. 230, pp 1-50.
126. McClure, J.J. (1997). Strategies for prevention of neonatal isoerythrolysis in horses and mules. *Equine Veterinary Education.*, Vol. 9, No. 3, pp 118-122.
127. Stern, K; Goodman, H.S. and Berger, M. (1961). Experimental isoimmunization to hemo-antigens in man. *J.Immunol.*, Vol. 78, pp 189.
128. Durham, A.E. (1997). Failure of the indirect anti-globulin test to predict a case of neonatal isoerythrolysis. *Equine Veterinary Education*, Vol. 9, No. 3, pp 115-117.
129. Stormont, C. (1979). Positive horse identification, part 2, blood typing. *Equine Pract*, Vol 1, pp 48-54.
130. Stoneham, J.S. (1991). Failure of passive transfer of colostral immunity in the foal. *Equine Veterinary Education*, Vol. 3, No. 1, pp 43-44.
131. Smith C.A. and Wood, E.J. (1991). Respuesta inmune. En, *Biología celular*. 1/a Edición E.U.A., Ed. Addison-Wesley Iberoamericana S.A., pp 287-322.
132. Banks, K.L. and McGuire, T.C. (1989). Neonatal immunology. In, *Veterinary clinical immunology*, Ed. Saunders, pp 193-204.
133. Renshaw, H.W. and Everson, D.O. (1979). Classical and alternative complement pathway activities in paired dairy cow/newborn calf sera. *Comp. Immun. Microb. Inf. Dis.*, Vol 1, pp 259-267.
134. Poppie, M.J. and McGuire, T.C. (1979). Combined immunodeficiency with failure of colostral immunoglobulin transfer in foals. *Vet. Rec.*, Vol. 99, pp 44-46.

135. Koterba, A.M; Brewer, B.D. and Tarplee, F.A. (1984). Clinical and clinicopathological characteristics of the septicaemic neonatal foal: Review of 38 cases. *Equine Vet.J.*, Vol. 16, pp 376-383.
136. Brewer, B.D. and Koterba, A.M. (1985). The diagnosis and treatment of equine neonatal septicaemia. *Proc.Am.Ass. Equine Pract.*, Vol. 31, pp 127-135.
137. Kent, J.E. and Blackmore, D.J. (1985). Measurement of IgG in equine blood by immunoturbidimetry and latex agglutination. *Equine Vet. J.*, Vol. 17, pp 125-129.
138. Stoneham, S.J; Wingfield Digby, N.J. and Ricketts, S.W. (1991). Failure of passive transfer of colostral immunity in the foal: Incidence, effect of stud management and efficacy of plasma transfusions. *Vet. Rec.*, Vol. 3, No. 1, pp 43-44.
139. LeBlanc, M.M.; McLaurin, B.I. and Boswell, R. (1986). Relationship among serum immunoglobulin concentration in foals, colostral specific gravity and colostral immunoglobulin concentration. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, Vol. 198, pp 57-60.
140. Brewer, B.D. and Mair, T.S. (1988). Failure of passive transfer: to treat or not to treat. *Equine Vet. J.*, Vol. 20, pp 394-396.
141. Koterba, A.M., Brewer, B.D. and Drummond, W.H. (1985). Prevention and control of infection: In *Neonatal Equine Disease*. Ed: J. Beech *Vet. Clin. North Am.*, Vol. 1, pp 41-50.
142. Boeta, A.M. (Tesis de Maestría en Producción Animal). (1996). Estudio sobre mortalidad embrionaria por regresión prematura de las copas endometriales en yeguas utilizadas para la producción de mulas. Universidad Nacional Autónoma de México. División de Estudios de Posgrado. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.