

## 1.5. - DIAGNOSTICO DE LA INTOXICACIÓN POR PLOMO

### 1.5.1. - AVES VIVAS

#### 1.5.1.1. - Sintomatología

Para efectuar el diagnóstico hemos de tener en cuenta diversos factores. Uno de ellos, evidentemente, es el examen externo del estado del animal, buscando los signos o síntomas característicos de esta enfermedad, comentados en el apartado anterior.

#### 1.5.1.2. - Examen radiológico

Las radiografías siempre nos suministrarán importante información, ya que permiten comprobar la presencia de perdigones en la molleja. Éstos se distinguen en la radiografía porque forman pequeños puntos blancos alojados en la molleja. Pese a todo, existen unas limitaciones: 1) transporte de los animales desde las zonas donde se produce la intoxicación hasta los lugares donde se disponga de un aparato de rayos-X; 2) es un sistema caro, de modo que no es práctico para evaluar la incidencia del plumbismo en estudios que impliquen un número elevado de ejemplares; 3) otros objetos metálicos pueden confundirse con perdigones de plomo, como por ejemplo trozos de metales o perdigones de acero (Redig, 1987) ; 4) muchas veces los perdigones acaban siendo expulsados, vía regurgitación (Hovette, 1972; Pattee *et al.*, 1981) o vía anal (Hovette, 1972), de modo que el hecho de no encontrar perdigones en la zona del estómago muscular no implica necesariamente ausencia de plumbismo (LaBonde, 1988) . En las rapaces, como ya hemos comentado anteriormente, únicamente un 15% de los animales diagnosticados de plumbismo presentan perdigones en la molleja (Redig, 1987) . No obstante algunos autores consideran que es un método más seguro que la observación visual, tanto en el caso de las mollejas de aves muertas como en el caso de sedimentos (Furness and Robel, 1989).

#### 1.5.1.3. - Analíticas sanguíneas

La confirmación del diagnóstico de un animal que presente los síntomas ya descritos o tras haber realizado radiografías, se puede obtener mediante análisis de sangre, en el cual se incluyen los niveles de plomo y también las alteraciones de algunos parámetros sanguíneos:

**A.Niveles de plomo en sangre:** Uno de los problemas con el que se han encontrado los investigadores, ha sido el de definir la frontera a partir de la cual la concentración de plomo detectada en sangre se puede considerar indicativa de intoxicación. Si esto ya es complicado en humanos (World Health Organization, 1989), siendo sólo una especie, todavía resulta más complejo en las aves, que son miles de especies diferentes con variaciones intraespecíficas a veces importantes (Lumeij, 1985). LaBonde (1988) da algunos ejemplos claros de esto: en Cacatúas se han observado signos intestinales a concentraciones tan bajas en sangre como  $0,23 \mu\text{g/ml}$ , la muerte se ha dado a niveles de  $0,44 \mu\text{g/ml}$ ; psitácidas del género *Ara* muestran signos neurológicos a una concentración de  $0,50 \mu\text{g/ml}$ , mientras que en pollitos de gallina con concentraciones de  $8,00 \mu\text{g/ml}$  no se presentaban síntomas.

Por lo tanto, no es de extrañar que a medida que se van acumulando datos, los valores críticos también se modifiquen con el tiempo y para las especies. En general, la mayoría de los autores actualmente sitúan el valor frontera para diferenciar una exposición anormal al plomo en las aves acuáticas desde  $0,10 \mu\text{g/ml}$  (Daury *et al.*, 1993),  $0,15 \mu\text{g/ml}$  (Scheuhammer, 1989),  $0,18 \mu\text{g/ml}$  (DeStefano *et al.*, 1991; 1992),  $0,20 \mu\text{g/ml}$  (Friend, 1985; LaBonde, 1988),  $0,25 \mu\text{g/ml}$  (Mugde, 1983),  $0,25-0,30 \mu\text{g/ml}$  (Pain, 1989b) e incluso hasta  $0,40 \mu\text{g/ml}$  (Degernes *et al.*, 1990), mientras que el valor límite para diferenciar una exposición anormal pero leve de una intoxicación grave y aguda, con clara sintomatología y posible muerte, lo sitúan entre el  $0,50 \mu\text{g/ml}$  (LaBonde, 1988) y los  $0,80 \mu\text{g/ml}$  (Scheuhammer, 1989; 1991). Éste es un punto importante a la hora de tomar medidas correctoras para evitar el plumbismo. Por ejemplo en Canadá, si más del 5% de una especie indicadora, como el Anade Sombrío, presenta más de  $0,2 \mu\text{g/ml}$  de plomo en sangre (nivel umbral aceptado en este caso) , el uso de perdigones no tóxicos deberá ser considerado (Canadian Wildlife Service, 1990).

Para las rapaces, Redig (1987) diferencia 4 categorías: la categoría I engloba a los animales con una concentración

en sangre inferior a los  $0,2 \mu\text{g/ml}$ , a la que pertenece la población no expuesta; la categoría II la, formarían los animales con concentraciones entre  $0,2 \mu\text{g/ml}$  y  $0,6 \mu\text{g/ml}$ , que todavía no muestran síntomas clínicos muy claros; la categoría III la formarían los que poseen concentraciones entre  $0,6$  y  $1 \mu\text{g/ml}$ , que exhiben anemia y depresión y que ya precisan tratamiento con agentes quelantes; finalmente, la categoría IV la formarían los individuos con concentraciones superiores a  $1 \mu\text{g/ml}$ , que están muy enfermos y precisan de un tratamiento urgente.

**B. Parámetros hemáticos:** Unos parámetros sanguíneos que a veces se estudian son el hematocrito y la hemoglobina (Reiser y Temple, 1981; Pain, 1989b). No obstante muchos autores dudan de su valor diagnóstico, tanto por las dificultades que comporta el tener valores de referencia de la población normal para todas las especies y las diferentes épocas del año, como por el hecho de que son parámetros que sólo se alteran en intoxicaciones por plomo graves además de que otras enfermedades también pueden modificarlos (Pain y Rattner, 1988; O'Halloran *et al.*, 1988; Pain, 1989b). La búsqueda de cuerpos de inclusión intranucleares en los eritrocitos de las aves, que se ha observado mediante microscopio electrónica en palomas (Lumeij, 1985), tampoco parece ser un método muy sensible ni utilizado.

Como ya mencionamos en el apartado correspondiente a los efectos del plomo, este metal afecta a diversos pasos de la biosíntesis del grupo hemo. Por tanto, muchas técnicas diagnósticas de laboratorio se basan en este hecho.

La más utilizada, y probablemente también la más útil en aves (Hutton, 1980; Lumeij, 1985; Friend, 1985; Pain, 1989a y 1989b; Scheuhammer, 1989), es la medida de la actividad del enzima  $\delta$ -ALADH, también conocido a veces por porfobilinógeno sintetasa (Redig, 1987), en sangre (también puede mirarse en cerebro e hígado) (Friend, 1985). Aunque la técnica es sencilla y bastante sensible (Pain, 1989a; Scheuhammer, 1989), tiene el inconveniente de la necesidad de disponer de valores de referencia normales para las distintas especies. No obstante, recientemente se ha superado este problema, al aplicar una técnica que también se emplea en humanos, consistente en medir la actividad del enzima directamente, y después compararlo con la que se obtiene tras su reactivación (Pain, 1989a; Scheuhammer, 1989). La técnica se basa en que la inhibición provocada por el plomo (debido a que la  $\delta$ -ALA-DH es un enzima alostérico con 28 grupos tiol en su molécula) (Pain, 1989b) se revierte por otros factores, entre ellos el zinc. De este modo se obvia la necesidad de disponer de valores de referencia, ya que cada muestra de sangre puede utilizarse también como su propio control. Tanto Pain (1989b) como Scheuhammer (1989) llegaron a la misma conclusión en sus estudios trabajando con diferentes especies de aves en considerar este método el más eficaz para llevar a cabo estudios de prevalencia del plumbismo en condiciones de campo.

La inhibición de la  $\delta$ -ALA-DH comporta la acumulación del sustrato de este enzima, el ácido  $\delta$ -aminolevulínico ( $\delta$ -ALA). La medida de éste en orina es una técnica de diagnóstico en humanos y ciertas especies de animales domésticos, pero comporta problemas prácticos al aplicarlo a las aves salvajes, y aparentemente no es empleado (Lumeij, 1985; Humphreys, 1990). Además, experimentalmente, esta técnica no ha resultado eficaz en la detección de exposiciones al plomo en conejos inferiores a los  $100 \text{ mg/kg}$  diarias durante 87 días (Roscoe *et al.*, 1975).

Debido a la interferencia del plomo con otro enzima, la ferroquelatasa (o hemosintetasa) (Lumeij, 1985), también se acumula el sustrato de éste, la protoporfirina IX (PP-IX). Este enzima es el encargado de insertar el ion hierro en la PP-IX: si el enzima no funciona, entonces queda la porfirina eritrocitaria libre (sin quelar ningún ion) o bien se une con el ion zinc (formándose la zinc protoporfirina, ZPP), y tanto uno como otro dan fluorescencia en la región de los  $595 \text{ nm}$  (zona del rojo) bajo una radiación de excitación alrededor de los  $415\text{-}420 \text{ nm}$  (Pain, 1989b; Sassaroli *et al.*, 1992), fluorescencia que no da el grupo hemo ya que el ion hierro lo impide (Sassaroli *et al.*, 1992). Desde hace ya tiempo se dispone de instrumentos especiales para llevar a cabo esta técnica (hematofluorimetría), y aplicada a aves es útil como método de selección inicial cuando se analizan gran número de muestras. Es barata (comparada con otras técnicas) y precisa sólo de unas pocas gotas de sangre (Lumeij, 1985; Friend, 1987). La medida de la concentración de ZPP es considerada, pese a todo, no excesivamente sensible ni fiable (Pain, 1989b; Scheuhammer, 1989).

## 1.5.2. - AVES MUERTAS

### 1.5.2.1. - Lesiones

La necropsia de los animales muertos también es una importante fuente de información. En caso de intoxicación, se observa frecuentemente la falta de grasa y una musculatura pectoral atrofiada, mientras que la vesícula biliar y el interior de la molleja aparecen coloreados de color verde brillante u oscuro (Friend, 1987; Pokras y Chafel, 1992).

Tampoco resulta raro encontrar lesiones cardiovasculares y renales (Pattee *et al.*, 1981). Unos recientes trabajos de

Ochiai *et al.*, (1992 y 1993) en Cisne Cantor (*Cygnus cygnus*) y Ánsar Careto Anser albifrons intoxicados por ingestión de perdigones de plomo, describen cuáles son los hallazgos anatomopatológicos más característicos:

**A.- Macroscópicamente:** hígado teñido de bilis, médula ósea edematosa o gelatinosa, molleja con perdigones de plomo, hiperqueratosis de la capa córnea y teñida de bilis, impactación del proventrículo;

**B.- Histopatológicamente:** hígado con ictericia hemolítica, hemosiderosis en hígado y bazo, hipoplasia de la médula ósea con incremento de eritroblastos policromáticos, y cuerpos de inclusión intranucleares ácido-resistentes en el riñón.

Probablemente la lesión más significativa de cara al diagnóstico es la detección de perdigones en la molleja, junto con restos de alimentos no digeridos (debido a la parálisis del tracto gastrointestinal), tierra y pequeñas piedras. El desgaste sufrido por los perdigones hace que muchas veces hayan perdido su forma inicial esférica y tengan un tamaño reducido (Friend, 1987).

### 1.5.2.2. - Determinación de plomo en tejidos

De todos modos, al igual que en los animales vivos, la confirmación definitiva del diagnóstico proviene de los análisis de plomo que, de modo habitual, suelen hacerse en hígado y riñón, que son los dos órganos que suelen contener la máxima concentración tras una exposición aguda. Como ejemplo, en la Tabla 1.15 se muestran los resultados de los análisis efectuados por Honda *et al.* (1990) en Cisnes Cantores, tanto en controles como en individuos intoxicados. Con estos datos se determinó que en cisnes intoxicados, el  $71,4 \pm 19,3\%$  (media  $\pm$  SD) del total de plomo estaba almacenado en huesos, el  $7,86 \pm 4,25\%$  en músculo, el  $6,19 \pm 5,31\%$  en hígado, el  $4,52 \pm 3,83\%$  en plumas, y el  $2,38 \pm 2,85\%$  en riñón.

**Tabla 1.15. - Valores medios (SD) de plomo (ppm sobre peso fresco) en diferentes tejidos de Cisne Cantor controles (n= 12) e intoxicados (n= 5), encontrados muertos en Japón entre 1984 y 1987.<sup>1</sup>**

Tejido	Normales	Intoxicados
Cerebro	0.12 (0.11)	1.95 (0.66)
Músculo pectoral	Nd <sup>2</sup>	1.07 (0.57)
Hígado	0.53 (0.43)	27.1 (11.2)
Riñón	0.44 (0.51)	56.5 (28.8)
Tibia	5.65 (4.20)	36.3 (38.7)
Plumón del pecho <sup>3</sup>	0.83 (0.34)	9.57 (3.59)
Plumas primarias <sup>3</sup>	0.56 (0.20)	0.55 (0.08)
Concentración total corporal	0.24 (0.09)	5.31 (2.29)
Carga total corporal (mg)	1.72 (1.00)	37.6 (11.7)

1) Fuente: Honda *et al.* (1990).

2) nd= Niveles por debajo de los límites de detección.

3) Concentración expresada en ppm sobre peso seco.

La determinación del plomo en hueso, a pesar de que las concentraciones suelen ser bastante elevadas en este tejido, no resulta conveniente ya que su contenido refleja más bien la exposición crónica a largo plazo que no la exposición aguda (Friend, 1985; Pain, 1989a; Merchant *et al.*, 1991). Lo mismo ocurre en humanos (Nilsson *et al.*, 1991; Rabinowitz, 1991). Pain *et al.* (1992) indican que los niveles de plomo en hueso e hígado no están correlacionados dentro de un mismo individuo, si bien comparando diferentes especies los niveles de plomo en hueso dan una visión de la exposición de la especie similar a la que se obtiene con los niveles de plomo en hígado. El estudio experimental realizado por Irwin y Karstad (1972) con Ánade Real, parece demostrar que los valores de plomo en huesos, son relativamente fiables como indicadores de la intoxicación, al menos después de 14 semanas de

exposición a este metal (ver Tabla 1.20).

Las plumas presentan el mismo inconveniente que el hueso. Indican una exposición anterior al plomo, en el momento en el que la pluma está creciendo, lo que la hace ser menos fiable para estudiar la exposición al plomo de una especie a lo largo del año (Pain *et al.*, 1992).

Al igual que en la sangre, los niveles límite en hígado y riñón son motivo de discusión. Respecto al hígado existe mucha información. Los valores varían, como se puede comprobar en la Tabla 1. 16, desde 1, 5 ppm a 14 ppm sobre peso fresco (WW) para diferenciar los niveles de una fuente de exposición anormal al plomo. En los últimos años ha habido una tendencia a disminuir este valor frontera. Esto ha sucedido al demostrarse que concentraciones relativamente tan bajas como las 10 ppm sobre peso seco (DW) han sido, por ejemplo, suficientes para matar a flamencos (Bayle *et al.*, 1986).

**Tabla 1. 16.** - Niveles de plomo en hígado ( $\mu$  g/g o ppm)<sup>1</sup> a partir de los cuales se considera que un ave ha tenido una exposición anormal al plomo o que sufre una intoxicación franca y aguda.

Niveles límite	Fuente
EXPOSICION ANORMAL	Guitart <i>et al.</i> , 1994
1.5 ppm WW	Friend, 1985; USFWS, 1986; DeStefano <i>et al.</i> , 1991
2 ppm WW	
2-10 ppm WW	Craig <i>et al.</i> , 1990 <sup>2</sup>
2.3 ppm	Blus <i>et al.</i> , 1991
5 ppm WW	Cook y Trainer, 1966
7-14 ppm WW	Clausen y Wolstrup, 1979
5 ppm DW	Guitart <i>et al.</i> , 1994
INTOXICACION AGUDA	Friend, 1987
6-8 ppm WW	Blus <i>et al.</i> , 1991
6.4 ppm WW	Longcore <i>et al.</i> , 1974; Humphreys, 1990
6-20 ppm WW	Friend 1985; Craig <i>et al.</i> , 1990 <sup>2</sup>
8 ppm WW	Pattee <i>et al.</i> , 1981; Scheuhammer 1991
10 ppm WW	Clausen y Wolstrup 1979
15 ppm WW	Mudge 1983
10-20 ppm DW	Friend 1987
20-30 ppm DW	

1) Expresado sobre peso fresco (WW) o peso seco (DW).

2) Mencionado por estos autores a partir de fuentes no especificadas.

También existe una cierta variación para los valores que claramente definen o diagnostican una intoxicación, aunque la mayoría de autores en los últimos años sitúan la concentración frontera en el hígado alrededor de las 6-10 ppm WW o las 20 ppm DW. Friend (1985) indica que cifras superiores a las 8 ppm en aves encontradas muertas tienen un valor diagnóstico firme cuando además los análisis patológicos son compatibles con el plumbismo.

En otros tejidos, como el riñón, los valores límites se cifran en 7-14 ppm WW (Clausen y Wolstrup, 1979) para una exposición anormal, y las 5 ppm WW (Pattee *et al.*, 1981), 6-20 ppm WW (Longcore *et al.*, 1974; Humphreys, 1990), 15 ppm WW (Clausen y Wolstrup, 1979) o 20 ppm WW (Scheuhammer, 1991) para indicar una exposición fuerte y aguda, de valor ya claramente diagnóstico.

En el estudio del Ánade Real del Delta de l'Ebre (Guitart *et al.*, 1994) se determinó el nivel de plomo límite por la comparación de los niveles de plomo en hígado y riñón de los animales que tienen perdigones en la molleja con los que no presentan perdigones. De esta forma encontramos un nivel que separa con la mayor precisión los animales expuestos de los no expuestos a los perdigones. En la Tabla 1.17 se puede observar que las aves expuestas tienen unos niveles de plomo en hígado y riñón superior a las no expuestas. En este caso el valor que mejor separa los niveles de los que tienen perdigones en molleja de los que no tienen es 1, 5 ppm en el caso del hígado y 3 ppm en el caso del riñón.

**Tabla 1. 17. - Media aritmética ( $\bar{x}$ ) i SD, i media geométrica (G), de los niveles de plomo en hígado y riñón (ppm WW) de Ánade Real de las aves sin perdigones (NP) y con perdigones (SP) en molleja.<sup>1</sup>**

Hígado					Riñón			
	n	$\bar{x}$	SD	– G	n	$\bar{x}$	SD	– G
NP	29	0.7271	0.597	0.4835	29	1.9341	2.870	0.8013
SP	10	6.6473	6.723	3.8217	10	9.0594	8.215	6.4251

1) Fuente: Guitart *et al.* (1994).

En otros tejidos existe muy poca información. Por ejemplo, en cerebro se consideran niveles superiores a las 3 ppm como valor diagnóstico de plumbismo (Longcore *et al.*, 1974; Humphreys, 1990), y en hueso la barrera se sitúa alrededor de las 20 ppm DW (Mugde, 1983; USFWS, 1986) para diagnosticar una exposición anormal. El plomo que se encuentra en el tracto digestivo también podría ser utilizado para determinar la exposición reciente a los perdigones de plomo. En un estudio experimental con Codornices del Japón *Coturnix coturnix japonica* tratadas con un perdigón de plomo del nº 4, los niveles en el tracto gastrointestinal a las dos semanas de la dosificación fueron superiores a los del grupo control, incluso en las heces (Yamamoto *et al.*, 1993).

En definitiva los tejidos que se podrían utilizar para diagnosticar la exposición al plomo serían aquellos en los que se acumula el plomo en cantidades que permitan su determinación y que representen una exposición reciente y no acumulativa a este metal. En los Ánades Reales del Delta de l'Ebre se pudo ver que los tejidos que presentaban niveles de plomo más altos eran el hueso seguido del encéfalo, el páncreas y por último el bazo (Tabla 1.18).

**Tabla 1.18. - Concentración de plomo en hueso, bazo, páncreas y encéfalo (ppm WW) de Ánade Real del Delta de l'Ebre.<sup>1</sup>**

	Hueso	Bazo	Páncreas	Encéfalo
n	10	6	6	6
MEDIA	70.122	0.958	5.517	20.258
SD	72.738	0.803	5.831	47.445
MEDIANA	35.221	0.880	2.335	.0780

1) Fuente: Guitart *et al.* (1994).

El problema de la analítica de hueso es que no representa únicamente la exposición reciente al plomo y si observamos la correlación de los niveles de plomo en hueso con los de vísceras que sí que tienen un valor diagnóstico, como el hígado o el riñón, veremos que están muy poco correlacionados (Tabla 1.19). Lo mismo sucede para el encéfalo, mientras que el bazo parece representar bastante bien los niveles circulantes de plomo en un animal. El problema del bazo es que es un órgano muy pequeño y con niveles de plomo bastante bajos, lo que puede hacer difícil la determinación de niveles basales de plomo. El otro órgano estudiado, el páncreas, podría considerarse como sustituto del hígado en su análisis ya que presenta concentraciones similares, aunque podría tener el mismo inconveniente que el bazo por ser un órgano bastante pequeño.

**Tabla 1. 19. - Correlación (r de Pearson) entre los niveles de plomo de los diferentes tejidos que se indican de Ánade Real (n= 6).<sup>1</sup>**

	RIÑÓN	HUESO	BAZO	PÁNCREAS	ENCÉFALO

HÍGADO	0.6127 <sup>a</sup>	-0.1992 <sup>a</sup>	0.9312 <sup>c</sup>	0.8800 <sup>b</sup>	0.1025 <sup>a</sup>
RIÑÓN	-----	-0.0816 <sup>a</sup>	0.8278 <sup>b</sup>	0.5067 <sup>a</sup>	0.0131 <sup>a</sup>
HUESO	-----	-----	-0.2390 <sup>a</sup>	0.0198 <sup>a</sup>	0.3278 <sup>a</sup>
BAZO	-----	-----	-----	0.8127 <sup>b</sup>	0.0895 <sup>a</sup>
PÁNCREAS	-----	-----	-----	-----	0.5611 <sup>a</sup>

1) Fuente: Guitart *et al.* (1994).

### 1.5.3. - DIAGNÓSTICO EN POBLACIONES DE AVES

Además de realizar el diagnóstico en los individuos se puede estudiar la enfermedad a nivel de la población para conocer su incidencia y por tanto los efectos que puede tener en el conjunto de aves.

Los métodos de diagnóstico son los mismos que los realizados en el caso de las aves individualmente, tanto si están muertas como si se capturan vivas, lo único importante es hacer una consideración sobre los métodos de captura de los animales muestrarios en los estudios de campo encaminados a conocer aspectos epidemiológicos de la enfermedad.

Cuando los animales han sido cazados para llevar a cabo estudios en los que se pretende estimar la prevalencia de la intoxicación en una población, se debe tener en cuenta que los animales que están expuestos al plomo pueden ser más vulnerables a ser cazados (Bellrose, 1959). El estudio de animales muertos en epidemias de cólera aviar ha permitido observar que los animales muertos por esa enfermedad presentan en menor frecuencia perdigones en la molleja que los cazados, lo que corrobora la puntualización anterior (Gordus, 1993). Mediante otros métodos de captura, como pueden ser las pateras cebadas con grano para que entren los patos, el problema del sesgo va a estar igualmente presente al estar seleccionando los animales en peor condición física, que pueden ser los afectados por plumbismo. Lo mismo pasa en los estudios de rapaces que se capturan con ballesta (Pain *et al.*, 1993), etc. De hecho esto no supone ningún problema si se utilizan los datos para comparar la situación en poblaciones de distintos lugares o para comparar prevalencia en distintas especies, ya que el mismo sesgo se estará cometiendo en todos los casos.