

LINFANGITIS EPIZOÓTICA

RESUMEN

Descripción e importancia de la enfermedad: La linfangitis epizoótica es una enfermedad crónica y contagiosa de los caballos y otros équidos que se caracteriza clínicamente por una dermatitis piogranulomatosa invasiva, supurativa y ulcerosa y por linfangitis. Esto se observa en particular en el cuello, las patas y el pecho, pero puede tener lugar en cualquier parte del cuerpo. También se puede presentar como una conjuntivitis ulcerosa o, de manera más infrecuente, en forma respiratoria con secreción nasal purulenta, lesiones piogranulomatosas alrededor de las narinas con extensión de la afectación al conducto nasolagrimal, y signos de vías respiratorias bajas causados por neumonía multifocal. La transmisión se considera que se produce por el contacto de la piel traumatizada con material infectado, por las picaduras de las moscas, por las garrapatas o por inhalación de esporas. El agente causal, *Histoplasma capsulatum* var. *farciminosum*, es un hongo saprófito de suelos fangosos y con dimorfismo térmico que persiste en el medio constituyendo un reservorio de la infección. El diagnóstico diferencial incluye el muermo (en inglés, glanders o farcy), causado por *Burkholderia mallei*, la linfangitis ulcerosa debida a *Corynebacterium pseudo-tuberculosis*, la esporotricosis causada por *Sporothrix schenckii*, y las lesiones dérmicas de histoplasmosis causadas por *H. capsulatum* var. *capsulatum*.

Identificación del agente: La identificación del agente se realiza por su presencia en los frotis de exudados o en las secciones histológicas del material de la lesión. La forma de levadura del microorganismo aparece en un gran número en lesiones bien establecidas, y se presenta en forma de estructuras pleomórficas ovales o globosas de unos 2–5 µm de diámetro en los macrófagos y en las células gigantes, tanto con localización extracelular como intracelular. Los microorganismos aparecen, por lo general, rodeados por un “halo” cuando se tiñen con tinción de Gram, con hematoxilina y eosina, Giemsa, con la reacción del ácido periódico de Schiff o con la tinción de Gomori por metenammina y plata. La forma miceliar del microorganismo crece lentamente en condiciones aerobias a 25–30°C en muchos medios, incluyendo el agar micobiótico, el agar Sabouraud enriquecido con dextrosa, el agar con infusión de cerebro y corazón, y el agar nutritivo para micoplasmas; sin embargo, el cultivo es difícil. Para poder confirmar el diagnóstico, debe demostrarse la conversión a la fase de levadura a 37°C.

Pruebas serológicas y de otro tipo: Los anticuerpos contra *Histoplasma capsulatum* var. *farciminosum* se desarrollan con la aparición de los síntomas clínicos o con anterioridad. Los ensayos que se han descrito para la detección de anticuerpos incluyen la inmunofluorescencia, el enzoinmunoanálisis y las pruebas de hemoaglutinación pasiva. Además se ha descrito una prueba de hipersensibilidad en la piel.

Requisitos para las vacunas y el material de diagnóstico: Se han utilizado vacunas muertas y vivas en una escala limitada en áreas endémicas, pero solo dentro de entornos de investigación y no están disponibles comercialmente. Para detectar la inmunidad mediada por células, pueden usarse pruebas cutáneas de hipersensibilidad.

A. INTRODUCCIÓN

1. Descripción e impacto de la enfermedad

La linfangitis epizoótica es una enfermedad contagiosa y crónica de los caballos, las mulas y los asnos. La enfermedad se caracteriza clínicamente por una dermatitis multifocal piogranulomatosa, de carácter supurativo,

ulceroso e invasivo, y por linfangitis. Se presenta con más frecuencia en las extremidades, el pecho y el cuello, pero también puede presentarse en forma de conjuntivitis ulcerosa en la conjuntiva de los párpados, o, en raras ocasiones, como una neumonía multifocal. El microorganismo también puede invadir las heridas, incluyendo los abscesos reventados y las heridas resultantes de la castración. También se la ha denominado seudomuermo. Otro sinónimo es histoplasmosis equina, que quizás sea un nombre más apropiado para esta enfermedad, pues no todos los casos clínicos muestran una linfangitis manifiesta. La forma que toma la enfermedad parece depender fundamentalmente de la vía de entrada (Singh, 1965). La piel con traumatismo puede resultar infectada de forma directa por el pus, las secreciones nasales y oculares infectadas, o de forma indirecta por el suelo o los arneses contaminados, el equipo de aseo, los utensilios de comida y bebida, los vendajes de las heridas o las moscas. También se cree que las garrapatas pueden desempeñar un papel en la transmisión de ese agente (Ameni & Terefe, 2004). Se cree que la forma conjuntival de la enfermedad es difundida por las moscas de los géneros *Musca* o *Stomoxys* (Singh, 1965). La forma pulmonar de la enfermedad es menos frecuente que la forma cutánea, y se ha descrito que tiene lugar tras la inhalación del microorganismo (Singh, 1965b). El período de incubación es de entre 3 semanas y 2 meses (Ameni, 2006). En cualquier caso, las lesiones son de tipo nodular y granulomatoso, y el microorganismo, una vez que se establece, se extiende localmente mediante la invasión y luego a través de la vía linfática. A menudo se presenta un engrosamiento de las vías linfáticas, con formación de gránulos piogranulomatoso, y la infección se puede extender a los ganglios linfáticos regionales, que aumentan de tamaño y se inflaman. En ocasiones, y probablemente en función de la susceptibilidad del hospedador y de la gravedad de la infección, las lesiones se pueden curar de forma espontánea a los 2 o 3 meses, convirtiéndose en cicatrices con forma de estrella. No obstante, pueden producirse lesiones extensas con altas tasas de mortalidad en zonas con poco acceso a tratamiento y nutrición veterinarios (Ameni, 2006).

2. Naturaleza y clasificación del agente patógeno

El agente causal, *Histoplasma capsulatum* var. *farciminosum*, es un hongo dimórfico térmico. En el suelo está presente la forma miceliar; en las lesiones, la forma habitual es la levaduriforme. Antes se creía que *H. farciminosum* era una especie independiente, pero en la actualidad se considera como una variedad de *H. capsulatum* debido a la estrecha similitud morfológica de sus formas miceliar y levaduriformes (Ueda *et al.*, 2003). *H. capsulatum* var. *farciminosum* e *H. capsulatum* var. *capsulatum* son antigénicamente indistinguibles; sin embargo, la última es la responsable de la diseminación de la histoplasmosis, es endémica en América del Norte y tiene una amplia variedad de hospedadores (Robinson & Maxie, 1993). Existe a la venta una prueba de detección de antígeno para la detección de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* a partir de muestras clínicas de équidos, aunque su rendimiento en la detección de *Histoplasma capsulatum* var. *farciminosum* no se conoce. Se han analizado las secuencias del ADN de cuatro genes que codifican proteínas para clarificar las relaciones evolutivas de las variedades de *H. capsulatum*. Los resultados indican que *H. capsulatum* var. *farciminosum* está incrustado en la rama del grupo A Sam Hcc (H60 a -64, -67, -71, -74 y -76), lo cual sugiere que podría originarse en una cepa del *H. capsulatum* var. *capsulatum* sudamericano (Kasuga *et al.*, 1999; Murata *et al.*, 2007). Estos hallazgos moleculares sugieren que HCF y HCC están más estrechamente relacionados de lo que se pensaba, y los avances futuros en la secuenciación del genoma completo pueden aportar más conocimientos sobre la taxonomía de varias especies de *Histoplasma*, que podrían ser relevantes para identificar cepas epidémicas o factores de virulencia. Más recientemente, se ha descrito que la reacción en cadena de la polimerasa anidada puede usarse para detectar la presencia de HCF directamente a partir de muestras clínicas equinas (Scantlebury *et al.*, 2016).

3. Diagnóstico diferencial

La forma cutánea de la enfermedad puede confundirse con un tipo de muermo (la forma cutánea del muermo), causado por *Burkholderia mallei*, la linfangitis ulcerosa debida a *Corynebacterium pseudotuberculosis*, las úlceras indoloras causadas por *Rhodococcus equi*, la esporotricosis causada por *Sporothrix schenckii*, la histoplasmosis causada por *Histoplasma capsulatum* var. *Capsulatum*, la criptococosis, los estrangulamientos, los sarcoides y los linfosarcomas cutáneos (Jungerman & Schwartzman, 1972; Lehmann *et al.*, 1996), por lo tanto, es importante confirmar el agente causal.

4. Epidemiología

La enfermedad actualmente es endémica en regiones del África subsahariana, e históricamente se han descrito casos en el norte de África, en ciertas partes de Asia, la India, Pakistán y ciertos países con costa en el Mediterráneo (Refai & Loot, 1970). La falta de instalaciones para pruebas de diagnóstico y de vigilancia y notificación desde las regiones endémicas hace que no se conozca la prevalencia de la enfermedad y, por lo tanto, es necesario coordinar esfuerzos para determinar la ubicación actual de la enfermedad y así poder definir las estrategias de control de la misma.

Actualmente, la enfermedad es común en Etiopía, especialmente en los caballos de tiro, afectando a un promedio del 18,8% de los caballos en las zonas templadas y húmedas situadas entre los 1.500 y los 2.300 metros sobre el nivel del mar (Ameni, 2006; Ameni & Terefe, 2004, Endebu & Roger, 2003). En otras

partes del mundo, los casos documentados son esporádicos y la enfermedad debe diagnosticarse mediante pruebas de laboratorio. La prevalencia de la enfermedad aumenta con el hacinamiento de los animales; en el pasado, se ha producido brotes cuando se estabulaban juntos varios caballos en unidades de caballería o para otras necesidades relacionadas con el transporte, como por ejemplo, durante la guerra de Boer (Pallin, 2904). Normalmente, los más afectados por la enfermedad son los caballos, las mulas y los asnos, aunque se puede presentar la infección en los camellos (Chandel & Kher, 1994; Purohit *et al.*, 1985), el ganado bovino, especies de fauna salvaje y los perros (Murata *et al.*, 2007; Ueda *et al.*, 2003). Experimentalmente, se ha comprobado que ciertas especies de animales de laboratorio, como los ratones, cobayas o conejos, también son susceptibles a la infección (Herve *et al.*, 1994; Singh, 1965a).

5. Riesgo zoonótico y requisitos de bioseguridad

La infección en humanos se ha documentado esporádicamente, pero su potencial zoonótico no está completamente establecido (Al-Ani *et al.*, 1998, Chandler *et al.*, 1980, Guerin *et al.*, 1992, Murata *et al.*, 2007). Todos los procedimientos de laboratorio deben realizarse aplicando los procedimientos adecuados de bioseguridad y bioprotección, que vendrán determinados por un análisis del riesgo biológico (véase el Capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioprotección: norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales*).

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la linfangitis epizoótica y su propósito

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	Comprobar la prevalencia de la infección - vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Identificación del agente						
Microscopía óptica	-	-	-	+	++	-
Cultivo	-	-	++	+++	+++	-
PCR anidada	++	++	++	++	++	-
Detección de respuesta inmunitaria						
FAT	-	-	++	++	++	-
ELISA indirecto	-	-	++	++	++	-
HA pasiva	-	-	++	++	++	-
Prueba de hipersensibilidad cutánea	-	-	++	++	-	++

Clave: +++ = método recomendado para este propósito; ++ = método recomendado pero tiene limitaciones; + = método adecuado en muy pocas situaciones; - = no adecuado para este propósito.
 PCR = reacción en cadena de la polimerasa; FAT = prueba de la inmunofluorescencia, ELISA = enzimoimmunoanálisis; HA = hemaglutinación.

1. Identificación del agente

El material debe aspirarse por medios asépticos de los nódulos que no se han abierto empleando una aguja y una jeringa. Para el aislamiento microbiológico, se debe poner el material en un medio nutritivo líquido con antibacterianos y mantenerlo refrigerado hasta el cultivo, que debe iniciarse lo antes posible. Para el examen directo, se pueden realizar frotis del material de las lesiones y fijarlos de inmediato. Para análisis histopatológicos, se colocan secciones del material de las lesiones, que incluyan tanto tejido viable como no viable, en 10% de formalina neutra tamponada. La confirmación de la enfermedad depende del aislamiento y la identificación de *H. capsulatum* var. *farciminosum*.

1.1. Examen microscópico directo

1.1.1. Frotis de impresión teñidos

Los frotis de impresión de material purulento pueden teñirse directamente con la tinción Gram, tinción de Giemsa o reacción del ácido periódico de Schiff para comprobar si contienen la forma levaduriforme típica del microorganismo, que aparece como estructuras ovales o globosas Gram-positivas de unos 2–5 µm de diámetro (Al-Ani *et al.*, 1998). Se pueden presentar aisladas o en grupos, extracelularmente o dentro de los macrófagos. El citoplasma intracelular puede teñirse de forma variable dependiendo de la edad de la lesión o de la manipulación de la muestra, y con frecuencia se observa un halo refractario alrededor del microorganismo (que corresponde a la cápsula no teñida).

1.1.2. Histopatología

En cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina (H&E) el aspecto de la lesión es muy característico y presenta una inflamación piogranulomatosa con fibroplasia. Son frecuentes las células gigantes de Langhans. Se observa la presencia de numerosos microorganismos tanto extra como intracelularmente en los macrófagos o células gigantes multinucleadas en las secciones de tejidos teñidos con H&E, con la reacción del ácido periódico de Schiff, y con la tinción de metenamina y plata de Gomori (Robinson & Maxie, 1993). Existen indicios de que el número de microorganismos aumenta con la cronicidad. Los microorganismos son pleomórficos, a veces se describen como masas basófilas con forma semejante a un limón, de 2 a 5 µm de diámetro, y rodeadas por un halo tras teñirlas con H&E o con tinción de Gram (Al-Ani, 1999).

1.1.3. Microscopía electrónica

Se ha empleado la microscopía electrónica en muestras de biopsia de la piel de 1,5–2,0 mm prefijadas inmediatamente a 4°C con una solución de 2% de glutaraldehído tamponada con fosfato y fijadas luego con tetróxido de osmio al 1%. Se cortaron secciones ultrafinas y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo. El examen demostró la estructura fina interna del microorganismo, *H. capsulatum* var. *farciminosum*, incluyendo la envoltura celular, la membrana plasmática, la pared celular, la cápsula y las estructuras celulares internas (Al-Ani, 1999).

1.2. Cultivo

La forma micelial de *H. capsulatum* var. *farciminosum* es difícil de cultivar y crece lentamente en medios de laboratorio (entre 2 y 8 semanas a 26°C). Los medios a utilizar son agar Micobiótico (Al-Ani *et al.*, 1998), Sabouraud con dextrosa enriquecido con 2,5% de glicerol, el medio sólido de infusión de cerebro y corazón suplementado con 10% de sangre de caballo, y el agar nutritivo para micoplasmas enriquecido con 2% de dextrosa y 2,5% de glicerol, pH 7,8 (Guerin *et al.*, 1992; Robinson & Maxie, 1993). Se recomienda la adición de antibióticos al medio: cicloheximida (0,5 g/litro) y cloranfenicol (0,5 g/litro). Se consigue una actividad bacteriana de amplio espectro usando gentamicina (50 mg/litro) y penicilina G (6×10^6 unidades/litro) en lugar de cloranfenicol. Al cabo de 2–8 semanas las colonias aparecen como micelio de aspecto seco, de color gris-blanquecino, granular y arrugado. Con el tiempo, las colonias pueden volverse de color marrón. Pueden aparecer formas aéreas, pero son raras. La forma micelial produce una variedad de conidios, incluidos los clamidosporos, los artroconidios y los blastoconidios. Sin embargo, no se dan los macroconidios grandes y redondos de doble pared que a menudo pueden observarse en *H. capsulatum* var. *capsulatum*.

Como una prueba confirmativa, se puede inducir la forma levaduriforme de *H. capsulatum* var. *farciminosum* subcultivando parte del micelio en infusión de agar y corazón que contenga un 5% de sangre de caballo o en medio de Pine a 35–37°C en una atmósfera enriquecida con un 5% de dióxido de carbono. Las colonias de levadura son lisas, convexas, rugosas, de color blanco a marrón grisáceo,

y de consistencia pastosa (Robinson & Maxie, 1993). Sin embargo, la conversión completa a fase de levadura solo se puede conseguir tras la repetición de cuatro o cinco pases seriados.

2. Pruebas serológicas

Se han publicado trabajos sobre varias pruebas para detectar anticuerpos así como una prueba de hipersensibilidad cutánea para detectar la inmunidad celular. Normalmente, los anticuerpos aparecen después de los la presentación de los síntomas clínicos.

2.1. Pruebas de inmunofluorescencia

2.1.1. Prueba de inmunofluorescencia indirecta

El procedimiento no cuantitativo es el descrito por Fawi (1969).

- i) Se preparan portas que contengan el microorganismo mediante la colocación de un frotis del tejido afectado en un porta, o por emulsión de la fase levaduriforme del microorganismo cultivado en una solución salina para crear una lámina fina sobre el porta.
- ii) Las preparaciones se fijan con calor.
- iii) Luego se lavan los portas durante 1 minuto con solución salina tamponada con fosfato (PBS).
- iv) Se colocan sobre el porta los sueros problema sin diluir y se incuban 30 minutos a 37°C.
- v) Se lavan los portas tres veces con PBS cada 10 minutos.
- vi) Se pone sobre los portas una dilución adecuada de anticuerpo anti-caballo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), y luego se incuba 30 minutos a 37°C.
- vii) Se repiten tres veces los lavados con PBS cada 10 minutos.
- viii) Los portas se examinan en un microscopio de fluorescencia.

2.1.2. Prueba de inmunofluorescencia directa

El procedimiento es el descrito por Gabal *et al.* (1983).

- i) Se precipita la fracción de globulinas del suero problema empleando sulfato amonio saturado al 35%, y luego se resuspende con solución salina en el volumen original de suero y se purifica con una filtración por gel. El suero se conjuga luego con FITC.
- ii) Sobre un porta se resuspende en 1–2 gotas de solución salina una pequeña parte de una colonia de la forma miceliar cultivada. Con un segundo porta, se aplastan las partículas de la colonia y se extiende la solución para crear una lámina fina. También se preparan frotis directamente a partir de pus de nódulos no abiertos.
- iii) Los frotis se fijan por calor.
- iv) Se incuban los con diluciones del suero conjugado durante 60 minutos a 37°C.
- v) Se lavan tres veces con PBS cada 5 minutos.
- vi) Se examinan en un microscopio de fluorescencia.

2.2. Enzoinmunoanálisis indirecto

El siguiente es el procedimiento descrito por Gabal & Mohamed (1985).

2.2.1. Procedimiento analítico

- i) La forma miceliar del microorganismo se produce en tubos de agar Sabouraud con dextrosa, incubados durante 4 semanas a 26°C. Se homogenizan tres colonias en 50 ml de PBS estéril. La suspensión se diluye a 1/100 y se revisten placas de microtitulación de 96 pocillos con 100 µl /pocillo.
- ii) Se incuban las placas toda la noche a 4°C.
- iii) Se lavan las placas tres veces con PBS que contenga Tween 20 (0,5 ml/litro) (PBS-T), 3 minutos cada vez.

- iv) Se vuelven a incubar en agitación a 23–25°C durante 30 minutos con 5% de seroalbúmina bovina, 100 µl/pocillo.
- v) Las placas se lavan con PBS tres veces durante tres minutos cada vez.
- vi) Se diluyen los sueros de forma seriada utilizando una dilución doble por duplicado en PBS-T, comenzando con una dilución de 1/50, y se incuban durante 30 minutos a 23–25°C.
- vii) Se lavan las placas en PBS-T tres veces durante 3 minutos cada vez.
- viii) Se diluye a 1/800 la IgG anti-caballo obtenida en cabras y se ponen 100 µl /pocillo, incubando en agitación durante 30 minutos a 23–25°C.
- ix) Las placas se lavan tres veces con un PBS) durante 3 minutos cada vez.
- x) Finalmente, se añaden 100 µl/pocillo de peróxido de hidrógeno y ABTS (2,2'-azino-di-[3-etil-benzotiazolina]-6 ácido sulfónico) en un tampón de ácido cítrico a pH 4.
- xi) A los 60 minutos se leen las placas en un espectrofotómetro con una longitud de onda de 405 nm.
- xii) Se obtienen dos veces los valores de absorbancia de cada dilución de suero, y se tienen en cuenta para la interpretación de los resultados la desviación estándar y el valor medio de los valores de absorbancia de las diferentes muestras de suero.

2.3. Prueba de la hemoaglutinación pasiva

El procedimiento es el descrito por Gabal & Khalifa (1983).

2.3.1. Procedimiento analítico

- i) El microorganismo se propaga durante 8 semanas en medio de Sabouraud con dextrosa. Se toman cinco colonias, se homogenizan, se suspenden en 200 ml de solución salina y se someten a ultrasonidos durante 20 minutos. Los elementos miceliares que quedan se filtran y el filtrado se diluye 1/160.
- ii) Se lavan eritrocitos (RBC) normales de oveja, se tratan con ácido tánico, se vuelven a lavar, y se resuspenden a una concentración del 1%.
- iii) Se mezclan diferentes diluciones de la preparación de antígeno con las RBC tratadas con ácido tánico y se incuban en un baño María a 37°C durante 1 hora. Se recogen las RBC por centrifugación, se lavan tres veces con solución salina tamponada y se resuspenden hasta lograr una suspensión celular al 1%.
- iv) Los sueros problema se inactivan calentando a 56°C durante 30 minutos y luego se absorben con un volumen igual de RBC lavadas.
- v) Se colocan en tubos de ensayo diluciones de suero (0,5 ml) con 0,05 ml de RBC tratadas con ácido tánico y recubiertas con antígeno.
- vi) La lectura de la aglutinación se lleva a cabo a las 2 y las 12 horas.
- vii) La aglutinación se detecta cuando las RBC forman un tapete uniforme en el fondo del tubo. Una prueba negativa se refleja en forma de un depósito de RBC en el fondo del tubo.

2.4. Pruebas de hipersensibilidad cutánea

- i) El antígeno para la prueba cutánea se prepara mediante uno de los dos métodos que se describen en el apartado C.
- ii) Los animales se inoculan por vía intradérmica en el cuello con 0,1 ml de antígeno para la prueba cutánea que contenga 0,2 mg/ml de proteína.
- iii) El punto de inoculación se examina para la presencia de una induración local y un área elevada a las 24, 48 y 72 horas de la inyección. Se considera como positivo un incremento del espesor de la piel superior a 4 mm.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y EL MATERIAL BIOLÓGICO DE DIAGNÓSTICO

1. Vacunas

Dependiendo de la normativa de la región afectada por la enfermedad, el control de la misma generalmente se lleva a cabo mediante la eliminación de la infección, aunque esto puede verse limitado por la falta de recursos y de acceso a antifúngicos en las regiones donde la enfermedad es actualmente endémica. Las directrices internacionales recomiendan que el control se logre sacrificando caballos infectados y aplicando estrictas prácticas de higiene para evitar la propagación del microorganismo; sin embargo, esto puede no ser fácil de implementar en todas las regiones por razones socioeconómicas y falta de compensación disponible por la pérdida del animal. Existen informes publicados sobre el uso de vacunas inactivadas (Al-Ani *et al.*, 1998; Noskoav, 1960) y vivas atenuadas (Zhang *et al.*, 1986) en áreas donde la linfangitis epizoótica es o fue previamente endémica, aparentemente con resultados relativamente buenos. Sin embargo, estos informes derivan de estudios experimentales y actualmente no existe ninguna vacuna a la venta.

2. Antígenos para la prueba cutánea

Los antígenos utilizados en las pruebas de inoculación intradérmica se preparan mediante uno de los dos métodos publicados:

2.1. Método 1 (Armeni *et al.*, 2006; Gabal & Khalifa, 1983)

Se propaga un cultivo puro de *H. farciminosum* durante 8 semanas en agar dextrosa de Sabouraud que contenga 2,5% de glicerol. Cinco colonias se raspan, se muelen, se suspenden en 200 ml de solución salina, se someten a cinco ciclos de congelación-descongelación y se sonicán a una amplitud de 40° durante 20 minutos. Los elementos miceliales restantes se eliminan por centrifugación a 1006 **g** a 4°C durante 11 minutos. La esterilidad de la preparación se verifica incubando una alícuota en agar dextrosa de Sabouraud a 26 °C durante 4 semanas.

2.2. Método 2 ('histofarcina', Soliman *et al.*, 1985)

- i) La forma micelial del microorganismo se cultiva en discos de poliestireno que flotan en 250 ml de medio PPLO con glucosa al 2% y glicerina al 2,5% a 23–25 °C durante 4 meses.
- ii) El filtrado del cultivo libre de hongos se mezcla con acetona (2/1) y se mantiene a 4 °C durante 48 horas.
- iii) El sobrenadante se decanta y la acetona se deja evaporar.
- iv) El precipitado se suspende a 1/10 del volumen original en agua destilada.

BIBLIOGRAFÍA

AL-ANI F.K. (1999). Epizootic lymphangitis in horses: a review of the literature. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **18**, 691–699.

AL-ANI F.K., ALI A.H. & BANNA H.B. (1998). *Histoplasma farciminosum* infection of horses in Iraq. *Veterinarski Arhiv.*, **68**, 101–107.

AMENI G. (2006). Preliminary trial on the reproducibility of epizootic lymphangitis through experimental infection of two horses. Short Communication. *Veterinary J.*, **172**, 553–555.

AMENI G. & TEREFE W. (2004). A cross-sectional study of epizootic lymphangitis in cart-mules in western Ethiopia. *Preventive Vet. Med.*, **66**, 93–99.

AMENI G., TEREFE W. & HAILU A. (2006). Histofarcin test for the diagnosis of epizootic lymphangitis in Ethiopia: development, optimisation and validation in the field. *Veterinary J.*, **171**, 358–362.

CHANDEL B.S. & KHER H.N. (1994). Occurrence of histoplasmosis like disease in camel (*Camelus dromedarius*) *Indian Vet. J.*, **71**, 521–523.

- CHANDLER F.W., KAPLAN W. & AJELLO L. (1980). Histopathology of Mycotic Diseases. Year Book Medical Publishers, Chicago, USA, 70–72 and 216–217.
- ENDEBU B. & ROGER F. (2003). Comparative studies on the occurrence and distribution of Epizootic lymphangitis and Ulcerative Lymphangitis in Ethiopia. *Int. J. Appl. Res. Vet. Med.*, **1** (3).
- FAWI M.T. (1969). Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of *Histoplasma farciminosum* infections in Equidae. *Br. Vet. J.*, **125**, 231–234.
- GABAL M.A., BANA A.A. & GENDI M.E. (1983). The fluorescent antibody technique for diagnosis of equine histoplasmosis (epizootic lymphangitis). *Zentralbl. Veterinarmed. [B]*, **30**, 283–287.
- GABAL M.A. & KHALIFA K. (1983). Study on the immune response and serological diagnosis of equine histoplasmosis (epizootic lymphangitis). *Zentralbl. Veterinarmed. [B]*, **30**, 317–321.
- GABAL M.A. & MOHAMMED K.A. (1985). Use of enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of equine *Histoplasma farciminosi* (epizootic lymphangitis). *Mycopathologia*, **91**, 35–37.
- GUERIN C., ABEBE S. & TOUATI F. (1992). Epizootic lymphangitis in horses in Ethiopia. *J. Mycol. Med.*, **2**, 1–5.
- HERVE V., LE GALL-CAMPDONICO P., BLANC F., IMPROVISI, L., DUPONT, B, MATHIOT C. & LE GALL F. (1994). Histoplasmosis a *Histoplasma farciminosum* chez un cheval africain. *J. Mycologie Med.*, **4**, 54.
- JUNGERMAN P.F. & SCHWARTZMAN R.M. (1972). Veterinary Medical Mycology. Lea & Febiger. Philadelphia, USA.
- KASUGA T., TAYLOR T.W. & WHITE T.J. (1999). Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* darling. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 653–663.
- LEHMANN P.F., HOWARD D.H. & MILLER J.D. (1996). Veterinary Mycology. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp: 251–263.
- MURATA Y., SANO A., UEDA Y., INOMATA T., TAKAYAMA A., POONWAN N., NANTHAWAN M., MIKAMI Y., MIYAJI M., NISHIMURA K. & KAMEI K. (2007). Molecular epidemiology of canine histoplasmosis in Japan. *Med. Mycol.*, **45**, 233–247.
- NOSKOAV I. (1960). Immunity to epizootic lymphangitis and the efficacy of vaccines. *Tr. Vsesoyuz Inst. Vet. Sanif.*, **16**, 368–372.
- PALLIN W.A. (1904). A Treatise on Epizootic Lymphangitis, Published for the University of Liverpool by Williams & Norgate, London
- PUROHIT N.R., CHOUHAN D.S. & CHOUDHARY RJ (1985). Lymphangitis in the camel (two cases). *Agr. Practice*, **6**, 23–24.
- REFAI M. & LOOT A. (1970). Incidence of epizootic lymphangitis in Egypt with reference to its geographical location. *Mykosen*, **13**, 247–252.
- ROBINSON W.F. & MAXIE M.G. (1993). The cardiovascular system. *In: Pathology of Domestic Animals*, Vol. 3. Academic Press, New York, USA, 82–84.
- SCANTLEBURY C.E., PINCHBECK G.L., LOUGHNANE P., AKLILU N., ASHINE T., STRINGER A. P., GORDON L., MARSHALL M., CHRISTLEY R.M. & MCCARTHY A.J. (2016). Development and evaluation of a molecular diagnostic method for rapid detection of *Histoplasma capsulatum* var. *farciminosum*, the causative agent of Epizootic lymphangitis, in equine clinical samples. *J. Clin. Microbiol.*, **54**, 2990–2999.
- SINGH T. (1965a). Studies on epizootic lymphangitis. I. Modes of infection and transmission of equine histoplasmosis (epizootic lymphangitis). *Indian J. Vet. Sci.*, **35**, 102–110.
- Singh T. (1965b) Studies on Epizootic lymphangitis. II. Pathogenesis and histopathology of equine histoplasmosis. *Indian J. Vet. Sci.*, **35**, 111–120.
- SOLIMAN R., SAAD M.A. & REFAI M. (1985). Studies on histoplasmosis farciminosii (epizootic lymphangitis) in Egypt. III. Application of a skin test ('histofarcin') in the diagnosis of epizootic lymphangitis in horses. *Mykosen*, **28**, 457–461.

UEDA Y., SANO A. TAMURA M., INOMATA T., KAMEI K., YOKOYAMA K., KISHI F., ITO J., Y., MIYAJI M. & NISHIMURA K. (2003). Diagnosis of histoplasmosis by detection of the internal transcribed spacer region of fungal rRNA gene from a paraffin-embedded skin sample from a dog in Japan. *Vet. Microbiol.*, **94**, 219–224.

ZHANG W.T., WANG Z.R., LIU Y.P., ZHANG D.L., LIANG P.Q., FANG Y.Z., HUANG Y.J. & GAO S.D. (1986). Attenuated vaccine against epizootic lymphangitis in horses. *Chinese J. Vet. Sci. Tech.*, **7**, 3–5.

*
* *

NB: En el momento de la publicación (2018) no existían Laboratorios de Referencia de la OIE para la linfangitis epizoótica (puede consultarse la página web de la OIE:

<https://www.oie.int/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>)

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1990. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2018.