

CAPÍTULO 3.6.3.

DURINA EN LOS CABALLOS (INFECCIÓN POR *TRYPANOSOMA EQUIPERDUM*)

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.

Trypanosoma equiperdum 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 tienen lugar recuperaciones espontáneas, así como portadores latentes e infecciones subclínicas. 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 durante cada cópula. Aunque la adaptación a otros hospedadores no siempre es posible, los perros, los conejos, las ratas y los ratones pueden infectarse experimentalmente y emplearse para aislar y 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 paroplejía, 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.

Detección del agente: El diagnóstico definitivo se basa en el reconocimiento de los signos clínicos y en la identificación del parásito y la evidencia de transmisión sexual. Como eso rara vez es posible, normalmente el diagnóstico se basa en los signos clínicos, la evidencia serológica o molecular y el contexto epizootiológico.

Pruebas serológicas: En los animales infectados se encuentran anticuerpos humorales independientemente de que estos presenten 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 enzimoanálisis y las pruebas inmunocromatográficas.

Pruebas moleculares: No se dispone de marcadores genéticos que permitan distinguir de manera inequívoca entre cepas de T. equiperdum y de T. evansi 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 fómites contaminados.

A. INTRODUCCIÓN

La durina es una enfermedad contagiosa crónica o aguda de los équidos reproductores que se transmite principalmente de manera directa de animal a animal durante el coito. No se han documentado otras vías de transmisión, como la vertical o la congénita. El microorganismo causante es *Trypanosoma equiperdum* (Doflein, 1901).

Trypanosoma equiperdum es un parásito protozooario extracelular flagelado perteneciente al orden *Kinetoplastida*, la familia *Trypanosomatidae*, subgénero *Trypanozoon*. Otras especies de este subgénero son *T. brucei*, causante de la nagana (Capítulo 3.4.14 *Nagana: infecciones por tripanosomas salivarianos [excepto Trypanosoma evansi y T. equiperdum]*) y *T. evansi*, causante de la surra (Capítulo 3.1.21 *Surra en todas las especies [infección por Trypanosoma evansi]*). Ambas especies pueden causar algunos signos clínicos similares a lo de la durina en infecciones crónicas, como edema ventral, emaciación, anemia y signos neurológicos (Büscher *et al.*, 2019). Sin embargo, la presentación inicial de la durina suele incluir lesiones genitales que pueden progresar a una enfermedad neurológica y crónica durante un período de semanas a meses. Morfológica y genéticamente estas tres especies son muy similares.

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 (Rouget, 1896). *Trypanosoma equiperdum* 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 durina 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, como el sistema nervioso central. En los casos típicos, esta invasión metastática 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 Etiopía y en Mongolia, la durina parece ser endémica más que epidémica (Davaasuren *et al.*, 2017; Hagos *et al.*, 2010). 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.

Como los tripanosomas no se encuentran presentes 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 (Hoare, 1972). 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). No todas las cepas de *T. equiperdum* se adaptan con facilidad a los animales de laboratorio, como los roedores o los conejos. Se ha observado que la adaptación a las ratas es posible tras el aislamiento en conejos, mediante la inoculación intratesticular (Schneider & Buffard, 1900; Soldini, 1939). También se ha logrado el aislamiento directo *in vitro* a partir del tracto uretral (Suganuma *et al.*, 2016). Se ha comprobado que las cepas adaptadas a las ratas y a la vida *in vitro* pueden mantenerse indefinidamente y criopreservarse. Lo habitual es que los antígenos utilizados en las pruebas serológicas se generen en roedores de laboratorio infectados o en parásitos propagados *in vitro*.

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 frecuente pero no constante es la formación de placas edematosas, que consisten 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. Durante mucho tiempo, las placas edematosas se han considerado patognomónicas, pero también se han descrito en infecciones por *T. evansi* (Van den Bossche et al., 2009).

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 glande, el 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 para el diagnóstico de la durina y sus propósitos

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Detección del agente^(a)						
Observación al microscopio	–	+	+	+++	–	–
PCR/ PCR en tiempo real	–	+	+	+++	+	–
Detección de respuesta inmunitaria						
CFT	++	+++	+++	+++	+++	–
IFAT	++	+	++	+	++	–

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
ELISA	+++	+	+++	+	+++	–
ICT	+	+	+	+	+	–

Clave: +++ = método recomendado para este propósito; ++ = método recomendado pero con limitaciones; + = adecuado en muy pocas circunstancias; – = no adecuado para este propósito.

PCR = reacción en cadena de la polimerasa; CFT = prueba de fijación del complemento; IFAT = prueba de inmunofluorescencia indirecta; ELISA = enzimoimmunoanálisis; ICT = prueba inmunocromatográfica.

^(a)Se recomienda aplicar una combinación de métodos de identificación a cada muestra clínica.

1. Detección del agente

1.1. Descripción de los métodos parasitológicos

El diagnóstico se confirma con en el reconocimiento de los signos clínicos y la demostración del parásito y de que se ha producido la infección a través del coito. 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 o infecciones por otros tripanosomas, como *T. evansi* (Büscher *et al.*, 2019); (b) normalmente, los tripanosomas se encuentran presentes de manera dispersa y son extremadamente difíciles de encontrar, incluso en las zonas edematosas; y (c) a menudo no se conoce cuál ha sido la vía de transmisión.

Recientemente, se han aislado nuevas cepas de *T. equiperdum* en Etiopía (Dodola) (ICT 2011), Venezuela (TeAp-N/D1) y Mongolia (IVM-t1), aunque estas cepas todavía están por caracterizar (Hagos *et al.*, 2010; Perrone *et al.* 2009; Pascucci *et al.*, 2013; Sánchez *et al.*, 2015a, 2015b; Suganuma *et al.*, 2016). En la práctica, el diagnóstico se basa en la evidencia clínica respaldada por el modo de transmisión, por la serología y por la histopatología.

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 uretral y vaginal (Parkin, 1948) y en los exudados de las placas y 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 o raspados prepuciales o vaginales 4–5 días después de la infección. 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, o la técnica de la centrifugación con mini-intercambio aniónico (Lanham & Godfrey, 1970; Woo 1970).

Trypanosoma equiperdum es relativamente fácil de distinguir morfológicamente de *T. congolense* y de *T. vivax*, especies que pueden infectar a los caballos. Sin embargo, en países donde tienen lugar *T. evansi* o *T. brucei*, es difícil diferenciar al microscopio a *T. equiperdum* (morfología, movilidad) de estos otros miembros del subgénero *Trypanozoon*. En particular, *T. equiperdum* y *T. evansi* no pueden diferenciarse en base a criterios morfológicos. Ambos son tripomastigotes delgados monomórficos con un flagelo libre, aunque en ocasiones se han descrito formas 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 visible con tinción de Giemsa) en animales infectados, pero esta situación no se ha observado en *T. equiperdum*. La sugerencia de Li *et al.* (2007) de que *T. equiperdum* se puede distinguir de *T. evansi* por la presencia aparente de maxi-círculos intactos en *T. equiperdum* sigue siendo controvertida. Por otra parte, la ausencia de la glicoproteína de superficie variante (VSG) RoTat 1.2 podría ser un marcador molecular para diferenciar las infecciones por *T. equiperdum* de las infecciones por *T. evansi* tipo A (Claes *et al.*, 2003; 2004). Aunque no se dispone de ninguna reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específica de *T. equiperdum*, puede utilizarse la PCR y la PCR en tiempo real específicas del subgénero *Trypanozoon* para detectar ADN de *T. equiperdum* (Benfodil *et al.*, 2020; Masiga *et al.*, 1992) (véase también el Capítulo 3.1.21 *Surra en todas las especies [infección por Trypanosoma evansi]*). Se ha aplicado una PCR en 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 (Becker *et al.*, 2004; Pascucci *et al.*, 2013).

Tabla 2. Cebadores y sondas descritos para la PCR convencional y para la PCR en tiempo real específicas de *Trypanozoon* que pueden utilizarse para la detección de ADN de *T. equiperdum*

Diana	Secuencias de los cebadores/sondas (5' → 3')	Longitud del amplicón	Referencia
177 repeticiones de pb	TBR1: GAA-TAT-TAA-ACA-ATG-CGC-AG	164 pb	Masiga <i>et al.</i> , 1992
	TBR2: CCA-TTT-ATT-AGC-TTT-GTT-GC		
177 repeticiones de pb	Tb177F: AAC-AAT-GCG-CAG-TTA-ACG-CTA-T	134 pb	Becker <i>et al.</i> , 2004; Pascucci <i>et al.</i> , 2013
	Tb177B: ACA-TTA-AAC-ACT-AAA-GAA-CAG-CGT-TG		
ADNr de la subunidad 18S	M18SF: CGT-AGT-TGA-ACT-GTG-GGC-CAC-GT	150 pb	Benfodil <i>et al.</i> , 2020
	M18SR: ATG-CAT-GAC-ATG-CGT-GAA-AGT-GAG		
	M18SP: TCG-GAC-GTG-TTT-TGA-CCC-ACG-C-MGB-VIC		

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) 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, o para fines de diagnóstico clínico, la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFAT) y el enzimoimmunoanálisis (ELISA) pueden aportar información adicional. No existen protocolos adoptados internacionalmente. Es posible la aparición de reacciones cruzadas debido a la presencia de otros tripanosomas en algunos países; por ejemplo, *T. cruzi*, *T. vivax* y *T. evansi*. *Trypanosoma equiperdum* se encuentra estrechamente relacionado con otros miembros del género *Trypanosoma*, como *T. brucei* y *T. evansi*. Todos los miembros de este subgénero 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. Prueba de fijación del complemento

Se pueden utilizar técnicas de microplaca estándar. 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 o moleculares fiables para diferenciar *T. equiperdum* de otros taxones de *Trypanozoon* (Büscher et al., 2019; Cuyppers et al., 2017), *T. equiperdum* se utiliza para cualquier preparación de antígeno. Las cepas que crecen fácilmente en los roedores son *T. equiperdum* OVI, BoTat, Dodola y TeAp-N/D1. Las cepas que están adaptadas al cultivo *in vitro* son *T. equiperdum* OVI y IVM-t1. Debe tenerse en cuenta que las preparaciones de antígeno crudo como las descritas a continuación no son específicas de ratones y que presentarán reacción cruzada con sueros de caballos infectados por *T. brucei* y *T. evansi*.

2.1.1.1 Preparación de antígeno a partir de parásitos propagados *in-vitro*

El procedimiento que se describe a continuación se basa en el de Bassarak et al. (2016), aunque con algunas modificaciones. *Trypanosoma equiperdum* OVI (ITMAS 241199C, comprado en el *Institute of Tropical Medicine*, Antwerp, en 2008) se adaptó a las condiciones de cultivo *in vitro*. Previa petición, se pueden adquirir reservas de tripanosomas adaptados al cultivo y conservadas en nitrógeno líquido¹.

i) Reactivos y soluciones para preparar el medio

Sustancia	Sistema de identificación	Número
Potencia del MEM para 1 litro con sales de Earle y L-glutamina, sin NaHCO ₃ (Sigma-Aldrich M0268)		
2-Mercapto-etanol	CAS	60-24-2
Adenosina	CAS	58-61-7
Solución de antibiótico-antimicótico (100×)		
Disulfonato de batocuproína	CAS	52698-84-7
Cisteína	CAS	52-90-4
D(+)-Glucosa × 1 H ₂ O	CAS	50-99-7
Glicerol	CAS	51-81-5
HEPES	CAS	7365-45-9
Isopropanol	CAS	67-63-0
Hipoxantina	CAS	68-94-0
Suero de neonato bovino (NCS) inactivado por calor		
Cloruro potásico	CAS	7447-40-7
Sulfato magnésico × 7 H ₂ O	CAS	10034-99-8
MEM no esencial (100×)		
Piruvato sódico	CAS	113-24-6
Cloruro sódico	CAS	7647-14-5
Carbonato hidrógeno sódico	CAS	144-55-8
Na ₂ HPO ₃ × 12 H ₂ O	CAS	10039-32-4

¹ Del Laboratorio de Referencia de la OIE para la durina: <https://www.woah.org/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>

Sustancia	Sistema de identificación	Número
NaH ₂ PO ₃ × 2 H ₂ O	CAS	10049-21-5
Ornitina/HCl	CAS	3184-13-2
Timidina	CAS	50-89-5
Hipoxantina 100× solución primaria	225 ml de H ₂ O, 340 mg de hipoxantina, 25 ml de NaOH 1 M. Agitar en baño de agua durante 20 min a 55°C. Filtrar por un filtro de 0.22 µm; conservar a 4°C.	
Cisteína/batocuproína-disulfonato 100× solución primaria	225 ml de H ₂ O, 705 mg de disulfonato de batocuproína, 4550 mg de cisteína, 25 ml de HCl 2 M. Agitar durante 20 min a 55°C. Filtrar por un filtro de 0.22 µm. Conservar a 4°C.	

ii) Preparación del medio de cultivo con NCS al 15% (ejemplo para 3 litros)

Con una campana extractora, se agregan 47 µl de 2-mercapto-etanol a 10 ml de H₂O. En un vaso de precipitados de 5 litros con 2430 ml de H₂O, se añaden: 3 paquetes de polvo de MEM, 6,6 g de NaHCO₃, 17,85 g de HEPES, 3 g de glucosa, 0,66 g de piruvato de sodio, 0,15 g de ornitina, 0,012 g de timidina, 0,039 g de adenosina, 30 ml de MEM no esencial solución primaria 100×, 15 ml de solución primaria de antibiótico-antimicótico 100× y 10 ml de la dilución de 2-mercapto-etanol. Se ajusta a pH 7,4 con NaOH y HCl y se agita durante 10 minutos. Se añaden 30 ml de solución primaria de hipoxantina 100× y 30 ml de solución primaria de cisteína/disulfonato de batocuproína 100×. Se ajusta a pH 7,4 con NaOH y HCl y se agregan H₂O hasta 2550 ml.

En tres matraces de 1 litro, se dispensan 150 ml de NCS. Se llenan los matraces con 850 ml de medio de cultivo filtrado por un filtro de 0,22 µm. Se mezcla suavemente y se conserva a 4°C. El medio de cultivo será estable durante al menos 8 semanas.

iii) Preparación del tampón de dilución de tripanosomas (TDB), pH 7,7

Se disuelven 3,23 g de Na₂HPO₄ × 12 H₂O, 0,14 g de NaH₂PO₄ × H₂O, 0,19 g de KCl, 2,34 g de NaCl, 0,13 g de MgSO₄ × 7 H₂O, 1,80 g de D(+)-Glucosa × H₂O en 450 ml de H₂O. Ajustar a pH 7,7 con NaOH y HCl. Se completa hasta 500 ml con H₂O. Se filtra a través de un filtro de 0,22 µm. Se conserva a 4°C (será estable durante al menos 8 semanas).

iv) Preparación de una solución de 5% de PVP (polivinilpirrolidona), 0.01% de mertiolato-NaCl

Se prepara una solución de mertiolato-NaCl al 1% disolviendo 4,25 mg de NaCl y 5 mg de tiosalicilato sódico de etilmercurio en 0,5 ml de H₂O. En un vaso de precipitados de 50 ml, se disuelven 425 mg de NaCl y 2,5 g de PVP 25 en 40 ml de H₂O. se añaden 0,5 ml de solución de mertiolato-NaCl al 1% y se completa hasta 50 ml con H₂O. Se filtra a través de un filtro de 0,22 µm. Se conserva a 4°C.

v) Se prepara un cultivo de tripanosomas con 1 × 10⁵ tripanosomas/ml respetando una relación superficie-volumen de 3,25 cm² por ml, p. ej. en matraces de cultivo T-500 de tres niveles llenos con 154 ml de medio de cultivo e incubando a 37°C en una incubadora de CO₂.

vi) Se recogen los tripanosomas a concentraciones de 1,5 a 2 × 10⁶ /ml una o dos veces por semana en lotes de 400 ml de medio de cultivo celular. Se mantienen los tripanosomas sobre hielo durante todo el proceso. El medio que contiene tripanosoma se dispensa en un conjunto de tubos de 50 ml y se centrifuga (10 minutos, 4°C, 1300 g). Los precipitados de 8 tubos se resuspenden cuidadosamente con un pequeño volumen de TDB helado y se transfieren a un nuevo tubo estéril de 50 ml. Los tripanosomas se lavan dos veces con TDB (10 minutos, 4°C, 1300 g) y el sobrenadante se elimina por completo. Los precipitados se conservan a -20°C. Es aconsejable confirmar la esterilidad de las preparaciones utilizando placas de agar sangre.

- vii) Se determina el número total de células de todos los sedimentos. Se prepara una solución fresca de PVP-mertiolato (1 ml por 1×10^9 tripanosomas). Se descongelan los precipitados sobre hielo, se resuspenden los precipitados con el 50% del volumen calculado de solución de PVP al 5% helada en una solución de mertiolato-NaCl al 0,01% y se agrupan en un nuevo tubo estéril de 50 ml. Se dispensa solución de PVP al 5% helada en una solución de mertiolato-NaCl al 0,01% hasta el 100% del volumen calculado. Se depositan 200 μ l de solución de antígeno en cada uno de los frascos de borde perlado estériles (se mezcla bien varias veces durante el proceso) y se ponen en la caja de transporte de bioseguridad sobre hielo para transportarlos al congelador a -80°C . Se pone en marcha el aparato de liofilización y, después de 90 minutos, los frascos congelados que contienen antígeno se colocan en el aparato de liofilización. La liofilización se realiza durante la noche. Al día siguiente, se completa la liofilización e inmediatamente la tapa se cierra herméticamente y el antígeno se conserva a -20°C . Como alternativa, la solución de antígeno se puede conservar en pequeños volúmenes a -80°C . La dilución de trabajo del antígeno se estandariza mediante titulación frente a una dilución 1/5 de un antisero estándar de título bajo.

2.1.1.2 Preparación de antígeno a partir de parásitos propagados *in vivo*

Teniendo en cuenta el principio de las 3R, el procedimiento de propagación *in vivo* descrito a continuación debe plantearse solo cuando no pueda aplicarse la propagación *in vitro*.

- i) Se anestesian ratas libres de patógenos específicos con CO_2 o isoflurano y se inoculan con cepas de *T. equiperdum* crioconservadas después de que un frotis de sangre haya indicado su viabilidad. Las ratas adultas reciben por vía intraperitoneal 0,3 a 1,0 ml de estabilizado congelado rápidamente descongelado. En la parasitemia máxima, estas ratas iniciadoras se anestesian y se usa una punción cardíaca para extraer sangre que se depositará en tubos con anticoagulante, como jeringas de heparina o Alsever, que servirán como cultivo primario para la inoculación de otras ratas.
- ii) Se anestesian 20 a 100 ratas grandes justo antes de ser inoculadas por vía intraperitoneal con 0,3–1.0 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 a diario del rabo para realizar extensiones de sangre de gota fina, que se examinan al microscopio. Cuando la parasitemia es máxima se eutanasian las ratas mediante CO_2 y se les extrae sangre vía punción cardíaca 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). La sangre a granel se mezcla enérgicamente y después se preparan alícuotas de 45 ml que se depositarán en tubos cónicos de centrifuga de 50 ml. Estos tubos se centrifugan a 2500 *g* durante 10 minutos a 4°C . El contenido del tubo debe separarse en tres partes (de arriba a abajo): suero/anticoagulante, tripanosomas/leucocitos, y eritrocitos.
- iv) La capa de suero/anticoagulante se retira y se desecha. La capa de tripanosomas/leucocitos se retira de cada tubo y se coloca en un recipiente lo suficientemente grande como para volver a poner “a granel” todos los tripanosomas juntos. Además, aproximadamente 1 a 3 ml de los eritrocitos situados debajo de la capa de tripanosomas/leucocitos contendrán tripanosomas. Varios ml de eritrocitos situados debajo de la capa de tripanosomas/leucocitos deben eliminarse y agregarse al conjunto a granel.
- v) Para lavar los tripanosomas para eliminar los eritrocitos, se debe usar el mismo anticoagulante que se usó en la extracción de sangre a granel y se deben realizar varios pasos de lavado. Se agregan ~ 25 ml de una capa de tripanosomas a granel a tubos cónicos de 50 ml y se completa cada tubo hasta un volumen total de 45 ml de anticoagulante. Los tubos se centrifugan a 2500 *g* durante 10 minutos a 4°C . La capa que contiene tripanosomas se retira y se conserva de nuevo. Se repiten los pasos de lavado

anteriores hasta que los eritrocitos se hayan eliminado en su mayor parte de la capa de tripanosomas.

- vi) Para diluir los tripanosomas purificados para la producción de antígeno, la capa de tripanosomas purificada se mezcla con medios de liofilización (PVP al 5%). En general, el factor de la dilución de partida es 1:5 (capa de tripanosomas respecto a los medios de liofilización). 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], 2016). 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 puede 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.

2.1.4. Tampones y reactivos

- i) Tampón de dilución de tripanosomas (TDB), pH 7,7: Na_2HPO_4 12 H_2O 18 mM, NaH_2PO_4 H_2O 2 mM, KCl 5 mM, NaCl 80 mM, MgSO_4 7 H_2O 1 mM, y glucosa 18 mM.
- ii) PVP al 5% en solución 1/10 000 de mertiolato-NaCl: NaCl 145 mM, solución al 1% de mertiolato 25 mM - NaCl 145 mM y PVP al 5%.

El tampón salino veronal 0,15 M, a pH 7,4, o cualquier tampón CFT que pueda adquirirse, se utiliza para diluir los reactivos y para lavar los RBC de oveja. El antígeno se analiza previamente mediante titulación, 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 (USDA, 2016). 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 para el cribado

- i) Se depositan 25 µl del suero problema inactivado en tres pocillos.
- ii) Se depositan 25 µ 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 IFAT para la durina 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 marcados con fluoróforo (a la venta).

2.2.4. 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. Enzimoimmunoanálisis (ELISA)

El ELISA se ha desarrollado y comparado con otras pruebas serológicas para el diagnóstico de la durina (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. Sistema indicador del sustrato

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

2.3.5. Conjugado

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

2.3.6. Antígeno

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

2.3.7. 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 350 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.

2.4. Otras pruebas serológicas

Se han utilizado otras pruebas serológicas, como el radioinmunoanálisis, y las pruebas de contraelectroforesis e inmunodifusión en gel de agar, pero estos formatos han quedado obsoletos. Más recientemente, se ha desarrollado una prueba inmunocromatográfica con antígeno recombinante derivado de *T. evansi* y una prueba de inmunoelectrotransferencia con antígeno nativo

de *T. equiperdum* OVI, y ambas deben seguir investigándose (Davaasuren et al., 2017; Luciani et al., 2018).

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

No se dispone de vacunas contra esta enfermedad. El único método efectivo de control es el sacrificio de los animales infectados. Durante la monta asistida es fundamental contar con una buena higiene, puesto que la transmisión de la infección puede tener lugar por fómites contaminados.

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.

BASSARAK B., MOSER I. & MENGE C. (2016). *In vitro* production of *Trypanosoma equiperdum* antigen and its evaluation for use in serodiagnosis of dourine. *Vet. Parasitol.* **223**, 133–140.

BECKER S., FRANCO J.R., SIMARRO P.P., STICH A., ABELE P.M. & STEVERDING D. (2004). Real-time PCR for detection of *Trypanosoma brucei* in human blood samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **50**, 193–199.

BENFODIL K., BÜSCHER P., ABDELLI A., VAN REET N., MOHAMED-HERIF A., ANSEL S., FETTATA S., DEHOU S., BEBRONNE N., GEERTS M., BALHARBI F. & AIT-OUHDIA K. (2020). Comparison of serological and molecular tests for detection of *Trypanosoma evansi* in domestic animals from Ghardaïa district, South Algeria. *Vet. Parasitol.*, **280**, 109089.

BÜSCHER P., GONZATTI M.I., HÉBERT L., INOUE N., PASCUCCI I., SCHNAUFER A., SUGANUMA K., TOURATIER L., VAN REET N. (2019). Equine trypanosomosis: enigmas and diagnostic challenges. *Parasit. Vectors*, **12**, 234.

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.

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.

CUYPERS B., VAN DEN BROECK F., VAN REET N., MEEHAN C.J., CAUCHARD J., WILKES J.M., CLAES F., GODDEERIS B., BIRHANU H., DUJARDIN J.-C., LAUKENS K., BÜSCHER P. & DEBORGGRAEVE S. (2017). Genome-wide SNP analysis reveals distinct origins of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma equiperdum*. *Genome Biol. Evol.*, **9**, 1990–1997.

DAVAASUREN B., AMGALANBAATAR T., MUSINGUZI S.P., SUGANUMA K., OTGONSUREN D., MOSSAAD E., NARANTSATSRAL S., BATTUR B., BATTSETSEG B., XUAN X. & INOUE N. (2017). The evaluation of GM6-based ELISA and ICT as diagnostic methods on a Mongolian farm with an outbreak of non-tsetse transmitted horse trypanosomosis. *Vet. Parasitol.*, **244**, 123–128.

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.

HENNING M.W. (1955). *Animal Diseases in South Africa*, Third Edition. Central News Agency, South Africa.

HOARE C.A. (1972). *The Trypanosomes of Mammals. A Zoological Monograph*. Blackwell Scientific Publications, Oxford & Edinburgh, UK.

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.
- LUCIANI M., DI FEBBO T., ORSINI M., KRASTEVA I., CATTANE O.A., PODALIRI VULPIANI M., DI PANCRIZIO C., BACHI A. & TITTARELLI M. (2018). *Trypanosoma equiperdum* Low Molecular Weight Proteins As Candidates for Specific Serological Diagnosis of Dourine. *Front. Vet. Sci.*, **5**, 40. doi: 10.3389/fvets.2018.00040. eCollection 2018.
- MASIGA D.K., SMYTH A.J., HAYES P., BROMIDGE T.J. & GIBSON W.C. (1992). Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. *Int. J. Parasitol.*, **22**, 909–918.
- 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.
- ROUGET J. (1896). Contribution à l'étude du trypanosome des mammifères. *Annales Inst. Pasteur*, **10**, 716–728.
- SÁNCHEZ E., PERRONE T., RECCHIMUZZI G., CARDOZO I., BITEAU N., ASO P.M., MIJARES A., BALTZ T., BERTHIER D., BALZANO-NOGUEIRA L. & GONZATTI M.I. (2015a). Molecular characterization and classification of *Trypanosoma* spp. Venezuelan isolates based on microsatellite markers and kinetoplast maxicircle genes. *Parasit. Vectors*, **8**, 536–546.
- SANCHEZ E., PERRONE T., RECCHIMUZZI G., CARDOZO I., BITEAU N., ASO P.M., MIJARES A., BALTZ T., BERTHIER D., BALZANO-NOGUEIRA L., GONZATTI M.I. (2015b). Erratum to: Molecular characterization and classification of *Trypanosoma* spp. Venezuelan isolates based on microsatellite markers and kinetoplast maxicircle genes. *Parasit. Vectors*, **8**, 566.
- 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.
- SUGANUMA K., NARANTSATSRAL S., BATTUR B., YAMASAKI S., OTGONSUREN D., MUSINGUZI S.P., DAVAASUREN B., BATTSETSEG B. & INOUE N. (2016). Isolation, cultivation and molecular characterization of a new *Trypanosoma equiperdum* strain in Mongolia. *Parasit. Vectors*, **9**, 481.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (2016). 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.
- VAN DEN BOSSCHE P., GEERTS S. & CLAES F. (2009). Equine trypanosomiasis. In: *Infectious diseases of the horse*, Mair T.S. & Hutchinson R.S., eds. Equine Veterinary Journal, Ely, UK, 354–365. <https://www.amazon.co.uk/Infectious-Diseases-Horse-Tim-Mair/dp/0954568923>
- 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: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la durina (puede consultarse en la página web de la OIE: <https://www.woah.org/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>). Por favor, contacte con el Laboratorio de Referencia de la OIE para más información sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la durina

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1990. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2021.