

DURINA

RESUMEN

La durina es una enfermedad contagiosa aguda o crónica de los équidos reproductores que se transmite directamente de animal a animal durante el coito. El microorganismo causante es Trypanosoma (Trypanozoon) equiperdum (Doflein, 1901).

La durina es la única tripanosomiasis que no se transmite mediante un vector invertebrado. Trypanosoma equiperdum se distingue de otros tripanosomas en que consiste básicamente en un parásito tisular que casi nunca se detecta en la sangre. No se conoce la existencia de ningún otro reservorio natural del parásito más que los équidos infectados. Se encuentra presente en las secreciones genitales de los machos y las hembras infectadas. El periodo de incubación, gravedad y duración de la enfermedad varían considerablemente; a menudo es fatal, aunque se ha dicho que pueden producirse recuperaciones espontáneas y que también existen portadores asintomáticos. Pueden producirse infecciones subclínicas; los burros y los mulos son más resistentes que los caballos y pueden permanecer como portadores subclínicos. Los animales afectados no siempre transmiten la infección en cada cópula. Aunque la adaptación a otros hospedadores no siempre es posible, determinados roedores de laboratorio, como conejos, ratas y ratones pueden infectarse experimentalmente y emplearse para mantener cepas del parásito indefinidamente. Las cepas de Trypanosoma equiperdum se almacenan preferiblemente en nitrógeno líquido.

Los signos clínicos se caracterizan por el empeoramiento y las recaídas periódicas, finalizando con la muerte, a veces tras una paraplejía, o, posiblemente, con la recuperación. Pueden observarse fiebre moderada, edema local de los genitales y las glándulas mamarias, erupciones cutáneas, falta de coordinación, parálisis facial y labial, lesiones oculares, anemia y emaciación. Las placas edematosas cutáneas, de entre 5 y 8 cm de diámetro y 1 cm de grosor, todavía se consideran patognomónicas, aunque en ocasiones también se han hallado en équidos infectados por T. evansi.

Identificación del agente: *El diagnóstico definitivo se basa en el reconocimiento de los signos clínicos y la identificación del parásito. Como eso rara vez es posible, normalmente el diagnóstico se basa en los signos junto con la evidencia serológica a partir de pruebas de fijación del complemento (FC).*

Pruebas serológicas: *En los animales infectados se encuentran anticuerpos humorales independientemente de que presenten o no signos clínicos. La prueba de FC se emplea para confirmar la infección en los casos clínicos o en portadores latentes. Los animales no infectados, especialmente los burros, a veces proporcionan resultados poco claros. La prueba de inmunofluorescencia indirecta puede utilizarse para confirmar la infección o para resolver resultados no concluyentes de la prueba de FC. También se emplean los enzoinmunoanálisis.*

Pruebas moleculares: *Se están investigando marcadores genéticos que permitirán distinguir entre T. equiperdum y T. evansi, ambos dentro del subgénero Trypanozoon.*

Requisitos para las vacunas: *No se dispone de vacunas contra este parásito. El único control eficaz consiste en el sacrificio de los animales infectados. Es esencial una buena higiene durante la cópula asistida, ya que la infección puede transmitirse a través de fomites contaminados.*

A. INTRODUCCIÓN

La durina es una enfermedad contagiosa crónica o aguda de los équidos reproductores que se transmite directamente de animal a animal durante el coito. El microorganismo causante es *Trypanosoma equiperdum* (Doflein, 1901). La durina también se conoce con otros nombres: *mal de coït*, *syphilis du cheval*, *el dourin*, *morbo coitale maligno*, *Beschälseuche*, *slapsiekte*, *sluchnaya bolyezni* y *covering disease* (Barner, 1963; Hoare, 1972). Hasta ahora no se ha notificado ningún caso en el ser humano.

Aunque esta enfermedad se conoce desde la antigüedad, su naturaleza no se estableció hasta 1896, cuando Rouget descubrió *Trypanosoma* en un caballo argelino infectado. La durina es la única tripanosomiasis que no se transmite por medio de un vector invertebrado. *Trypanosoma equiperdum* se distingue de otros *trypansomas* en que es fundamentalmente un parásito tisular que rara vez se detecta en la sangre. No se conoce la existencia de ningún otro reservorio natural del parásito además de los équidos infectados.

La infección se transmite durante la cópula, más frecuentemente del semental a la yegua, aunque también de la yegua al semental, debido a la presencia del parásito en el líquido seminal y el exudado mucoso del pene y del prepucio del macho infectado, y en el mucus vaginal de la hembra infectada. En un animal infectado por primera vez, inicialmente los parásitos se encuentran libres sobre la superficie de la mucosa o entre las células epiteliales. A continuación tiene lugar la invasión de los tejidos, y aparecen placas edematosas en el tracto genital. Los parásitos pueden pasar entonces a la sangre, desde donde son transportados a otras partes del organismo. En los casos típicos, esta invasión metastásica da lugar a las placas cutáneas características.

El periodo de incubación, la gravedad y la duración de la enfermedad varían considerablemente. En África del Sur, lo típico es que la enfermedad sea crónica, generalmente leve, y puede durar entre 6 meses y 2 años (Henning, 1955). En otras zonas, como África del Norte y América del Sur, la enfermedad tiende a ser más aguda, durando solamente 1–2 meses o, excepcionalmente, 1 semana. Aunque la durina es una enfermedad fatal con una media de mortalidad del 50% (especialmente en los sementales), puede producirse la recuperación espontánea. Se reconoce la existencia de infecciones subclínicas. Los burros y los mulos son más resistentes que los caballos. En los burros, la enfermedad a menudo pasa desapercibida, mientras que su semen y secreciones vaginales contienen tripanosomas infectivos. En 2011, se notificó un brote de durina en Italia, 16 años después del caso de durina previo notificado oficialmente en ese mismo país (Pascucci *et al.*, 2013; Scacchia *et al.*, 2011).

Como *Trypanosoma* no se encuentra presente de manera continua en el tracto genital a lo largo de todo el curso de la enfermedad, la transmisión de la infección no tiene lugar necesariamente en cada cópula del animal infectado. La transmisión de la infección de la yegua al potro puede ocurrir a través de diversas mucosas, como la conjuntiva. Tras el examen mediante inmunohistoquímica, se han hallado tripanosomas en la glándula mamaria de una yegua que no estaba en lactación (Parkin, 1948), así como muestras de piel (Pascucci *et al.*, 2013; Scacchia *et al.*, 2011). Otros animales distintos a los équidos pueden resultar infectados, aunque muy difícilmente, de forma experimental, como los conejos, las ratas y los ratones. Así, el aislamiento de nuevas cepas es bastante difícil. Se ha observado que la adaptación a las ratas es posible tras el aislamiento en conejos, mediante la inoculación intratesticular (Heisch *et al.*, 1970; Schneider & Buffard, 1900; Soldini, 1939). Se ha comprobado que las cepas adaptadas a las ratas pueden mantenerse indefinidamente; la sangre infectada de roedor puede guardarse congelada con resultados satisfactorios. Lo habitual es que los antígenos utilizados en las pruebas serológicas se generen en roedores de laboratorio infectados.

La durina se caracteriza por fases de empeoramiento, tolerancia o recaída, que varían en cuanto a duración y que pueden aparecer una o varias veces antes de la muerte o la recuperación. Los signos clínicos de esta enfermedad que se detectan con mayor frecuencia son: pirexia, tumefacción y edema local de los genitales y las glándulas mamarias, erupciones edematosas cutáneas, crujido de las articulaciones, falta de coordinación, parálisis facial y labial, lesiones oculares, anemia y emaciación. Un signo patognomónico es la placa edematosa, que consiste en una lesión elevada sobre la piel de 5–8 cm de diámetro y 1 cm de grosor. Normalmente las placas aparecen en las costillas, aunque pueden presentarse en cualquier parte del cuerpo, y generalmente, persisten de 3 a 7 días. No constituyen un hecho constante en el tiempo.

Por lo general, el edema desaparece y reaparece a intervalos regulares. Durante cada reaparición puede observarse un incremento de la extensión del tejido engrosado e indurado de forma permanente. La mucosa vaginal puede presentar placas semitransparentes elevadas y engrosadas. Pueden sobresalir por la vulva pliegues de la membrana tumefacta. Es frecuente encontrar edema en las glándulas mamarias y en los tejidos adyacentes. Puede producirse la despigmentación de la zona genital, el periné y la ubre. En el semental, el primer signo clínico consiste en una tumefacción variable del pene y el prepucio. El edema se extiende en sentido caudal hacia el escroto, los ganglios linfáticos inguinales y el periné, con una extensión en sentido craneal a lo largo la parte inferior del abdomen. En los sementales de razas pesadas, el edema puede extenderse sobre la totalidad de la superficie del abdomen.

La pirexia es intermitente; los signos nerviosos incluyen la falta de coordinación, principalmente de los miembros pélvicos, la boca, las fosas nasales, las orejas y la garganta. Normalmente, la parálisis facial es unilateral. En los

casos fatales, la evolución de la enfermedad es, por lo general, lenta y progresiva, con un incremento de la anemia y la emaciación, aunque el apetito es bueno durante prácticamente todo el proceso.

Durante el examen post-mórtem se observan exudados gelatinosos bajo la piel. En el semental, el escroto, el prepucio y la bolsa testicular se encuentran engrosados e infiltrados. En algunos casos los testículos están inmersos en una masa dura de tejido esclerótico y pueden ser irreconocibles. En la yegua, la vulva, la mucosa vaginal, el útero, la vejiga y las glándulas mamarias pueden estar engrosadas con una infiltración gelatinosa. Los nódulos linfáticos, concretamente los de la cavidad abdominal, están hipertrofiados, reblandecidos, y, en algunos casos, hemorrágicos. La médula espinal de los animales con paraplejía es a menudo blanda, pulposa y presenta un cambio de color, en concreto, en las regiones lumbar y sacra.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Pruebas de las que se dispone y sus finalidades

Método	Finalidad			
	Determinar la ausencia de infección en la población	Determinar la ausencia de infección en animales determinados	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia
Identificación del agente¹				
Microscopía	–	+	+++	-
PCR	–	+	++	+
Detección de la respuesta inmunitaria				
Prueba de fijación del complemento	+	+++	+++	+++
IFAT	++	+	+	++
ELISA	++	+	+	++

Clave: +++ = método recomendado; ++ = método adecuado; + = puede utilizarse en ciertas situaciones, pero el coste, la fiabilidad u otros factores limitan mucho su aplicación; – = no adecuado para esta finalidad.

Aunque no todas las pruebas clasificadas como +++ o ++ han sido estandarizadas y validadas formalmente, su perfil sistemático y el hecho de que se hayan utilizado mucho sin resultados dudosos, las hace aceptables.

PCR = reacción en cadena de la polimerasa; IFAT = prueba de inmunofluorescencia indirecta;

ELISA = enzimoimmunoanálisis

1. Identificación del agente causal

1.1. Descripción de los métodos parasitológicos

El diagnóstico definitivo se basa en el reconocimiento de los signos clínicos y en la demostración del parásito. Eso rara vez es posible porque: (a) aunque los signos clínicos y las lesiones macroscópicas de la enfermedad desarrollada puedan ser patognomónicas, no siempre pueden identificarse con certeza, particularmente, en las fases tempranas o en los casos latentes; pueden confundirse con otras enfermedades, como el exantema coital (más aún, en algunos países [p. ej. América del Sur], las infecciones por *T. evansi* dan lugar a signos clínicos parecidos); (b) los tripanosomas se encuentran presentes de manera dispersa y son extremadamente difíciles de encontrar, incluso en las zonas edematosas; y (c) los tripanosomas se encuentran sólo de manera fugaz en la sangre, y en tan pequeño número que resulta difícil su detección. Un hecho que ilustra las dificultades de aislar *T. equiperdum* es que no se ha aislado ninguna cepa del parásito que se haya aceptado ampliamente que fuera *T. equiperdum* en ningún país desde 1979, y la mayoría de las cepas disponibles actualmente en los laboratorios nacionales de diagnóstico veterinario están relacionadas con *T. evansi* (Claes *et al.*, 2003; Lun *et al.*, 1992).

1 Se recomienda combinar varios métodos de identificación del agente en la misma muestra clínica

Recientemente, se han aislado nuevas posibles cepas de *T. equiperdum* en Etiopía (Dodola), en Italia y en Venezuela (TeAp-N/D1), aunque estas cepas todavía están por caracterizar (Hagos *et al.*, 2010; Perrone *et al.* 2009; Pascucci *et al.*, 2013). En la práctica, el diagnóstico se basa en la evidencia clínica respaldada por el modo de transmisión, por la serología y por la histopatología. Recientemente se han estudiado y publicado otras investigaciones sobre el tema (Claes *et al.*, 2003).

En los animales infectados, los tripanosomas se encuentran presentes sólo en cantidad escasa en los líquidos linfático y edematoso de los genitales externos, en el mucus vaginal (Parkin, 1948) en los exudados de las placas y de las glándulas mamarias (Pascucci *et al.*, 2013; Scacchia *et al.*, 2011). Normalmente, son indetectables en la sangre, aunque pueden encontrarse en el mucus uretral o vaginal recogido a partir de lavados prepuciales, vaginales, o raspados 4–5 días después de la infección. Después, pueden hallarse parásitos en el líquido del edema y de las placas, sobre todo poco después de su erupción. La piel de la zona que está sobre la placa debe rasurarse, lavarse y secarse, y se debe extraer el contenido líquido mediante una jeringa. Deben evitarse los vasos sanguíneos. El aspirado reciente se examina al microscopio para comprobar si presenta tripanosomas móviles. Solamente se encuentran presentes durante unos pocos días, así que las lesiones deben examinarse repetidamente a intervalos. Dado que rara vez el parásito se encuentra en extensiones de sangre de gota gruesa, se recomienda utilizar técnicas de concentración, como la centrifugación en tubo capilar, y la técnica de la centrifugación con mini-intercambio aniónico (Büscher *et al.*, 2009; Lanham & Godfrey, 1970; Woo 1970).

Como el de la durina es el único tripanosoma que afecta a los caballos en zonas libres de nagana y surra, la observación de los tripanosomas en extensiones de sangre de gota gruesa es suficiente para realizar un diagnóstico positivo. En países donde tienen lugar la nagana o la surra, es difícil diferenciar al microscopio a *T. equiperdum* (morfología, movilidad) de otros miembros del subgénero *Trypanozoon* (*T. evansi*, *T. brucei*). En particular, *T. equiperdum* y *T. evansi* no pueden diferenciarse en base a criterios morfológicos. Ambos son trypomastigotes delgados monomórficos con un flagelo libre, aunque se reconocen formas pleomórficas y cortas. Las cepas típicas del parásito tienen una longitud que oscila entre 15,6 y 31,3 µm.

1.2. Detección del ADN tripanosómico y diagnóstico diferencial

El ADN del kinetoplasto de la mitocondria es la característica más destacable del orden Kinetoplastida. En situaciones de campo, se han hallado cepas akinetoplásticas de *T. evansi* (no se tiñó ningún kinetoplasto con tinción de Giemsa) en animales infectados, pero esta situación no se ha observado en *T. equiperdum*. Lo más relevante para realizar esta distinción es la presencia de maxi-círculos en *T. equiperdum* y su ausencia en *T. evansi*, lo cual constituye una posible diferenciación entre estos dos parásitos (Li *et al.*, 2007). Además, otras publicaciones sugieren que la ausencia de la VSG (glicoproteína variable de superficie) RoTat 1.2 podría ser un marcador molecular para diferenciar *T. equiperdum* de *T. evansi* (Claes *et al.*, 2003; 2004), aunque la VSG RoTat 1.2 está ausente en algunas cepas de *T. evansi* (Ngaira *et al.*, 2005). Aunque no se dispone de ninguna reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específica de *T. equiperdum*, puede utilizarse la PCR específica del subgénero *Trypanozoon* para detectar ADN de *T. equiperdum* (véase el Capítulo 3.1.21 *Infecciones por Trypanosoma evansi (incluyendo surra)*). Recientemente, se ha aplicado una PCR de tiempo real muy sensible para el subgénero *Trypanozoon* a muestras de tejidos y líquido de un caballo infectado de forma natural por durina, que ha permitido la detección de niveles bajos del parásito (Pascucci *et al.*, 2013; Scacchia *et al.*, 2011).

Se ha utilizado la PCR y otros métodos relacionados de amplificación del ADN para examinar muestras de exudado o tejido, teniendo en cuenta que no funcionan en muestras de sangre tras la fase inicial de la infección (Calistri *et al.*, 2013).

2. Pruebas serológicas

En los animales infectados se encuentran presentes anticuerpos humorales, ya muestren signos clínicos o no. La prueba de fijación del complemento (FC) (UK Ministry of Agriculture, Fisheries and Food [MAFF], 1986) se emplea para confirmar la evidencia clínica y para detectar infecciones latentes. Los équidos no afectados, concretamente los burros y mulos, a menudo dan reacciones inconstantes o inespecíficas debido a los efectos anticomplementarios de sus sueros. En el caso de los sueros anticomplementarios, es aconsejable emplear la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFAT). No existe un protocolo adoptado internacionalmente. Es posible la aparición de reacciones cruzadas debido a la presencia de otros tripanosomas en algunos países; por ejemplo, *T. cruzi* y *T. evansi*. También se emplean enzimo-inmunoanálisis (ELISA). *Trypanosoma equiperdum* se encuentra estrechamente relacionado con otros tripanosomas del Viejo Mundo, como *T. brucei* y *T. evansi*. Todos los miembros de este género tienen en común elementos conservados del citoesqueleto que producen una fuerte reacción serológica cruzada. Todos los antígenos y antisueros para el diagnóstico que se encuentran disponibles actualmente para realizar las pruebas de serodiagnóstico contienen estos elementos conservados o

anticuerpos frente a ellos, y, por lo tanto, ninguno de los procedimientos serológicos que se describen a continuación es específico para la durina. Por lo tanto, el diagnóstico de la durina debe incluir el historial, los resultados clínicos y de anatomopatología, y la serología para confirmar el caso de enfermedad definitivamente. (Calistri *et al.*, 2013). Para mejorar significativamente el serodiagnóstico de la durina se necesitará el desarrollo de más antígenos de subunidades específicos de *T. equiperdum* y anticuerpos frente a ellos.

2.1. La prueba de fijación de complemento

Se pueden utilizar técnicas de microplaca estándar (Herr *et al.*, 1985). Como fuente de complemento se emplea suero de cobaya (disponible comercialmente). Otros reactivos son los eritrocitos (RBC) de oveja lavados en tampón veronal, y el suero hemolítico de conejo (es decir, anticuerpos anti-RBC de oveja generados en conejo) (comercial), así como sueros control que se sepa que son negativos o positivos.

2.1.1. Producción de antígeno

Debido a la falta de marcadores serológicos ni moleculares fiables para diferenciar *T. equiperdum* de *T. evansi*, debe prestarse especial atención a qué cepa de *T. equiperdum* se utiliza para la preparación del antígeno. Según avances recientes en la diferenciación de estas dos especies estrechamente relacionadas (Claes *et al.*, 2003, 2004), la verdadera *T. equiperdum* parece diferenciarse del *T. evansi* tipo A por la ausencia del gen VSG RoTat 1.2. Teniendo esto en cuenta, las cepas OVI y BoTat 1.1 de *T. equiperdum* podrían ser cepas adecuadas como fuentes de antígeno.

- i) Se inocula una rata libre de patógenos específicos con un concentrado de *T. equiperdum* almacenado por congelación. Se administran a ratas adultas intraperitonealmente 0,5–1,0 ml del estabilizado descongelado de forma rápida. Cuando se produce la máxima parasitemia, se recoge la sangre en presencia de un anticoagulante como la heparina, y aquella servirá como cultivo concentrado para inocular a más ratas.
- ii) Se inoculan intraperitonealmente veinte ratas grandes con 0,5–1.0 ml de este cultivo concentrado. Todas las ratas van a padecer una infección grave simultáneamente. Si es necesario, se ajusta la dosis y se inoculan más ratas para alcanzar una parasitemia máxima en el momento deseado dentro de las 72–96 horas. Normalmente, las ratas mueren en 3–5 días; antes de que eso ocurra, se extrae sangre del rabo para realizar extensiones de sangre de gota fina, que se examinan al microscopio. Cuando la parasitemia es máxima se sacrifica la rata y se recoge la sangre para separar los tripanosomas mediante uno de los dos siguientes protocolos: centrifugación diferencial o cromatografía de intercambio aniónico.
- iii) Para la centrifugación diferencial, se recoge sangre de rata infectada en solución salina de Alsever o de ácido-citrato-dextrosa (ACD). Aunque la parasitemia suele ser sincrónica, en caso de que no lo sea puede extraerse sangre y mantenerse en solución de Alsever o ACD a 4°C hasta que se haya extraído sangre de todas las ratas. La sangre se filtra a través de una gasa de muselina y se centrifuga a 800 **g** durante 4 minutos. La mayoría de los RBC sedimentan, mientras que los tripanosomas permanecen en suspensión.
- iv) El líquido sobrenadante se transfiere a un tubo fresco; la capa superior de RBC se mezcla con los tripanosomas en un segundo tubo, y la siguiente capa, en un tercero. Se añade solución salina de Alsever o ACD a los tubos 2 y 3 para evitar la coagulación de las células. Se mezclan todos los tubos y se centrifuga a 1.500 **g** durante 5 minutos.
- v) Se descarta el líquido sobrenadante y la capa superior blanca que contiene los tripanosomas se transfiere desde todos los tubos a uno limpio. La capa rosada siguiente se transfiere a un segundo tubo, y la capa inferior a un tercero.
- vi) Se añade solución salina fisiológica, se mezclan los tubos y se centrifugan de nuevo a 1.500 **g** durante 5 minutos para separar los tripanosomas. Se repite el paso de lavado hasta que todos los tripanosomas se recogen como una masa blanca pura. Diez ratas deben producir 3–5 g de antígeno. Los tripanosomas concentrados se diluyen con dos volúmenes de tampón veronal y polivinilpirrolidona al 5% como crioprotector. Antes de su empleo en las pruebas de FC, el antígeno debe dispersarse hasta obtenerse una suspensión fina con un homogenizador manual o motorizado y enfriado en hielo (Watson, 1920). Este antígeno puede dividirse en alícuotas, congelarse y liofilizarse.
- vii) Para la cromatografía de intercambio aniónico, se extrae sangre usando tubos con heparina y se carga en un gel de celulosa de DEAE (dietilaminoetil) equilibrado con una solución de solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenga glucosa, a pH 8,0 (Lanham & Godfrey, 1970). Se retienen células hemáticas en el gel y los tripanosomas

eluidos se centrifugan a 1.000-1.5000 **g** durante 15 minutos. Se vuelve a suspender un volumen de tripanosomas en tampón de fosfato 0,01 M helado a pH 8,0 y lisado de este modo mediante concentrado hipotónico durante 15 minutos. A partir de ese momento, la suspensión se centrifuga a 42.000 **g** durante 1 hora y el sobrenadante se recoge y se filtra mediante un filtro de 0,22 μm . El sobrenadante clarificado contiene la fracción hidrosoluble de tripanosomas. El contenido en proteína puede determinarse mediante espectrofotometría UV u otro método similar, y esta preparación de antígeno puede guardarse a -80°C en volúmenes pequeños.

El antígeno se estandariza mediante titulación frente a una dilución 1/5 de un antisuero estándar de título bajo.

2.1.2. Sueros

Deben inactivarse sueros positivos y negativos a 58°C durante 30 minutos antes de utilizarse en las pruebas. Normalmente, los sueros de burro y mulo se inactivan sometiéndolos a 62°C durante 30 minutos. El protocolo de la prueba de la fijación del complemento del USDA indica que se inactiven los sueros durante 35 minutos (*United States Department of Agriculture* [USDA], 2006). Las diluciones de los sueros que son positivos en las pruebas de detección sistemática se titulan frente a dos unidades del antígeno. Los sueros problema se analizan a una dilución de 1/5. Los sueros que presentan más de un 50% de fijación de complemento a esta dilución, generalmente, se consideran positivos.

2.1.3. Sueros anticomplementarios

Si el control anticomplementario muestra solamente una ligera señal positiva, esta puede ignorarse. Para el resto de los sueros anticomplementarios, la actividad debe titularse. Se preparan series de diluciones por duplicado y la muestra se analiza de nuevo empleando antígeno de *T. equiperdum* en la primera fila y solamente tampón veronal en la segunda. La segunda fila proporciona el título de la reacción anticomplementaria. Con tal que la primera fila muestre un punto final que sea al menos tres diluciones mayor que la segunda, el efecto anticomplementario puede ignorarse y la muestra puede considerarse positiva. Si los resultados son muy parecidos, debe requerirse una muestra fresca de suero. La dilución del suero a 1/2 y la inactivación por calor a 60–63°C durante 30 minutos puede originar una reducción o eliminación del efecto anticomplementario.

2.1.4. Tampones y reactivos

El tampón salino veronal 0,15 M, a pH 7,4, se utiliza para diluir los reactivos y para lavar los RBC de oveja. El antígeno se analiza previamente mediante titulación con el sistema de doble entrada, y en la prueba se emplean dos unidades. Se analiza complemento (C) de cobaya para determinar su actividad hemolítica, y se diluye para proporcionar dos unidades para la prueba. Se lavan tres veces RBC de cordero en solución de Alsever o ACD. Para el sistema hemolítico se emplea una solución al 3%. El protocolo del USDA requiere una solución al 2% en el procedimiento de la microtitulación con confirmación en un tubo de ensayo con RBC al 3% (USDA, 2006). Se recogen anticuerpos contra RBC de oveja generados en conejo – el suero hemolítico de conejo – a una concentración del doble de su título hemolítico (dos unidades). Todos los sueros problema, incluidos los sueros control positivo y negativo, se inactivan a una dilución 1/5 antes de ser analizados.

2.1.5. Diluciones primarias

- i) Se diluyen sueros problema y sueros control positivo y negativo cinco veces con tampón veronal.
- ii) Las soluciones se incuban en un baño con agua a 58°C durante 30 minutos para inactivar el complemento y destruir los factores anticomplementarios. Los sueros de burro y de mula deben inactivarse sometiéndolos a 63°C durante 30 minutos.

2.1.6. Procedimiento analítico

- i) Se depositan 25 μl del suero problema inactivado en tres pocillos.
- ii) Se depositan 25 μl del suero control inactivado en tres pocillos.
- iii) Se colocan solamente en el primer pocillo de cada suero 25 μl de antígeno de *T. equiperdum* diluido hasta obtener 2 unidades.
- iv) Se añaden 25 μl de complemento únicamente en los dos primeros pocillos de cada suero diluido hasta obtener cinco unidades.

- v) Se añaden 25 µl de tampón veronal, pH 7,4, al segundo pocillo de cada suero (pocillo anticomplementario).
- vi) Se depositan 50 µl de tampón veronal, pH 7,4, en el tercer pocillo de cada suero (pocillo de actividad lítica).
- vii) Se prepara el control del complemento.
- viii) Se agita la placa en un microagitador durante el tiempo necesario hasta mezclar los reactivos.
- ix) Se incuba la placa en un baño con agua durante 1 hora, en una incubadora o en una cámara húmeda 37°C.
- x) Se prepara el sistema hemolítico. Después de los primeros 50 minutos de incubación los RBC de oveja se sensibilizan mezclando volúmenes iguales de suero hemolítico de conejo diluido hasta contener dos unidades por 50 µl, y una suspensión al 3% de RBC lavados; se mezcla bien la solución y se incuba durante 10 minutos a 37°C.
- xi) Después de la incubación se añaden 50 µl del sistema hemolítico a cada pocillo.
- xii) Se agita la placa en un microagitador durante el tiempo necesario hasta mezclar los reactivos.
- xiii) Se incuba la placa durante 30 minutos a 37°C. Para facilitar la lectura de los resultados, las placas pueden centrifugarse tras la incubación.
- xiv) *Lectura de los resultados:* la placa se observa por la parte superior con retroiluminación. La fijación en cada pocillo se determina estimando la proporción de células no lisadas. El grado de fijación se expresa como 0, 1+, 2+, 3+, 4+ (0%, 25%, 50%, 75% o 100% de células no lisadas). Las reacciones se interpretan como sigue: 4+, 3+, 2+ = positivo, 1+ = sospechoso; trazas = negativo; hemólisis completa = negativo.
- xv) *Titulación de punto final:* Todos los sueros que dan reacciones positivas a una dilución 1/5 se diluyen de forma seriada en diluciones a la mitad, y se analizan de acuerdo con el procedimiento previo para la titulación de punto final.

2.2. Prueba de inmunofluorescencia indirecta

También puede emplearse una prueba de IFI para la durina (MAFF, 1986) como una prueba confirmativa o para resolver resultados no concluyentes obtenidos con la FC. La IFI se realiza como se indica a continuación:

2.2.1. Antígeno

(Para conocer el método, véase la preparación del antígeno para la prueba FC en el apartado B.2.1.). Se recoge sangre en *vacutainers* heparinizados o en una solución de dextrosa-ácido cítrico, a partir de un animal en el que el número de tripanosomas todavía esté aumentando (debe haber más de diez parásitos por campo del microscopio con un aumento de $\times 40$).

- i) La sangre se centrifuga durante 10 minutos a 800 **g**.
- ii) Se añaden uno o dos volúmenes de PBS a los RBC concentrados, se agita la mezcla y se preparan frotis que recubran todo el porta de manera uniforme.
- iii) Los frotis se secan al aire y se envuelven en grupos de cuatro, separados entre ellos por papel. Los grupos de portas se envuelven con papel de aluminio, se sellan en un contenedor hermético sobre gel de sílice, y se almacenan a -20°C o -80°C .
- iv) Los portas almacenados a -20°C deben mantener su actividad durante aproximadamente un año; a -80°C , deben ser utilizables durante más tiempo.

2.2.2. Solución de ácido-citrato-dextrosa

Se emplean 15 ml por 100 ml de sangre.

2.2.3. Conjugado

Anticuerpos anti-inmunoglobulinas de caballo generadas en oveja y marcadas con fluorescencia.

2.1.4. Procedimiento analítico

- i) Los portas con el antígeno se ajustan a la temperatura ambiente en un desecador. Un método alternativo consiste en retirar directamente los portas del congelador y fijarlos en acetona durante 15 minutos.
- ii) Se marcan los portas.
- iii) Se aplican de forma separada gotas de los sueros problema diluidos en PBS, y se incuban los portas en un contenedor húmedo a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- iv) Se lavan tres veces los portas durante cinco minutos con PBS, pH 7,2, y se secan al aire.
- v) Se añade el conjugado marcado con fluorescencia a la dilución adecuada. Los lotes individuales de antígeno y conjugado deben titularse unos frente a otros utilizando sueros control para optimizar la dilución del conjugado. Se incuban los portas en un contenedor a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- vi) Se lavan tres veces los portas durante cinco minutos con PBS, pH 7,2, y se secan al aire. Un método alternativo para reducir la fluorescencia de fondo consiste en la tinción de contraste, utilizando Azul Evans (0,01% en agua destilada) durante 1 minuto, se lava en PBS y se seca al aire.
- vii) Se montan los portas con glicerol de inmersión/PBS (50/50), con aceite de inmersión (disponible comercialmente, grado no fluorescente) o reactivo de montaje para tinción fluorescente (disponible comercialmente).
- viii) Finalmente, se examinan los portas con luz UV. La luz incidente se emplea con un equipo de filtro adecuado. Los portas pueden almacenarse a 4°C durante 4–5 días. Generalmente se consideran positivos los sueros diluidos a 1/80 o más que presentan una fluorescencia fuerte debida a los parásitos. La estimación de la intensidad de la fluorescencia exige experiencia por parte del observador.

En cada lote de pruebas deben incluirse los sueros control positivos y negativos, y debe tenerse especialmente en cuenta el patrón de fluorescencia de estos controles cuando se determinen los resultados de los sueros problema.

2.3. Prueba de enzimoimmunoanálisis (ELISA)

El ELISA se ha desarrollado y comparado con otras pruebas serológicas para el diagnóstico de la durina (Bundesinstitut für Gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, 1995; Wassall *et al.*, 1991).

Tampón carbonato, pH 9,6, para recubrir las placas de microtitulación con el antígeno: Na₂CO₃ (1,59 g); NaHCO₃ (2,93 g); y agua destilada (1 litro). Como alternativa, puede utilizarse solución salina tamponada con fosfato (PBS) KH₂PO₄ (0,2 g); Na₂HPO₄ × 12 H₂O (2,94 g); NaCl (8,0 g); KCl (0,2 g en 1 litro de agua destilada) para preparar la solución de antígeno.

2.3.1. Tampón de bloqueo

Tampón carbonato+ suero fetal bovino (FCS) al 3% o PBS + caseína al 1% (p/v).

2.3.2. PBS, pH 7,4, con Tween 20 (PBST) para el lavado

PBS + Tween 20 al 0,05% (v/v).

2.3.3. Tampón para muestra y conjugado

PBST + FCS al 6%, o PBS + caseína al 1% (p/v).

2.3.4. Tampón citrato-fosfato

Acido cítrico monohidratado (4,2 g en 200 ml de agua destilada); Na₂HPO₄ × 12 H₂O (en 200 ml de agua destilada). Se mezclan ambos componentes a volúmenes iguales.

2.3.5. Sistema indicador del sustrato

ABTS (2,2'-Azino-bis-[3-etilbenzotiazolina ácido 6-sulfónico]) (disponible comercialmente).

2.3.6. Conjugado

Anticuerpo anti IgG de caballo (H+L) PO o IgY anti Ig-PO de caballo generados en conejo.

2.3.7. Antígeno

El método se indica en la preparación del antígeno para la prueba de la FC, en el apartado B.2.1.

2.3.8. Procedimiento analítico

- i) Los pocillos de las columnas 2, 4, 6, etc., se cargan con 100 µl del antígeno (2 µg/ml); las columnas 1, 3, 5, etc., se cargan con la misma cantidad de tampón carbonato o PBS. La placa se incuba durante 40 minutos a 37°C (o durante toda la noche a 4°C) en una cámara húmeda, y se añaden 300 µl de tampón de bloqueo a cada pocillo. La placa se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente, se lava tres veces con PBST, con tiempos de lavado de 3 minutos/ciclo.
- ii) Se añaden en paralelo a los pocillos con y sin antígeno 150 µl de las muestras problema y suero equino control prediluido a 1/100 en tampón de muestra/conjugado. La placa se incuba durante 1 hora, y se lava tres veces con PBST.
- iii) Se añaden 150 µl del conjugado diluido apropiadamente en tampón de muestra/conjugado a todos los pocillos. La placa se incuba durante 1 hora con posterior lavado, tal como se ha descrito anteriormente.
- iv) Se añaden 150 µl del sistema indicador de sustrato a todos los pocillos y se incuban durante 1 hora.
- v) La reacción placa se agita durante 10 segundos y los resultados se leen espectrofotométricamente a una longitud de onda de 415 nm.
- vi) *Cálculo de los resultados:* La absorbancia (con antígeno) menos la absorbancia (sin antígeno) = extinción neta. Una reacción que sobrepase una extinción neta de 0,3 se considera un resultado positivo.

En cada lote de pruebas deben incluirse sueros control estándar positivo y negativo.

También se ha descrito un ELISA competitivo para detectar anticuerpos frente a *Trypanosoma equiperdum* (Katz *et al.*, 2000).

2.4. Otras pruebas serológicas

Se han utilizado otras pruebas serológicas, como el radioinmunoanálisis, y las pruebas de inmunoelectroforesis en contracorriente e inmunodifusión en gel de agar (AGID) (Caporale *et al.*, 1981; Hagebock *et al.*, 1993). La prueba AGID se ha empleado para confirmar muestras positivas y para analizar sueros anticomplementarios. Se utiliza un patrón de siete pocillos excavados en agarosa al 0,8% con tampón Tris, depositando el antígeno de FC en el pocillo central y los sueros desconocidos en pocillos alternos circundantes. Se ha publicado un método de inmunotransferencia para el diagnóstico simultáneo de la piroplasmosis equina, el muermo y la durina usando inmunotransferencia (Katz *et al.*, 1999). Se ha elaborado una prueba de aglutinación en placa que parece mejor que la prueba de fijación del complemento (Claes *et al.*, 2005).

3. Caso confirmado de durina

En caso de resultado serológicamente positivo y tras evaluar los signos clínicos, se repiten pruebas serológicas dos veces con un intervalo de 15 a 20 días y se lleva a cabo un minucioso estudio epidemiológico.

Un caso confirmado de durina se define como un animal que ha dado un resultado positivo mediante FC o IFAT o PCR y que (i) presenta signos clínicos compatibles con la durina o (ii) presenta un aumento del título serológico en la prueba de la FC en dos pruebas consecutivas o (iii) está epidemiológicamente vinculado a un caso confirmado de durina (Calistri *et al.*, 2013).

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

No se dispone de vacunas contra esta enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

- BARNER R.D. (1963). Protozoal diseases. *In: Equine Medicine and Surgery*, Bone J.F. *et al.*, eds. American Veterinary Publications, Santa Barbara, California, USA, 205–210.
- BUNDESINSTITUT FÜR GESUNDHEITLICHEN VERBRAUCHERSCHUTZ UND VETERINÄRMEDIZIN (Federal Institute for Consumer Health Protection and Veterinary Medicine) (1995). Working Protocols: ELISA on Dourine. BgVV. P.O. Box 33 00 13, D-14191 Berlin, Germany.
- BÜSCHER P., NGOYI D.M., KABORÉ J., LEJON V., ROBAYS J., JAMONNEAU V., BEBRONNE N., VAN DER VEKEN W. & BIÉLER S. (2009) Improved models of mini anion exchange centrifugation technique (mAECT) and modified single centrifugation (MSC) for sleeping sickness diagnosis and staging. *PLoS Negl. Trop. Dis*, **3**, e471.
- CALISTRI P., NARCISI V., ATZENI M., DE MASSIS F., TITTARELLI M., MERCANTE M.T., RUGGIERI E. & SCACCHIA M. (2013) Dourine re-emergence in Italy. *J. Equine Vet. Sci.*, **33**, 83–89.
- CAPORALE V.P., BIANCIFIORI F., DI MATTEO A., NANNINI D. & URBANI G. (1981). Comparison of various tests for the serological diagnosis of *Trypanosoma equiperdum* infection in the horse. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis*, **4**, 243–246.
- CLAES F., AGBO E.C., RADWANSKA M., TE PAS M.F., BALTZ T., DE WAAL D.T., GODDEERIS B.M., CLAASSEN E. & BUSCHER P. (2003). How does *T. equiperdum* fit into the *Trypanozoon* genus? A cluster analysis and multiplex genotyping approach. *Parasitol*, **126**, 425–431.
- CLAES F., ILGEBAYEVA G.D., VERLOO D., SAIDOULDIN T.S., GEERTS S., BUSCHER P. & GODDEERIS B.M. (2005). Comparison of serological tests for equine trypanosomosis in naturally infected horses from Kazakhstan. *Vet. Parasitol.*, **131** (3–4), 221–225.
- CLAES F., RADWANSKA M., URAKAWA T., MAJIWA P.A.O., GODDEERIS B. & BÜSCHER P. (2004). Variable surface glycoprotein RoTat 1.2 as a specific diagnostic tool for the detection of *Trypanosoma evansi* infections. *Kinetoplastid. Biol. Dis*, **3**, 3.
- HAGEBOCK J.M., CHIEVES L., FRERICHS W.M. & MILLER C.D. (1993). Evaluation of agar gel immunodiffusion and indirect fluorescent antibody assays as supplemental tests for dourine in equids. *Am. J. Vet. Res*, **54**, 1201–1208.
- HAGOS A., DEGEFA G., YACOB H., FIKRU R., ALEMU T., FESEHA G., CLAES F. & GODDEERIS B.M. (2010) Seroepidemiological survey of *Trypanozoon* infection in horses in the suspected dourine-infected Bale highlands of the Oromia region, Ethiopia. *Rev. Sci. Tech*, **29**, 649–654.
- HEISCH R.B., KILICK-KENDRICK R., GUY M.W. & DORRELL J. (1970). The development of trypanosomes, *Leishmania* and ascetic tumor cells in the testicles of laboratory animals. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*, **64**, 679–682.
- HENNING M.W. (1955). *Animal Diseases in South Africa*, Third Edition. Central News Agency, South Africa.
- HERR S., HUCHZERMAYER H.F.K.A., TE BRUGGE L.A., WILLIAMSON C.C., ROOS J.A. & SCHIELE G.J. (1985). The use of a single complement fixation technique in bovine brucellosis, Johne's disease, dourine, equine piroplasmosis and Q fever serology. *Onderstepoort J. Vet. Res*, **52**, 279–282.
- HOARE C.A. (1972). *The Trypanosomes of Mammals*. A Zoological Monograph. Blackwell Scientific Publications, Oxford & Edinburgh, UK.
- KATZ J.B., CHIEVES L.P., HENNAGER S.G., NICHOLSON J.M., FISHER T.A. & BYERS P.E. (1999). Serodiagnosis of equine piroplasmosis, dourine and glanders using an arrayed immunoblotting method. *J. Vet. Diagn. Invest*, **11**, 292–294.
- KATZ J.B., DEWALD R. & NICHOLSON J. (2000). Procedurally similar competitive immunoassay systems for the serodiagnosis of *Babesia equi*, *Babesia caballi*, *Trypanosoma equiperdum* and *Burkholderia mallei* infection in horses. *J. Vet. Diagn. Invest*, **12**, 46–50.
- LANHAM S.M. & GODFREY D.G. (1970). Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Exp. Parasitol*, **28**, 521–534.

- LI F.J., GASSER R.B., LAI D-H., CLAES F., ZHU X-Q. & LUN Z-R. (2007) PCR approach for the detection of *Trypanosoma brucei* and *T. equiperdum* and their differentiation from *T. evansi* based on maxicircle kinetoplast DNA. *Mol. Cell. Probes*, **21**, 1–7.
- LUN Z-R., BRUN R. & GIBSON W. (1992) Kinetoplast DNA and molecular karyotypes of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma equiperdum* from China. *Mol. Biochem. Parasitol*, **50**, 189–196.
- MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD (1986). A Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques, Third Edition. Her Majesty's Stationery Office, London, UK.
- NGAIRA J.M., OLEMBO N.K., NJAGI E.N. & NGERANWA J.J. (2005). The detection of non-RoTat 1.2 *Trypanosoma evansi*. *Exp. Parasitol.*, **110**, 30–38.
- PARKIN B.S. (1948) The demonstration and transmission of the South African strain of *Trypanosoma equiperdum* of horses. *Onderstepoort J. Vet. Sci. Anim. Ind*, **23**, 41–57.
- PASCUCCI I., DI PROVVIDO, A., CAMMÀ C., DI FRANCESCO G., CALISTRI P., TITTARELLI M., FERRI N., SCACCHIA M. & CAPORALE V. (2013). Diagnosis of dourine outbreaks in Italy. *Vet. Parasitol.*, **193**, 30–38.
- PERRONE T.M., GONZATTI M.I., VILLAMIZAR G., ESCALANTE A. & ASO P.M. (2009). Molecular profiles of Venezuelan isolates of *Trypanosoma sp.* by random amplified polymorphic DNA method. *Vet. Parasitol*, **161**, 194–200.
- ROUGET J. (1896). Contribution à l'étude du trypanosome des mammifères. *Annales Inst. Pasteur*, **10**, 716–728.
- SCACCHIA M., CAMMÀ C., DI FRANCESCO G., DI PROVVIDO A., GIUNTA R., LUCIANI M., MARINO A.M.F., PASCUCCI I. & CAPORALE V. (2011) A clinical case of dourine in an outbreak in Italy. *Vet. Ital*, **47**, 473–475.
- SCHNEIDER G. & BUFFARD M. (1900) Le trypanosome de la dourine. *Arch. Parasitol*, **3**, 124–133.
- SOLDINI M. (1939) Procédé rapide et pratique pour le diagnostic expérimental de la Dourine. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, **32**, 334–341.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (2006). Complement Fixation Test for Detection of Antibodies to *Trypanosoma equiperdum* – Microtitration Test. United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, National Veterinary Services Laboratories, Ames, Iowa, USA.
- WASSALL D.A., GREGORY R.J.F. & PHIPPS L.P. (1991). Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of dourine. *Vet. Parasitol*, **39**, 233–239.
- WATSON A.E. (1920). Dourine in Canada 1904–1920. History, Research and Suppression. Dominion of Canada Department of Agriculture, Health of Animals Branch, Ottawa, Canada.
- WOO P.T.K. (1970) The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Acta Trop*, **27**, 384–386.

*
* *

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1990; ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2013.