

TRANSFERÈNCIA EMBRIONÀRIA EN ÈQUIDS

Introducció general i punts crítics

Treball presentat per: GARCÍA RODRÍGUEZ, LAURA; TRIGUEROS PÉREZ, RAQUEL; WILHELCMI VILARRASA, ITZIAR.

Curs acadèmic 2011-2012



ÍNDEX

➤ Introducció	pàg. 3-4
➤ Descripció de la tècnica	pàg. 5-9
○ Eugues receptores	pàg. 5
○ Eugues donants	pàg. 5-7
○ Transferència quirúrgica	pàg. 7-9
➤ Legislació	pàg. 10-16
○ Legislació europea	pàg. 10-14
○ Legislació espanyola	pàg. 14-16
➤ Enquesta	pàg. 17-20
○ Conclusió de l'enquesta	pàg. 20-21
➤ Entrevistes	
○ Entrevista a Luis Losinno	pàg. 22-26
○ Entrevista a Jordi Miró	pàg. 26-29
○ Entrevista a Guillem Formiguères	pàg. 29-31
➤ Conclusions i punts crítics.	pàg. 32-35
➤ Bibliografia	pàg. 36
➤ Annexes	pàg. 37-

INTRODUCCIÓ

La primera transferència d'embrions realitzada en l'espècie equina es va fer l'any 1972 a Gran Bretanya però no va ser fins als anys 80 que la tècnica es va acceptar en el procediment de cria d'èquids; i fins a principis dels 90 no es va realitzar la primera transferència a Espanya.

Algunes de les aplicacions i avantatges de la transferència embrionària són les següents:

- L'obtenció dels embrions de mares que competeixen, sense provocar efectes adversos i no havent d'esperar a la seva jubilació.
- La producció d'un major nombre de poltres de mares amb un elevat valor genètic.
- L'obtenció d'embrions de mares amb patologies del tracte reproductiu i la conseqüent gestació completament segura en la mare receptora amb un tracte reproductiu sa.
- La recuperació d'embrions de mares que freqüentment tenen gestacions dobles (que majoritàriament desencadenen avortaments)
- La producció de descendència d'èquids en perill d'extinció com les zebres, els cavalls Przewalski, entre d'altres.
- La tècnica ajuda a la comprensió dels fonamentals aspectes fisiològics de la reproducció equina.
- Permet l'avaluació de la fertilitat dels sementals, de diferents diluents i del semen congelat.
- L'obtenció d'animals genèticament similars pels estudis d'investigació.
- Inconvenients de la transferència embrionària:
 - Les taxes d'embaràs per cicle són variables depenen de la qualitat del semen, la superovulació, la fertilitat de la donant, experiència/habilitat/tècnica/laboratori, fertilitat de l'euga receptora.
 - La transferència immediata té major èxit, seguit del emmagatzematge a curt plaç, que els embrions congelats.

- La transferència quirúrgica té una taxa d'èxits més elevada que la transferència transcervical.
- El 70% de les transferències transcervicals tenen èxit en l'establiment d'una gestació temprana.

La tecnologia de la transferència embrionària està molt acceptada en la majoria d'animals de granja, sobretot en vaques, no obstant hi ha moltes qüestions en la indústria equina:

- Per una banda, l'ús de semen refrigerat o congelat disminueix la fertilitat i per tant disminueix el percentatge d'èxits en la transferència d'embrions.
- A més, no ha comportat un gran progrés genètic ja que el mètode de superovulació en eugues no és eficaç.
- Una altre limitació és el registre dels poltres ja que aquest s'ha restringit a un per any i han condicionat que les eugues receptores siguin de la mateixa raça que l'euga donant.

El concepte i la tècnica de la transferència embrionària és relativament simple. L'embrió és conduit fora del úter de la mare el dia 7 o 8 després de l'ovulació, és recuperat i examinat i després és implantat dintre del úter de la mare receptora de manera quirúrgica o no quirúrgica (transcervical).

DESCRIPCIÓ DE LA TÈCNICA

EUGUES RECEPTORES

- Eugues joves i fèrtils.
- Requereixen un examen reproductor, el qual ha de ser normal.
- Sincronització de l'euga receptora: ovulació 1-3 dies després de la donant.
 - Les tècniques més comuns tenen 3 o 4 potencials receptores sincronitzades amb la donant utilitzant l'administració de prostaglandines.
- Monitorització de la receptora per determinar el moment de la seva ovulació.

La selecció de la receptora es basa en aquella euga que ovula en el moment correcta i té el cicle més normal.

EUGUES DONANTS

- Monitorització de la donant per tal de reproduir o inseminar a l'euga en el moment adequat per aconseguir una gestació.
- Adequat maneig després de la cria per tal d'evitar endometritis.
- Registrar el moment de l'ovulació.
- Els millors embrions són aquells recuperats el dia 7 o 8 després de l'ovulació.

Evaluació d'embrions

Els òvuls o embrions extrets de l'oviducte, contenen de 2 a 64 cèl·lules segons el moment en que es va fer el rentat a partir de l'ovulació. Els que es recullen de l'úter, varien desde 64 cèl·lules fins la fase de blàstula.

Els embrions es col·loquen baix el microscopi de disecció, per a determinar si el seu aspecte és normal i si tenen probabilitats de desenvolupar-se després del transplant:

Els òvuls unicel·lulars no van ser fecundats i, per tant, no deuen ser transplantats, presenten forma ovalada, aplanats en una direcció.

Els ous de dues cèl·lules denoten fertilització (excepte en rars casos de divisió) i se'ls

considera normals si tenen dos dies d'edat. Si la recol·lecció es va fer després de dos dies a partir de l'ovulació, se'ls considera anormals i no deuen ser transplantats.

Els òvuls amb un nombre petit de blastòmers, deuen ser evaluats segons la seva edat per a determinar si son anormals.

Els òvuls deformes son anormals, existeixen molts tipus i formes dins d'aquesta categoria: contracció del trofoblast de la zona pel·lúcida, blastòcits foscos de forma irregular, blastòmers degenerats, embrions de forma irregular o amb una massa cel·lular interna fosca.

Els embrions deuen ser rodonets i turgents, amb la zona pel·lúcida intacta i en l'estat normal de desenvolupament que li correspon, segons la seva edat.

Es valora forma i color de l'embrió, nombre i compactació dels blastòmers, la mida de l'espai perivitel·lí, nombre de cèl·lules degenerades, danys a la zona pel·lúcida i l'etapa de desenvolupament en comparació a l'edat de l'embrió.

Existeix un sistema de classificació basat en graus per qualificar els embrions d'èquids:

- Grau I. Excel·lent. Embrió ideal, esfèric, amb cèl·lules de mida, color i textura uniforme.
- Grau II. Bo. Imperfeccions menors com alguns blastòmers degenerats, forma irregular o separació trofoblàstica.
- Grau III. Regular. Definit, però sense problemes greus. Presència de blastòmers degenerats, cèl·lules degenerades o blastocel col·lapsat.
- Grau IV. Pobre. Greus problemes, blastocel col·lapsat, molts blastòmers degenerats, cèl·lules degenerades però amb una aparença viable de la massa embrònica.
- Grau V. Infètil o mort. Òcits infètils o embrió totalment degenerat.

Els òvuls deuen mantenir-se en una incubadora a 37°C i permaneixer dins del recipient tancat. Per obtenir millor viabilitat, els embrions deuen transplantar-se tan aviat com sigui possible.

N'hi han anomalies directament relacionades amb la refrigeració durant 12- 24 hores. Com ara un blastocel col·lapsat amb separació cel·lular de la zona pel·lúcida o de la càpsula, blastòmers degenerats, cèl·lules fosques o augment de l'aparença granular de la

superfície amb aparent separació cel·lular.

Transferència d'embrions a l'euga receptora:

TRANSFERÈNCIA QUIRÚRGICA

La transferència quirúrgica es pot realitzar de dues maneres, fent una incisió a la línia mitja de l'abdomen o bé una incisió al flanc.

- Incisió a la línia mitja.
 - Incisió a la línia mitja de l'abdomen.
 - Retracció i exposició parcial de la punta de la banya uterina ipsilateral al lloc de l'ovulació.
 - Incisió a la llum de la banya uterina.
 - Inserció de 0.5 ml de medi de cultiu que conté l'embrió a la llum de la banya uterina.
 - Tancament de l'obertura externa de l'úter mitjançant compressió de la serosa uterina amb una pinça hemostàtica.
 - Retorn de l'úter a la seva posició normal.
 - Tancament de la línia ventral mitja.

L'inconvenient d'aquesta tècnica és que és necessària l'anestèsia general, unes instal·lacions adequades i un personal qualificat:

- Incisió al flanc.
 - Col·locació de les receptora en un poltre de contenció i sedació.
 - Esquilar la fossa paralumbar formant una àrea d'uns 35 cm d'ample i 45 cm de llarg i netejar-la.
 - Anestèsia local de la fossa paralumbar.
 - Incisió en els teixits superficials i profunds situats entre la tuberositat coxal i l'última costella, començant uns 10 cm ventralment als processos lumbars i estenent-se 15-20 cm ventralment.
 - Rentar l'àrea asèpticament.

- Realitzar una dissecció romà de la musculatura i penetrar al peritoneu. Aquesta última tècnica és la més freqüent.
- Exposició de la banya uterina ipsilateral al lloc de l'ovulació.
- Incisió a la llum de la banya uterina.
- Inserció de 0.5 ml de medi de cultiu que conté l'embrió a la llum de la banya uterina.
- Tancament de l'obertura externa de l'úter mitjançant compressió de la serosa uterina amb una pinça hemostàtica.
- Retorn de l'úter a la seva posició normal.
- Reconstrucció dels grups musculars amb una sutura contínua.
- Tancament del teixit subcutani i la pell.

Aquest procés té l'avantatge que només és necessària anestèsia local, es pot realitzar amb l'euga dreta i té una recuperació immediata.

Transferència no quirúrgica

La transferència no quirúrgica és una tècnica menys agressiva, ja que es transfereix l'embrió per via transvaginal. Es pot realitzar amb pipetes de inseminació artificial estàndards, pistola de inseminació plàstica d'un sol ús o la pistola d'inseminació d'acer inoxidable reutilitzable. El procediment és similar a una inseminació artificial. És la tècnica més utilitzada actualment. El material necessari és una via d'inseminació dins d'una funda protectora, amb l'embrió situat entre 0.5 ml de medi, 0.2 ml d'aire, 0.5 ml de medi que conté l'embrió, i 0.2 ml d'aire. Tot el procediment ha de ser estèril i utilitzant material estèril. L'euga receptora es col·loca en un poltre de contenció i se li neteja i desinfecta la vulva i la zona perianal. El tècnic introduceix una mà via rectal i amb l'altra guiarà la via d'inseminació per via vaginal. Es busca l'obertura del cèrvix per introduir la via d'inseminació utilitzant el dit índex. S'introduceix la via a l'úter fins que es troba una resistència, llavors es retira uns 2 cm. Es diposita l'embrió i es retira la via d'inseminació.

Tot i que històricament la transferència embrionària quirúrgica ha tingut millors taxes de pregnituts (70-75% una setmana post transferència); publicacions recents han demostrat

que les taxes de gestació de la transferència no quirúrgica s'han incrementat o fins i tot superat a la tècnica quirúrgica.

Factors que afecten les taxes de gestació

La femella receptora, l'embrió i/o la tècnica de transferència embrionària són els principals factors.

- L'edat de la femella receptora afecta significativament.
- La majoria de transferències embrionàries s'han de fer entre els dies 6 i 8 post ovulació, que és quan tenen el diàmetre i l'estat de desenvolupament òptims. Diferents estudis demostren que els embrions més vells i llargs són menys viables en transferències no quirúrgiques i inclús quirúrgiques.
- La morfologia anormal del embrió disminueix la taxa de gestació.

Maneig de la femella receptora post-transferència embrionària

Alguns clínics administren progestàgens a la femella receptora per fomentar la supervivència embrionària i retrassar la luteòlisis, amb l'objectiu de permetre el reconeixement de la gestació.^{1,2}

LEGISLACIÓ

LEGISLACIÓ EUROPEA

A continuació s'exposa una recopilació dels reglaments, les directives i les decisions de caràcter europeu, relacionades amb la transferència d'embrions. S'han agrupat segons la temàtica que tracten.

Condicions generals dels animals, del material genètic i dels centres de recollida i emmagatzematge d'aquest.

- [Directiva 2008/73/CE](#), del Consell de 15 de juliol de 2008. Simplifica els procediments per confeccionar llistes i publicar informació als àmbits veterinaris i zootècnics i modifica les directives 64/432/CEE, 77/504/CEE, 88/407/CEE, 88/661/CEE, 89/361/CEE, 89/556/CEE, 90/426/CEE, 90/427/CEE, 90/428/CEE, 90/429/CEE, 90/539/CEE, 91/68/CEE, 91/496/CEE, 92/35/CEE, 92/65/CEE, 92/66/CEE, 92/119/CEE, 94/28/CE, 2000/75/CE, la Decisió 2000/258/CE y les Directives 2001/89/CE, 2002/60/CE i 2005/94/CE. Estableix que els òvuls i embrions de les espècies ovina, caprina, equina i porcina han de ser extrets per equips de recollida o produïts per un equip de producció autoritzats per l'autoritat competent d'un Estat membre. Les condicions d'autorització d'aquests equips estan especificades a la Directiva 92/65/CEE a l'annexa D.
 - Capítol I: condicions aplicables als centres de recollida d'esperma, centres de magatzem d'esperma, equips de recollida d'embrions i equips de producció d'embrions.
 - Capítol II: condicions aplicables als animals donants.
 - Capítol III: requisits aplicables a l'esperma, òvuls i embrions.
 - Segons aquesta directiva, els Estats membres han de redactar i mantenir al dia les llistes dels establiments zoosanitaris i posar-la a disposició de la resta dels Estats membres i del públic. Per

uniformitzar els models d'aquestes llistes i facilitar l'accés a les actualitzacions, és necessari establir criteris comuns següent el procediment de comitologia. Els procediments s'han simplificat a la Decisió 2009/436/CE. A l'annexa I de la Decisió 2007/240/CE s'exposa un model de certificat veterinari per la UE per esperma, embrions i òvuls. Aquest nou procediment s'ha d'aplicar també a l'àmbit zootècnic, en particular a les associacions de cria autoritzades per portar o crear llibres genealògics en els Estats membres

- Decisió 2009/436/CE, del Consell de 5 de maig (corregeix la directiva 2008/73/CE). Es parla de simplificar els procediments per a confeccionar llistes i publicar informació en els àmbits veterinaris i zootècnics.
- Decisió 2007/240/CE, de la Comissió de 16 d'abril de 2007. S'estableixen nous certificats veterinaris per a la introducció a la Comunitat d'animals vius, esperma, embrions, òvuls i productes d'origen animal, en el marc de les decisions 79/542/CEE, 92/260/CEE, 93/195/CEE, 93/196/CEE, 93/197/CEE, 95/328/CE, 96/333/CE, 96/539/CE, 96/540/CE, 2000/572/CE, 2000/585/CE, 2000/666/CE, 2002/613/CE, 2003/56/CE, 2003/779/CE, 2003/804/CE, 2003/858/CE, 2003/863/CE, 2003/881/CE, 2004/407/CE, 2004/438/CE, 2004/595/CE, 2004/639/CE y 2006/168/CE. Disposa que els diferents certificats veterinaris, sanitaris i zoosanitaris exigits per la introducció a la Comunitat d'animals vius, esperma, embrions, òvuls i productes d'origen animal, així com els certificats pel trànsit a través de la Comunitat de productes d'origen animal, es presentaran prenent com a base els models únics de certificat veterinari que figurin a l'annex I d'aquesta decisió.
- Decisió 96/79/CE, de la Comissió de 12 de gener de 1996. S'estableixen certificats zootècnics relatius a l'esperma, òvuls i als embrions dels èquids registrats.

Intercanvis entre països membres de la Comunitat Europea

- Directiva 92/65/CEE, del Consell de 13 de juliol de 1992. S'estableix les condicions de policia sanitària aplicables als intercanvis i les importacions a la Comunitat d'animals, esperma, òvuls i embrions no sotmesos, amb respecte a aquestes condicions, a les normatives comunitàries específiques a la que es refereix la secció. . En l'article 4 del

capítol II, sobre les disposicions aplicables als intercanvis, diu que s'hauran de fer examinar amb regularitat els animals, s'haurà de declarar qualsevol malaltia de declaració obligatòria. Concretament, per a cavalls sementals i femelles donants s'ha de sotmetre a proves per la detecció d'anèmia infecciosa equina i metritis contagiosa equina. També s'haurà de declarar l'aparició de malalties en les que s'hagi establert un programa de lluita o vigilància en l'Estat membre i s'hauran de respectar les mesures nacionals imposades per la lluita de la malaltia. En quant a la comercialització, només es podrà dur a terme amb aquells animals que no presentin signes de malaltia i que procedeixin d'explotacions o de zones que no siguin objecte de cap mesura de prohibició per motius de policia sanitària. També poden entrar en el comerç aquells que no tinguin certificat sanitari, però que portin un autocertificat de l'empresari, que acrediti que els animals de que es tracti no presenten cap signe apparent de malaltia i que la seva explotació no està sotmesa a mesures de restricció de policia sanitària.

- [Reglament \(UE\) 176/2010](#), de la Comissió de 2 de març de 2010 (es modifica l'annex D de la Directiva 92/65/CEE del Consell). Fa referència als centres de recollida i emmagatzematge d'esperma, els equips de recollida i producció d'embrions i les condicions aplicables als animals donants de les espècies equina, ovina i caprina i la manipulació d'esperma, òvuls i embrions d'aquestes espècies.
- [Decisió 2004/186/CE](#), de la Comissió del 16 de febrer de 2004 (es modifiquen determinats annexes de la decisió 96/510/CE). Es refereix als requisits zootècnics per la importació d'esperma, òvuls i embrions de l'espècie equina.
- [Reglament \(CE\) 1802/2002](#), de la Comissió de 10 d'octubre de 2002 (rectifica el reglament (CE) 1282/2002 i determinats annexes de la Directiva 92/65/CEE del Consell). S'estableix les condicions de policia sanitària aplicables als intercanvis i les importacions a la Comunitat d'animals, esperma, òvuls i embrions no sotmesos, amb respecte a aquestes condicions, a les normatives comunitàries específiques a que es refereix la secció I de l'annex A de la directiva 90/425/CEE.
- [Decisió 95/294/CE](#), de la Comissió de 6 d'abril de 1995 (es modifiquen els annexes C I D de la Directiva 92/65/CEE del Consell pel que s'estableix el model de certificat sanitari pel comerç d'òvuls i embrions de l'espècie equina.

Intercanvis amb països fora de la Comunitat Europea.

- [Reglament \(CE\) 668/2004](#), de la Comissió de 10 de març de 2004 (modifica alguns annexes del Reglament (CE) 1774/2002 del Parlament Europeu i del Consell). Parla de la importació de subproductes animals de tercers països.
- [Decisió 2004/211/CE](#), de la Comissió, de 6 de gener de 2004. S'estableix la llista de tercers països i parts del seu territori a partir dels quals els Estats membres autoritzen la importació d'èquids vius i esperma, òvuls i embrions de l'espècie equina i pel que es modifiquen les decisions 93/195/CEE i 94/63/CE. L'annexa 1 d'aquesta Decisió es veu modificada per la Decisió 2011/686/UE, de la Comissió de 13 d'octubre de 2011.
- [Directiva 91/496/CEE](#), de 15 de juliol de 1991, per la que s'estableixen els principis relatius a l'organització de controls veterinaris dels productes que s'introdueixin a la Comunitat procedents de països tercers i per la que es modifica les Directives 89/662/CEE, 90/425/CEE i 90/675/CEE. En aquesta directa s'estableix que cada lot d'animals procedents de tercers països han de ser sotmesos per les autoritats competents a un control documental, a un control d'identitat i a un control físic, en un lloc d'inspecció situat a la immediata proximitat del punt d'entrada al territori comunitari o, en el seu cas, en una estació de quarantena. Llavors, quan es compleixen els requisits veterinaris d'importació i no hi ha perill per a la salut pública i la sanitat animal, el veterinari responsable del lloc d'inspecció expedeix un certificat. Pel que fa als sistema de dades, la Comissió treballa amb un connecta els serveis dels llocs d'inspecció de les fronteres i les autoritats veterinàries d'aquesta. Aquest sistema, anomenat Traces (sistema que ha substituït l'antic SHIFT), inclou els elements relatius a les importacions d'animals procedents de tercers països i està connectat amb el sistema d'intercanvi de dades entre les autoritats veterinàries, establert per la Directiva 90/425/CEE.
- [Directiva 94/28/CE](#), de 23 de juny de 1994, per la que s'estableixen els principis relatius a les condicions zootècniques i genealògiques aplicables a la importació d'animals, esperma, òvuls i embrions, procedents de tercers països i per la que es modifica la Directiva 77/504/CEE referent a animals de l'espècie bovina de raça selecta per a reproducció.

Altres organismes que tracten temes referents a la transferència d'embrions

- Codi sanitari pels animals terrestres, de la OIE (Organització Mundial de la Salut Animal). Els capítols 4.7, 4.8 i 4.9, de la seva última versió, de 2011, contenen les recomanacions sobre la recollida i transformació d'embrions obtinguts in vivo, d'embrions produïts in vitro i d'embrions micromanipulats, respectivament. Concretament, a l'article 4.7.14 es parla sobre les recomanacions relatives al risc de transmissió de malalties per embrions recol·lectats in vivo, basades en les conclusions extretes per la IETS (Societat internacional de Transferència d'Embrions). En el capítol 4.11 parla sobre la transferència nuclear de cèl·lules somàtiques en el ramat i els cavalls de cria. Altres punts a destacar d'aquesta edició és el fet que es va proposar com a definició del terme “Biotecnologia reproductiva” la generació d'animals mitjançant l'ús de tecnologies reproductives assistides, que abarquin des de la inseminació artificial fins a tecnologies que impliquin un component in vitro, entre les quals es troba la transferència d'embrions.
- La Societat Internacional de Transferència d'Embrions (IETS, en les sigles angleses) és una organització internacional i un aforament professional que, entre altres coses, fomenta la ciència de producció d'embrions i coordina a nivell internacional les activitats de normalització relacionades amb la manipulació d'embrions i els procediment de registre. Una de les seves funcions principals és la formulació de protocols de caràcter pràctic i de base científica, amb la finalitat d'evitar els riscos de transmissió de malalties a la transferència d'embrions dels donants als receptors. Aquests protocols estan basats, en gran mesura, en els mètodes higiènics de manipulació d'embrions, exposats a la tercera edició del Manual de la IETS i al Codi Terrestre. En algunes malalties, aquests mètodes poden arribar a servir per substituir mètodes tradicionals o per reforçar-los i complementar-los.

LEGISLACIÓ ESPANYOLA

- [Reial Decret 2129/2008](#) de 26 de desembre, pel qual s'estableix el Programa nacional de conservació, millora i foment de les races ramaderes.
- [Reial Decret 662/2007](#) de 25 de maig de 2007, sobre selecció i reproducció de bestiar equí de races pures.(Vigent fins el 28 de gener de 2009). Aquest Reial Decret té per objecte establir:
 - o El règim jurídic del reconeixement oficial de les associacions de criadors d'èquids registrats per a la gestió dels llibres genealògics.
 - o Les condicions zootècniques i genealògiques que regulen els intercanvis comunitaris d'èquids, i les importacions de tercers països.
 - o El règim jurídic dels llibres genealògics d'èquids així com els criteris d'inscripció dels animals, i de selecció de reproductors en els mateixos.
- [Reial Decret 517/2005](#) de 6 de maig, pel que es modifica el Reial Decret 1133/2002 de 31 de octubre, pel que es regulen en l'àmbit de les races equines, el règim jurídic dels llibres genealògics, les associacions de criadors i les característiques zootècniques de les diferents races.
- [Reial Decret 1429/2003](#) de 21 de novembre, pel que es regulen les condicions d'aplicació de la normativa comunitària en matèria de subproductes d'origen animal no destinats al consum humà.
- [Llei 8/2003](#) de 24 de abril, de sanitat animal.
- [Reial Decret 1133/2002](#) de 31 d'octubre, el present Reial Decret estableix les condicions zootècniques i genealògiques dels èquids de pura raça i èquids registrats, el règim jurídic referent a la gestió dels llibres genealògics, procediments i criteris d'inscripció del ramat equí en els llibres de caràcter nacional e internacional i de selecció de reproductors. Així mateix, estableix el règim jurídic de les associacions i organitzacions de criadors d'èquids registrats. (Vigent fins el 10 de juny de 2007)
- [Reial Decret 1881/1994](#) del 10 de setembre pel que s'estableixen les condicions de policia sanitària aplicables als intercanvis intracomunitaris i a les importacions

procedents de països tercers d'animals, esperma, òvuls i embrions no sotmesos, respecte a aquestes condicions, a les disposicions contingudes en la secció 1a de l'annex A del RD 1316/1992.

- [Reial Decret 1316/1992](#) del 30 d'octubre pel que s'estableixen els controls veterinaris i zootècnics aplicables en els intercanvis intracomunitaris de determinats animals vius i productes amb vistes a la realització del mercat interior.

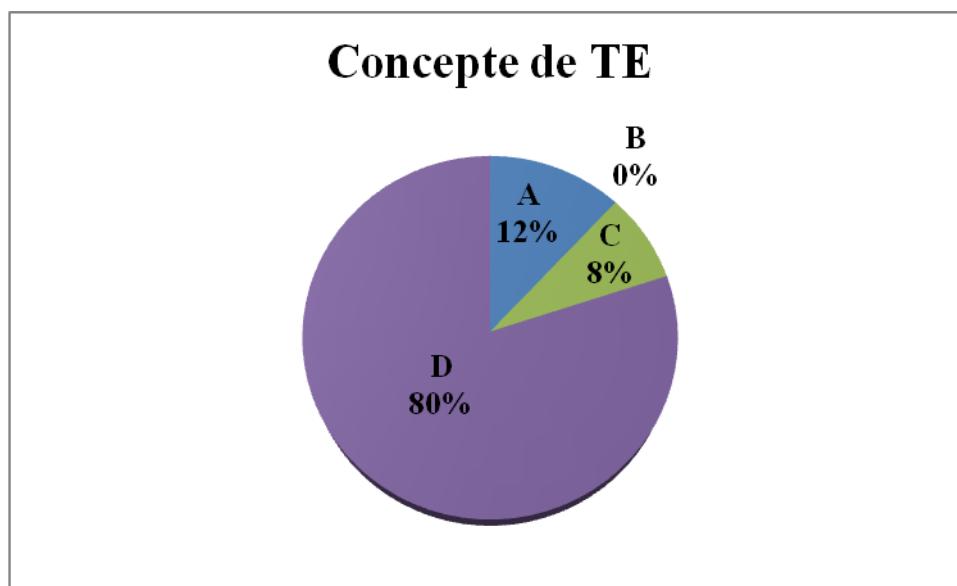
ENQUESTA

Aquesta enquesta consta de 6 preguntes, contestades per 30 persones relacionades amb la veterinària, tant dedicades a èquids com a altres espècies.

1. Pel que fa a la transferència d'embrions en èquids...

- a. És una tècnica amb la que s'obtenen embrions del tracte reproductiu d'una femella (donadora) abans de la implantació i després es transfereix al tracte reproductiu d'una altra femella (receptora) per a que pugui completar el seu desenvolupament (gestació).
- b. No existeix la transferència d'embrions en èquids, només s'empra a l'espècie humana.
- c. Permet crear individus d'una euga que es troba en competició sense necessitat de què aquesta es quedi gestant.
- d. Tant la a) com la c) són certes.

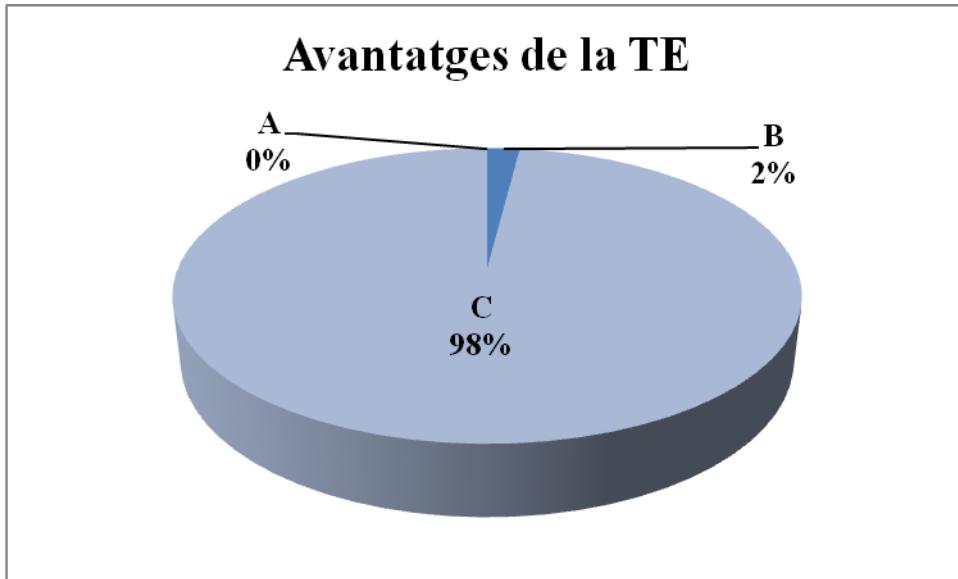
Resultats:



2. Quin és un avantatge de la Transferència d'embrions?

- a. Cap.
- b. És econòmic.
- c. Es poden reproduir animals en perill d'extinció.

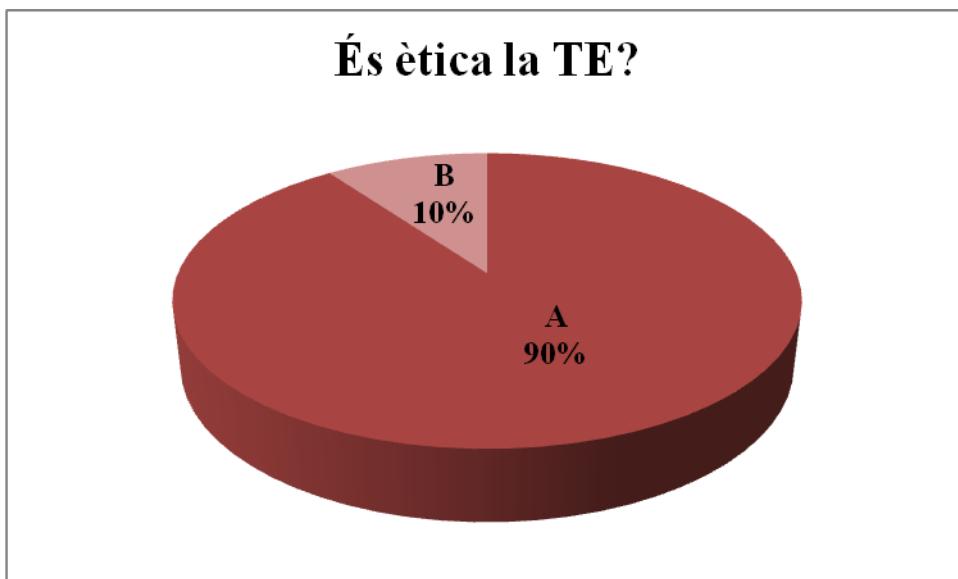
Resultats:



3. Veus ètic el tema de la transferència d'embrions en èquids?

- a. Sí.
- b. No.

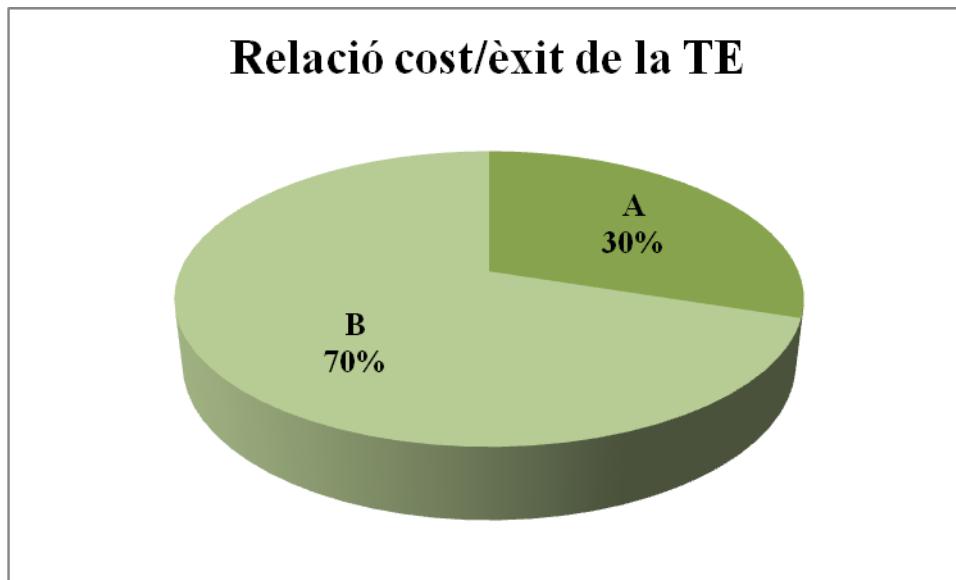
Resultats:



4. El cost aproximat és de 3000€ amb un percentatge d'èxit del 40%. Ho veus adequat?

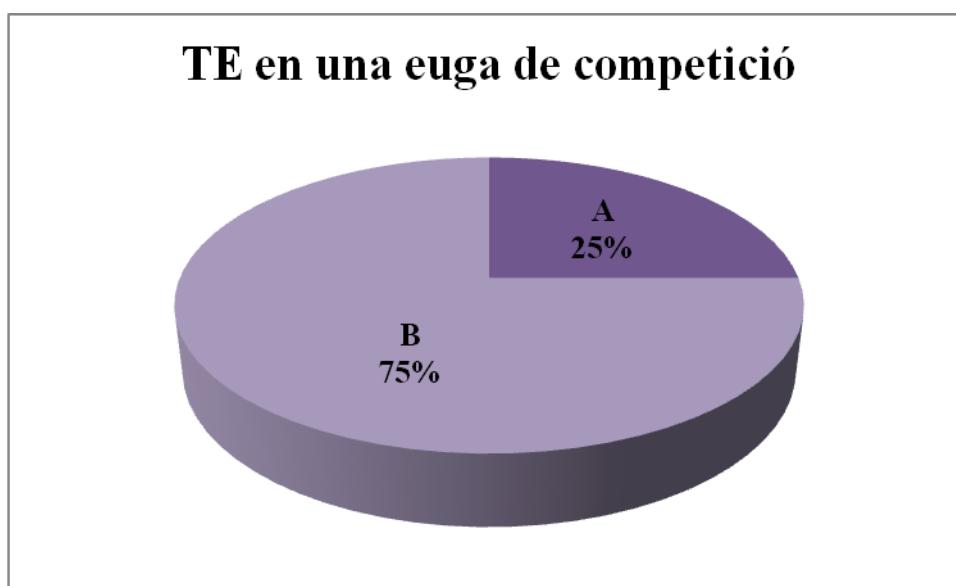
- a. Sí.
- b. No.

Resultats:



5. Si tinguessis una euga de competició i tenint en compte el cost i el percentatge d'èxit. Et plantejaries l'extracció d'òvuls per tal de fer una transferència d'embrions?
- a. Sí.
 - b. No.

Resultats:



6. I si la teva euga no fos fèrtil. Et plantejaries ara la transferència d'embrions com a opció per obtenir descendència?

a. Sí.

b. No.

Resultats:



CONCLUSIÓ DE L'ENQUESTA

La gran majoria de la gent que ha respost l'enquesta (80%) sap què és la transferència d'embrions i quins avantatges es poden obtenir. Aquest fet entra dintre de les expectatives que ens havíem plantejat. Principalment, per dues raons:

- És un tema bastant introduït a la societat, encara que és relativament nou.
- El perfil dels enquestats, ja que pertanyen al món veterinari.

També per aquest últim fet, no ens sorprèn que el 90% cregui ètic la TE.

On hi ha hagut més diversitat de respostes, ha sigut en el tema de la relació cost/benefici. És normal, perquè hi ha un elevat percentatge de fracàs i la inversió feta és molt elevada, de manera que pot ser que 3000 € sigui una quantitat de diners que l'interessat en la TE no pugui arriscar-se a perdre.

Per últim, comentar l'augment del percentatge de persones que farien TE quan canviem la donadora d'una euga de competició a una no fèrtil. Segurament, això sigui degut al fet que a la segona no hi ha moltes més opcions.

Laura García Rodríguez
Raquel Trigueros Pérez
Itziar Wilhelmi Vilarrasa

Això ens porta a la conclusió que potser per a molta gent la TE és una alternativa, una solució secundària a un problema, més aviat que una qüestió de millora genètica.

ENTREVISTES

ENTREVISTA A LUIS LOSINNO

Luis Losinno, mèdic veterinari, PhD en Ciències Veterinàries, investigador docent en producció equina a la Universitat Nacional de Río Cuarto, província de Còrdoba, República Argentina, director del laboratori de reproducció equina, consultor internacional en programes de producció i reproducció equina i expert en instal·lacions per èquids.

1. ¿Desde cuando lleva trabajando con la transferencia de embriones (TE)?

Desde 1986, en la Universidad, hice mi primer lavaje y obtuvimos los primeros embriones en esa temporada reproductiva 86/87. En 1988 dimos el primer curso internacional de TE en equinos junto al Dr Marcelo Villahoz (Lex, Ky, USA). Desde entonces, he trabajado en TE en equinos ininterrumpidamente. Hasta 2000 en un programa comercial y desde entonces como consultor sobre diseño y control de programas de TE en diferentes razas y países. Continuo trabajando en programas de TE en mi Laboratorio de la Universidad, pero sólo desarrollando tecnologías aplicadas como superovulación y vitrificación de embriones, expresión génica, etc. Además, damos cursos de capacitación personalizados sobre TE desde hace mas de 15 años.

2. ¿Nos puede hacer un breve resumen de cómo lleva a cabo usted la TE?

Lavamos las yeguas entre los días 7 y 9,5, dependiendo de la edad de la donante y sus datos; con un sistema CERRADO, con filtro tipo Emcon on line; con 2 litros de Ringer Lactato. Trabajamos bajo flujo laminar para la búsqueda y transferimos con espéculo y pinza de cérvix con el método Wilsher.

3. ¿Qué porcentaje de éxito obtiene en las TE que practica?

Las tasas SIEMPRE se expresan en función de otras variables, nunca como algo “promedio”. Las variables que uso para las tasas son: 1) edad de la donante; 2) tipo (fresco, refrigerado, congelado) y calidad de semen (regular, aceptable, bueno, excelente); categoría de la donante (apta sin observaciones; apta con observaciones). En principio, las tasas de RECUPERACION embrionaria por ovulación están sobre

75% (rangos de 60 a 85%) y las de preñez post transferencia 70% (rangos de 60 a 80%). Es decir la EFICIENCIA del sistema en cualquier programa comercial debería estar sobre 48-50% (2 lavajes/prenez), al menos esos son los valores de nuestro laboratorio y también en promedio los de Argentina, sobre unas 9,000 preñeces comerciales por TE anuales.

4. ¿Cuáles podrían ser los puntos críticos a la hora de realizar una TE?;Qué riesgos pueden tener las yeguas, tanto la donadora como la receptora?

En mi opinión, los puntos críticos más importantes para lograr una preñez (no un embrion) por TE son: 1) la calidad del semen; 2) el grado de aptitud reproductiva de la donante; 3) la calidad de las receptoras; 4) el entrenamiento y capacitación del operador, en ese orden.

Los riesgos de la técnica son mínimos. Un flushing dura 12 minutos y es poco invasivo. Las rupturas de recto en yeguas en programas de TE continuos versus una yegua de cría aumentan levemente pero no son significativos. En centros comerciales es mayor el riesgo de enfermedades infecciosas.

5. En cuanto a la fecundación, para obtener un mejor resultado de cara a tener una TE exitosa ¿es mejor la monta natural o la inseminació artificial?

Sin NINGUNA duda la IA. Jamás hago una monta natural en un programa de TE. Es algo DESCONTROLADO y eso va en contra de mis principios de trabajo en un programa de reproducción asistida.

6. ¿Es posible conservar los embriones? Si usan la congelación como método de conservación ¿Qué porcentaje de éxito tienen?

Es posible refrigerarlos por 24-36 hs a 5 grados sin ninguna alteración en las tasas de preñez post transferencia si es hecho adecuadamente. Las tasas de preñez con sistemas de criopreservación convencional, es decir con curvas de descenso térmico controladas en dos o tres pasos son MUY variables, dependiendo del sistema utilizado (entre 5 y 55%) pero hay programas que conozco en los cuales estas tasas son consistentemente superiores a 60%. Nosotros VITRIFICAMOS embriones desde hace 5 años. Hemos utilizado varios protocolos y actualmente estamos ensayando uno nuevo. Nuestras tasas de preñez post vitrificación son hasta el momento, con el último sistema utilizado, de 72% en un número bajo de animales. Esperamos vitrificar unos 200 embriones esta

temporada en curso. Tendremos más datos a fines de 2012.

7. ¿Qué coste tiene el proceso?

Depende de QUE proceso. SI es TODO, es decir incluyendo el mantenimiento de las receptoras todo el año, amortización del equipo, sueldos, impuestos, etc etc, en Argentina entregar una preñez de 60 días por TE a un cliente, entre 1000 y 1500 dólares (se cobra al cliente entre 2,500 y 3,000 dólares, sin incluir el costo del semen). Si se refiere sólo al LAVAJE. En los centros de USA me sale 130-150 dólares y en Argentina aprox. 40 dólares.

8. ¿Tiene experiencia con la TE de otras especies?

Solamente en bovinos y como curiosidad, para ver como era trabajé part time en un programa comercial por una temporada. Suficiente para saber que no me interesaba en lo mas mínimo. Lo que hago esta en las antipodas de lo que se hace en bovinos. Trabajé toda mi vida sólo en reproducción equina (y no me arrepiento).

9. Inicialmente, la transferencia embrionaria fue un método que permitía la obtención de potros a partir de yeguas viejas o subfértiles.

Correcto, (Douglas, 1984) pero hoy ya no es el objetivo principal dada la extremadamente baja eficiencia. La mayor aplicación es MULTIPLICAR es decir incrementar la progenie en la unidad de tiempo y en lo posible, de yeguas fertiles

10. ¿Afecta este hecho a la viabilidad del embrión?

Sí, lo afecta. Por varias razones. De hecho la tesis en curso de una de mis estudiantes de doctorado es sobre ese tema. Infecciones subclínicas y expresión génica de embriones de yeguas jóvenes y viejas.

11. ¿Respecto al éxito de la TE y comparando con yeguas donadoras más jóvenes, ¿hay mucha diferencia entre donadoras viejas o subfértiles y jóvenes?

Sí, hay diferencia, obviamente si descartamos factores como fertilidad del semen, operador y receptoras y focalizamos sólo en edad de la donante. La eficiencia aceptable en yeguas jóvenes debería estar sobre 50% y en viejas esta entre 20 y 30%, máximo.

12. En su opinión, ¿ es recomendable usar este tipo de yeguas?

Las técnicas de reproducción asistida son siempre recomendables para animales BUENOS, es decir genéticamente SUPERIORES a la media. Si este hecho es verdad (objetivamente –muy raro-) siempre está justificado utilizar la TE porque permite incrementar la progenie, evaluar combinaciones genéticas, disminuir el intervalo generacional, y suprimir los riesgos del parto y de la gestación. Si son viejas (mayores de 17 años), que sean subfertiles es una cuestión de tiempo (muy corto); y si esas yeguas permanecen en sistemas de producción es porque tienen buena progenie, o sea vale la pena reproducirlas. La TE es una buena herramienta para eso y un gran NEGOCIO para todos. Para el propietario inteligente y no miserable (rarísimo) y para los veterinarios.

El problema es que la mayoría de los criadores tiene la ilusión o creencia que sus animales son buenos, lo que no es verdad (objetivamente) en la mayoría de los casos, pero ese no es el problema principal.

13. ¿Existe algun límite en el registro de nacimientos de potros por yegua y año? Si es así, ¿ A qué se debe?

La mayoría de las Asociaciones de Criadores que conozco, van a la retaguardia de la realidad, es decir son conservadores, ortodoxos y en general arrogantes epistémicos (la arrogancia de los ignorantes, es decir de los que creen que tienen el conocimiento), por lo que sólo incorporan biotecnologías cuando la tasa de criadores que lo hace de manera ilegal (enorme) es tan escandalosa que no les queda más remedio. Por lo tanto lo que les da “seguridad” es restringir y comienzan por limitar el número de crías por yegua/año (una o dos); sólo permitir hacer TE a yeguas calificadas; sólo con sementales vivos; etc etc; pero esta manifestación de “poder corporativo” sólo dura entre dos y tres temporadas máximo. Lo he visto- y padecido- decenas de veces. Después se des-regula, en general.

Discutir los argumentos me llevaría bastante tiempo. He dado estas conferencias – discusiones para las Asociaciones durante mucho tiempo en diferentes países y en general casi todo se repite.

14. ¿Puede influir de alguna manera la genética de la receptora sobre el embrión?

Estoy convencido que sí. Son efectos epigenéticos, es decir no "cambian" el genoma del feto, pero si pueden alterar - en algunos casos de por vida-, las tasas de expresión génica y con ello el fenotipo, la susceptibilidad a enfermedades, etc etc.

En general esto es MUY mal recibido por los veterinarios, que no les gusta que diga esto y a los criadores tampoco, pero hay un corpus de evidencia muy fuerte al respecto. Ya no es sólo una opinión.

También influye que la receptora sea virgen, por ejemplo, algo INDESEABLE dado que disminuye el peso al nacimiento de la primera cría, etc etc.

ENTREVISTA A JORDI MIRÓ ROIG

Jordi Miró Roig, Doctor en veterinaria. Director del Servei de Reproducció Equina a la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona.

1. Des de quan està treballant amb la transferència d'embrions (TE)?

Des de l'any 1989.

2. Ens pot fer un breu resum de com du a terme la TE?

Controlem i inseminem l'euga donant. Si es vol transferir l'embrió en fresc (immediat) sincronitzem també, al menys, 2 receptores. Quan transferim en fresc recollim l'embrió entre els dies 7-8 postovulació. Quan congelem (per vitrificació) l'embrió el recollim el dia 6.

L'embrió es recull per rentat uterí mitjançant una sonda Fooley de doble via i DPBS o Ringer lactat com a fluids de rentat. Es passen entre 1 i 3 litres de líquid. En la mateixa sonda de recollida s'incorpora un filtre que impedeix el pas de l'embrió, de manera que aquest queda en la part anterior del filtre amb una petita quantitat de líquid i la resta és eliminada. El possible embrió recollit es busca en el líquid guardat mitjançant una lupa binocular.

Un cop localitzat l'embrió es col·loca en una palera de 0.5ml i gràcies a un catèter es transfereix a l'euga receptora que està millor sincronitzada amb la donant.

3. Quin percentatge d'èxit obté en les TE?

Aprox. 50%

4. Quins podrien ser els punts crítics a l'hora de realitzar una TE? Quins riscs poden tenir les eugues, tant la donadora com la receptora?

Punts crítics:

- Fertilitat del semen utilitzat
- Ús de semen fresc, refrigerat o congelat. El semen congelat té pitjors resultats, molt variables segons el cavall i/o sistema de congelació i requereix un control acurat de l'euga (cada 4-6hores)
- Euga donadora amb problemes que la incapacitin per a la fecundació (endometritis, obstruccions oviductals, problemes ovàrics...)
- Euga receptora vella (per obtenir bons resultats hem de fer servir, normalment, eugues entre 3 i 7 anys)

Si ho fem bé, en principi no tenen cap risc ni donadora ni receptora.

S'aconsella deixar passar un zel entre recollida i recollida d'embrions d'una euga donadora. El zel té un bon efecte de neteja i regenerador de l'endometri. Així mateix, just després d'un rentat es sol administrar una prostaglandina, fet que induceix la luteòlisi i el proper zel, però que així mateix produueix contraccions uterines i el buidat de possibles restes de líquid.

5. En quant a la fecundació per obtenir un millor resultat de cara a tenir una TE exitosa, és millor la munta natural o la inseminació artificial?

La munta natural o la inseminació artificial amb semen fresc ofereixen els mateixos resultats. Com es comenta en una pregunta anterior, quan s'usa semen refrigerat o congelat els resultats comencen de baixar. De totes maneres, sempre fa falta un bon seguiment ecogràfic de la ovulació.

6. És possible conservar els embrions? Si empra la congelació com a mètode de conservació, quin percentatge d'èxit obté?

Podem conservar els embrions en el medi de rentat a 20°C fins a 24hores.

Podem conservar-lo més enllà congelant-lo, amb una congelació ultra ràpida (vitrificació). Els resultats són bons, potser baixen una mica, però ningú dona

encara mitges fiables (falta tenir molts més resultats). En el nostre cas, fins ara estan molt a prop de la transferència en fresc.

7. Quin cost té el procés?

La primera transferència d'una euga 2000 euros. Les següents el procés s'abaretaix una mica.

8. Té experiència amb TE d'altres espècies?

Fa anys, vaig treballar una temporada en TE en vacú.

9. Inicialment, la transferència embrionària va ser un mètode que permetia l'obtenció de poltres a partir d'eugues velles o subfèrtils.

a. Afecta aquest fet a la viabilitat de l'embrió?

Pot afectar

b. Respecte a l'èxit de la TE i comparant amb eugues donadores més joves, hi ha molta diferència entre donadores velles o subfèrtils i joves?

Evidentment els millors resultats s'obtenen en eugues joves, reproductivament sanes i fèrtils. Però cada cas és un món. Hi ha eugues joves i velles excel·lents donadores i d'altres amb molt baixa eficàcia.

c. Segons la seva opinió, és recomanable emprar aquest tipus d'eugues?

Evidentment. Hi ha moltes eugues amb gran valor genètic, que per diversos motius no poden gestar, però sí poden donar embrions.

10. Existeix algun límit en el registre de naixements de poltres per euga i any?

Si és així, a què es deu?

Depèn de la raça. Hi ha Stood boocks que no l'admeten, d'altres que hi posen restriccions i d'altres que no hi posen cap problema.

11. Pot influir d'alguna manera la genètica de la receptora sobre l'embrió?

NO, la genètica de la receptora no pot influir en el material genètic de l'embrió ja que aquest prové totalment de la euga i del semental biològics, no obstant, la receptora pot alterar la seva expressió gènica i com a conseqüència el seu fenotip ja que l'expressió d'un gen es veu alterada per les condicions ambientals.

També tenir en compte el tamany de l'úter ja que si la femella receptora té l'úter més gran que la donadora, el fetus creixerà més i en el moment del part aquest probablement pesarà més que si hagués nascut de l'euga biològica, no obstant a la llarga no té perquè influenciar.

ENTREVISTA A GUILLEM FORMIGUERA

És representant a Catalunya de [Embriones Equinos SLP](#). Empresa dedicada a la transferència d'embrions en èquids.

1. ¿Desde cuando lleva trabajando con la transferencia de embriones (TE)?

Empecé en 1995 en Argentina y los primeros productos en Catalunya los hice en el 96.

2. ¿Nos puede hacer un breve resumen de cómo lleva a cabo usted la TE?

Inseminamos la yegua donante y a los 8 días postovulación le hago el lavage uterino para recuperar el embrión. Lo proceso en el laboratorio para cambiarlo de medio. Transfiero el embrión de forma no quirúrgica a una receptora que se encuentra ovulada el mismo día que la donante o uno o dos días después.

3. ¿Qué porcentaje de éxito obtiene en las TE que practica?

Al final de la temporada los porcentajes suelen oscilar siempre entre un 60-80% de recuperación y un 80-90% de tasa de preñez de los embriones transferidos. Esto significa una eficiencia final de entre un 50 y un 65%.

4. ¿Cuáles podrían ser los puntos críticos a la hora de realizar una TE? ¿Qué riesgos pueden tener las yeguas, tanto la donadora como la receptora?

No existen riesgos asociados específicamente a la técnica. Pueden existir los mismos accidentes debidos al manejo de los animales que en una ecografía ordinaria, una inseminación,... Los puntos críticos son todos los del proceso porque si haces uno mal, no tienes resultado final. Si inseminas mal no tienes

embrión, si lo procesas mal, lo matas y si no sincronizas bien las receptoras y no sabes transferir, no se prenya.

5. En cuanto a la fecundación, para obtener un mejor resultado de cara a tener una TE exitosa ¿es mejor la monta natural o la inseminación artificial?

Las dos técnicas son válidas si se realizan de forma correcta y en algunos casos hay yeguas que conviene más uno u otro tipo de cubrición.

6. ¿Es posible conservar los embriones? Si usan la congelación como método de conservación ¿Qué porcentaje de éxito tienen?

Estamos usando la vitrificación de embriones de pequeño tamaño (mórlulas o blastocitos muy pequeños). Solo hemos transferido 9 de estos embriones vitrificados y se han preñado 5. No es un número suficiente para sacar conclusiones, pero por los números publicados, un 60% de tasa de preñez es hacerlo todo muy bien.

7. ¿Qué coste tiene el proceso?

Todo incluído está entre 3500 y 4000€.

8. ¿Tiene experiencia con la TE de otras especies?

No

9. Inicialmente, la transferencia embrionaria fue un método que permitía la obtención de potros a partir de yeguas viejas o subfértilles.

a. ¿Afecta este hecho a la viabilidad del embrión?

Si porqué la calidad de los óvulos no es la misma de una yegua vieja que de una joven.

b. ¿Respecto al éxito de la TE y comparando con yeguas donadoras más jóvenes, ¿hay mucha diferencia entre donadoras viejas o subfértilles y jóvenes?

Este año tenemos 7 receptoras preñadas con embriones de una yegua geriátrica (de 22 años) pero no es lo normal y habitualmente las yeguas a partir de 18 años suelen ir bajando la calidad de los óvulos y por lo tanto esto afecta la viabilidad de los embriones.

c. En su opinión, ¿es recomendable usar este tipo de yeguas?

La donante es interesante por su valor genético independientemente de su edad o su fertilidad.

10. ¿Existe algun límite en el registro de nacimientos de potros por yegua y año? Si es así, ¿A qué se debe?

Algunas razas ponen límites pero siempre son razones comerciales y no existe una razón científica de peso.

11. ¿Puede influir de alguna manera la genética de la receptora sobre el embrión?

No. Puede influir el tamaño de la receptora, la cantidad de leche, la aptitud maternal, sobre el desarrollo del embrión pero nunca sobre su genética.

CONCLUSIONS I PUNTS CRÍTICS

La *Unió Europea* regula molt l'àmbit veterinari, i dintre d'aquest, l'àmbit de salut de la transferència d'embrions.

Regula les autoritzacions per l'extracció de material genètic, estableix les condicions per l'esmentada extracció, certificats pertinents. També regula tot el tema relacionat amb intercanvis de material genètic entre països europeus i altres. D'aquest últim fet, cal destacar l'apartat de malalties obligatòries: per cavalls sementals i femelles donants, els quals s'han de sotmetre a proves per a la detecció d'anèmia infecciosa equina, metritis contagiosa equina i aquelles en què s'hagi establert un programa de lluita o vigilància en l'estat pertinent. Tampoc pot ser susceptible a intercanvi, segons el CE, qualsevol animal que “presenti signes de malaltia”.

Sota el nostre punt de vista, està regulat molt superficialment, perquè només s'imposa dues malalties de Declaració Obligatòria. En quant a l'últim punt, dir que la OIE elabora una llista de malalties transmissibles important des del punt de vista sanitari, amb repercuSSIONS pel comerç internacional, entre les que estan:

- [Anèmia infecciosa equina](#)
- [Arteritis viral equina](#)
- [Durina](#)
- [Encefalitis japonesa](#)
- [Encefalomielitis equina del Est o del Oest](#)
- [Encefalomielitis equina veneçolana](#)
- [Grip equina](#)
- [Linfangitis epizoòtica](#)
- [Metritis contagiosa equina](#)
- [“Muermo”](#)
- [Piroplasmosis equina](#)
- [Rinopneumònia equina](#)
- [Sarna equina](#)
- [Surra \(Trypanosoma evansi\)](#)
- [Verola equina](#)

És cert que hi ha algunes malalties d'aquesta llista, com l'encefalitis japonesa, encefalomielitis equina del Est o del Oest i encefalomielitis equina veneçolana, que tenen importància només en certs països. Però [l'arteritis viral equina](#) és de distribució mundial i en eugues gestants pot causar problemes, com avortaments de manera que creiem que probablement aquesta també l'hauria de tenir en compte la CE a part de les altres dues.

Un altre punt a tenir en compte, és el fet que la UE només es planteja la realització de proves per detectar les malalties anomenades anteriorment en cavalls sementals i femelles donants, no obstant, tal i com el doctor Luis Losinno esmenta a la seva entrevista, la genètica de la receptora juga un paper d'importància encara desconeguda, però, per qüestions preventives s'hauria de tenir en compte i incloure en les proves per la detecció de malalties transmissibles. S'hauria de fer una bona selecció de la receptora per tal de que la gestació es dugui a terme amb èxit.

En quant als intercanvis amb tercers països, la mesura preventiva establerta està molt ben regulada ja que controla el punt just d'entrada i si no és possible, hi ha una alternativa de quarantena.

Per altra banda, la OMS i la IETS donen recomanacions sobre com manipular el material genètic en aquests casos per tal de fer un bon ús de la tècnica de la transferència embrionària. En molts casos els reglaments i les directives es basen en les conclusions d'aquestes organitzacions, que són un model a seguir.

En l'àmbit espanyol

En les últimes dècades s'han posat en perill moltes races ramaderes autòctones, arribant inclús a la desaparició d'algunes d'elles, degut fonamentalment a la introducció de races estrangeres que ofereixen millors produccions a costa de la seva explotació en sistemes intensius o semi intensius, amb els conseqüents impactes en els ecosistemes tradicionals.

Per això, és competència i responsabilitat de les Administracions Pùbliques realitzar una eficaç regulació i ordenació del patrimoni genètic, i aquesta circumstància reforça la necessitat d'establir a Espanya un Programa nacional de conservació, millora i foment de les races ramaderes, que és, junt amb l'actualització i sistematització de la normativa zootècnica existent en el nostre país, l'objectiu fonamental d'aquest [Reial Decret](#)

2129/2008

Les normes d'actuació davant la presentació d'epizoòties concedeixen gran importància al coneixement immediat de qualsevol focus de malaltia i a l'actuació ràpida i eficaç de les Administracions Pùbliques, mitjançant la coordinació de les seves accions i amb la disponibilitat de mitjans adequats, entre els quals la possibilitat de sacrifici immediat dels animals malalts o sospitosos d'estar-ho, i la indemnització justa i compensatòria al particular afectat.

Davant la supressió dels controls veterinaris en les fronteres, que garantitzaven la protecció de la salut pública i animal, es fa oportú establir dits controls en el lloc de destí. També donat que la responsabilitat recau en l'estat d'expedició és necessari establir controls en els punts d'expedició que asseguren que els enviaments no presenten irregularitats. A més a més, es fa convenient aplicar una normativa similar de controls zootècnics.

Com a comentari global, la legislació espanyola justifica el manteniment d'un certificat sanitari zootècnic i de identificació que deu acompanyar als animals i als productes. Per la mateixa raó, es fa oportú l'establiment d'un sistema de identificació animal que permeti establir l'origen dels mateixos d'una forma harmonitzada.

Per últim, volíem comentar bàsicament, de les entrevistes fetes a gent entesa en el tema, la influència genètica de la receptora al embrió ja que creiem que és un punt conflictiu important. Sembla que el material genètic no és modificat però sí la seva expressió gènica ja que aquesta està influenciada per factors ambientals abans, durant i després de la seva formació. Entre aquests factors ambientals podem destacar l'alimentació, la temperatura, la llum, entre d'altres.

A més, el “imprinting” de la receptora pot influir en el caràcter del poltre però no en la seva informació genètica. És a dir, un Pura Sang Anglès transferit a una euga Bretona serà més tranquil ja que durant el “imprinting” copia el comportament de l'euga Bretona, però seguirà sent un pura sang anglès i també podrà destacar la seva genètica en l'àmbit esportiu.

Laura García Rodríguez
Raquel Trigueros Pérez
Itziar Wilhelmi Vilarrasa

BIBLIOGRAFIA

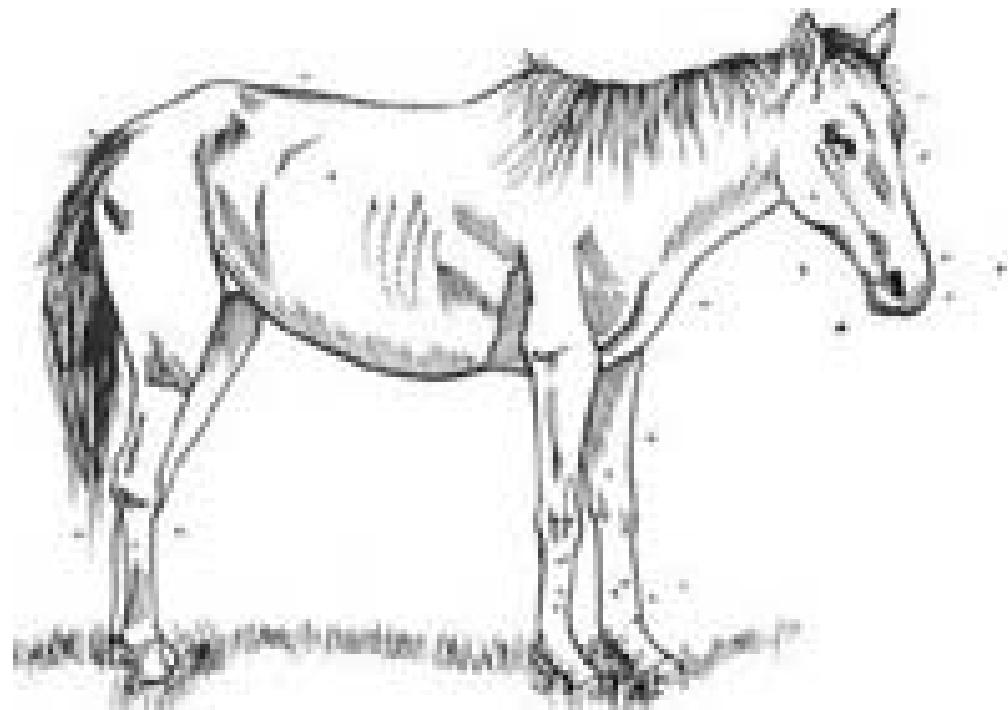
1. *Current Therapy in Equine Reproduction*. Juan C. Samper, Jonathan F Pycock, Angus O. McKinnon. Ed. Saunders Elsevier. Chapter 51. Page. 319-322
2. *Fertility & obstetrics in the horse*. Gary England. 3rd Edition. Blackwell Publishing. Page. 195-198.

ANNEXES

- http://www.inseminacionyeguas.es/Informacion_inseminacion_yeguas/Informacion_inicial_inseminacion_caballos_y_transferencia_embriонaria.html
- http://www.ivis.org/advances/reproduction_ball/embryo_transfer_vanderwall_es/ivis.pdf
- http://www.ivis.org/advances/reproduction_ball/embryo_transfer_vanderwall_es/ivis.pdf

ANEMIA INFECCIOSA EQUINA

- Fiebre de los pantanos (Swamp fever)



Afecta miembros de la familia *Equidae* (caballos, mulas, asnos y cebras)

ANEMIA INFECCIOSA EQUINA: agente etiológico

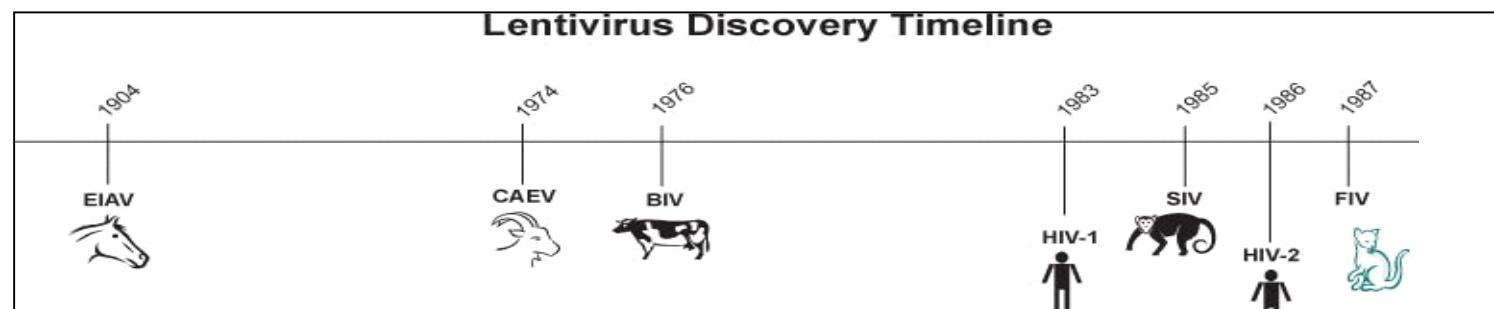
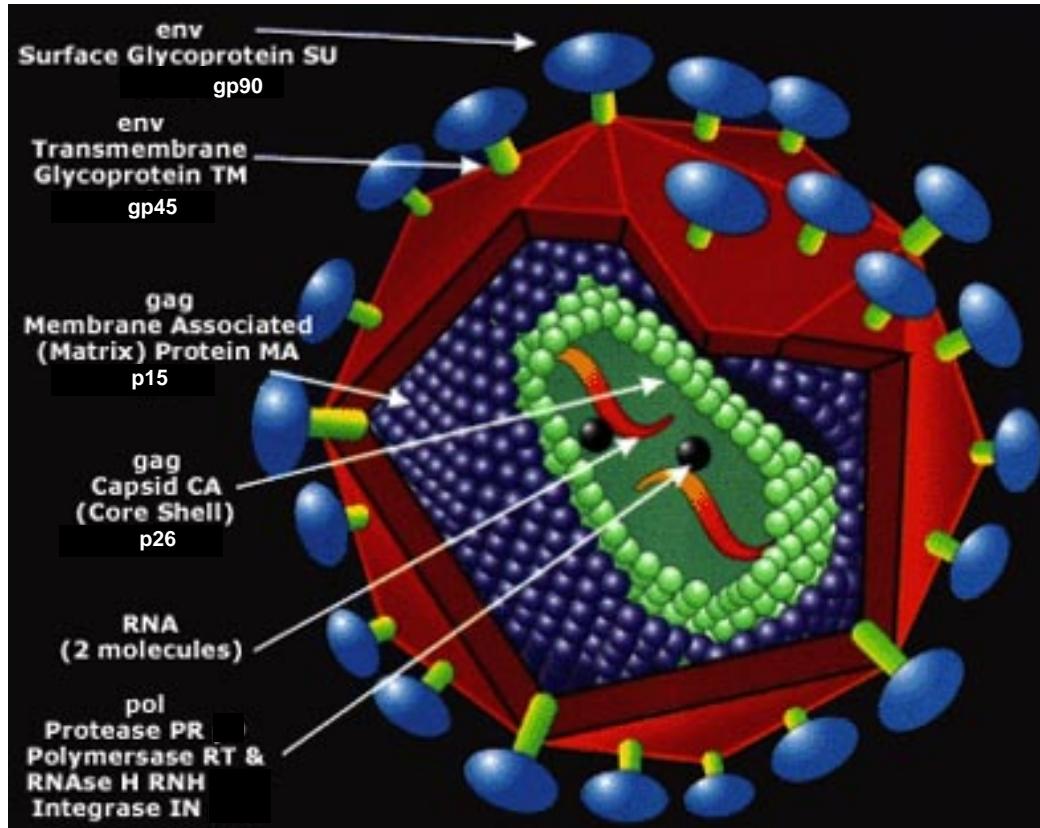
- Lentivirus
- Filia Retroviridae
- dos copias de ss-RNA

Proteínas codificadas

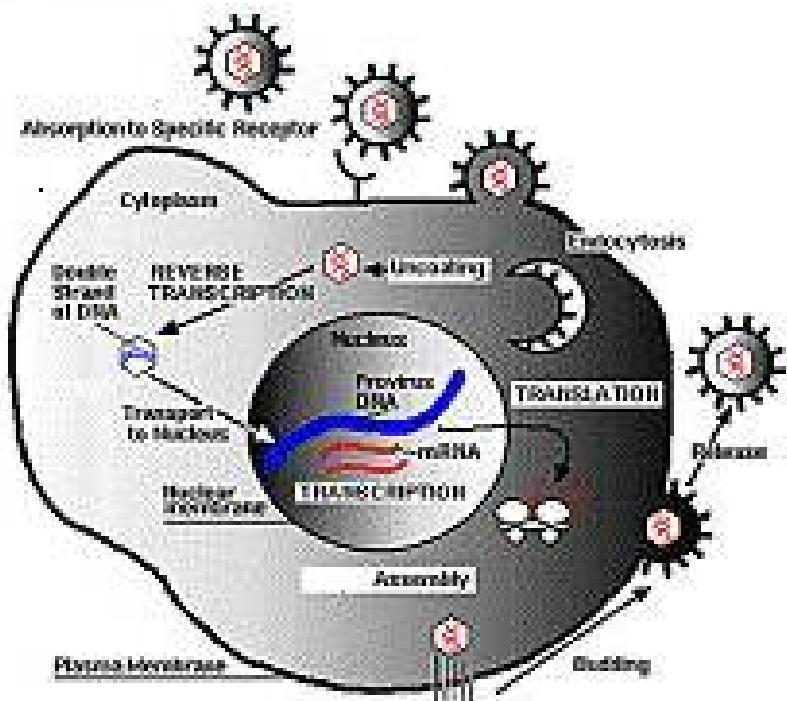
gag p15 - p26 - p11 - p9

pol RT - PR - DU - IN

env gp90 - gp45



- RNA viral a DNA mediante la acción de la transcriptasa reversa, migra al núcleo celular , una integrasa viral inserta DNA viral (provirus) en el genoma celular
- Mecanismo de persistencia del virus
 - provirus
 - acumulación de mutaciones puntuales (variación antigenica).



Retrovirus replication

ANEMIA INFECCIOSA EQUINA: transmisión

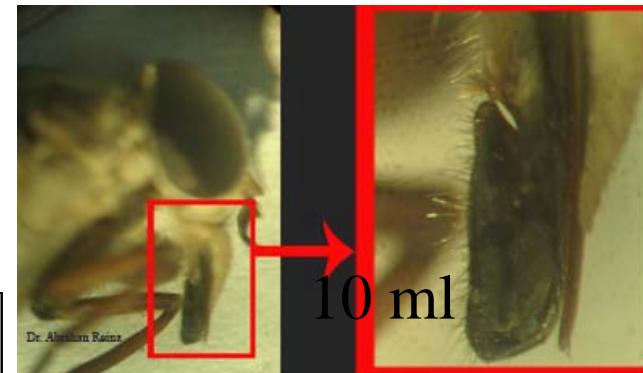
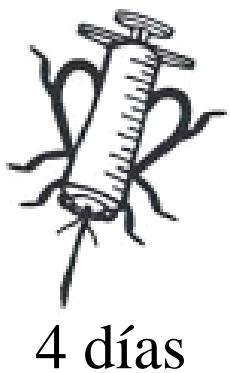
...por transferencia de sangre de un caballo infectado hacia otro no infectado

- Transmisión natural por insectos hematófagos principalmente tábanos y mosca de los establos (*Stomoxys calcitrans*)

- Forma iatrogénica

- Transmisión vertical: in utero, durante el parto, ingestión de calostro y leche infectada

- Transmisión venérea es posible



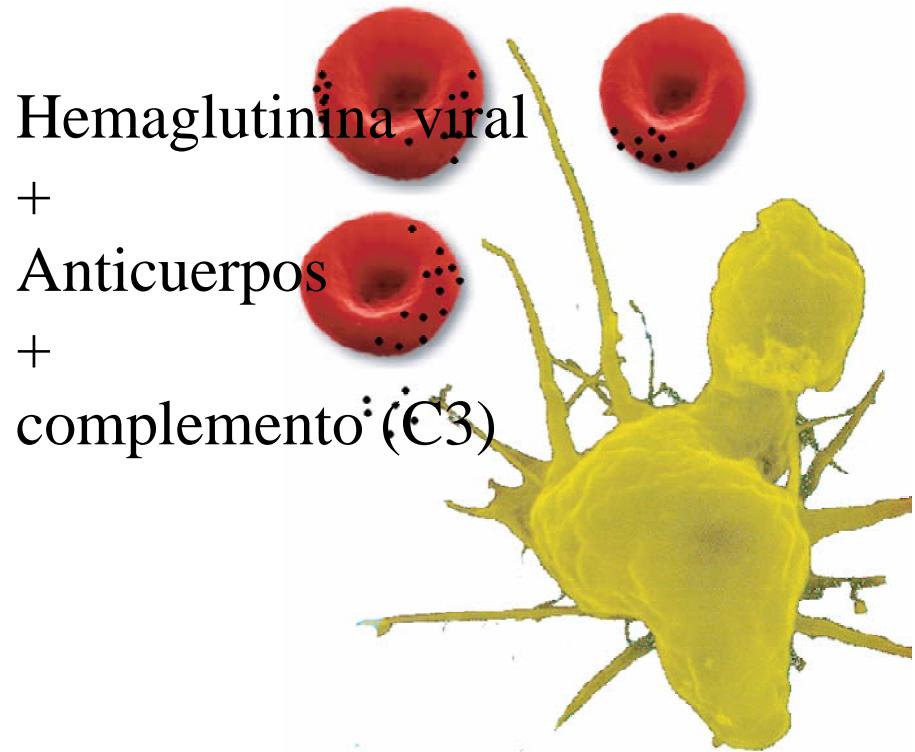
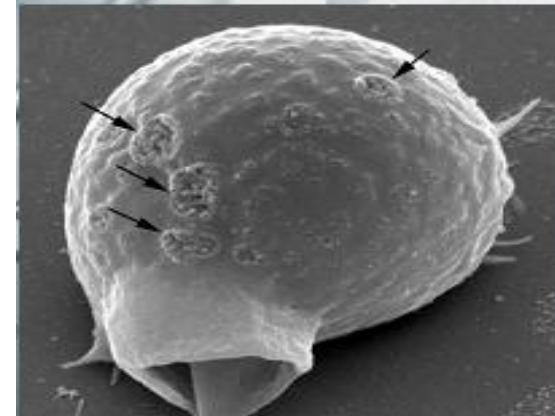
ANEMIA INFECCIOSA EQUINA: factores críticos para la transmisión

Transmisión mas eficiente:

- + caballos con enfermedad clínica (alta viremia)
 - + regiones con alta concentración del vector
 - + alta concentración de caballos (distancia entre caballos infectados y susceptibles)
-
- Si la distancia es 48 m entre caballo y caballo el 99% de los tábanos prefiere volver a picar el caballo original
 - Una separación de 180 m reduce significativamente la probabilidad de transmisión
 - No hay tratamiento o vacuna preventiva disponible

PATOGENESIS

- Relación directa entre signos clínicos, carga y replicación viral
- Infecta macrófagos



ANEMIA= HEMOLISIS + SUPRESION DE LA ERITROPOYESIS

SIGNOS CLINICOS

- Episodios de fiebre recurrente
- Letargia
- Inapetencia
- Trombocitopenia
- Anemia

ANEMIA INFECCIOSA EQUINA: formas clínicas

Anemia Infecciosa Equina FORMA AGUDA

- 5 a 30 días posteriores a la exposición
- Pronunciada viremia
- Fiebre
- Trombocitopenia
- Letargia
- Inapetencia
- Los caballos generalmente se recuperan luego de unos pocos días pero en algunos casos se desarrolla una enfermedad severa fatal



ANEMIA INFECCIOSA EQUINA: formas clínicas

INFECCION CRONICA (“SWAMPER”)

episodios febriles recurrentes, trombocitopenia, amenia, rápida perdida de peso, edema en las partes bajas de cuerpo.

CARRIER INAPARENTE

- no presenta síntomas clínicos visibles
 - actúa como reservorio de la enfermedad
-
- Transmisión de la infección fue 100% cuando se transfieren 250ml de sangre

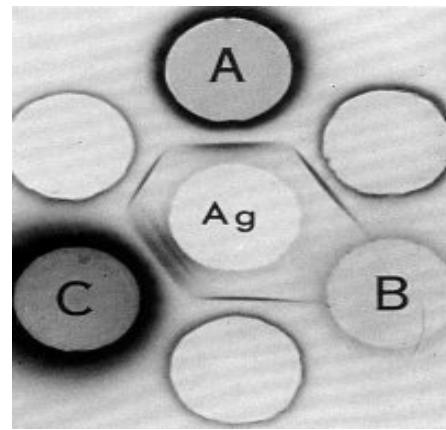
Anemia Infecciosa Equina: reglamentación vigente y diagnóstico

Reglamentación de la AIE

SENASA (Directiva 617/05/SAGPyA = Reglamento Equino)
OIE



- Certificación obligatoria de todos los equinos en tránsito o que ingresen y/o permanezcan en concentraciones.
- Declaración obligatoria.



DIAGNOSTICO DE LA AIE

- **IDGA**
 - **ELISA**
- } Aprobados oficialmente



Equipos
diagnósticos
importados

- **WB** (Rossmanith and Horvath, 1989; Issel and Cook, 2003;)
- **PCR** (Langemeier y col., 1996; Cook y col, 2002; Quilliane y col, 2007)

ANEMIA INFECCIOSA EQUINA

Situación en Argentina

✓ infección es endémica en el NE del país

- Santa Fe 26%
- Formosa 43%
- Chaco 32%
- Corrientes 17%
- Buenos Aires: No hay datos publicados de la prevalencia de la infección (entre 1,5% y 10%)



✓ Certificación de serología negativa

✓ Enfermedad de declaración obligatoria



In: **Equine Respiratory Diseases**, P. Lekeux (Ed.)

Publisher: International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA.

Arteritis Viral Equina (15-Apr-2003)

P. J. Timoney

Gluck Equine Research Center, Department of Veterinary Science, The University of Kentucky, Lexington, KY, USA.

Traducido por: **N. Fondevila y O. Zabal**, Catedra de Enfermedades Infecciosas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Salvador, Buenos Aires, Argentina., (10-May-2004).

Introducción

La arteritis viral equina (AVE) es una enfermedad contagiosa que afecta al aparato respiratorio de equinos, denominada así por las lesiones inflamatorias características inducidas por el virus causal en los vasos sanguíneos más pequeños, sobre todo las arteriolas del animal con una infección aguda [1,2]. Identificada dentro del complejo "aborted-influenza equino" durante muchos años, la AVE fue finalmente identificada como una enfermedad etiológicamente separada después de un brote de enfermedad respiratoria y abortos en una finca de cría de Standardbred cerca de Bucyrus, Ohio en 1953 [3]. Basado en informes en la literatura veterinaria de fines del siglo diecinueve, existen muy pocas dudas que una enfermedad clínicamente idéntica ó muy similar descrita con diferentes nombres (celulitis epizoótica, ojo rosado, pferdestaube, etc.), ya estaba presente en Europa durante el siglo anterior [4-7].

La AVE no despertó mayor interés como una enfermedad viral del equino durante los 30 años posteriores a su identificación y mucho menos como una causa para la preocupación con respecto al tránsito internacional [8]. Sin embargo, esto cambió dramáticamente, después de un brote en un número significante de granjas de cría de Pura sangre en Kentucky en 1984 [9]. El temor que una cepa altamente patogénica del agente viral había emergido, sumado a la creencia que la mayoría de las poblaciones equinas eran susceptible al virus, produjo una reconsideración sobre la importancia de la enfermedad en el sector de producción equina a nivel mundial [10]. Se impusieron restricciones severas en el movimiento de caballos con títulos positivos de anticuerpos contra el virus. En los años siguientes, estas medidas se fueron aliviando grandemente, poniendo un mayor énfasis actualmente en controlar el comercio internacional de los sementales portadores y semen infectivo los que frecuentemente han sido implicados en la diseminación del virus dentro y entre los países [11-14].

Algunos sostienen que el nivel de importancia que se le dio a la AVE desde 1984 injustificado, [15-17], manteniendo, no sin justificación que hay otras enfermedades infecciosas equinas de mayor importancia en veterinaria que no están tan rigurosamente reguladas internacionalmente [17]. Sin tener en cuenta cuan válidas puedan ser estas afirmaciones, hoy en día hay propietarios, veterinarios y oficiales de salud que todavía perciben a la AVE como una amenaza significativa para las poblaciones equinas a nivel mundial.

Etiología

La Arteritis viral equina (AVE) es causada por un virus ARN pequeño, envuelto, el virus de la arteritis equina (VAVE) que es el virus prototipo del género *Arterivirus*, familia *Arteriviridae*, orden *Nidovirales* [1,18,19]. Basado en su estructura genética y su estrategia de replicación, otros tres virus han sido clasificados en el mismo género y familia, el virus incrementador de la deshidrogenasa láctica de ratones, el virus de la fiebre hemorrágica del simio y de mayor importancia, el virus del síndrome respiratorio y reproductivos porcino; [20] que produce grandes pérdidas económicas en las poblaciones porcinas en América del Norte, Europa y otras partes [21].

Toda la evidencia acumulada indicaría que la infección natural con AVE se restringe a los miembros de la familia *Equidae* [8]. El virus no se transmite a los humanos.

Basado en extensos estudios comparativos a nivel antigénico y genómico, solo se ha detectado un serotipo mayor del virus de AVE, denominado la cepa Bucyrus [8,22]. No obstante, se ha demostrado una considerable diversidad geográfica y

temporal entre diferentes aislamientos del [23-27]. Así mismo existe variabilidad entre la patogenicidad de las cepas, [8] ya que existen cepas capaces de causar el rango de síntomas clínicos referidos colectivamente como AVE en la población susceptible [1,28,29] y otros que solamente producen un ligero cuadro febril [29,30].

Se debe considerar de mayor importancia cuando se consideran las propiedades patogénicas de la AVE, el hecho que históricamente, el virus se ha reconocido como una causa de aborto contagioso en las yeguas preñadas [3,28,31]. Mientras no hay ninguna duda que ciertas cepas de AVE han sido responsables de brotes extendidos de aborto en yeguas susceptibles, [32,33] existe también la evidencia que sugeriría que no todas las cepas del virus son abortigénicas [8]. Estas últimas provocan cuadros clínicos muy leves ó asintomáticos y son consideradas por algunos como candidatos para ser utilizadas como cepas vacunales del virus. Desde un punto de vista práctico, sin embargo, la distinción entre las cepas de AVE capaces de causar aborto y aquéllas que no, es difícil. Actualmente, no existen técnicas muy fiables y rápidas para clasificar las cepas basadas en sus propiedades abortivas. Por lo tanto, desde el punto de vista clínico, todas las cepas del virus deben ser consideradas potencialmente abortigénicas a menos que demuestren lo contrario.

Durante muchos años, existió un concepto erróneo, ampliamente distribuido que la AVE es un patógeno equino altamente virulento, con una tasa de letalidad de 50 a 60 por ciento [8,17]. Este concepto erróneo probablemente se originó de las descripciones de AVE en los textos veterinarios basado en los resultados de estudios experimentales con la variante velogénica de laboratorio derivada de la cepa original Bucyrus de la AVE [34]. Debe remarcarse que estas descripciones tempranas de la enfermedad experimental causadas por esta cepa particular, contrastan notoriamente con la naturaleza y severidad de los síntomas clínicos y tasas de letalidad descritas en brotes de campo de AVE [8,33,35]. Hasta este momento, ninguna de las cepas aisladas de brotes naturales de AVE ha presentado las propiedades de virulencia semejante ó aproximada a aquellas de la variante velogénica del virus Bucyrus [8].

El virus de la arteritis equina no es un virus particularmente resistente fuera del cuerpo y es rápidamente inactivado por un rango de condiciones fisicoquímicas [8,34]. Es sensible a la luz del sol, temperaturas altas, humedad baja y varios desinfectantes y solventes de lípidos. Sin embargo, la viabilidad del virus se conserva en temperaturas de refrigeración ó congelación. El virus de la arteritis equina puede permanecer infectivo en el semen congelado por períodos muy largos de tiempo, inclusive por muchos años [13].

Distribución

Basado en los brotes registrados de AVE y los resultados de estudios serológicos, la AVE está distribuida en muchas poblaciones equinas a lo largo del mundo. Japón e Islandia son notables excepciones [8,36-43]. Sin embargo, existe un considerable número de países cuyo estado respecto a la infección permanece cuestionado debido a la ausencia de datos de vigilancia fiables.

Los estudios de diferentes poblaciones equinas han mostrado que la prevalencia de la infección de AVE puede variar ampliamente entre las razas de caballos tanto en el mismo país como entre los países [8,36,44-46]. Esto frecuentemente se ejemplifica por la proporción de seropositividad significativamente más alta encontrada en Standardbreds y algunas razas de Warmblood comparadas a las proporciones encontradas en los Purasangre y ciertas otras razas, por ejemplo, Cuarto de milla. Se podría especular que esto puede reflejar una predisposición inherente a la infección con AVE entre algunas razas particulares, viz. Standardbreds, sin embargo aun falta evidencia experimental que sustente esta hipótesis (McCollum & Timoney, datos inéditos). Estudios limitados sobre poblaciones de équinos salvajes, demostraron que AVE no parece haberse extendido significante por lo menos en los países donde se estudió (Timoney & McCollum, datos inéditos) [47].

Respuesta clínica

Aun persiste un grado de confusión sobre la real importancia clínica de AVE. Esto se deriva principalmente del concepto erróneo que la AVE es una seria enfermedad con una tasa de letalidad del 40 al 60% [8,17]. La realidad es que la mayoría de casos naturales de infección de AVE son cuadros subclínicos [8,9,48]. La exposición al virus puede resultar en infecciones clínicas ó inaparentes que dependen de la cepa viral involucrada, la dosis del virus, edad y condición física del animal infectado y de varios factores medioambientales [8]. La tasa de morbilidad puede diferir significativamente entre los brotes de AVE, con tasas mayores en las grandes concentraciones de caballos, por ejemplo, en hipódromos [49,50]. Los caballos mantenidos en estas circunstancias están frecuentemente estresados por las demandas del entrenamiento y las competencias. El comienzo de los signos clínicos esta precedido por un período de incubación de 3 a 14 días que varían según la ruta de infección [1,3,8,51]. Es más corto en el caso de exposición por aerosol y más prolongado si la transmisión ocurre por la ruta venérea.

Los casos típicos de la enfermedad pueden presentar todos ó cualquier combinación de los siguientes síntomas:

- Fiebre hasta 41°C que puede durar desde 2 a 9 días;
- Un grado variable de anorexia y depresión (Fig. 1);
- Leucopenia;
- Edema en los miembros que principalmente se puede observar en la parte inferior de miembros posteriores pero que puede involucrar los cuatro miembros (Fig. 2);
- Descarga nasal serosa-mucoidea asociada con un grado variable de rinitis;
- Edema supraorbital ó periorbital (Fig. 3);
- Conjuntivitis de diferente severidad, normalmente llamado "ojo rosado";
- Epifora que puede ser unilateral ó bilateral (Fig. 4);
- Fotofobia, muy frecuentemente observada en los casos con las conjuntivitis severas;
- Edema que involucra el escroto y prepucio en los potrillos/padrillos y las glándulas mamarias en la yegua (Fig. 5 y Fig. 6);
- Salpullido de urticaria que puede presentarse como lesiones localizadas, pequeñas, discretas, normalmente en las mejillas, los lados del cuello ó región del pecho, ó generalizadas, como un salpullido máculo-papular en la mayoría del cuerpo; [8,9] (Fig. 7).
- Aborto en la yegua;
- Neumonía intersticial fatal ó neumoenteritis en los potros jóvenes [52,53].



Figura 1. Depresión en un caso experimental de AVE. - Para ver esta imagen en su tamaño completo, diríjase al sitio www.ivis.org. -



Figura 2. Severo edema en la zona inferior del miembro posterior en un caso experimental de AVE. - Para ver esta imagen en su tamaño completo, diríjase al sitio www.ivis.org. -



Figura 3. Edema periorbital y conjuntivitis u ojo rosado en un caso experimental de AVE. - Para ver esta imagen en su tamaño completo, diríjase al sitio www.ivis.org. -



Figura 4. Epifora en un caso experimental de AVE. - Para ver esta imagen en su tamaño completo, diríjase al sitio www.ivis.org. -



Figura 5. Edema escrotal y prepucial en un caso experimental de AVE. - Para ver esta imagen en su tamaño completo, diríjase al sitio www.ivis.org. -



Figura 6. Edema de las glándulas mamarias en un caso experimental de AVE. - Para ver esta imagen en su tamaño completo, diríjase al sitio www.ivis.org. -



Figura 7. Salpullido de urticaria en la zona del cuello y hombro de un caso experimental de AVE. - Para ver esta imagen en su tamaño completo, diríjase al sitio www.ivis.org. -

Otros signos clínicos que se observan menos frecuentemente incluyen:

- Tumefacciones edematosas adventicias en el espacio intermandibular, debajo del esternón, la región del hombro u otras partes del cuerpo;
- Estrés respiratorio, incluso con polipnea y disnea, sobre todo en los potros jóvenes;
- Tos;
- Diarrea;
- Paresia en tren posterior y ataxia;
- Linfoadenopatía submaxilar;
- Erupciones papulares en la membrana mucosa del labio superior; normalmente se encuentran asociadas con un salpullido en piel; [9].
- Erosiones gingivales y bucales [54].

En general, la severidad de la AVE tiende ser mayor en los caballos muy jóvenes ó viejos, en los individuos debilitados y en caballos que están físicamente estresados [8,49]. Es importante enfatizar que con muy pocas excepciones, los caballos afectados con esta enfermedad se recuperan completamente, incluso en ausencia de cualquier tratamiento sintomático. Los caballos en entrenamiento pueden experimentar un período de menor performance durante las fases agudas y tempranas de convalecencia de la infección [49,50]. La mortalidad en los casos naturales de infección de AVE ocurre, pero son infrecuentes en neonatos que normalmente se infectan congénitamente con el virus; éstos sucumben de una neumonía intersticial fulminante dentro de las 48 a 96 horas del nacimiento [31,53,55,56]. También se han reportado muertes en los potros de pocas semanas a meses de edad que desarrollan una rápida neumoenteritis progresiva [35,52].

Las Yeguas preñadas expuestas a la AVE pueden abortar en la fase aguda tardía ó en la fase convaleciente temprana de la infección y no meses después de la exposición viral, como algunos podrían creer [1,17,28,31]. El aborto puede ó no precederse por signos clínicos de AVE en la yegua infectada [8]. Se han registrado casos de aborto por infección natural ó experimental de AVE desde los 3 hasta los 10 meses de gestación [1,28,33]. El porcentaje de abortos en las yeguas susceptibles puede variar ampliamente desde menos de 10 % hasta el 50 y 60 %, así como porcentajes tan altos del 71 % observados en un estudio experimental con la cepa Kentucky 1984 del virus [32]. La exposición de yeguas preñadas con AVE en períodos tardíos de la gestación puede no producir el aborto sino el nacimiento de un potro infectado congénitamente con el virus [31,56]. Estos potrillos invariablemente sucumben rápidamente de neumonía intersticial progresiva dentro de los primeros 3 a 4 días de vida. Las yeguas que abortan debido a AVE no parecen sufrir efectos adversos en la fertilidad.

En contraste, los sementales afectados con AVE pueden sufrir un período corto de subfertilidad [57]. Se cree que esto es el resultado del incremento de la temperatura testicular causada por la pirexia y el severo edema escrotal que pueden presentarse en las infecciones agudas del semental. No se considera que sea debido a los efectos directos de la AVE. Los sementales afectados por la AVE frecuentemente presentan la libido reducida asociada con la disminución de la motilidad espermática, concentración y porcentaje de esperma morfológicamente normal. Tales cambios pueden persistir por 16 a 17 semanas en los sementales experimentalmente infectados. Mientras la severidad de estos cambios en la calidad de semen es suficiente para causar deterioro temporal de la fertilidad en algunos sementales, este efecto no es de largo plazo. La persistencia del virus de la AVE en el tracto reproductor de sementales crónicamente infectados no parece tener efecto adverso en la fertilidad [8]. Estos animales son portadores asintomáticos del virus. Las hembras que se infectan por servicio de un semental portador tampoco experimentan ningún problema de fertilidad a corto ó largo plazo relacionado con el virus.

Epidemiología

A pesar de la amplia distribución de la AVE en poblaciones equinas alrededor del mundo, se registraron pocos brotes confirmados de AVE anterior a 1984 cuando la enfermedad ocurrió en un número significativo de granjas de cría de Purasangre en Kentucky [9]. Los últimos 10 a 15 años, sin embargo, han visto un aumento en los informes de brotes de AVE en América del Norte y Europa [8,10,11]. Si bien esto puede reflejar un mayor conocimiento de la enfermedad entre los propietarios, criadores y veterinarios, sumado a una mayor capacidad de diagnóstico de laboratorio, muchos creen que ha habido un auténtico incremento en la incidencia de AVE. Esto ha sido principalmente debido a las tendencias cambiantes en la industria equina, sobre todo por el continuo aumento en el comercio internacional de caballos y semen [11]. En numerosas ocasiones, el origen de los brotes de AVE ha podido ser determinado por el movimiento de caballos, por ejemplo, sementales portadores ó el uso de semen congelado ó fresco infectado [12-14].

Es importante destacar que la diseminación generalizada de AVE puede ocurrir tanto en los hipódromos como en las granjas de cría [49,50,58]. Debido a que muchos casos de infección primaria con AVE son asintomáticos, la ausencia de evidencia clínica de AVE no es ninguna garantía de ausencia del virus en cualquier población caballar.

Factores del virus, huésped y medioambientales están involucrados en la epidemiología de AVE [8,58]. Entre ellos se han identificado como de importancia: la variación de la patogenicidad en cepas de brotes naturales de AVE, las rutas de transmisión en fases agudas y crónicas de la infección, la persistencia del virus en el semental y la naturaleza de la inmunidad adquirida por la infección.

Características virales - Se ha reconocido durante mucho tiempo que las cepas de la AVE que ocurren naturalmente varían en su patogenicidad [8]. Estudios de infección experimental han demostrado que las cepas pueden ser de virulencia baja, moderada ó alta para el caballo [29,30]. Hay evidencia para indicar que algunas cepas del virus, pero no todas, son abortigénicas. Mientras que muchos sementales portadores diseminan cepas de AVE que parecen ser de baja patogenicidad, en ocasiones, tales animales han servido como la fuente de infección en brotes de AVE [13,59].

Modos de Transmisión - Los caballos en estado agudo de la infección eliminan el virus de la AVE durante un período limitado de tiempo en varias secreciones y excreciones del cuerpo [60-62]. La mayor concentración de virus normalmente se elimina por vía del tracto respiratorio; la diseminación del virus puede durar hasta 16 días [60]. La transmisión por aerosol es el medio más significativo de diseminación de AVE ya sea en las granjas de cría ó dondequiera que los caballos estén en contacto íntimo entre si, por ejemplo, en hipódromos, muestras, ventas ó clínicas veterinarias [8,60]. Una vía importante adicional de transmisión del virus en las granjas de cría es venéreamente por el semental agudamente infectado [58]. La transmisión de AVE también puede ocurrir por la ruta congénita, produciendo el aborto ó el nacimiento de un potrillo vivo pero congenitalmente infectado y enfermo [1,31,56]. En tales ocasiones, la placenta, fluidos placentales y el feto son fuentes abundantes de virus. En el caso del semental portador, la transmisión de AVE ocurre sólo por la ruta venérea [63].

A parte de la diseminación de AVE por contacto directo, también puede ocurrir, aunque menos frecuentemente, la transmisión indirecta por medio de las zancas, cabestros, la ropa, el equipo de inseminación, etc., contaminados con secreciones/excreciones infectivas [8,58].

Reservorio del virus - El semental portador es el reservorio natural de AVE que asegura su persistencia en poblaciones equinas a lo largo del mundo [8,63]. El estado de portador sólo se ha identificado en el semental y no en la yegua, en el caballo castrado ó el potro sexualmente inmaduro. El virus puede persistir en el semental durante semanas, meses ó años, quizás incluso de por vida en ciertos individuos. La frecuencia de portadores en cualquier población de sementales puede variar desde menos del 10 por ciento a más del 70 por ciento [64]. El virus de la Arteritis viral equina se localiza en las glándulas accesorias sexuales en el semental crónicamente infectado [61,65]. Se ha demostrado que el establecimiento y la persistencia del estado portador es testosterona dependiente [65]. Los sementales portadores eliminan constantemente el virus en el semen y por consiguiente, el riesgo de transmisión de la infección se limita al momento del servicio [8,63]. Las tasas de transmisión pueden ser tan altas como 85 a 100%, independientemente si el servicio es natural ó se realiza inseminación artificial. Los sementales portadores de AVE son clínicamente saludables y no exhiben una disminución clara en la fertilidad. Un porcentaje variable de sementales portadores a largo plazo puede eliminar el virus espontáneamente de sus tractos reproductores y ya no presentar ningún riesgo para la transmisión de la infección [8,64].

Se han investigado asnos y otros équinos aparte del caballo como reservorios alternativos de AVE en países con poblaciones significativas de équinos salvajes [40,47,66,67]. La evidencia hasta la fecha indicaría que estos no juegan un papel

apreciable en la epidemiología de este virus.

Inmunidad - Una inmunidad sólida y duradera es adquirida por los caballos luego de una infección natural con AVE [68,69]. El nivel de protección inmunitaria persiste probablemente por muchos años. Los potros nacidos de yeguas seropositivas están pasivamente protegidos contra la enfermedad clínica durante los primeros 2 a 5 meses de edad [70]. La inmunización a través de la vacunación ha sido empleada con éxito en ciertos países para prevenir AVE y también, para proteger los sementales contra el establecimiento del estado portador [8]. Un nivel alto de inmunidad se ha obtenido después de repetir la vacunación, sobre todo cuando se utilizó la vacuna a virus vivo modificado contra AVE (Arvac ®, Ft. Dodge Animal Health) (el McCollum & Timoney, datos no publicados).

Diagnóstico del laboratorio

Teniendo en cuenta la similitud clínica de la AVE con otras enfermedades equinas infecciosas y no-infecciosas, un diagnóstico presuntivo de AVE debe confirmarse siempre por la remisión de muestras apropiados para el examen del laboratorio [71]. Donde se sospecha la infección aguda de AVE, la confirmación del diagnóstico se basa en el aislamiento del virus ó la detección del ácido nucleico viral ó antígeno y/o la demostración de una seroconversión de anticuerpos específica, en sueros pareados (agudo y convaleciente) obtenidos con diferencia de 3 a 4 semanas [8].

Los muestras más convenientes para probar la infección aguda en los equinos incluyen el hisopado nasofaringeo y conjuntival y muestras de sangre con citrato de sodio ó EDTA. Para optimizar las chances de la detección del virus, las muestras deben obtenerse lo más pronto posible después del inicio de fiebre ó de los síntomas sospechosos de infección de AVE. Los hisopos deben transferirse a un medio de transporte viral conveniente y deben enviarse refrigerados ó congelados en un recipiente protegido a un laboratorio adecuadamente calificado, preferentemente utilizando un servicio de entrega nocturno. Las muestras de sangre entera deben enviarse refrigeradas, pero no congeladas.

En los casos de aborto sospechosos de ser producidos por AVE, debe intentarse el aislamiento ó la detección del virus del tejido placentario y fluidos, y del pulmón, hígado y tejidos linfo-reticular fetales. [8,72]. Cuando se sospecha de AVE en casos de muerte en potros jóvenes ó caballos más viejos, una amplia gama de tejidos se pueden seleccionar para el examen del laboratorio, aunque no exclusivamente, los ganglios linfáticos asociados con los tractos respiratorio y digestivo [53]. Las muestras deben remitirse para el aislamiento/detección del virus, examen inmunohistoquímico e histopatológico para la observación de las lesiones vasculares características de esta infección.

La infección por el virus de arteritis equina se demuestra serológicamente por la de seroconversión ó por un aumento significativo en los títulos de anticuerpo contra el virus (cuatro diluciones ó más) [73]. Mientras varios procedimientos serológicos se han empleado en el pasado para el estudio de anticuerpos, las pruebas de microneutralización reforzada por el complemento se han usado con éxito durante muchos años para el diagnóstico de infección de AVE aguda, para la certificación en importación-exportación, y en los estudios de seroprevalencia [74]. Se han desarrollado varias pruebas de ELISA, algunas de las cuales ofrecen la promesa de ser el ensayo serodiagnóstico alternativo con una sensibilidad y especificidad comparable a la prueba de la neutralización [75-77].

Al investigar el posible estado del portador de un semental, en primer lugar es importante, establecer si el individuo es serológicamente negativo ó positivo a anticuerpos de la AVE [78]. Dado que el estado del portador nunca ha sido demostrado en un semental seronegativo, sólo sementales con títulos de 1:4 ó mayor al virus sin una historia apropiadamente certificada de vacunación contra AVE, son considerados potenciales portadores [64]. El estado del portador puede confirmarse por aislamiento del virus ó determinación de ácido nucleico viral en una muestra de semen que contiene la fracción rica en espermatozoides del eyaculado [63,78,79]. Una alternativa más lenta, más cara pero muy fiable es probar el semen de un semental sospechoso de ser portador, inseminando dos yeguas que se supervisan clínicamente y serológicamente por hasta 28 días para controlar la evidencia de transmisión de la infección [63].

La diferenciación serológica de sementales portadores de aquellos cuya seropositividad es el resultado de una vacunación, aunque deseable, no es posible todavía. Aun cuando fuera, a través del uso de una vacuna marcadora y una prueba confirmatoria de diagnóstico, no se podría diferenciar un semental no portador vacunado y seguidamente expuesto naturalmente a la infección, de uno portador y posteriormente vacunado con una vacuna marcadora. Dada la longevidad de esta especie y la frecuencia con que los caballos se mueven dentro de y entre los países, hay un amplio chance de estar expuesto a AVE por lo menos en una ocasión durante sus vidas. Lo que es muy importante de enfatizar es que se pueden proteger los sementales con éxito contra el establecimiento del estado portador a través de la vacunación, y que actualmente se dispone de pruebas diagnósticas en el semen que pueden detectar el estado portador en un semental con un grado muy alto de exactitud.

Diagnóstico diferencial

Pueden confundirse varias enfermedades infecciosas y no infecciosas, respiratorias y sistémicas de equinos por los síntomas clínicos con AVE [8]. Entre las más significativas están las infecciones por los herpesvirus equinos 1 y 4, influenza equina, anemia infecciosa equina, púrpura hemorrágica, urticaria y toxicosis debido al alyssum cano (*Berteroia incana*). Las enfermedades adicionales que es necesario diferenciar con AVE y que son exóticas en muchos países son peste equina africana, durina y la infección por el virus Getah.

El aborto ó la muerte neonatal debido a AVE son cuadros con similitud al causado por EHV-1 y menos frecuentemente, EHV-4. De acuerdo con esto, siempre es aconsejable remitir las muestras apropiadas para el examen del laboratorio a fin de determinar qué infección viral está presente.

Tratamiento

En la ausencia de una droga anti-viral específica contra AVE, el tratamiento de casos de AVE es sintomático, con énfasis en controlar la fiebre y el edema, sobre todo en los sementales afectados [8,72]. Se debe proporcionar adecuado reposo, particularmente a los sementales en servicio y a los caballos en entrenamiento, para minimizar ó evitar los efectos adversos en la performance. Hasta el presente, no hay ningún tratamiento exitoso para los potros jóvenes con neumonía intersticial asociada a la AVE ó neumoenteritis. La administración profiláctica de antibióticos se indica en potros más viejos infectados agudamente con AVE para controlar la posible infección bacteriana secundaria. Se continúan los esfuerzos para desarrollar medios terapéuticos seguros y eficaces para eliminar el estado del portador en el semental.

Prevención y control

La prevención y control de la AVE se puede lograr con éxito basado en el conocimiento que se tiene sobre la biología y epidemiología de AVE. Otra ventaja es la disponibilidad en ciertos países de vacunas seguras y eficaces con las cuales inmunizar contra la enfermedad [8,68,69,80].

Muchos programas de control se dirigen a prevenir ó restringir la difusión de AVE en las poblaciones equinas de cría para minimizar ó eliminar el riesgo de aborto asociado al virus ó a la muerte en los potros jóvenes, y el establecimiento del estado del portador en los sementales [8,72]. Tales programas son los aconsejados por las buenas prácticas de manejo, con identificación de cualquier semental portador e inmunización de toda la población semental no portador.

Se han desarrollado dos vacunas contra AVE, una producida con virus vivo modificado (Arvac®, Ft. Dodge Animal Health) y una con virus inactivado más adjuvantes (Artervac®, Ft. Dodge Animal Health) [8,73]. El uso extensivo de la vacuna a virus vivo modificado desde que 1985 ha confirmado su seguridad e inmunogenicidad para los sementales, yeguas no preñadas, potrancas y potros. Los fabricantes de la vacuna no aconsejan su uso en las yeguas preñadas y potros menores de 6 semanas de edad, a menos que exista un riesgo significativo de exposición natural a AVE. La vacuna inactivada, aunque segura para el uso en las yeguas preñadas, no es tan fuertemente inmunogénica como la vacuna a virus vivo modificado. Frecuentemente se requieren de dos ó más vacunaciones para estimular una respuesta de anticuerpo neutralizantes perceptibles. La durabilidad de inmunidad producida por esta vacuna todavía no se ha establecido.

Un componente importante en los programas de control de la AVE es la identificación del semental portador [8,14,58]. Éstos deben manejarse separadamente para asegurar que no hay ningún riesgo de diseminación inadvertido de AVE a caballos no expuestos ó no vacunados, especialmente las yeguas preñadas. Bajo condiciones apropiadas de manejo, los sementales portadores pueden continuar siendo usados para monta. Se recomienda que sólo se utilicen para montar a yeguas naturalmente seropositivas ó yeguas adecuadamente vacunadas contra AVE.

A parte de la inmunización contra la AVE de los sementales no portadores, es muy aconsejable llevar a cabo un programa de vacunación profiláctica de todo potro entre 6 y 12 meses antes de que en ellos aumente el riesgo de infectarse naturalmente con AVE [8,81]. Con el tiempo esta medida reduciría el número de portadores naturales del virus significativamente, sobre todo en poblaciones en las que la infección es endémica.

Como previamente se mencionó, existe un riesgo significativo de la introducción de AVE en una población equina de cría susceptible a través del uso de semen fresco refrigerado ó congelado infectivo [12-14]. Por ello, es importante determinar el estado de infectividad del semen usado para la inseminación artificial, sobre todo si se importó desde el extranjero. Deben tomarse las precauciones apropiadas al servir yeguas con semen de infectado de AVE para evitar el riesgo de diseminar el virus a otros caballos susceptibles en el establecimiento.

En vista de la ocurrencia esporádica y poco frecuente de los brotes de AVE en hipódromos, muestras, las ventas, las clínicas veterinarias, etc., es cuestionable si se debe vacunar la población caballar masivamente contra la enfermedad [16]. Muchos consideran que el riesgo no es lo suficientemente grande para justificar la adopción de esa medida preventiva. Tal estrategia tendría la desventaja en este momento de privar la exportación de caballos seropositivos a ciertos países.

Importancia económica

La Arteritis Viral Equina puede tener significativos efectos económicos en sectores de cría y en la performance del equino [8,10]. Las siguientes son las fuentes de pérdidas económicas atribuibles a esta infección:

- Brotes de aborto y/o mortalidad en los potros jóvenes;
- Valor comercial disminuido y menor demanda de sementales portadores.
- Cierre de mercados de exportación para los sementales portadores, semen infectado con AVE y en el caso de algunos países, cualquier caballo seropositivo para los anticuerpos a EAV;
- Interrupción de entrenamientos y reducción de participación ó cancelaciones de carreras en hipódromos con brotes de AVE.

Bibliografía

1. Doll ER, Bryans JT, McCollum WH, et al. Isolation of a filterable agent causing arteritis of horses and abortion by mares. Its differentiation from the equine abortion (influenza) virus. Cornell Vet 1957; 47:3-40.
2. Jones TC, Doll ER, Bryans JT. The lesions of equine viral arteritis. Cornell Vet 1957; 47:52-68.
3. Doll ER, Knappenberger RE, and Bryans JT. An outbreak of abortion caused by the equine arteritis virus. Cornell Vet 1957; 47:69-75.
4. Bergman AM. A contribution to the knowledge of the virus carrier in Equine Influenza. Zeitschrift fur Infektionskrankheiten 1913; 13:161-174.
5. Clark J. Transmission of pink-eye from apparently healthy stallions to mares. J Comp Pathol Therio 1892; 5:261-264.
6. Pottie A. The propagation of influenza from stallions to mares. J Comp Pathol Therap 1888; 1:37-38.
7. Reeks HC. The transmission of pink-eye from apparently healthy stallions to mares. J Comp Pathol Therap 1902; 18:97-102.
8. Timoney PJ, McCollum WH. Equine viral arteritis. Vet Clin North Am Equine Pract 1993; 9:295-309.
9. Timoney PJ. Clinical, virological and epidemiological features of the 1984 outbreak of equine viral arteritis in the Thoroughbred population in Kentucky, USA. In: Proceedings of the Grayson Found Int Conf Thoroughbred Breeders Org on Equine Viral Arteritis 1984; 24-33.
10. Timoney PJ and McCollum WH. Equine viral arteritis in perspective in relation to Int trade. J Equine Vet Sci 1993; 13:50-52.
11. Timoney PJ. The increasing significance of international trade in equids and its influence on the spread of infectious diseases. Ann NY Acad Sci 2000; 916:55-60.
12. Balasuriya UBR, Evermann JF, Hedges JF, et al. Serologic and molecular characterization of an abortigenic strain of equine arteritis virus isolated from infective frozen semen and an aborted equine fetus. J Am Vet Med Assoc 1998; 213:1586-1589.
13. Timoney PJ. Equine viral arteritis. Am Assoc Equine Pract Report 2000; 7.
14. Timoney PJ, McCollum WH, Vickers ML. The carrier stallion as a reservoir of equine arteritis virus. Equine Dis Quarterly 1997; 6:2.
15. Timoney PJ, McCollum WH. Equine viral arteritis. Am Trakehner 1997; 23:40-42.
16. Timoney P, McCollum WH. Equine viral arteritis: Essential facts about the disease. In: Proceedings of the 43rd Annu Am Assoc Equine Pract Conv 1997; 199-201.
17. Timoney PJ. Equine viral arteritis in perspective: Fact vs. Fiction. In: Proceedings of the Sixth World Equine Vet Congr 1999; 167-170.
18. Cavanagh D. Nidovirales: a new order comprising *Coronaviridae* and *Arteriviridae*. Arch Virol 1997; 142:629-633.
19. Snijder EJ and Meulenberg JJM. The molecular biology of arteriviruses. J Gen Virol 1998; 79:961-979.
20. Plagemann PGW and Moennig V. Lactate dehydrogenase-elevating virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhagic fever virus: A new group of positive-strand RNA viruses. Adv Virus Res 1992; 41: 99-192.

21. Goyal SM. Porcine reproductive and respiratory syndrome. *J Vet Diagn Invest* 1993; 5:656-664.
22. Fukunaga Y, McCollum WH. Complement-fixation reactions in equine viral arteritis. *Am J Vet Res* 1977; 38:2043-2046.
23. Balasuriya UBR, Timoney PJ, McCollum WH, et al. Phylogenetic analysis of open reading frame 5 of field isolates of equine arteritis virus and identification of conserved and nonconserved regions in the GL envelope glycoprotein. *Virology* 1995; 214:690-697.
24. Balasuriya UBR, Patton JF, Rossitto PV, et al. Neutralization determinants of laboratory strains and field isolates of equine arteritis virus: Identification of four neutralization sites in the amino-terminal ectodomain of the GL envelope glycoprotein. *Virology* 1997; 232:114-128.
25. Belak S, Stadejek T, Bjorklund H, et al. Genetic diversity among field isolates of equine arteritis virus. In: *Proceedings of the 8th Int Conf Equine Infect Dis*, 1999.
26. Murphy TW, Timoney PJ, McCollum WH. Analysis of genetic variation among strains of equine arteritis virus. In: *Proceedings of the 5th Int Conf Equine Inf Dis* 1988; 3-12..
27. Murphy TW, McCollum WH, Timoney PJ, et al. Genomic variability among globally distributed isolates of equine arteritis virus. *Vet Microbiol* 1992; 32:101-115.
28. McCollum WH, Timoney PJ. The pathogenic qualities of the 1984 strain of equine arteritis virus. In: *Proceedings of the Grayson Found Int Conf Thoroughbred Breeders Org*, 1984; 34-47.
29. McCollum WH, Timoney PJ. Experimental observation on the virulence of isolates of equine arteritis virus. In: *Proceedings of the Eighth Int Conf Equine Infect Dis*, 1999; 558-559.
30. McCollum WH, Timoney PJ, Roberts AW, et al. Response of vaccinated and non-vaccinated mares to artificial insemination with semen from stallions persistently infected with equine arteritis virus. In: *Proceedings of the 5th Int Conf Equine Infec Dis* 1988; 13-18.
31. Golnik W. Viruses isolated from aborted foetuses and stillborn foals. In: *Proceedings of the 6th Int Conf Equine Infec Dis* 1992; 314.
32. Cole JR, Hall RF, Gosser HS, et al. Transmissibility and abortigenic effect of equine viral arteritis in mares. *J Am Vet Med Assoc* 1986; 189:769-771.
33. van der Meulen K, Cajj A, Nauwynck H, et al. An outbreak of equine viral arteritis abortion in Belgium. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 2001; 70: 221-222.
34. Gillespie, Timoney JF. The Togaviridae. The genus rubivirus. In: Timoney JF ed. *Hagan & Bruner's Microbiology & Infectious Diseases of Domestic Animals*. Ithaca: Cornell University Press 1988; 685-687.
35. McCollum WH, Timoney PJ, Lee JW, Jr., et al. Features of an outbreak of equine viral arteritis on a breeding farm associated with abortion and fatal interstitial pneumonia in neonatal foals. In: *Proceedings of the 8th Int Conf Equine Inf Dis* 1999; 559-560.
36. McCollum WH and Bryans JT. Serological identification of infection by equine arteritis virus in horses of several countries. In: *Proceedings of the 3rd Int Conf Equine Infec Dis* 1973; 256-263..
37. Nosetto PEO, Etcheverrigaray ME, Oliva GA, et al. Arteritis viral equina: Detección de anticuerpos en equinos de la Repùblica Argentina. *Zentralblatt Vet Reihe B* 1984; 31:536-529.
38. de Boer GF, Osterhaus ADME, van Oirschot JT, et al. Prevalence of antibodies to equine viruses in the Netherlands. *Tijdschr Diergeneeskdt* 1979; 1: 65-74.
39. Moraillon A, Moraillon R. Results of a serological survey of viral arteritis in France and in several European and African countries. In: *Proceedings of the 4rd Int Conf Equine Infec Dis* 1978; 467-473.
40. Paweska JT, Binns MM, Woods PSA, et al. A survey for antibodies to equine arteritis virus in donkeys, mules and zebra using virus neutralisation (VN) and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Equine Vet J* 1997; 29: 40-43.
41. Konishi S, Akashi H, Sentsui H, et al. Studies on equine viral arteritis. I. Characterization of the virus and trial survey on antibody with vero cell cultures. *Jap J Vet Sci* 1975; 37: 259-267.
42. Matumoto M, Shimizu TT, and Ishizaki R. Constatation d'anticorps contre le virus de l'artérite équine dans le sérum de juments indiennes. In: *Proceedings of the Soc Franco-Japanaise Biol* 1965; 1262-1264.
43. Huntington PJ, Forman AJ, and Ellis PM. The occurrence of equine arteritis virus in Australia. *Aust Vet J* 1990; 67: 432-435.
44. NAHMS. Equine viral arteritis (EVA) and the US horse industry. In: USDA: APHIS: VS, CEAH, National Animal Health Monitoring System. 2000.

45. Moraillon A, Moraillon R. Results of an epidemiological investigation on viral arteritis in France and some other European and African countries. *Ann Rech Vet* 1978; 9:43-54.
46. McCue PM, Hietala SK, Spensley MS, et al. Prevalence of equine viral arteritis in California horses. *California Vet* 1991; March-April: 24-26.
47. Arab A. Equine serological survey 1995/1996. United Arab Emirates Ministry of Agriculture and Fisheries, 1997.
48. Gerber H, Steck F, Hofer B, et al. Clinical and serological investigations on equine viral arteritis. *Proceedings of the 4th Int Conf Equine Infec Dis* 1978; 461-465.
49. McCollum WH, Swerczek TW. Studies of an epizootic of equine viral arteritis in racehorses. *J Equine Med Surg* 1978; 2:293-299.
50. Scollay MC, Foreman JH. An overview of the 1993 equine viral arteritis outbreak at Arlington Int Racecourse. In: *Proceedings 39th Annu Conven Am Assoc Equine Pract* 1993; 255-256.
51. Timoney PJ, McCollum WH. Equine viral arteritis: Current clinical and economic significance. In: *Proceedings of the Am Assoc Equine Pract* 1991; 403-409.
52. Golnik W, Michalska Z, Michalak T. Natural equine viral arteritis in foals. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1981; 123: 523-533.
53. Del Piero F, Wilkins PA, Lopez JW, et al. Equine viral arteritis in newborn foals: clinical, pathological, serological, microbiological and immunohistochemical observations. *Equine Vet J* 1997; 29:178-185.
54. Montreal L, Villatoro AJ, Hooghuys H, et al. Clinical features of the 1992 outbreak of equine viral arteritis in Spain. *Equine Vet J* 1995; 27:301-304.
55. Carman S. Cross-Canada Disease Report: Ontario - Equine arteritis virus isolated from a Standardbred foal with pneumonia. *Can Vet J* 1988; 29:937.
56. Vaala WE, Hamir AN, Dubovi EJ, et al. Fatal, congenitally acquired infection with equine arteritis virus in a neonatal Thoroughbred. *Equine Vet J* 1992; 24:155-158.
57. Neu SM, Timoney PJ, Lowry SR. Changes in semen quality in the stallion following experimental infection with equine arteritis virus. *Theriogenology* 1992; 37:407-431.
58. Timoney PJ, McCollum WH. The epidemiology of equine viral arteritis. In: *Proceedings of the Am Assoc Equine Pract* 1986; 545-551.
59. Balasuriya UBR, Hedges JF, Nadler SA, et al. Genetic stability of equine arteritis virus during horizontal and vertical transmission in an outbreak of equine viral arteritis. In: *18th Ann Meet Am Soc Virol*. 1999; P22-6.
60. McCollum WH, Prickett ME, Bryans JT. Temporal distribution of equine arteritis virus in respiratory mucosa, tissues and body fluids of horses infected by inhalation. *Res Vet Sci* 1971; 2:459-464.
61. Neu SM, Timoney PJ, McCollum WH. Persistent infection of the reproductive tract in stallions experimentally infected with equine arteritis virus. In: *Proceedings of the 5th Conf Equine Infec Dis* 1988; 149-154.
62. Fukunaga Y, Imagawa H, Tabuchi E, et al. Clinical and virological findings on experimental equine viral arteritis in horses. *Bull Equine Res Instit* 1981; 18.
63. Timoney PJ, McCollum WH, Murphy TW, et al. The carrier state in equine arteritis virus infection in the stallion with specific emphasis on the venereal mode of virus transmission. *J Reprod Fertility* 1987; 35: 95-102.
64. Timoney PJ, McCollum WH. Equine viral arteritis: Further characterization of the carrier state in stallions. *J Reprod Fertility Suppl* 56, 2000; 3-11.
65. Little TV, Holyoak GR, McCollum WH, et al. Output of equine arteritis virus from persistently infected stallions is testosterone-dependent. In: *Proceedings of the 6th Int Conf Equine Infec Dis* 1992; 225-229.
66. Paweska JT, Barnard BJH. Serological evidence of equine arteritis virus in donkeys in South Africa. *Onderstepoort J Vet Res* 1993; 60: 155-158.
67. Paweska JT. Is the South African asinine strain of equine arteritis virus a threat to local horses? *Tydskr S Afr Vet Ver* 1996; 67: 102-103.
68. Doll ER, Bryans JT, Wilson JC, et al. Immunization against equine viral arteritis using modified live virus propagated in cell cultures of rabbit kidney. *Cornell Vet* 1968; 58:497-524.
69. McCollum WH. Vaccination for equine viral arteritis. In: *Equine Infectious Diseases II*. *Proceedings of the 2nd Int Conf* 1970; 143-151.
70. McCollum WH. Studies of passive immunity in foals to equine viral arteritis. *Vet Microbiol* 1976; 1:45-54.
71. Timoney PJ, McCollum WH. Equine viral arteritis. *Equine Vet Edu* 1996; 8:97-100.
72. Glaser AL, de Vries AAF, Rottier PJM, et al. Equine arteritis virus: Klinische verschijnselen en preventie. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 1997; 122:2-7.
73. Timoney PJ. Equine viral arteritis. O.I.E. *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*. Paris: 2000; 582-594.

74. Senne DA, Pearson JE, Carbrey EA. Equine viral arteritis: A standard procedure for the virus neutralization test and comparison of results of a proficiency test performed at five laboratories. In: Proceedings of the US Anim Health Assoc 1985; 89:29-34.
75. Cho HJ, Entz SC, Deregt D, et al. Detection of antibodies to equine arteritis virus by a monoclonal antibody-based blocking ELISA. Can J Vet Res 2000; 64:38-43.
76. Kondo T, Fukunaga Y, Sekiguchi K, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for serological survey of equine arteritis virus in racehorses. J Vet Med Sci 1998; 60:1043-1045.
77. Nugent J, Sinclair R, deVries AAF, et al. Development and evaluation of ELISA procedures to detect antibodies against the major envelope protein (GL) of equine arteritis virus. J Virol Methods 2000; 90:167-183.
78. Timoney PJ, McCollum WH, Roberts AW. Detection of the carrier state in stallions persistently infected with equine arteritis virus. In: Proceedings of the Ann Meet Am Assoc Equine Pract 1987; 57-65.
79. Belak S, Ballagi-Pordany A, Timoney PJ, et al. Evaluation of a nested PCR assay for the detection of equine arteritis virus. In: Proceedings of the 7th Int Conf Equine Infec Dis 1994; 33-38.
80. McCollum WH. Responses of horses vaccinated with avirulent modified-live equine arteritis virus propagated in the E. Derm (NBL-6) cell line to nasal inoculation with virulent virus. Am J Vet Res 1986; 47:1931-1934.
81. Holyoak GR, Little TV, McCollum WH, et al. Relationship between onset of puberty and establishment of persistent infection with equine arteritis virus in the experimentally infected colt. J Comp Pathol 1993; 109:29-46.

Derechos Reservados. Este documento está disponible en www.ivis.org. Documento No. B0324.0402.ES.

Leading the way in providing veterinary information



CAPÍTULO 2.5.2.

DURINA

RESUMEN

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

La durina es la única tripanosomiasis que no se transmite por un vector invertebrado. Trypanosoma equiperdum se distingue de otros trypanosomas en que se trata de un parásito tisular que raramente invade 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 pueden producirse recuperaciones espontáneas. Tienen lugar infecciones subclínicas; los burros y los mulos son más resistentes que los caballos y pueden permanecer como portadores no aparentes. La infección no siempre se transmite en cada cópula por el animal infectado. Las ratas pueden infectarse experimentalmente y emplearse para mantener cepas del parásito indefinidamente. Las cepas de Trypanosoma equiperdum se almacenan preferiblemente en nitrógeno líquido.

Los síntomas clínicos se caracterizan por empeoramientos y recaídas periódicas, finalizando con la muerte y, a veces, con la recuperación. Pueden observarse fiebre, edema local de los genitales y las glándulas mamarias, erupciones cutáneas, falta de coordinación, parálisis facial, lesiones oculares, anemia y demacración. Las placas edematosas cutáneas, de 5-8 cm de diámetro y 1 cm de grosor, son patognomónicas.

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

Pruebas serológicas: *Los anticuerpos humorales se encuentran presentes en los animales infectados independientemente de que muestren o no los signos clínicos. La prueba 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 FC. También se emplean los enzimoinmunoensayos.*

Requisitos para las vacunas y los materiales de diagnóstico: *No existen vacunas disponibles. El único control efectivo consiste en el sacrificio de los animales infectados. Es esencial una buena higiene durante las cópulas asistidas, ya que la infección puede transmitirse a través de fomites contaminados.*

A. INTRODUCCIÓN

La durina es una enfermedad contagiosa crónica o aguda de los solípedos de cría que se transmite directamente de animal a animal durante el coito. El organismo causante es *Trypanosoma equiperdum* (Doflein, 1901). La durina también se conoce con otros nombres: mal de coit, el *dourin*, *orbo coitale maligno*, *Beschälseuche*, *slapsiekte*, *sluchnaya bolyezn* y *covering disease* (1, 7).

Aunque la enfermedad se ha conocido desde tiempos antiguos, su naturaleza no se estableció hasta 1896, cuando Rouget descubrió trypanosomas en caballos argelinos infectados. La durina es la única trypanosomiasis que no se transmite por medio de un vector invertebrado. *Trypanosoma equiperdum* se distingue de otros

trypanosomas 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 fluido seminal y el exudado mucoso del pene y el prepucio del macho infectado, y en el mucus vaginal de la hembra infectada. En un animal infectado por primera vez, los parásitos se encuentran libres inicialmente 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 cuerpo. 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 varios años (5). 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.

Como los trypanosomas no se encuentran presentes de manera continua en el tracto genital a lo largo del curso de la enfermedad, la transmisión de la infección no tiene lugar necesariamente en cada cópula que involucre a un animal infectado. La transmisión de la infección del semental al potro puede ocurrir a través de distintas mucosas, como la conjuntiva. La leche de las yeguas ha resultado ser infectiva. Otros animales distintos a los équidos pueden infectarse de forma experimental. Se ha comprobado que cepas adaptadas a las ratas pueden mantenerse indefinidamente; la sangre infectada de rata puede criopreservarse satisfactoriamente. Lo habitual es que los antígenos utilizados en los ensayos serológicos se preparen a partir de tratas de laboratorio infectadas.

La enfermedad se caracteriza por fases de empeoramiento, tolerancia o recaída, que varían en su duración y que pueden aparecer una o varias veces antes de la muerte o la recuperación. Los síntomas 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, lesiones oculares, anemia y demacración. Un signo patognomónico es la placa edematosas, 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 durante 3 a 7 días. No constituyen un hecho constante en el tiempo.

Por lo general el edema desaparece y revierte con períodos regulares. Durante cada remisión puede observarse un incremento de la extensión del tejido engrosado. La mucosa vaginal puede presentar placas semitransparentes elevadas y engrosadas. Pueden sobresalir por la vulva pliegues de la membrana inflamada. No es infrecuente encontrar edema de las glándulas mamarias y los tejidos adyacentes. Pueden producirse la despigmentación de la zona genital, el perineo y la ubre. En el semental el primer signo clínico consiste en una inflamación variable del pene y el prepucio. El edema se extiende posteriormente hacia el escroto, los nódulos linfáticos inguinales y el perineo, con una extensión anterior a lo largo del abdomen inferior. En los sementales de razas pesadas, el edema puede extenderse sobre la totalidad de la superficie del abdomen.

La pirexia es intermitente; los síntomas nerviosos incluyen falta de coordinación, principalmente de los miembros traseros, labios, orificios nasales, orejas y garganta. Normalmente, la parálisis facial es unilateral. En los casos fatales la enfermedad es, por lo general, lenta y progresiva, con un incremento de la anemia y demacración, aunque el apetito es bueno durante todo el proceso.

Durante el examen post-mortem se observan exudados gelatinosos bajo la piel. En el semental, el escroto, el prepucio y la cubierta testicular se encuentran engrosados e infiltrados. En algunos casos los testículos están embebidos 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 paraplejia es a menudo blanda, pulposa y decolorada, en concreto, en las regiones lumbar y sacra.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

1. Identificación del agente

El diagnóstico definitivo depende del reconocimiento de los signos clínicos y la demostración del parásito. Eso rara vez es posible: (a) aunque los signos clínicos y las lesiones características de la enfermedad en desarrollo pueden 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 trypanosomas se encuentran presentes de manera dispersa y son extremadamente difíciles de encontrar, incluso en las zonas edematosas; y (c) los trypanosomas se encuentran sólo de manera fugaz en la sangre, y en tan pequeño número que dificulta su detección. Por razones desconocidas, no se ha aislado ninguna cepa de parásito de *T. equiperdum* en ningún país desde 1982, y la mayoría de las cepas disponibles actualmente en los laboratorios nacionales de diagnóstico veterinario están relacionadas con *T. evansi* (3).

En la práctica, el diagnóstico se basa en la evidencia clínica apoyada por la serología. Recientemente se han estudiado y publicado otras investigaciones sobre el tema (3).

En los animales infectados, los trypanosomas se encuentran presentes sólo en cantidad escasa en los fluidos linfático y edematoso de los genitales externos, en el mucus vaginal y en el contenido líquido de las placas. 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. La piel del área que está sobre la placa debería afeitarse, lavarse y secarse, y el fluido tomarse mediante una jeringa. Deberían evitarse los vasos sanguíneos. El aspirado fresco se examina microscópicamente para detectar la presencia de trypanosomas móviles. Solamente se encuentran presentes durante unos pocos días, así que las lesiones deberían examinarse repetidamente a intervalos. Rara vez el parásito se encuentra en frotis de sangre entera, pero a veces es detectable después de centrifugar la sangre y examinar de nuevo el plasma centrifugado.

Como la durina es el único trypanosoma que afecta a los caballos en los climas templados, la observación de trypanosomas en frotis de sangre es suficiente para realizar un diagnóstico positivo. En países donde tienen lugar el nagana o el surra, es difícil diferenciar al microscopio a *T. equiperdum* (morfología, movilidad) de otros miembros del género *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 proteonucleares pleomórficas y cortas.

Las cepas típicas del parásito tienen una longitud que oscila entre 15.6 y 31.3 µm.

2. Pruebas serológicas

En los animales infectados se encuentran presentes anticuerpos humorales, ya muestren signos clínicos o no. La prueba de fijación de complemento (FC) (11) 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 inconsistentes 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 (IFI). No existe un protocolo adoptado internacionalmente. Es posible la aparición de reacciones cruzadas debido a la presencia en algunos países de otros trypanosomas; por ejemplo, *T. cruzi* y *T. evansi*. También se emplean enzimoinmunoensayos (ELISAs). *Trypanosoma equiperdum* se encuentra estrechamente relacionado con otros trypanosomas del Viejo Mundo, incluyendo *T. brucei* y *T. evansi*. Todos los miembros de este género comparten elementos conservados del citoesqueleto que producen una fuerte respuesta serológica de reacción cruzada. Todos los antígenos y antisueros (monoclonales o policlonales) 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. El diagnóstico de la durina debe incluir la historia, los resultados clínicos y patológicos, así como la serología. Para mejorar significativamente el serodiagnóstico de la durina se necesitará el desarrollo de más antígenos de subunidades específicas de trypanosoma, y anticuerpos frente a ellos.

a) La prueba de fijación de complemento (la prueba prescrita para el comercio internacional)

Se pueden utilizar técnicas de microplaca estándar (6). Como fuente de complemento se emplea suero de cobaya (disponible comercialmente). Otros reactivos son los eritrocitos de oveja (RBCs) lavados en tampón veronal, y el suero hemolítico de conejo (p. ej. RBCs de conejo anti-oveja)(comercial).

- **Preparación del antígeno**

- Se inocula una rata con un concentrado de *T. equiperdum* almacenado por congelación. La rata debe estar libre de *T. lewisi*, lo que podría conseguirse mediante inyección con neoarsfenamina, aunque es mejor emplear ratas libres de patógenos. Las ratas adultas reciben intraperitonealmente 0,5-1,0 ml del estabilizado descongelado. Cuando se produce la máxima parasitemia, se recoge la sangre en presencia de un anticoagulante como la heparina, y servirá como cultivo concentrado para inocular a más ratas.
- Se inoculan intraperitonealmente veinte ratas grandes con 0,3 ml de este cultivo concentrado. Todas las ratas van a padecer una infección severa simultáneamente. Normalmente, las ratas mueren en 3-5 días; antes de que eso ocurra, se recoge la sangre a partir del rabo para realizar frotis, que se examinan al microscopio. Cuando la parasitemia es máxima las ratas se sangran en tampón salino

citrato. Si la parasitemia no es sincrónica, las ratas pueden sangrarse y mantener su sangre en tampón salino citrato a 4°C hasta que todas se hayan sangrado.

- iii) La sangre se filtra a través de una gasa de muselina y se centrifuga a 800 **g** durante 4 minutos. La mayoría de los RBCs sedimentan mientras que los trypanosomas permanecen en suspensión.
- iv) El líquido sobrenadante se transfiere a un tubo fresco; la capa superior con los RBCs se mezcla con los trypanosomas en un segundo tubo, y la siguiente capa, en un tercero. Se añade tampón salino citrato a los tubos 2 y 3 para evitar la coagulación de las células. Se mezclan todos los tubos y se centrifugan a 1.500 **g** durante 5 minutos.
- v) Se descarta el líquido sobrenadante y la capa superior blanca que contiene los trypanosomas 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 tampón salino, se mezclan los tubos y se centrifugan de nuevo a 1.500 **g** durante 5 minutos para separar los trypanosomas. Se repite el paso de lavado hasta que todos los trypanosomas se recogen como una masa blanca pura. Las ratas deberían producir 3-5 g de antígeno. Este paso de purificación puede realizarse también empleando una columna de DAE (dietilaminoetil) celulosa en solución en tampón fosfato salino (PBS) con glucosa, pH 8,0 (10).
- vii) Los trypanosomas concentrados se diluyen con dos volúmenes de tampón veronal y un 5% de polivinilpirrolidona como crioprotector. Antes de su empleo en las pruebas FC, el antígeno debe dispersarse hasta obtenerse una suspensión fina con un homogenizador manual o motorizado y enfriado en hielo (13). Este antígeno puede dividirse en alícuotas, congelarse y liofilizarse.

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

Sueros: Los sueros positivos y negativos deberían inactivarse a 58°C durante 30 minutos antes de utilizarse en los ensayos. Normalmente, los sueros de burro y mulo se inactivan a 62°C durante 30 minutos. Las diluciones de los sueros que son positivos en los ensayos se titulan frente a dos unidades del antígeno. Los sueros problema se investigan 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.

Sueros anticomplementarios: Si el control anticomplementario muestra sólamente 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 ensaya de nuevo empleando antígeno de *T. equiperdum* en la primera fila y sólamente 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 1/2 y la inactivación por calor a 60-63°C durante 30 minutos puede originar una reducción o eliminación del efecto anticomplementario.

Tampones y reactivos: El tampón salino con 0,15 M veronal, pH 7,4, se utiliza para diluir los reactivos y para lavar los RBCs de oveja. El antígeno se comprueba mediante titulación con el sistema de doble entrada, y en el ensayo se emplean dos unidades. Se ensaya el complemento (C) de cobaya para determinar su actividad hemolítica, y se diluye para proporcionar dos unidades en el ensayo. Los RBCs de cordero en solución de Alsever se lavan tres veces. Para el sistema hemolítico se emplea una solución al 3%. Se recogen los RBCs titulados de conejo anti-oveja -el suero hemolítico de conejo- a una concentración del doble de su título hemolítico (dos unidades). Todos los sueros a ensayar, incluidos los sueros control positivo y negativo, se inactivan a una dilución 1/5 antes de probarse.

- **Diluciones primarias**
 - i) Se diluyen 100µl del suero problema con 400 µl de tampón veronal (1/5).
 - ii) Se diluyen 100µl de los sueros control positivo y negativo con 400 µl de tampón veronal (1/5).
 - iii) Las soluciones se incuban en un baño con agua a 58°C durante 30 minutos para inactivar el complemento y destruir los factores anticomplementarios.
- **Procedimiento de la prueba**
 - 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 sólamente 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 dos unidades.
- v) Añadir 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 a 37°C.
- x) Se prepara el sistema hemolítico. Después de los primeros 50 minutos de incubación los RBCs 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 RBCs 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.
- xiv) *Lectura de los resultados:* la placa se observa por la parte superior con una fuente de luz tras ella. La fijación en cada pocillo se confirma 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 dobles, y se ensayan de acuerdo con el procedimiento previo para la titulación de punto final.

b) Prueba de inmunofluorescencia indirecta

También puede emplearse un ensayo IFI para la durina (11) como una prueba confirmativa, o para resolver resultados no concluyentes obtenidos con el ensayo FC. El ensayo se realiza como se indica a continuación:

Antígeno: (Para ver el método, ver la preparación del antígeno para la prueba FC en la Sección B.2.a.) La sangre se recoge en contenedores de vacío heparinizados o en una solución de dextrosa-ácido cítrico, a partir de un animal en el que el número de trypanosomas todavía está aumentando (deberían estar presentes aproximadamente diez parásitos por campo del microscopio con un aumento de x 10).

- i) La sangre se centrifuga durante 10 minutos a 800 **g**.
- ii) Se añaden uno o dos volúmenes de PBS a los RBCs 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, con papel separando cada porta. Los grupos de portas se envuelven con papel de aluminio, se sellan en un contenedor hermético con gel de sílice, y se almacenan a -20°C o -76°C.
- iv) Los portas almacenados a -20 °C deberían mantener su actividad durante aproximadamente un año; a -76°C, deberían ser utilizables durante más tiempo.

Solución de dextrosa-ácido cítrico: Emplear 15 ml por 100 ml de sangre.

Conjugado: Inmunoglobulinas de oveja anti-caballo marcadas con fluoresceina.

- **Procedimiento de la prueba**

- i) Los portas con el antígeno se ajustan a la temperatura ambiente en un desecador.
- 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 en un baño con agua a 37°C 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 con fluoresceína a la dilución adecuada. Los lotes individuales de antígeno y conjugado deberían titularse entre sí empleando sueros control para optimizar la dilución del

- conjugado. Los portas se incuban en un contenedor húmedo en un baño con agua a 37°C durante 30 minutos.
- vi) Se lavan tres veces los portas durante cinco minutos con PBS, pH 7,2, y se secan al aire.
 - vii) Se montan los portas con aceite de inmersión (disponible comercialmente).
 - viii) Finalmente, los portas se examinan con iluminación por luz UV. Para realizar la iluminación con luz incidente se emplea un filtro de barrera K 530 y un filtro excitador BG 12. Los portas pueden almacenarse a 4°C durante 4-5 días. Generalmente los sueros diluidos 1/80 o más que presentan una fluorescencia fuerte debida a los parásitos se consideran positivos. La estimación de la intensidad de la fluorescencia exige experiencia por parte del observador.

En cada lote de ensayos deberían incluirse sueros control positivos y negativos, y debería considerarse el patrón de fluorescencia de estos controles cuando se confirmen los resultados de los sueros problema.

c) **Prueba de inmunofluorescencia indirecta**

La prueba ELISA ha sido desarrollada y comparada con otras pruebas serológicas para el diagnóstico de la durina (12, 14).

Los reactivos se preparan como se indica a continuación:

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).

PBS, pH 7,4, con Tween 20 (PBST) para el lavado: KH₂PO₄ (0,2 g); Na₂HPO₄ x 12 H₂O (2,94 g); NaCl (8,0g); KCl (0,2 g en 1 litro de agua destilada), y Tween 20 (0,5 ml).

Tampón para muestra y conjugado: PBST + 6% FCS.

Tampón citrato-fosfato: Ácido cítrico monohidratado (4,2 g en 200 ml de agua destilada); Na₂HPO₄ x 12H₂O (en 200 ml de agua destilada). Se mezclan ambos componentes a volúmenes iguales.

Sistema indicador del substrato: El ABTS (2,2'-Azino-bis-[3-etylbenzotiazolina ácido 6-sulfónico]) (40 mg) se disuelve en tampón citrato-fosfato (100 ml), y se almacena a 4°C en la oscuridad. Justo antes de usarse, se añaden 100 µl de una dilución 1/40 de H₂O₂ a 10 ml de ABTS.

Conjugado: IgG (H+L) PO de conejo anti-caballo, o IgY anti-caballo Ig-PO.

Antígeno: El antígeno liofilizado de *T. equiperdum* (0,5 ml) se reconstituye con tampón de carga (5 ml), se sonica dos veces durante diez segundos con un pico de 12 µm, y se centrifuga a 10.000 **g** durante 4 minutos. El sobrenadante se diluye posteriormente hasta obtener una dilución de trabajo ya probada (p. ej. 1/500).

• **Procedimiento de la prueba**

- i) Los pocillos de las columnas 2, 4, 6, etc., se cargan con 50 µl del antígeno; las columnas 1, 3, 5, etc., se cargan con la misma cantidad de tampón carbonato. La placa se incuba durante 40 minutos a 37°C en una cámara húmeda, se lava con agua destilada, y se añaden 50 µl de tampón de bloqueo a cada pocillo. La placa se incuba durante 20 minutos, se lava con agua seguido de tres ciclos de lavado con PBST, con tiempos de lavado de 3 minutos/ciclo.
- ii) Se añaden en paralelo a los pocillos con y sin antígeno 50 µl de las muestras problema y suero equino control prediluido 1/100 en tampón de muestra/conjugado. La placa se incuba durante 30 minutos y se lava con agua, realizándose después tres ciclos de lavado con PBST.
- iii) Se añaden 50 µl del conjugado diluido apropiadamente en tampón de muestra/conjugado a todos los pocillos. La placa se incuba durante 30 minutos, seguido de un lavado, tal como se describe anteriormente.
- iv) Se añaden 100 µl del sistema indicador de sustrato a todos los pocillos.
- v) La reacción se detiene después de incubar 15 minutos a temperatura ambiente mediante la adición de 25 µl de NaCN 37 mM. Alternativamente, pueden utilizarse detergentes comerciales una vez que han sido comprobados. Los resultados se leen espectrofotométricamente a una longitud de onda de 405 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.

También se ha descrito un ELISA competitivo para detectar anticuerpos frente a *Trypanosoma equiperdum* (9).

d) Otras pruebas serológicas

Se han utilizado otras pruebas serológicas, incluyendo el radioinmunoensayo, y las pruebas de inmunolectroforesis de contracorriente e inmunodifusión en gel de agar (IGDA) (2, 4). La prueba IGDA se ha empleado para confirmar muestras positivas y para probar 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 glanders y la durina (8).

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y LOS MATERIALES DE DIAGNÓSTICO

No existen productos biológicos disponibles. El control de la enfermedad depende de su notificación obligatoria y el sacrificio de los animales infectados. Es esencial mantener una buena higiene durante las cópulas asistidas.

REFERENCIAS

1. BARNER R.D. (1963). Protozoal diseases. *En: Equine Medicine and Surgery*, Bone J.F. et al., eds. American Veterinary Publications, Santa Barbara, California, USA, 205–210.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. HENNING M.W. (1955). Animal Diseases in South Africa, Third Edition. Central News Agency, South Africa.
6. 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.
7. HOARE C.A. (1972). The Trypanosomes of Mammals. A Zoological Monograph. Blackwell Scientific Publications, Oxford & Edinburgh, UK.
8. 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.
9. 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.
10. LANHAM S.M. & GODFREY D.G. (1970). Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Exp. Parasitol.*, **28**, 521–534.
11. MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD (1986). A Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques, Third Edition. Her Majesty's Stationery Office, London, UK.
12. 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.
13. 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.
14. WORKING PROTOCOLS, BGV: ELISA ON DOURINE (1995). Bundesinstitut f. gesundheitlichen Verbraucherschutz u. Veterinärmedizin (BgVV). PO Box 33 00 13, D-14191 Berlin, Germany.

*
* *

NB: Existe un laboratorio de referencia de la OIE para la Durina (ver Cuadro en la Parte 3 de este *Manual de animales terrestres*, o consultar el sitio WEB de la OIE para obtener una lista más actualizada: www.oie.int).

CAPÍTULO 2.5.14.

ENCEFALITIS JAPONESA

RESUMEN

El virus de la encefalitis japonesa es un flavivirus transmitido por mosquitos que causa encefalitis, principalmente en los caballos. También infecta al hombre y causa abortos en cerdos. Los cerdos actúan como amplificadores del virus y las aves también pueden estar implicadas en su propagación.

El diagnóstico definitivo de la encefalitis japonesa en los caballos depende del aislamiento del virus a partir de los animales afectados o muertos. Como normalmente la tasa de aislamiento vírica es muy baja, para el diagnóstico son útiles los hallazgos clínicos, serológicos y patológicos.

Identificación del agente: Para el aislamiento vírico se recoge el material de cerebro de caballos afectados o muertos que muestren signos clínicos de encefalitis. Algunos procedimientos de aislamiento son la inoculación de ratones lactantes y los cultivos celulares. Se inoculan por vía intracerebral ratones de 2-4- días de vida con una suspensión de material cerebral en solución salina tamponada que contenga suero de ternero (o seroalbúmina bovina) y antibióticos. Si los ratones muestran signos neurológicos seguidos de la muerte en un plazo de 14 días, entonces se podrá identificar el virus mediante cultivo celular. También se puede aislar el virus en cultivos celulares de embriones de pollo, de células de riñón de cerdo o hámster, de células de riñón de mono verde africano (Vero), de la línea celular MD-BK o de líneas celulares de mosquito.

En algunos cultivos celulares aparece un efecto citopático, pero habitualmente no es muy evidente. La identificación del virus en ratones o en cultivos de tejidos se confirmará mediante pruebas serológicas.

Pruebas serológicas: El ensayo de detección de anticuerpos es una técnica útil para determinar la prevalencia de la infección en una población de caballos y también para el diagnóstico de la encefalitis japonesa en individuos enfermos. Entre los métodos de ensayo, cabe señalar la prueba de neutralización vírica (NV), de inhibición de la hemaglutinación y de fijación del complemento. La prueba de NV es la más específica debido a su capacidad para diferenciar la infección causada por el virus de la encefalitis japonesa de otras infecciones debidas a flavivirus. La mejor manera de llevarla a cabo es utilizarla como prueba de reducción de placas.

Requisitos para las vacunas y los materiales de diagnóstico: Existe una vacuna inactivada preparada a partir de una suspensión vírica obtenida de cerebro de ratón o cultivo celular infectados.

A. INTRODUCCIÓN

La encefalitis japonesa es una enfermedad de caballos causada por un flavivirus transmitido por mosquitos que provoca signos clínicos de encefalitis en los animales infectados y que puede ser mortal (3, 4). También infecta al hombre y causa abortos en cerdos. Los cerdos actúan como amplificadores del virus y las aves también pueden estar implicadas en su propagación. Se ha identificado un único serotipo entre los aislados víricos de la encefalitis japonesa, aunque se reconoce la existencia de variación entre las cepas en estudios serológicos y moleculares. Mediante las pruebas de inhibición de la hemaglutinación y de neutralización combinadas con procedimientos de absorción antigenicas, se pueden distinguir al menos dos subtipos, el Nakayama y el JaGAr-01, entre los virus de la encefalitis japonesa (5).

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

El diagnóstico definitivo de la encefalitis japonesa en los caballos depende del aislamiento del virus causal. Normalmente la tasa de aislamiento del virus a partir de los caballos enfermos o muertos es muy baja, lo que puede deberse a la inestabilidad del virus bajo ciertas condiciones medioambientales y también a la presencia de anticuerpos en los animales infectados. Los hallazgos clínicos, serológicos y patológicos pueden servir de ayuda en el diagnóstico. También es posible el diagnóstico mediante la detección de anticuerpos específicos IgM e IgG en el líquido cerebroespinal empleando métodos de enzimoinmunoensayo (1). Se ha detectado ácido nucleico vírico en el cerebro de caballos infectados mediante la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (7).

Los materiales requeridos para aislar el virus se obtienen a partir de una porción del cuerpo estriado, córtex o tálamo de los cerebros de los caballos afectados. También se pueden emplear para el aislamiento muestras de sangre o de médula espinal. Se deberían mantener fríos todos los materiales inmediatamente después de recogerse y si el virus se va a aislar en fecha posterior, se deberían congelar a -80°C. Cualquier material sospechoso de infección se debe manipular según los procedimientos de contención de nivel 3 (véase Capítulo I.1.6. *Seguridad humana en los laboratorios veterinarios de microbiología*), para evitar el riesgo de infección humana. El hombre se puede infectar por contacto directo del material infeccioso con lesiones de la piel o membranas mucosas, por inoculación parenteral accidental o por aerosoles. Deberían tomarse las precauciones adecuadas con las muestras recogidas para el diagnóstico. Se dispone de una vacuna humana y los trabajadores de laboratorio y veterinarios de campo con riesgo deberían vacunarse.

1. Identificación del agente

Las muestras de cerebro y médula espinal se homogeneizan en una suspensión al 10 % de solución salina tamponada, pH 7,4, que contenga suero de ternero (2%) o seroalbúmina bovina (0,75%), estreptomicina (100µg/ml) y penicilina (100 unidades/ml). El suero de ternero debería estar libre de anticuerpos de la encefalitis japonesa. La suspensión se centrifuga a 1.500 **g** durante 15 minutos, y el sobrenadante se extrae para la inoculación: se administra un inóculo intracerebral de 0,02 ml en ratones de 2–4 días de edad. Dichos ratones se mantienen bajo observación clínica durante 14 días. Puede que no desarrollen unos signos clínicos claros pero la anorexia se hará evidente por la desaparición de la mancha blanca lechosa del abdomen. Posteriormente la piel cambia de color de rosada a rojo oscuro y, de inmediato, sufren convulsiones antes de morir. Los cerebros de los ratones muertos o moribundos se recogen y conservan a -80°C para un pase posterior.

Para identificar el virus, se prepara el antígeno extrayéndolo con sacarosa/acetona a partir de cerebros de ratón infectado de un segundo pase en ratones, según se describe en la Sección B.2.b.1. Hay que comprobar si el antígeno es capaz de aglutinar los glóbulos rojos (RBCs) de pollos de 1 día de vida o de gansos a distintos valores de pH, entre pH 6,0 y 7,0, a intervalos de pH 0,2, de acuerdo con el método descrito (2). Brevemente, se preparan diluciones 1/24 de las suspensiones de RBCs en el diluyente con diferentes valores de pH. En una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo en U, se hacen diluciones seriadas del antígeno extraído en volúmenes de 25 µl. A continuación, a cada pocillo se le añaden 25µl de los RBCs diluidos. Se incuba la placa a 37°C durante 1 hora y se lee el resultado de la hemaglutinación. Si el antígeno es capaz de hemaglutinar, se emplea en una prueba de inhibición de la hemaglutinación (HI), utilizando un antisero de la encefalitis japonesa.

Para el aislamiento vírico se pueden utilizar cultivos primarios de embrión de pollo o células de riñón de hámster o la línea celular de mosquito C6/36 (un clon de la línea procedente de *Aedes albopictus*). En los cultivos se inoculan las muestras, que pueden ser de cerebro o sangre, recogidas a partir de animales sospechosos de estar infectados, o de la suspensión de cerebro de ratón después de la inoculación; para identificar el virus mediante una prueba de inmunofluorescencia indirecta se pueden emplear anticuerpos monoclonales específicos del virus de la encefalitis japonesa y de los flavivirus (6).

2. Pruebas serológicas

Las pruebas serológicas son útiles para determinar la prevalencia de la infección en una población animal, la distribución geográfica del virus y el grado de producción de anticuerpos en los caballos vacunados. Para aplicar las pruebas con fines diagnósticos en los caballos individuales, debería recordarse que los caballos que habitan zonas endémicas puede que durante algún tiempo se hayan infectado con el virus de un modo no evidente o que hayan sido inmunizados con la vacuna. La validez de los datos depende de si se produce una elevación del título de anticuerpos en sueros pareados recogidos en las fases aguda y convaleciente. Asimismo, se debería considerar la especificidad de cada prueba serológica. Recientemente se ha descrito una prueba de aglutinación en látex para detectar anticuerpos porcinos de la encefalitis japonesa (8).

En algunas regiones del mundo, es necesario llevar a cabo pruebas adicionales para detectar virus relacionados antes de poder lograr un diagnóstico inequívoco de la encefalitis japonesa. Por ejemplo, en Australia se encuentra el virus de la encefalitis del Valle Murray y el virus Kunjin, que están relacionados estrechamente desde el punto de vista antigenético. La expansión reciente de la distribución del virus del Oeste del Nilo en

Norteamérica, que se sabía que era endémico en San Luis, ilustra ampliamente la flexibilidad de los flavivirus para adaptarse a nuevos ambientes.

a) Neutralización vírica

La prueba de reducción de placas es sensible y fiable y utiliza cultivos primarios de embrión de pollo, células de riñón de mono verde africano (Vero) o células de riñón de cría de hámster.

El virus de la encefalitis japonesa (cepa Nakayama o cepa JaGAr-01) se propaga mediante inoculación intracerebral en ratones de 1 día de vida. Se consiguen ratones muertos o moribundos, recogiéndose sus contenidos cerebrales y a continuación se prepara una suspensión al 10% en solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,2, que contenga suero de ternero fetal al 10%. La suspensión se centrifuga a 5.000 **g** durante 20 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se conservan en alícuotas a -80°C.

• **Procedimiento de la prueba**

- i) Los sueros se inactivan durante 30 minutos en un baño con agua a 56°C.
- ii) Se preparan diluciones seriadas de los sueros en el medio de cultivo celular desde la dilución 1/10 a la 1/160 empleando una placa de microutilitación de 24 pocillos (17 mm de diámetro) de fondo plano (o tubos de ensayo).
- iii) La solución de base del virus se diluye hasta conseguir 100 unidades formadoras de calvas (PFU) /0,2 ml del medio de cultivo celular.
- iv) Se mezcla un volumen de cada suero diluido con un volumen igual del virus diluido. Con el medio de cultivo se incluye un control vírico, un suero control negativo y un suero control positivo en cada placa.
- v) Se incuba durante 90 minutos a 37°C.
- vi) Se añaden 200 µl de la mezcla virus/suero a los pocillos de la monocapa de células BHK-21 formada sobre unas placas de cultivo de 24 pocillos.
- vii) Las placas se incuban en una atmósfera de CO₂ durante 90 minutos a 37°C.
- viii) El inóculo se recoge y se añade 1 ml de medio de recubrimiento (carboximetil celulosa al 1,5% y suero de ternero fetal al 1% en medio de Eagle).
- ix) Las placas se incuban en una atmósfera de CO₂ durante 4 días a 37°C.
- x) Despues de recoger el sobrenadante del cultivo, las placas se fijan con una solución que contenga dicromato potásico al 2,5%, ácido acético glacial al 5% y formalina al 5% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Lleve puestos guantes de goma cuando maneje la solución de fijación.
- xi) La placa se tiñe con una solución de cristal violeta al 0,1% durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- xii) Se elimina el colorante y las células se lavan con agua corriente.
- xiii) Las células se secan y se cuentan las calvas.
- xiv) Se considera la dilución de suero que reduce el número de calvas en un 50% o más respecto al control sin suero.

b) Inhibición de la hemaglutinación

La prueba HI se utiliza ampliamente para el diagnóstico de la encefalitis japonesa, pero presenta reacción cruzada con otros flavivirus. Para esta prueba, primero deben tratarse los sueros con acetona o caolín y a continuación ser absorbidos con RBCs homotípicos para eliminar cualquier hemaglutinina inespecífica. Los RBCs de ganso o los de pollo de 1 día de vida se emplean a pH óptimo (6,6-7,0). Se debería llevar a cabo la prueba con los sueros tratados y 8 unidades del antígeno estándar; en algunos países se encuentra disponible comercialmente.

• **Hemaglutinación (HA)**

• **Preparación del antígeno vírico**

1. *Extracción del antígeno con sacarosa-acetona a partir de cerebros de ratones lactantes infectados (SMB)*

- i) Los SMB infectados se homogeneizan con 4 volúmenes de sacarosa al 8,5%.
- ii) Se adiciona el homogeneizado gota a gota a 20 veces su volumen de acetona fría.

- iii) Se centrifuga (500 **g** durante 5 minutos), y a continuación se elimina el sobrenadante.
 - iv) El precipitado se resuspende con el mismo volumen indicado más arriba de acetona fría y se mantiene en un baño con hielo durante 1 hora.
 - v) Se centrifuga (500 **g** durante 5 minutos), y, a continuación, se elimina el sobrenadante.
 - vi) El precipitado se agrupa en un solo tubo con acetona fría.
 - vii) Se centrifuga (500 **g** durante 5 minutos), y a continuación se elimina el sobrenadante.
 - viii) Se extiende el precipitado en el interior del tubo y se seca al vacío durante 1–2 horas.
 - ix) El precipitado seco se disuelve en solución salina: el volumen será el 0,4 del homogeneizado original.
 - x) Se centrifuga (8.000 **g** durante 1 hora, 4°C). El sobrenadante estará en condiciones de uso.
2. *Sobrenadante infectado de células del clon C6/36 de Aedes albopictus.*
- i) Se recoge el sobrenadante infectado después de 1 semana de incubación a 28°C.
 - ii) Se centrifuga (1.000 **g** durante 15 minutos). El sobrenadante estará en condiciones de uso.
- **Preparación de glóbulos rojos de ganso**
1. *Soluciones*
- Ácido-citrato-dextrosa (ACD): 11,26 g de citrato sódico ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$); 4,0 g de ácido cítrico ($H_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O$); 11,0 g de dextrosa ($C_6H_{12}O_6$); agua destilada hasta un volumen final de 500 ml. Se autoclava a 10 lb (1,7 unidades de presión) durante 10 minutos.
- Dextrosa-gelatina-veronal (DGV): 0,58 g de veronal (Barbital); 0,60 g de gelatina; 0,38 g de veronal sódico (barbital sódico); 0,02 g (0,026 g) de $CaCl_2$ (si se trata de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$); 0,12 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 8,50 g de NaCl; 10,0 g de dextrosa; agua destilada hasta un volumen final de 1.000 ml. Se autoclava a 10 lb (1,7 unidades de presión) durante 10 minutos (es más fácil preparar una solución de base cinco veces concentrada).
2. *Tratamiento de la sangre*
- 1,5 ml de ACD + 8,5 ml de sangre (0,5 ml de ACD + 2,8 ml de sangre).
3. *Lavado (estéril)*
- i) Sangre total + 2,5 volúmenes de DGV. Se centrifuga (500 **g** durante 15 minutos) y a continuación se elimina el sobrenadante.
 - ii) Los RBCs precipitados se resuspenden en tres volúmenes (sangre total) de DGV.
 - iii) Se centrifuga (500 **g** durante 15 minutos) y a continuación se elimina el sobrenadante. Se repiten las etapas 2 y 3 dos veces más (en total cuatro ciclos de centrifugación).
 - iv) Se transfiere la solución final de RBCs a un frasco cubierto con papel de aluminio.
4. *Ajuste de la concentración de los RBCs.*
- i) 0,2 ml de la suspensión de los RBCs + 7,8 ml de NaCl al 0,9% (dilución 1/40).
 - ii) La lectura se realiza a densidad óptica (OD_{490}) en un espectrofotómetro con tubos de 10 mm.
 - iii) Se ajusta la solución de base de los RBCs de modo que la dilución 1/40 dé 0,450 a OD_{490} . (Volumen final = volumen inicial × absorbancia a $OD_{490}/0,450$).
 - iv) La solución de base de los RBCs se conserva en un refrigerador durante un máximo de 3 semanas.
 - v) Antes de usar, los RBCs se resuspenden cuidadosamente y se diluyen 1/24 en VAD.

- **Dilución del antígeno**

1. Soluciones de base (se deberían mantener a 4°C): 1,5 M NaCl; 87,7 g de NaCl y agua destilada hasta un volumen final de 1.000 ml; 0,5 M ácido bórico: 30,92 g de H_3BO_3 y agua destilada caliente hasta un volumen final de 700 ml (se disuelve el ácido bórico y se enfriá); 1 N NaOH: 40 g de NaOH y agua destilada hasta un volumen final de 1000 ml; solución borato salina (BS), pH 9,0: 80 ml de 1,5 M NaCl, 100 ml de 0,5 M H_3BO_3 , 24 ml de 1,0 N NaOH, y agua destilada hasta un volumen final de 1000 ml; albúmina bovina al 4%: 4 g de la fracción V de albúmina bovina (Armour), 90 ml de BS, pH 9,0, se ajusta el pH a 9,0 con 1 N NaOH, y BS, pH 9,0, para preparar un volumen final de 1000 ml.

2. Diluyente del antígeno: albúmina bovina al 0,4%/solución borato salina (BABS): 10 ml de albúmina bovina al 4%, pH 9,0, y 90 ml de BS, pH 9,0.
3. Se preparan diluciones seriadas al doble del antígeno con BABS en placas de microtitulación (con forma de U).

- **Adición de glóbulos rojos de ganso**

1. Soluciones de base

1,5 M NaCl

0,5 M Na₂HPO₄: 70,99 g de Na₂HPO₄ (para Na₂HPO₄, 12 H₂O: 179,08 g), y agua destilada hasta un volumen final de 1000 ml.

1,0 M NaH₂PO₄: 138,01 g de NaH₂PO₄.H₂O (para Na₂PO₄, 2H₂O: 156,01 g), y agua destilada hasta un volumen final de 1000 ml.

2. *Solución de trabajo: diluyente ajustable al virus (VAD)*

VAD	1,5 M NaCl	0,5 M Na ₂ HPO ₄	1,0 M NaH ₂ PO ₄	
6,0	100	32	184	
6,2	100	62	160	y en todos los casos
6,4	100	112	144	agua destilada hasta un
6,6	100	160	120	volumen final
6,8	100	192	104	de 1000 ml
7,0	100	240	80	

Los valores de los VADs no son el pH de cada VAD, sino el pH después de que cada VAD se mezcle con un volumen igual de BABS, pH 9,0.

3. *Procedimientos*

- i) 1 volumen de solución de base de los RBCs de ganso + 23 volúmenes de VAD (dilución 1/24).
 - ii) Se añaden 25 µl de los RBCs diluidos a cada pocillo de una placa de microtitulación que contenga el antígeno diluido (25 µl/pocillo).
 - iii) Se incuba a 37°C durante 1 hora, y a continuación se lee el resultado.
- ++ Aglutinación completa (película uniforme y delgada de RBCs que sigue la curvatura del fondo del pocillo)
- + Aglutinación parcial (un anillo asociado con una película rugosa o más delgada)
- ± Aglutinación mínima (un sedimento sobre una película delgada o dispersa)
- Aglutinación negativa (un sedimento claramente definido sin película de RBCs)

El punto final es la dilución última (la dilución mayor) en la cual se observa ++ o +.

Título: el inverso de la dilución a punto final.

- **Inhibición de la hemaglutinación**

- **Preparación de los sueros problema**

1. *Tratamiento de la sangre y separación de los sueros*

- i) La muestra de sangre se incuba a 37°C durante 1 hora y a continuación a 4°C toda la noche. Si se debe realizar la prueba de inmediato, se puede reemplazar la incubación nocturna por una incubación de la muestra durante 2–3 horas a 37°C.
- ii) Se centrifuga (2.000 **g** durante 15 minutos) para separar el suero del coágulo sanguíneo.
- iii) Se inactiva por calor a 56°C durante 30 minutos.
- iv) Si no se procesa inmediatamente, se conserva a -20°C.

2. *Tratamiento con 2-mercaptoetanol*

- i) Se ponen 50 μ l de los sueros en dos pequeños tubos de ensayo.
 - ii) Se añaden 150 μ l de 0,13 M 2-mercaptopropano en PBS en uno de los tubos, y 15 μ l de PBS en el otro tubo.
 - iii) Despues de una incubación a 37°C durante 1 hora, se enfrian en un baño con hielo.
3. *Extracción con acetona*
- i) En cada tubo se ponen 2,5 ml de acetona fría. Se tapan con tapones de cierre de goma y la extracción se realiza durante 5 minutos en un baño con hielo.
 - ii) Se centrifuga en frío (1.500 **g** durante 5 minutos) y a continuación se elimina el sobrenadante.
 - iii) Se Repiten las etapas (i) e (ii) una vez más.
 - iv) El sedimento se extiende en el interior de los tubos y se seca al vacío a temperatura ambiente durante 1 hora.
 - v) A cada tubo se añaden 0,5 ml de BS, pH 9,0. Se aplican tapones de goma. El sedimento se disuelve toda la noche a 4°C hasta conseguir una dilución 1/10 de los sueros.
4. *Extracción con caolín como alternativa a la extracción con acetona*
- i) Se utiliza caolín lavado con ácido (Fischer) al 25% en BS, pH 9,0.
 - ii) 1 volumen de sueros + 4 volúmenes de BS + 5 volúmenes de caolín al 25 %.
 - iii) Se extrae a temperatura ambiente durante 20 minutos con agitación ocasional.
 - iv) Se centrifuga (1.000 **g** durante 30 minutos). Los sobrenadantes son la dilución 1/10 de los sueros.
5. *Absorción con los RBCs de ganso*
- i) Para cada suero se añade un volumen 1/50 de RBCs de ganso empacados.
 - ii) Se absorbe durante 20 minutos en un baño con hielo.
 - iii) Se centrifuga (800 **g** durante 10 minutos). Los sobrenadantes están preparados para la prueba de HI (dilución 1/10).
- **Prueba de inhibición de la hemaglutinación**
1. *Titulación primaria de hemaglutinación del antígeno*
- El antígeno se diluye hasta preparar 4–8 unidades/0,05 ml.
2. *Dilución seriada al doble de los sueros problema en placa de microtitulación*
- Reacción suero–antígeno*
- Se añaden 25 μ l del antígeno diluido en los pocillos que contengan los sueros problema diluidos. Se coloca el antígeno sobrante en los pocillos vacíos y la placa se incuba a 4°C toda la noche.
3. *Titulación secundaria de hemaglutinación del antígeno*
- i) Se recoge el antígeno distribuido en los pocillos vacíos y se realiza una prueba de HA mediante una dilución seriada al doble en volúmenes de 25 μ l.
 - ii) Se añaden 25 μ l de BABS a cada pocillo para poner 50 μ l/pocillo.
4. *Adición de los RBCs de ganso*
- i) Se diluye la solución de base de los RBCs (1/24) en VAD.
 - ii) Se distribuyen 50 μ l en cada pocillo que contenga 50 μ l de la mezcla del suero con el antígeno o de titulación secundaria del antígeno.
 - iii) Se incuba a 37°C durante 1 hora y a continuación se lee el resultado.
- Título del suero de la prueba de HI: el inverso de la dilución mayor de los sueros problema que muestre una inhibición completa de HA.

5. Interpretación de los resultados

Una diferencia de cuatro veces entre el título de los sueros de la fase aguda y convaleciente se considerará un aumento o reducción significativo y será diagnóstico de infección por un virus relacionado antigenicamente con el que se ha utilizado en la prueba.

c) **Fijación del complemento**

Algunas veces se utiliza la fijación del complemento (FC) para el diagnóstico serológico. Para esta prueba el antígeno se extrae con acetona/éter a partir de los cerebros de ratones inoculados.

• **Preparación del antígeno**

- i) Se extraen y pesan los cerebros de los ratones muertos inoculados.
- ii) Se añaden los cerebros, 20 volúmenes de acetona fría y seguidamente se mantienen a -20°C y se homogeneizan.
- iii) La suspensión se centrifuga a 5.000 **g** durante 5 minutos a 4°C y se elimina el sobrenadante.
- iv) Al precipitado se le añade el mismo volumen de acetona fría como la usada en la etapa ii indicada más arriba, y se mezcla a fondo.
- v) Se extrae con acetona manteniendo el precipitado a -20°C durante 20 minutos, y se repite la centrifugación descrita en la etapa iii indicada más arriba.
- vi) Se repiten las etapas (iv) y (v).
- vii) Se repiten las etapas (iv) y (v), pero esta vez se emplea acetona fría/éter (se mezclan en volúmenes iguales).
- viii) Se repiten las etapas (iv) y (v) dos veces utilizando éter frío.
- ix) Se elimina el sobrenadante mediante un aspirador y se extiende el sedimento sobre el tubo de centrífuga.
- x) Se secan al vacío durante 1-2 horas.
- xi) El sedimento se disuelve en solución salina fría (2 ml/g de cerebro) y se mantiene a 4°C toda la noche.
- xii) Se centrifuga a 5000 **g** durante 1 hora. El sobrenadante es el antígeno.

• **Procedimiento de la prueba**

- i) Los sueros problema se inactivan por calor a una dilución 1/4 en tampón gelatina-veronal.
- ii) Se realizan diluciones seriadas de los sueros al doble en una placa de microtitulación de 96 pocillos (25 µl).
- iii) Se añaden 25 µl de 4 unidades de antígeno y se mezclan por vibración.
- iv) Se añaden 50 µl de 2 unidades de complemento (suero de cobaya fresco).
- v) Se mezcla por vibración y se incuba a 4°C durante 18 horas.
- vi) Las placas deben permanecer 15 minutos a temperatura ambiente.
- vii) A cada pocillo se le adicionan 25 µl de RBCs sensibilizados de oveja.
- viii) Se mezcla por vibración y se incuba a 37°C durante 30 minutos y a continuación se lee el resultado.
- ix) La dilución mayor de los sueros problema que no muestre hemólisis es el título de los sueros obtenido en la prueba de FC. Se considerará significativa la elevación o reducción de cuatro veces o superior en el título.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y LOS MATERIALES DE DIAGNÓSTICO

En caballos la vacuna de la encefalitis japonesa se prepara mediante la inactivación de una suspensión vírica procedente de cerebros de ratón infectado o cultivos celulares.

Las directrices a seguir para la producción de vacunas de interés veterinario se indican en el Capítulo I.1.7. *Principios de producción de vacunas veterinarias*. Las directrices dadas aquí y en el Capítulo I.1.7. son de carácter general y pueden complementarse ante requerimientos regionales y nacionales.

1. Control del inóculo

a) Características del inóculo

En Japón para la producción de la vacuna se utiliza la cepa Beijing-1 del virus de la encefalitis japonesa. La cepa debe ser letal para los ratones cuando se inoculan por vía intracelular y debe ser capaz de crecer en un cultivo primario de riñón porcino. Esta cepa tiene la capacidad de hemaglutinar eritrocitos de ganso, de pollos de 1 día de vida o de palomas. El virus debe poderse neutralizar mediante un antisuero estándar dirigido contra el virus de la encefalitis japonesa.

b) Método de cultivo

Tanto el virus original como el del inóculo se deberían crecer en cerebros de ratón o en cultivos celulares. Los niveles de pases no deberían exceder de tres, respecto del virus original, y de dos, respecto del virus del inóculo.

c) Validación como vacuna

La vacuna producida a partir de esta cepa proporciona inmunidad frente a la encefalitis en equinos y previene la aparición de muertes de neonatos en cerdos.

Se recomienda que tanto el virus original como el del inóculo se mantengan por debajo de -70°C , o por debajo de 5°C después de la liofilización.

2. Método de producción

El virus se crece en los cerebros de ratones de 3–4 semanas de edad o en cultivos en monocapa. Los cultivos control no inoculados no deberían mostrar ningún efecto citopático causado por cualquier otro virus. El virus del inóculo se administra intracerebralmente en los ratones. Se recogen los cerebros de estos ratones que muestran signos clínicos severos de encefalitis. Dichos cerebros se homogeneizan en PBS, y después de centrifugarlos a 1.500 **g** durante 30 minutos, los sobrenadantes se procesan como la suspensión vírica.

El virus del inóculo se siembra en cultivos celulares y, posteriormente, los sobrenadantes se recogen por separado a partir de cada lote en el momento en que la replicación vírica alcance su máximo. Este sobrenadante se filtra o se centrifuga a 1500 **g** durante 30 minutos y se procesa como la suspensión vírica.

Se añade formalina (0,5%) a la suspensión para inactivar cualquier virus vivo; el producto se considerará la “suspensión vírica no diluida”. Se puede añadir adyuvante para incrementar su inmunogenicidad.

3. Control del proceso

Se debería examinar la suspensión vírica para detectar con técnicas de cultivo una posible contaminación bacteriana y para determinar la infectividad vírica mediante la inoculación intracerebral de ratón o la inoculación de cultivos celulares. Se tendría que re-examinar la suspensión vírica no diluida e inactivada con el fin de detectar contaminación mediante cultivo y microscopía después de teñir, y, asimismo, se debería comprobar que se ha logrado la completa inactivación con formalina mediante la inoculación intracerebral de ratón.

4. Control de lotes

a) Esterilidad

En el Capítulo I.1.5. se pueden encontrar las pruebas para determinar la esterilidad y ausencia de contaminación de los materiales biológicos.

b) Inocuidad

Se inoculan por vía intracerebral diez ratones de 3 días de vida con 0,02 ml del producto final y se observan durante 14 días para asegurar (por la ausencia de muertes) que se ha producido la inactivación completa del virus vivo.

5. Pruebas sobre el producto final

a) Esterilidad

En el Capítulo I.1.5. se pueden encontrar las pruebas para determinar la esterilidad y ausencia de contaminación de los materiales biológicos.

b) Inocuidad

Véase Sección C.4.b.

c) Determinación de formalina

La concentración de formalina debería ser inferior al 0,2% (v/v) y se determina mediante procedimientos de cuantificación generales.

d) Potencia

Se debería examinar el producto final para determinar la inmunogenicidad mediante pruebas de protección de ratones. Se diluye una parte del producto en diez partes de PBS; 30 ratones de 2–3 semanas de vida reciben una dosis intraperitoneal de 0,1 ml del producto diluido dos veces a intervalos de 3 días. Debería haber un grupo control equivalente no inoculado. Todos los ratones se desafían intraperitonealmente con dosis graduales del virus vivo a los 8 días después de la primera inoculación y se observan durante 14 días. La tasa de supervivencia debería ser mayor al 40% en el grupo inmunizado y la tasa de mortalidad en el grupo control debería ser superior al 90%. El título del virus de desafío no debería ser inferior a 10^3 LD₅₀ (dosis letal 50%) por 0,2 ml.

e) Estabilidad

El producto final debe ser plenamente efectivo durante 12 meses cuando se conserva a 4°C.

REFERENCIAS

1. BURKE D.S., HISALAK A. & USSERY M.A. (1982). Japanese encephalitis. *En: Proceedings of International Seminar on Viral Diseases in SE Asia and the Western Pacific*, Mackenzie J.S., ed. Academic Press, Sydney, Australia, 537–540.
2. CLARKE D.H. & CASALS I. (1958). Techniques for haemagglutination with arthropod-borne viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **7**, 561–573.
3. FENNER F.J., GIBBS E.P.J., MURPHY F.A., ROTT R., STUDDERT M.J. & WHITE D.O. (1992). Flaviviridae. *En: Veterinary Virology*, Second Edition. Academic Press, Nueva York, EE.UU., 441–455.
4. HOKE C.H. JR & GINGRICH J.B. (1994). Japanese encephalitis. *En: Handbook of Zoonoses*, Second Edition, Beran G.W., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, EE.UU., 59–69.
5. IGARASHI A. (1994). Japanese encephalitis virus. *En: Encyclopedia of Virology*, Webster R.G. & Granoff A., eds. Academic Press, Nueva York, EE.UU., 746–751.
6. KIMURA-KURODA J. & YASUI K. (1986). Antigenic comparison of envelop protein E between Japanese encephalitis virus and some other flaviviruses using monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.*, **67**, 2663–2672.
7. LIAN W.C., LIAU M.Y. & MAO C.L. (2002). Diagnosis and genetic analysis of Japanese encephalitis virus infected in horses. *J. Vet. Med. [B] Infect. Dis. Vet. Public Health*, **49**, 361–365.
8. XINGLIN J., HUANCHUN C., QIGAI H., XIANG W., BIN W., DEXIN Q. & LIURONG F. (2002) The development and application of the latex agglutination test to detect serum antibodies against Japanese encephalitis virus. *Vet. Res. Commun.*, **26**, 495–503.

*
* *

Encefalitis equina Venezolana

Dr. Fernando De la Hoz Restrepo. MD. MSc.

INS, Subdirector de Epidemiología, Bogotá OC, Colombia

El virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV) pertenece al género de los alfavirus (familia Togaviridae) con serotipos enzootico y epizootico. Dentro de este mismo grupo de virus se encuentran los de la encefalitis equina del Este y del Oeste, el de Mayaro, el de Mucambo y el de Everglades. Estos virus se caracterizan por tener entre 50 y 70 nm, tener un RNA de cadena simple y simetría icosahedrica. Poseen además una hemaglutinina activa para los eritrocitos de ganso, pollo recien nacido y paloma. El VEEV fue descubierto por primera vez por Kubes y Rios y por Beck y Wyckoff en 1937.

Los subgrupos antigenicos más importantes del VEE son:

- I. Comprende a su vez un grupo de 5 diferentes procedencias: IA (Venezuela y Trinidad), IB (Perú y Argentina), IC (Venezuela y Colombia), ID (Colombia y Panamá), IE (Panamá y Méjico).
- II. Florida.
- III. Mucambo. Aislada en Brasil, Surinam y Trinidad.
- IV. Pixuna. Aislada hasta ahora solo en Brasil.
- V. Cabassou. Aislada en mosquitos de la Guinea Francesa.
- VI. AG8O-663. Aislada en mosquitos de la Argentina.

Las variedades IA, IB, IE son las llamadas cepas epizooticas, responsables de los brotes de la enfermedad en equinos y las restantes variedades son llamadas enzooticas y circulan regularmente en equinos sin causar enfermedad. Todas las variedades pueden causar enfermedades en humanos, siendo este un huésped final (dead-end), es decir que termina la cadena de transmisión y no tiene mucha importancia como fuente propagadora del virus en la naturaleza.

La enfermedad es endémica en la parte norte de América del Sur, en Trinidad y en América Central. Aparece en forma de epizootias, principalmente en la zona septentrional y occidental de América del Sur, en algunos años (1970-1971) incluso se ha extendido a Estados Unidos.

La tabla 1 muestra la forma como han ocurrido los brotes de EEV en las Américas desde 1935.

Correspondencia: Dr Fernando De la Hoz - Instituto Nacional de Salud. Subdirección de epidemiología - Avenida el Dorado Carrera 50. CAN, zona 6. Bogotá Dc. - E-mail: fdelahoz@hemagogus.ins.gov.co Fax: 3157781; Teléfono: 2223111.

Los serotipos enzooticos son mantenidos en la naturaleza por un ciclo roedor-mosquito pero no se sabe con certeza como se perpetuan y/o surgen los serotipos epizooticos. En los brotes los serotipos epizooticos se transmiten por un ciclo en que intervienen caballos, que constituyen la principal fuente de virus para los mosquitos que a su vez infectan a los humanos.

El virus se transmite por la picadura de un mosquito infectado. Hay muchas especies de mosquitos que pueden transmitir este virus lo que lo hace capaz de producir grandes cantidades de casos humanos y animales en poco tiempo (alto poder epidémico). Dentro de las especies capaces de transmitir el VEEV tenemos el *Culex* (*Melaconion*), *Aedes*, *Mansonia*, *Psorophora*, *Haemagogus*, *Sabethes*, *Deinocerites* y *Anopheles*. También es posible que algunas clases de jejenes puedan transmitir el virus. El *Culex* es la especie que mantiene la transmisión de los virus enzooticos en la naturaleza, mientras que los virus epizooticos son transmitidos por una amplia gama de mosquitos. Pese a su variedad todos los potenciales vectores no tienen la misma capacidad de ser infectados, así por ejemplo el *Aedes aegypti* necesita 10^5 unidades formadoras de placas mientras que para *Aedes taeniorhyncus* se necesitan 10^7 unidades.

En el laboratorio son comunes las infecciones por aerosoles pero no hay evidencia de este tipo de contagio entre animales.

La enfermedad es casi indistinguible clínicamente de otras enfermedades virales como el dengue o la influenza y en realidad varias epidemias de encefalitis equina venezolana han sido diagnosticadas en sus estadios iniciales como debidas a dengue. Generalmente la enfermedad comienza repentinamente con cefalea intensa, fiebre, escalofríos, mialgia, dolor retroocular, náusea y vómitos. Las infecciones en un 80% son leves y duran solo de 3 a 5 días. En muchos casos el curso febril es difásico, es decir que después de unos pocos

días de fiebre puede haber signos que afectan al sistema nervioso central, que van desde la somnolencia hasta la encefalitis franca con desorientación, convulsiones, parálisis coma y muerte. Este cuadro del sistema nervioso central es más frecuente en los niños, se estima que alrededor del 5% de los menores de 15 años que se infectan con el VEEV pueden desarrollar cuadros neurológicos, sin embargo, en menores de 5 años esta cifra puede subir al 35%. En los casos graves la razón muerte-caso puede ser tan alta como 10% y en muchos casos pueden quedar secuelas como retardo mental, epilepsia, dificultad para aprender, hidrocefalia, cambios de personalidad y parálisis. En mujeres embarazadas que han sufrido infección por VEEV se ha encontrado un aumento de los abortos y de los nacimientos de niños con malformaciones congénitas especialmente a nivel de sistema nervioso central.

El mecanismo por el cual el VEEV invade el sistema nervioso central no es completamente claro. En hamsters se ha documentado que la invasión se da a través de las neuronas olfatorias cuando la inoculación es nasal o por aerosoles. Sin embargo este mecanismo también se ha observado después de inoculación periférica.

La inmunidad natural a la enfermedad es mediada básicamente por la presencia de anticuerpos contra la glicoproteína E2. Estos anticuerpos son protectores y pueden persistir toda la vida. Uno de los factores que parece ser más importante dentro de la virulencia de las cepas enzooticas y epizooticas de VEEV es la presencia de eliminación temprana de los viriones infectantes. En las cepas menos virulentas esta eliminación se da en menos de 30 minutos en los animales infectados experimentalmente, mientras que las cepas más virulentas demoran mucho más para ser removidas. Otras características importantes de las cepas menos virulentas es que inducen viremias menores y los títulos encontrados en los órganos linfoides son menores que los de cepas más virulentas.

El diagnóstico presuntivo se hace con base en las características clínicas (fiebre, cefalea intensa y convulsiones), asociación epidemiológica (presencia de muerte de equinos). El diagnóstico definitivo se confirma por aislamiento viral, aumento del título de anticuerpos o detección de IgM específica. Para el aislamiento se pueden inocular muestras de sangre o de lavado nasofaringeo recolectadas en las primeras 72 horas de enfermedad en cultivos celulares o en ratones recién nacidos. Los sueros pareados de pacientes convalecientes con 10 días de diferencia deben mostrar un aumento de los anticuerpos superiores a tres diluciones. Es posible la existencia de reacciones cruzadas en las pruebas serológicas con otros agentes de encefalitis como los virus de la encefalitis del Este y del Oeste, por lo que la confirmación de la circulación del VEEV en una región después de un silencio epidemiológico debe ser confirmada por aislamiento viral.

El período de incubación de la enfermedad va de dos a seis días y puede ser tan corto como de un solo día. Los casos humanos son infecciosos para los mosquitos durante 72 horas, pero la relevancia del humano como fuente de infección para otros humanos es muy poca. El período de incubación "extrinseca", en el mosquito dura aproximadamente 1 semana.

Existe una vacuna para equinos basada en la cepa TC83 y que se encuentra disponible comercialmente. Coberturas de más 80% en los equinos de las zonas expuestas prácticamente garantizan la no ocurrencia de brotes o epidemias de la enfermedad. Para humanos hay una vacuna de virus vivos atenuados que se usa solo para el personal de salud que puede estar expuesto en el laboratorio a aerosoles que contengan el virus. También se ha recomendado su uso en personas que por su oficio estén expuestos a un riesgo aumentado de infección.

Se han intentado desarrollar vacunas contra VEEV usando otras metodologías como las

técnicas recombinantes pero estas no han demostrado ser mejores que las de virus atenuados debido a que los títulos que inducen parecen ser menores y no protegen contra la infección por aerosoles.

El control de las epidemias se basa en la vacunación masiva de equinos y el control de la población de vectores. Esto último se logra por aspersión peridomiciliaria de insecticidas y por el control de criaderos extradomiciliarios con medios químicos o biológicos.

Hasta hace muy poco no estaba clara la razón que motivaba la aparición de las epidemias y epizootias y se habían propuesto al menos tres teorías que eran:

1) Mutación de las cepas del virus de la EEV, ya que existen focos silenciosos silvestres en varias partes de las Américas.

2) Liberación de las cepas epizooticas de sus propios ciclos enzooticos, por varias razones: acumulación de susceptibles, aumento de las poblaciones de vectores y de reservorios.

3) Mutación ocurrida alrededor de 1930, que hizo aparecer la primera cepa epizootica de VEEV, la cual es reintroducida periódicamente a los grupos de susceptibles, por la vacunación de equinos, con vacunas inactivadas parcialmente.

En los últimos años se ha logrado determinar con cepas colombianas que hay un gran parecido genético entre las cepas ID enzooticas y ciertas cepas epizooticas IAB lo cual pone en firme la posibilidad de que las cepas epizooticas deriven de una mutación de las cepas enzooticas predominantes en un lugar determinado. Sin embargo, los mecanismos por los cuales podría dispararse esta mutación no son claros.

La enfermedad tiene un gran impacto social, especialmente por las grandes pérdidas económicas que causa su alta mortalidad en equinos.

En Méjico en la epidemia de 1970-1973 produjo 50.000 casos humanos con 100 muertes y además 45.000 muertes en equinos. En 1962-63 y en la Guajira se produjeron más de 3.000 casos en humanos y luego en Venezuela produjo más de 20.000 casos en humanos, alrededor de 1.000 con compromiso neurológico y 160 muertes. La más grande epizootia y epidemia en Colombia fue la que ocurrió en el Valle del Cauca y que se extendió al Valle del Magdalena y la Costa Atlántica y que se calcula que produjo

alrededor de 200.000 casos humanos y 200.000 muertes en equinos.

Se ha recomendado que en los períodos interepidémicos se vigile la circulación de VEEV en las áreas rurales usando metodologías como la de los hamsters centinelas. Dado que la aparición de epizootias está fuertemente asociada con la presencia inusual de lluvias muy fuertes, es precisamente durante estas temporadas que se debe vigilar la circulación silvestre del virus.

TABLA 1
Distribución temporal y espacial de la encefalitis equina venezolana en las Américas.

Área	Año de aparición	Especies afectadas
Colombia (Valle, Tolima, Huila, Bolívar)	1935	Equinos
Colombia-Venezuela (La Guajira)	1936-1937	Equinos y humanos
Venezuela	1938	Equinos
Colombia (Sabana de Bogotá)	1941	Equinos
Colombia-Venezuela (La Guajira)-Trinidad	1942-1943	Equinos
Perú	1946	Equinos
Venezuela (La Guajira)	1949	Equinos
Colombia (Tolima)	1952	Equinos y humanos
Colombia	1954	Casos humanos sin epizotia
Venezuela (La Guajira)	1959	Equinos y humanos
Colombia-Venezuela (La Guajira)	1962-1964	23.283 humanos -960 casos neurologicos — 158 muertes - muchos equinos muertos.
Méjico-Venezuela	1966	Equinos y humanos.
Colombia (Costa Atlántica, Valle del Magdalena)	1967	220.000 personas afectadas y 104.000 equinos muertos en Colombia
Colombia-Venezuela (La Guajira)	1968	1.077 casos humanos — 155 casos neurológicos- 2 muertes en humanos y muchas no cuantificadas en equinos
Colombia, Venezuela, Perú, Ecuador, Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Méjico.	1969	30.000 caso humanos- 310 muertes en humanos-27.000 equinos muertos (Ecuador). 2.630 casos humanos- 143 casos neurológicos- 14 muertes en humanos (Venezuela).
Colombia, Venezuela, Costa Rica, Méjico	1970	2.000 casos humanos y más de 8.000 equinos muertos en Méjico
Estados Unidos	1971	1.426 equinos muertos y 60 casos en humanos
Colombia (Tolima)	1973	100 casos en humanos sin epizotia.
Colombia-Venezuela (La Guajira)	1995	Más de 25.000 casos en humanos más de 5.000 muertes de equinos en Colombia.

Tomado y adaptado de referencia 2.

REFERENCIAS

- 1) Benenson A. Manual para el control de las enfermedades transmisibles. OPS. 16 Edición. Washington. 1997.
- 2) Jaramillo C. Enfermedades Virales Humanas. En: Enfermedades Infecciosas. Tercera Edición. Serie Fundamentos de Medicina. Editada por Botero et al. Medellín. 1986.
- 3) Jhonston R and Peters C. Alphaviruses. En: Field's Virology. Editada por Fields B and Knipe D. Raven Press. New York. 1996.
- 4) Schlessinger S and Schlessinger M. Togaviridae: The viruses and their replication. En: Field 's Virology. Editada por Fields B and Knipe D. Raven Press. New York. 1996.
- 5) Peters C and Dalrymple J. Alphaviruses. En Field 's Virology. Editada por Fields B and Knipe D. Raven Press. New York. 1990.
- 6) Craven R. Togaviruses. En: Medical Virology. Editada por Baels R. 1991.

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

SERVICIOS OFRECIDOS A LA COMUNIDAD

DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

- Asesoría técnica integral de industrias pecuarias.
- Monitoreo de hatos bovinos.
- Estudio bromatológico de pastos y forrajes.
- Asesoría sobre manejo y producción de derivados lácteos.
- Evaluación andrológica de bovinos.
- Venta de material vegetativo y semillas de pastos tropicales.
- Venta de pie de cría porcícola.
- Venta de pie de cría de conejos.

Para más información

Expertos de referencia:

Dr. W. Eichhorn
Institute for Medical Microbiology, Infectious and Epidemic Diseases. Veterinary Faculty, Ludwig-Maximilians-University
Veterinärstrasse 13, 80539 München
ALEMANIA
Tel.: (49.89) 21.80.25.31
Fax: (49.89) 21.80.59.03
Correo electrónico: werner.eichhorn@micro.vetmed.uni-muenchen.de

Dra. Jennifer A. Mumford
Cambridge Infectious Diseases Consortium, Department of Veterinary Medicine Madingley Roas, Cambridge CB3 0ES
REINO UNIDO
Tel.: (44.1223) 76.46.66
Fax: (44.1223) 76.46.67
Correo electrónico: jam80@hermes.cam.ac.uk

Dra. Jennifer A. Mumford
Animal Health Trust
Lanwades Park, Kentford, Newmarket, Suffolk CB8 7UU
REINO UNIDO
Tel: (44.8700) 50.24.60
Fax: (44.8700) 50.24.61
Correo electrónico: jenny.mumford@aht.org.uk
Sitio Web: <http://www.equiunet.org.uk/>

Bibliografía:

3. Manual de Pruebas de Diagnóstico y Vacunas para los Animales Terrestres, 2011, Capítulo 2.5.7 <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/> (en inglés)
3. Código Sanitario para los Animales Terrestres, 2011, Capítulo 12.6 – Gripe Equina http://www.oie.int/es/normas-internacionales/codigo-terrestre/acceso-en-linea/?htmfile=chapitre_1.12.6.htm
3. Manual Merck de Veterinaria <http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp?cfile=htm/bc/121303.htm&word=equine%2cinfluenza> (inglés)
4. Report of the Commissioner of Agriculture, Washington, 1872, US Department of Agriculture, Dr.James Law (inglés)

Hechos clave:

- En el año 433 AC, un veterinario griego llamado Absирto observó un brote de una enfermedad similar a la gripe en caballos.
 - En 2004, el virus H3N8 de la gripe equina produjo un brote de gripe en perros en los Estados Unidos de América.
 - En 1872, un foco que se propagó por toda Norteamérica afectó a tantos caballos que paralizó el transporte de mercancías debido a que imposibilitó la descarga de barcos, así como también la circulación de autobuses e, incluso, de carros de bomberos.
 - En 1987, una epidemia de gripe equina afectó a más de 27.000 animales en India y provocó la muerte de varios centenares de ellos.
- 12, rue de prony • 75017 paris france
• tel. 33 (0)1 44 15 18 88 - fax 33 (0)1 42 67 09 87
• www.oie.int • oie@oie.int

Gripe equina

¿Qué es la gripe equina?

La gripe equina es una enfermedad respiratoria sumamente contagiosa, aunque rara vez mortal, que afecta a caballos, asnos, mulos y otros équidos. Se la conoce desde muy antiguo y, en tiempos en que los caballos eran los principales animales de tiro, los brotes de la enfermedad paralizaban el comercio. En la actualidad, las epidemias siguen teniendo graves consecuencias en el sector equino.

La gripe equina es una enfermedad provocada por los subtipos H7N7 y H3N8 del virus de la influenza A que, al igual que los agentes causales de la gripe humana y la influenza aviar, pertenecen a la familia *Orthomixoviridae*, aunque sus características son diferentes.

De conformidad con el Artículo 1.2.3 del Capítulo 1.2 del *Código Sanitario para los Animales Terrestres* (edición de 2011) de la OIE, la gripe equina es una enfermedad inscrita en la Lista de la Organización y, en cumplimiento de lo estipulado en el Capítulo 1.1 (Notificación de enfermedades y datos epidemiológicos) de ese Código, los Países y Territorios Miembros tienen la obligación de notificarla.



¿Dónde existe la enfermedad?

A excepción de Australia (donde se registró un importante brote en 2007), Nueva Zelanda e Islandia, la gripe equina es endémica en todo el mundo.

¿Cómo se transmite y propaga la enfermedad?

Altamente contagiosa, la gripe equina se transmite mediante el contacto con animales infectados que expelen el virus por conducto de la tos. En realidad, los animales pueden expulsar el virus antes de manifestar síntomas clínicos. También se propaga por la transmisión mecánica de los virus que se encuentran en la ropa, material, cepillos, etc., de las personas que trabajan con caballos.

Una vez que se introduce en una zona donde vive una población susceptible, la enfermedad, cuyo periodo de incubación es de 1-3 días únicamente, se propaga con rapidez y puede provocar brotes explosivos. La concentración de animales y el transporte favorecen la transmisión de la gripe equina.

¿Cuáles son los signos clínicos de la enfermedad?

En animales muy susceptibles, los síntomas clínicos comprenden fiebre y tos seca y dolorosa, seguidas de descargas nasales. Con frecuencia se observan decaimiento, pérdida del apetito, dolores musculares y debilidad. Por lo general, los síntomas clínicos ceden en pocos días, pero habitualmente aparecen complicaciones provocadas por infecciones secundarias.

Si bien la mayoría de los animales se recuperan en 15 días, la tos puede persistir durante más tiempo y algunos caballos demoran hasta seis meses en recobrar por completo su capacidad física. Si no se concede un reposo adecuado a los animales, la evolución clínica se prolonga.

Rara vez la enfermedad es mortal, pero habitualmente aparecen complicaciones que debilitan a los caballos durante largo tiempo como, por ej., la neumonía, que puede provocar la muerte, en particular en potros.

¿Cómo se diagnostica la enfermedad?

De conformidad con el Artículo 1.2.3 del Capítulo 1.2 del *Código Sanitario para los Animales Terrestres* (edición de 2011) de la OIE, la gripe equina es una enfermedad inscripta en la Lista de la Organización y, en cumplimiento de lo estipulado en el Capítulo 1.1 (Notificación de enfermedades y datos epidemiológicos) de ese Código, los Países y Territorios Miembros tienen la obligación de notificarla.

¿Cómo prevenir o controlar esta enfermedad?

En la mayoría de los países se recurre a la vacunación. Pero vista la variabilidad de las cepas víricas circulantes, y la dificultad para compararlas con las cepas vacunales, la vacunación no siempre protege de la infección, pero puede reducir la gravedad de la enfermedad y el tiempo necesario para la recuperación. Las vacunas se fabrican de conformidad con las directrices expuestas en el Capítulo 2.5.7 del *Manual de Pruebas de Diagnóstico y Vacunas para los Animales Terrestres* de la OIE. La Organización también reúne periódicamente a un Panel de Expertos en Vigilancia de las Vacunas contra la Gripe Equina que estudia las cepas de virus circulantes y recomienda las que deben de utilizarse.

Cuando se registra un foco de la enfermedad, se establecen controles de los desplazamientos y se aíslan los caballos infectados. El virus puede destruirse fácilmente con desinfectantes comunes; por consiguiente, la higiene y desinfección rigurosas forman parte de las medidas de bioseguridad para combatirlo.

Gripe equina



¿Qué riesgos implica para la salud pública?

La enfermedad no plantea riesgos mayores para la salud pública. El virus ha infectado a seres humanos en laboratorios; asimismo, un reducido número de personas que habían estado en contacto con caballos infectados desarrolló anticuerpos, pero ninguna contrajo la enfermedad.



LA VIRUELA EQUINA

La **Viruela Equina** se manifiesta, por un exantema cutáneo vesiculopustuloso, especialmente en el pliegue de la cuartilla, por una inflamación papulovesiculosa de la mucosa bucal. La última forma y la estomatitis pustulosa contagiosa, muchas veces considerada, en otro tiempo, como enfermedad independiente, son idénticas.

Historia

La naturaleza de la **viruela equina** sólo se ha investigado con precisión en los últimos años. Para JENNER, que fue quien primero la estudió, la **viruela equina** era el exantema vesiculopustuloso de pliegue de la cuartilla, el grease o greast heels de los herradores ingleses. Tan convencido estaba JENNER de que semejante dolencia y la viruela vacuna eran idénticas, que, con material de aquélla, inoculó a numerosos niños. En lo sucesivo, dicha dolencia fue poco tenida en cuenta; pero la idea de JENNER, a la que se adhirió luego BOLLINGER, se ha conservado, sobre todo en la bibliografía alemana, hasta los últimos tiempos.

Ubicación

La **viruela equina** de JENNER parece haber sido todavía frecuente mediados del siglo próximo pasado, pero actualmente se ha hecho sumamente rara. La viruela de la mucosa bucal (estomatitis pustulosa contagiosa) se presenta sobre todo en équidos jóvenes y, generalmente, como epizootia estabular. Puede adquirir gran importancia cuando se difunde rápidamente por grandes efectivos equinos, como los de los ejércitos, pues los animales enfermos no pueden trabajar durante algún tiempo y se desnutren, porque comen poco durante su enfermedad.

Etiología

El agente de la **viruela equina** es idéntico al de la viruela vacuno, pues ambas enfermedades pueden transmitirse recíprocamente y producen una inmunidad también recíproca. Investigadores franceses, así como CRAIG y KEHOE 1921, conceptúan el exantema vesicular de los órganos genitales como una forma de viruela equina, lo cual es discutible todavía.

Infección natural

Los primeros casos de la enfermedad suelen derivar de personas vacunadas y, posiblemente, de vacas con viruela. En las caballerizas infectadas transmiten luego la infección los caballos enfermos a los sanos, por contacto inmediato o mediato, que de extenderse, puede ser introducido en otras caballerizas. La **viruela equina** de JENNER debía de contagiarse principalmente por medio de las manos de los herradores y cocheros durante la operación del herrado (FRIEDBERGER y FRiHNER), pero también es posible que lo fuera por la paja de las camas. En la viruela de la mucosa bucal el virus llega con la saliva y el moco nasal al pienso y al agua de bebida, y así a la superficie de las mucosas bucal y nasal; pero el personal de la cuadra, el material de aseo y otros utensilios, también pueden contribuir a la propagación, generalmente rápida, en la caballeriza correspondiente. La **viruela equina** nc5 suele difundirse por grandes zonas. En los establos puede infectar vacas y, además, a personas que han manejado équidos enfermos; en éstas aparece un exantema variólico en los brazos y manos y, a veces, hasta en la cara, en ocasiones acompañado de salivación y molestias disfágicas.

Síntomas

La forma variólica es un exantema vesiculopustuloso del pliegue de la cuartilla (Schuizmauke = arestín protector o inmunizante). El desarrollo del exantema se manifiesta por dolor en dicho pliegue, con trastorno de la función del remo correspondiente y, de cuando en cuando, con moderada elevación de la temperatura. En la piel hinchada y roja del pliegue de la cuartilla brotan pronto nódulos y vesículas, aproximadamente del tamaño de lentejas, cuya rotura origina costras en el corion rezumante, debajo de las que se forma epitelio nuevo.

La enfermedad variólica de la mucosa bucal (la llamada, en otro tiempo, estomatitis pustulosa contagiosa) empieza, tras una incubación de 5 a 8 días, con fiebre moderada, que se traduce por una elevación térmica de 1 a 1,5°, poco más o menos, aceleración moderada del pulso y lasitud. Los animales toman el pienso lentamente, lo mastican poco a poco y se complacen moviendo los labios en el agua que se les ofrece.

La mucosa bucal está caliente, dolorosa y, al principio, salpicada de manchas rojas que pronto confluyen y originan nódulos consistentes, del tamaño de cañamones, que pronto alcanzan el de lentejas y aun el de guisantes, en la cara interna de los labios, partes opuestas a ellos de las encías, pliegues gingivolabiales, frenillo lingual, cercanías de las comisuras bucales y cara interna de los carrillos.

Curso

La enfermedad suele durar de 10 a 14 días, pero, en casos graves, dura de 3 a 4 semanas. Las pústulas brotan de 3 a 6 días después de presentarse los primeros síntomas; la supuración requiere de 4 a 6 días más, y la curación de la úlcera necesita igual tiempo, aproximadamente. La evolución se prolonga cuando se suceden las pústulas con gran lentitud o cuando, a causa de la supuración, sobreviene una infección maligna, y la curación de los tejidos, ahora destruidos profundamente, requiere largo tiempo. Excepcionalmente, pero sólo cuando está enferma la mucosa de la boca, el proceso morboso sigue una evolución mortal; en cambio, la viruela de JENNER cura siempre. En una yeguada, POSCHL vio morir tres potros con manifestaciones de grave faringitis y septicemia, y la necropsia reveló gran hinchazón y supuración de los folículos de la mucosa faríngea y del vestíbulo laríngeo, hemorragias en las serosas, en el bazo y en la mucosa gastroentérica y tumefacción aguda de los ganglios linfáticos del mesenterio. Las ulceraciones pueden ir seguidas de inflamación difteroide y de septicemia bacteriana. SZENDE ha observado intensos fenómenos de inquietud y excitación al principio de la enfermedad y casos de muerte por degeneración del miocardio, y HÜNIG ha descrito fallecimientos causados por extensa inflamación de las mucosas nasal, bucal, faríngea, etc., e insuficiencia cardiaca.

Diagnóstico

La estomatitis vesiculosa tiene cierto parecido con la viruela de la mucosa bucal (estomatitis pustulosa), pero, en aquélla, la erupción de vesículas no va precedida de nódulos, ni las vesículas se transforman en pústulas. Las inflamaciones causadas por heridas o cauterizaciones difieren, desde luego, por causar destrucciones más profundas.

El error es más fácil cuando, además de la mucosa bucal, están enfermas la mucosa nasal y la piel, y más todavía cuando la erupción brota en la última. En tales casos hay que tener presentes las enfermedades que siguen: El acné contagioso, que se distingue porque las pústulas en él son siempre mayores y, generalmente, se forman sólo en la ensilladura e inmediaciones y nunca en las mucosas.

El exantema vesicular, que difiere por limitarse a la mucosa de las partes genitales y zonas cutáneas limítrofes y desarrollarse, las más veces, tras el coito. El muermo, distinto porque jamás produce alteraciones en la mucosa bucal y si úlceras en la nariz, inmediatamente originadas de nódulos y úlceras cutáneas con escasa propensión a curar; además, en casos dudosos, lo excluyen la rápida difusión de la enfermedad variólica en las caballerizas y su curación, completa y también rápida. Cuando el exantema no pasa del pliegue de la cuartilla **viruela equina** de JENNER, su naturaleza variólica únicamente se puede asegurar por el resultado positivo de su transmisión a un animal receptivo, como el ternero o el conejo.

Tratamiento

Cuando es de curso benigno, la enfermedad no requiere tratamiento especial. Se disminuye a los animales enfermos la ración de cebada y, en su lugar, se les da forraje verde o heno tierno o agua con harina o con salvado y, a menudo, agua fresca y pura. Conviene lavarles la boca 3 ó 4 veces al día con un líquido débilmente antiséptico. Las úlceras de la piel se tratan análogamente o con polvos. Contra el catarro conjuntival prestan buenos servicios las instilaciones de sulfato de zinc o de tanino (0,5 %).

Profilaxis

El aislamiento inmediato de los équidos que primero enferman y de sus vecinos, impide muchas veces que la enfermedad se propague al resto del ganado amenazado. Pero si han enfermado ya varios équidos de la caballeriza y es de esperar la propagación de la epizootia, conviene recurrir a la inoculación de necesidad de los animales todavía sanos, para reducir la duración de aquélla. La inoculación se logra fácilmente frotando saliva de animales enfermos por la cara interna de los labios, algo estregada previamente con un lienzo áspero. Según TÓTH, la inoculación cutánea con material de la mucosa bucal de los enfermos produce sólo una erupción variólica local que inmuniza los animales contra la infección natural. Una vez extinguida la epizootia, se lavarán con lejía caliente los lugares de la caballeriza ocupados por los enfermos y los utensilios de la cuadra.

Fuente

Libro de texto Patología y Terapéutica Especiales de los Animales Doméstico po Dr. Rudolf Manninger y Dr. Johannes Mochis

CAPÍTULO 2.5.13.

LINFANGITIS EPIZOÓTICA

RESUMEN

*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, patas y pecho. También se puede presentar como una conjuntivitis ulcerosa o una neumonía multifocal. La transmisión se debe al contacto de la piel traumatizada con material infectado, a picaduras de mosca o a inhalación. El agente causal es un hongo dimórfico saprofita del suelo, *Histoplasma capsulatum* var. *farciminosum*. El diagnóstico diferencial incluye el muermo (en inglés, *glanders* o *farcy*), causado por *Burkholderia mallei*, la linfangitis ulcerosa debida a *Corynebacterium pseudotuberculosis*, la esporotricosis causada por *Sporothrix schenckii*, y las lesiones dérmicas de histoplasmosis causadas por *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. La anfotericina B es el antibiótico más adecuado para el tratamiento de los cuadros clínicos de linfangitis epizoótica.*

Identificación del agente: La identificación del agente se realiza por su presencia en frotis de exudados o en secciones histológicas de material de la lesión. La forma de levadura del organismo aparece en gran número en lesiones bien establecidas, y se presenta como 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 organismos aparecen por lo general rodeados de un “halo” cuando se tiñen con tinción de Gram, con hematoxilina y eosina, con la reacción del ácido periódico de Schiff o con la tinción de Gomori por metenamina y plata. La forma micelial del organismo crece lentamente en condiciones aerobias a 25–30°C en muchos medios, incluyendo el agar Micobiótico, el agar Sabouraud con destroza, el agar con infusión de cerebro y corazón, y el agar nutritivo para micoplasmas.

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

Requisitos para las vacunas y los materiales de diagnóstico: Se han utilizado a escala limitada vacunas muertas y vivas en áreas endémicas, pero, normalmente, no están disponibles.

A. INTRODUCCIÓN

La linfangitis epizoótica es una enfermedad contagiosa y crónica de los caballos y otros équidos. 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 como una neumonía multifocal. 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 (14). La forma cutánea de la enfermedad se da cuando un suelo contaminado contacta con una piel traumatizada. Se cree que la forma conjuntival de la enfermedad se transmite por moscas picadoras de los géneros *Musca* o *Stomoxys*. La forma pulmonar de la enfermedad es poco frecuente y se supone debida a la inhalación del organismo. En cualquier caso, las lesiones son de tipo nodular y granulomatoso, y el organismo, una vez que se establece, se extiende localmente mediante invasión y luego a través de la vía linfática. A menudo se presenta un engrosamiento de las vías linfáticas, con formación de gránulos piogranulomatosos. Los nódulos linfáticos regionales pueden infartarse e inflamarse. El agente causal, *Histoplasma capsulatum* var.

farcininosum, es un hongo dimórfico. En el suelo está presente la forma micelial; en las lesiones, la forma más corriente es la levaduriforme. Antes se creía que *H. farcininosum* 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 miciliares y levaduriformes (17). *H. capsulatum* var. *farcininosum* e *H. capsulatum* var. *capsulatum* son antigenéticamente indistinguibles (16). 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. *farcininosum* está incrustado en la rama del grupo A Sam Hcc (H60 a -64, -67, -71, -74 y -76), sugiriendo que es un aislamiento del *H. capsulatum* var. *capsulatum* sudamericano (10).

La forma cutánea de la enfermedad puede confundirse con el muermo, causado por *Burkholderia mallei*, la linfangitis ulcerosa debida a *Corynebacterium pseudotuberculosis*, la esporotricosis causada por *Sporothrix schenckii*, y la histoplasmosis causadas por *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* (9, 11).

La enfermedad es endémica en zonas de África, Oriente Medio y Asia. Se describe con más frecuencia en el norte de África, pero también en otras partes de África. En la India la enfermedad está bien documentada. En otras partes del mundo las descripciones son esporádicas y requieren un examen cuidadoso antes de confirmar la existencia de la enfermedad. La prevalencia de la enfermedad aumenta con el acaparamiento de animales; históricamente, era mucho más frecuente cuando se estabulaban juntos varios caballos en unidades de caballería o para otras necesidades de transporte. Los más afectados por la enfermedad son caballos, mulas y asnos, aunque se puede presentar la infección en camellos y ganado vacuno. Experimentalmente, otros animales son resistentes a la infección por inoculación, excepto algunas especies de animales de laboratorio como los ratones y conejos (14). También se ha descrito la infección en humanos (2, 3, 8). La anfotericina B es el antibiótico más adecuado para el tratamiento de los casos clínicos de linfangitis epizootica.

Como los síntomas clínicos de la linfangitis epizootica se pueden confundir con otras enfermedades en condiciones de campo, el diagnóstico definitivo descansa en una confirmación a nivel de laboratorio.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

1. Identificación del agente

El material debe recogerse directamente de las lesiones nodulares supurativas. 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. *farcininosum*.

a) Examen microscópico directo

• Frotis teñidos con Gram

Los frotis pueden teñirse directamente con la tinción de Gram para examinar la forma levaduriforme típica del organismo, que aparece como estructuras ovales o globosas Gram-positivas de unos 2–5 µm de diámetro (2). Se pueden presentar aisladas o en grupos, extracelularmente o dentro de los macrófagos. Con frecuencia se observa un halo alrededor del organismo (que corresponde a la cápsula no teñida).

• 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. La presencia, tanto intra como extracelularmente, de numerosos organismos en 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 (12), tiene valor diagnóstico. Existen indicios de que el número de organismos aumenta con la cronicidad. Los organismos son pleomórficos, a veces se describen como masas basófilas con forma semejante a un limón, de 2 a 5 µm de diámetro. A menudo se ven los organismos en estado de gemación intracelular en los macrófagos o de las células gigantes.

• 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 organismo, *H. capsulatum* var. *farcininosum*,

incluyendo la envoltura celular, la membrana plasmática, la pared celular, la cápsula y las estructuras celulares internas (1).

b) Cultivo

La forma micelial de *H. capsulatum* var. *farcininosum* crece lentamente en medios de laboratorio (2–8 semanas a 26°C). El medio recomendado es agar Micobiótico (2). Otros medios que se utilizan son el medio de 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 (8, 13). Se recomienda la adición de antibióticos al medio: cicloheximida (0,5 g/litro) y cloranfenicol (0,5 g/litro). Al cabo de 2–8 semanas las colonias aparecen como micelio de aspecto seco, de color amarillo a marrón oscuro, granular y arrugado. Pueden aparecer formas aéreas, pero son raras. A nivel microscópico, las hifas de las colonias en cultivo son septadas, ramificadas, pleomórficas y con tinción variable por el método de Gram.

Como una prueba confirmativa, se puede inducir la forma levaduriforme de *H. capsulatum* var. *farcininosum* subcultivando parte del micelio en infusión de agar y corazón que contenga 5% de sangre de caballo o en medio de Pine a 35–37°C. Las colonias de levadura son lisas, convexas, de color blanco a marrón grisáceo, y de consistencia pastosa (13).

c) Inoculación en animales

Se ha intentado la transmisión experimental de *H. capsulatum* var. *farcininosum* en ratones, cobayas y conejos. Los ratones inmunosuprimidos son muy susceptibles a la infección experimental y se pueden utilizar con fines diagnósticos (1).

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.

a) Pruebas de inmunofluorescencia

• **Prueba de inmunofluorescencia indirecta**

El procedimiento es el descrito por Fawi (4).

- i) Se preparan portas que contengan el organismo mediante frotis del tejido afectado en un porta de vidrio, o por emulsión de la fase levaduriforme del organismo 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 anticaballo conjugado con isoftiocianato 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.

• **Prueba de inmunofluorescencia directa**

El procedimiento es el descrito por Gabal *et al.* (5).

- i) Se precipita la fracción de globulinas del suero problema, y luego se resuspende con solución salina en el volumen original de suero. 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 micelial cultivada. Con un segundo porta, se aplastan las partículas de la colonia y se extiende la solución para crear una lámina fina.
- iii) Los frotis se fijan por calor.
- iv) Los portas se lavan con PBS.

- v) Los portas se incuban con diluciones del suero conjugado durante 60 minutos a 37°C.
- vi) Se lavan tres veces con PBS cada 5 minutos.
- vii) Se examinan en un microscopio de fluorescencia.

b) Enzimoinmunoensayo

El siguiente es el procedimiento descrito por Gabal & Mohamed (7).

- i) La forma micelial del microorganismo se produce en tubos de 20 x 125 mm de agar Sabouraud con dextrosa, incubados 4 semanas a 26°C. Se homogenizan tres colonias en 50 ml de PBS estéril. La suspensión se diluye 1/100 y se revisten placas de microtitulación con 100 µl /pocillo.
- ii) Se incuban las placas toda la noche a 4°C.
- iii) Las placas se lavan tres veces con PBS que contenga Tween 20 (0,5 ml/litro), 3 minutos cada vez.
- iv) Se vuelven a incubar en agitación a 23–25°C durante 30 minutos con 5% de seroalbúmina bovina, 100µl / pocillo.
- v) Las placas se lavan tres veces cada tres minutos con un PBS que contenga Tween 20 (0,5 ml/litro).
- vi) 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.
- vii) Las placas se lavan tres veces con un PBS que contenga Tween 20 (0,5 ml/litro), cada 3 minutos.
- viii) Finalmente, se añaden 100 µl /pocillo de peróxido de hidrógeno y ABTS (2,2'-azino-di-[3-etyl-benzotiazolina]-6 ácido sulfónico) en un tampón de ácido cítrico a pH 4.
- ix) A los 60 minutos se leen las placas en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm.
- x) 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.

c) Prueba de hemoaglutinación pasiva

El procedimiento es el descrito por Gabal & Khalifa (6).

- 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 (RBCs) normales de oveja, se tratan con ácido tónico, 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 tónico y se incuba en 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 tónico y recubiertas con antígeno.
- vi) La lectura de la aglutinación se lleva a cabo a las 2 y 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.

d) Pruebas de hipersensibilidad cutánea

Se han descrito dos pruebas de hipersensibilidad cutánea para el diagnóstico de la linfangitis epizootica. La primera prueba fue descrita por Gabal & Khalifa (6).

- i) El microorganismo se propaga durante 8 semanas en agar 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 miciliares que quedan se filtran y el filtrado se diluye 1/100. La esterilidad de la preparación se comprueba incubando una alícuota en agar Sabouraud con dextrosa a 26°C durante 4 semanas.

- ii) Los animales se inoculan intradérmicamente en el cuello con 0,2 ml.
- iii) El punto de inoculación se examina para la presencia de una induración local y un área elevada a las 48–72 horas de la inyección.

Alternativamente, se ha descrito una prueba de “histofarcina” por Soliman *et al.* (15).

- i) Se cultiva la forma micelial del microorganismo en discos de poliestireno sobre 250 ml de medio PPLO que contenga 2 % de glucosa y 2,5% de glicerina a 23–25°C durante 4 meses.
- ii) El filtrado del cultivo, libre del hongo, se mezcla con acetona (2/1) y se mantiene 48 horas a 4°C.
- iii) Se decanta el sobrenadante y se deja evaporar la acetona.
- iv) El precipitado se resuspende en agua destilada a 1/10 de su volumen original.
- v) Los animales se inoculan intradérmicamente en el cuello con 0,1 ml de antígeno.
- vi) El punto de inoculación se examina a fin de detectar la presencia de una induración local y una zona a las 24, 48 y 72 horas después de la inyección.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y LOS MATERIALES DE DIAGNÓSTICO

Normalmente la enfermedad se controla eliminando la infección. Esto se realiza separando los caballos infectados de los sanos y por aplicación de medidas higiénicas estrictas que eviten la difusión del organismo. Se han publicado trabajos sobre la utilización de vacunas inactivadas (2) y de vacunas atenuadas (17) en áreas donde la linfangitis epizootica es endémica, con resultados relativamente buenos.

Los antígenos utilizados en pruebas de hipersensibilidad cutánea se describen en la sección anterior.

REFERENCIAS

1. AL-ANI F.K. (1999). Epizootic lymphangitis in horses: a review of the literature. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **18**, 691–699.
2. AL-ANI F.K., ALI A.H. & BANNA H.B. (1998). *Histoplasma farciminosum* infection of horses in Iraq. *Veterinarski Arhiv.*, **68**, 101–107.
3. CHANDLER F.W., KAPLAN W. & AJELLO L. (1980). Histopathology of Mycotic Diseases. Year Book Medical Publishers, Chicago, USA, 70–72 and 216–217.
4. FAWI M.T. (1969). Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of *Histoplasma farciminosum* infections in Equidae. *Br. Vet. J.*, **125**, 231–234.
5. GABAL M.A., BANA A.A. & GENDI M.E. (1983). The fluorescent antibody technique for diagnosis of equine histoplasmosis (epizootic lymphangitis). *Zentralbl. Veterinärmed. [B]*, **30**, 283–287.
6. GABAL M.A. & KHALIFA K. (1983). Study on the immune response and serological diagnosis of equine histoplasmosis (epizootic lymphangitis). *Zentralbl. Veterinärmed. [B]*, **30**, 317–321.
7. 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.
8. GUERIN C., ABEBE S. & TOUATI F. (1992). Epizootic lymphangitis in horses in Ethiopia. *J. Mycol. Med.*, **2**, 1–5.
9. JUNGERMAN P.F. & SCHWARTZMAN R.M. (1972). Veterinary Medical Mycology. Lea & Febiger. Philadelphia, USA.
10. 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.

11. LEHMANN P.F. HOWARD D.H. & MILLER J.D. (1996). Veterinary Mycology. Springer–Verlag, Berlin, Germany, **96**, 251–263.
12. ROBINSON W.F. & MAXIE M.G. (1993). The cardiovascular system. *En: Pathology of Domestic Animals*, Vol. 3. Academic Press, New York, USA, 82–84.
13. SELIM S.A., SOLIMAN R., OSMAN K., PADHYE A.A. & AJELLO L. (1985). Studies on histoplasmosis farciminosi (epizootic lymphangitis) in Egypt. Isolation of *Histoplasma farciminosum* from cases of histoplasmosis farciminosi in horses and its morphological characteristics. *Eur. J. Epidemiol.*, **1**, 84–89.
14. SINGH T. (1965). Studies on epizootic lymphangitis. I. Modes of infection and transmission of equine histoplasmosis (epizootic lymphangitis). *Indian J. Vet. Sci.*, **35**, 102–110.
15. 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.
16. STANDARD P.G. & KAUFMAN L. (1976). Specific immunological test for the rapid identification of members of the genus *Histoplasma*. *J. Clin. Microbiol.*, **3**, 191–199.
17. WEEKS R.J., PADHYE A.A. & AJELLO L. (1985). *Histoplasma capsulatum* variety *farciminosum*: a new combination for *Histoplasma farciminosum*. *Mycologia*, **77**, 964–970.

*
* *

CAPÍTULO 2.5.2.

METRITIS CONTAGIOSA EQUINA

RESUMEN

*La metritis equina contagiosa consiste en una inflamación del endometrio de las yeguas causada por *Taylorella equigenitalis*, que normalmente origina una infertilidad temporal. Se trata de una infección no sistémica, cuyos efectos se encuentran restringidos al tracto reproductivo de la yegua.*

*Cuando aparecen, los principales signos clínicos consisten en la presencia de un flujo vaginal mucopurulento ligero o copioso y de cervicitis y vaginitis variables. La recuperación tiene lugar sin secuelas, aunque, en un gran número de las yeguas infectadas, se establece un estado asintomático de portador. *Taylorella equigenitalis* se transmite, en la mayoría de los casos, mediante el contacto sexual con sementales portadores que son siempre asintomáticos, y en los que los principales sitios de colonización por *T. equigenitalis* son las membranas urogenitales (fosa uretral, seno uretral, la uretra y el prepucio). Una higiene inadecuada durante la limpieza o el examen de los genitales de los caballos también puede ser la responsable de la transmisión de la infección. Los lugares de la yegua donde persiste *T. equigenitalis* son las membranas urogenitales, principalmente en los senos del clítoris y en la fosa, y es muy poco frecuente en el útero. Los potros nacidos de yeguas portadoras también pueden convertirse en portadores. El microorganismo puede infectar a especies de équidos distintas de los caballos, p.ej. a los burros.*

*El lavado con desinfectantes combinado con el tratamiento local y sistémico con antibióticos, puede eliminar a *T. equigenitalis*. La vacunación no ha resultado ser efectiva.*

*El principal método de control consiste en prevenir la transmisión, certificando que, antes del comienzo de la reproducción, los sementales y las yeguas se encuentran libres de *T. equigenitalis*. La determinación del estado de portador depende de la detección de *T. equigenitalis* a partir de los frotis urogenitales de los sementales y de las yeguas, y de su identificación precisa. En las yeguas puede detectarse un anticuerpo sérico frente a *T. equigenitalis* durante las 3-7 semanas después de la infección, y también puede detectarse en la yegua portadora ocasional, pero nunca en el semental. La serología es válida para detectar la infección reciente en la hembra, pero no la crónica, aunque los métodos para el control de la enfermedad deberían centrarse en la detección de los portadores mediante el cultivo.*

Identificación del agente: Los frotis deben enviarse al laboratorio con precaución, para evitar la pérdida de viabilidad. Debe en un medio de transporte Amies con carbón a ser posible, con la temperatura controlada, para su resiembra en las 48 horas siguientes a la recogida. El crecimiento de *T. equigenitalis* puede llevar al menos 72 horas, y puede extenderse hasta 14 días, aunque, normalmente, no le lleva más de 6 días a 37°C en medio enriquecido con sangre caliente y en una atmósfera del 5-10% de CO₂. Es aconsejable realizar una incubación de al menos 7 días antes de certificar que los cultivos son negativos para *T. equigenitalis*. Después de 72 horas en las condiciones de cultivo adecuadas, las colonias pueden ser pequeñas – de hasta 2-3 mm de diámetro – con un aspecto acuoso u opaco y con un color amarillo grisáceo, son suaves y presentan un borde liso. *Taylorella equigenitalis* es un coco-bacilo Gram-negativo pequeño, a veces pleomorfo, y presenta una tinción bipolar. Produce catalasa y fosfatasa, y es oxidasa positivo muy fuerte. Por el contrario, no reacciona bioquímicamente, y, al final, la identificación depende de la caracterización antigénica del aislamiento empleando anticuerpos específicos. La naturaleza compleja de *T. equigenitalis* dificulta su aislamiento, y se han empleado pruebas realizadas en manadas de sementales para detectar el estado de portador como una ayuda valiosa al examen de los cultivos.

Recientemente, otra especie de *Taylorella*, *T. asinigenitalis*, se ha aislado a partir de burros machos y de caballos sementales en los EE.UU y de caballos sementales en Europa. No se ha

asociado esta bacteria con ninguna enfermedad natural; se encuentra en el tracto genital de los burros machos, y puede transmitirse a otros burros y a caballos durante la cópula.

Se puede emplear un anticuerpo frente a células muertas de *T. equigenitalis* y un sistema de aglutinación con bolas de látex empleando dichos anticuerpos. Es esencial confirmar la especificidad frente al microorganismo y demostrar su incapacidad para reaccionar con otras bacterias Gram-negativas, oxidasa positivas y catalasa positivas que podrían cultivarse a partir del tracto urogenital de los caballos. Se han desarrollado anticuerpos monoclonales que pueden emplearse con éxito para identificar a *T. equigenitalis* y distinguirla de las cepas de *T. asinigenitalis*.

Pruebas serológicas: Ninguna prueba serológica descrita hasta la fecha sirve por sí misma para detectar de forma fiable la infección con vistas a su diagnóstico y control. Sin embargo las pruebas serológicas pueden utilizarse como ayuda al cultivo de *T. equigenitalis* en la identificación de yeguas que hayan copulado recientemente con un semental portador, pero no pueden utilizarse como sustitutivo del cultivo del microorganismo.

Requisitos para las vacunas y el material de diagnóstico: No existe todavía ninguna vacuna disponible que proteja frente a la metritis equina contagiosa o prevenga la colonización por *T. equigenitalis*.

A. INTRODUCCIÓN

La metritis equina contagiosa se describió por primera vez en el Reino Unido (RU) en 1977 (12), y después se diagnosticó en varios países del mundo. Se presentó por primera vez como un brote de una enfermedad caracterizada por un flujo vaginal mucopurulento causado por una inflamación del endometrio y el cérvix, y que provocaba una infertilidad temporal. La naturaleza compleja y el crecimiento lento de la bacteria causante, *Taylorella equigenitalis*, generó dificultades durante los intentos iniciales para cultivarla (22), pero la enfermedad se reprodujo mediante la infección experimental del clítoris con bacterias aisladas en el laboratorio (21, 23, 27). Empleando las condiciones de cultivo adecuadas, *T. equigenitalis* puede aislarse a partir del flujo vaginal infectante. Las yeguas pueden padecer más de un episodio de la enfermedad en un corto espacio de tiempo (32). Los anticuerpos permanecen en suero durante 3–7 semanas después de la infección, aunque a menudo no es detectable en las yeguas a los 15–21 días posteriores a la recuperación de una infección aguda (14). La mayoría de las yeguas se recuperan sin problemas, pero algunas pueden convertirse en portadoras de *T. equigenitalis* durante muchos meses (21). La colonización por *T. equigenitalis* se demuestra de forma consistente mediante el cultivo de frotis tomados de los recesos de las fosas y senos del clítoris, pero puede tomarse en cultivo puro a partir del cérvix y el endometrio (21). El estado de portador no siempre afecta a la concepción (33), y en tales casos la gestación puede evolucionar de tal manera que los potros nacen, se infectan durante el paso por la vagina y se convierten en portadores asintomáticos y subclínicos de larga duración (30). Muchos de los casos de infección primaria en la yegua son subclínicos, y un indicador frecuente de la infección consiste en que la yegua padece un estro prematuro después de haber copulado con un semental portador.

Los sementales y las yeguas portadores actúan como reservorios de *T. equigenitalis*, aunque los sementales, debido a que copulan con muchas yeguas, desempeñan un papel mucho más destacado en el contagio de la bacteria. Las membranas urogenitales de los sementales se contaminan durante el coito, originando un estado de portador que puede persistir durante muchos meses o años (25). El examen no higiénico de las yeguas y el lavado insalubre del pene del semental también pueden diseminar el microorganismo. No se conocen otros órganos del caballo que contengan *T. equigenitalis*. La mayoría de las yeguas portadoras de *T. equigenitalis* lo son a nivel del clítoris. No es frecuente la persistencia a largo plazo del microorganismo en el útero, aunque puede ocurrir. Sin embargo, existen yeguas portadoras que albergan al microorganismo en el útero. Para detectar a estas portadoras de *T. equigenitalis*, deben recogerse rutinariamente frotis de muestras del cérvix o del endometrio, además de muestrear la zona del clítoris en todas las yeguas. *T. equigenitalis* puede provocar el aborto en la yegua aunque se trata de un hecho poco frecuente. Para detectar tales portadores de *T. equigenitalis*, deben tomarse de forma rutinaria muestras de frotis cervicales o del endometrio además de muestras del área del clítoris de todas las yeguas. *Taylorella equigenitalis* puede ocasionar abortos en la yegua, pero ocurre pocas veces.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

La infección y la vacunación previas no protegen completamente (15), y la no persistencia de los anticuerpos han significado que el control de la infección se ha basado por completo en la prevención de la infección mediante la detección de *T. equigenitalis* en frotis del aparato urogenital. A pesar de las dificultades para el cultivo de *T. equigenitalis*, el examen de las yeguas y de los sementales durante su estancia en las caballerizas, ha

erradicado con éxito la enfermedad a partir de caballos de pura sangre en países que siguen voluntariamente esta práctica. Estos criterios están basados en el Manual de Prácticas del Consejo de Impuestos sobre Apuestas de Carreras de Caballos del Reino Unido (16), el cual se revisa anualmente y se actualiza si es necesario; a continuación se presentan las recomendaciones clave de este *Manual*.

Durante el comienzo de la temporada de cría, se toman frotis en los sementales, incluyendo a aquellos que se encuentren en su primera temporada, en dos ocasiones separadas por no menos de siete días, a partir de la uretra, la fosa uretral y los senos, el prepucio y el fluido pre-eyaculatorio. Las yeguas se clasifican de acuerdo con el grado de riesgo que presentan, y la frecuencia del muestreo se ajusta de manera adecuada. Las yeguas de alto riesgo se definen como: (a) aquellas a partir de las cuales se haya aislado *T. equigenitalis* (el estado de alto riesgo permanece hasta que se recogen tres conjuntos de frotis negativos en tres períodos diferentes de estro en cada uno de los dos años); b) yeguas que hayan permanecido en alguna de las instalaciones en las que se ha aislado *T. equigenitalis* dentro de un período de 12 meses; c) yeguas procedentes de Canadá, Francia, Alemania, Irlanda, Italia, Reino Unido Bretaña y Estados Unidos que han sido montadas durante la última estación de cría por sementales residentes fuera de estos países.; d) todas las yeguas que hayan estado en otros países a excepción de Canadá, Francia, Alemania, Irlanda, Italia, Reino Unido y Estados Unidos, dentro de los últimos 12 meses. Las yeguas de "bajo riesgo" son aquellas que no se definen como de "alto riesgo".

Se definen como sementales de alto riesgo: (a) los sementales que no hayan sido utilizados previamente para cría; (b) los sementales en los que se haya aislado *T. equigenitalis* (el estado de "riesgo alto" permanece hasta que se ha realizado el tratamiento y los resultados de los frotis exigidos sean negativos); (c) los sementales que hayan estado en cualquier instalación donde se haya aislado *T. equigenitalis* a lo largo de los últimos 12 meses; (d) los sementales que hayan montado una yegua cuyo frotis no ha sido negativo de acuerdo con el Código de Prácticas. Los sementales de "bajo riesgo" son todos aquellos que no se definen como de "alto riesgo". Existe un serio problema con la metritis equina contagiosa en estos grupos de caballos, especialmente con los que no pertenecen a razas de pura sangre.

Los resultados de las pruebas de laboratorio para *T. equigenitalis*, deberían registrarse mediante un certificado aprobado oficialmente, que se enviará a los veterinarios y al personal que supervisa la cría. El certificado debe reflejar el nombre del animal, los lugares y fecha de la recogida de los frotis, el nombre del veterinario que tomó el frotis, la identidad del laboratorio donde se realizó la prueba, la fecha en que se recibieron y se cultivaron los frotis por el laboratorio, si los frotis fueron positivos o negativos, o si el cultivo se colonizó por otras bacterias, de manera que el laboratorio no pudo asegurarse de que se podía detectar un pequeño número de *T. equigenitalis* y, por tanto, fue necesaria la recogida de otro grupo de frotis.

Las dificultades propias del cultivo de *T. equigenitalis*, requieren el empleo de un sistema de control de calidad que debería aprobarse antes de que a un laboratorio se le permita realizar las pruebas oficiales para el diagnóstico de la metritis contagiosa aguda, y extender certificados con los resultados de las pruebas. La labor del control de calidad debería llevarse a cabo por un laboratorio de microbiología experimentado, fiable e imparcial, autorizado para tal fin, y que no se encuentre implicado en el diagnóstico rutinario de la metritis contagiosa equina. Con intervalos de 6 meses, se deben enviar a los laboratorios que deseen la licencia para efectuar pruebas con esta bacteria frotis inoculados en cultivos mixtos designados para comprobar la capacidad de un laboratorio para recuperar e identificar *T. equigenitalis* en presencia de contaminantes, así como protocolos para describir los resultados. Debería publicarse una lista de aquellos laboratorios que superen satisfactoriamente el control de calidad en una revista veterinaria que sea leída mayoritariamente por los veterinarios del país. Los veterinarios y el personal de las granjas de sementales de pura sangre que supervisan la cría de yeguas y sementales deberían aceptar solamente los certificados firmados por los laboratorios aprobados con ese fin.

Cualquier yegua que presente un exudado vaginal anormal, o que vuelva al estro prematuramente, debería investigarse y manipularse como si estuviera infectada con *T. equigenitalis* hasta que los resultados de las pruebas de laboratorio demuestren lo contrario. Otras causas de endometritis pueden ser debidas a *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus zooepidemicus* y cierto tipo de cápsulas de *Klebsiella pneumoniae*. Los frotis deberían examinarse para poner de manifiesto estas bacterias, y se debería intentar cultivar e identificar *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* para establecer un diagnóstico diferencial.

Si se detectan los portadores de *T. equigenitalis*, el microorganismo puede eliminarse mediante el tratamiento con antibióticos sistémicos combinados con lavados con desinfectantes de las membranas genitales expuestas (1). Debería prestarse una atención especial a la limpieza de las partes ocultas de los senos y la fosa del clítoris de las yeguas, donde, frecuentemente, se observa la colonización por *T. equigenitalis* en los animales portadores. La duración del tratamiento puede ser de varias semanas y puede necesitarse su repetición antes de que los frotis sean negativos a *T. equigenitalis* en los sementales y en las yeguas (13). Un número significativo de las yeguas portadoras puede ser resistente a varias tandas de tratamientos. Estos animales pueden necesitar cirugía y ablación de los senos del clítoris para eliminar el estado de portador.

Las medidas de control en los países considerados libres de la infección por *T. equigenitalis* deberían basarse en el examen de los animales antes de su importación y/o el periodo de la cuarentena tras la importación, empleando programas de toma de frotis y pruebas basadas fundamentalmente en las que se describen anteriormente para las poblaciones de cría.

1. Identificación del agente (prueba prescrita para el comercio internacional)

En las membranas urogenitales de los caballos pueden encontrarse presentes varias especies de bacterias como comensales no perjudiciales y pueden interferir con el cultivo de *T. equigenitalis*. Algunas pueden encontrarse inicialmente presentes en un número bajo, pero se multiplican en el frotis antes de que este se cultive. El crecimiento excesivo de estos microorganismos en los medios de cultivo puede enmascarar la presencia de *T. equigenitalis*. Los frotis deben depositarse en un medio de transporte con carbón activado, como el medio de Amies, para absorber los productos inhibidores del metabolismo secundario bacteriano (28). Con el tiempo el número de *T. equigenitalis* de los frotis disminuye, y este efecto es más acusado a temperaturas elevadas (24). Los frotis deben mantenerse fríos durante el transporte y deben llegar al laboratorio no más tarde de 24–48 horas después de su recogida. Los resultados negativos de los frotis sembrados más de 48 horas después de haber sido recogidos no son fiables. El tratamiento con antibióticos, sea cual sea la causa, debe cesar al menos 7 días antes de la recogida del frotis. La presencia de antibióticos puede dañar a *T. equigenitalis* de forma subletal, y aunque persiste en las membranas urogenitales, no puede crecer en los medios de laboratorio.

Cada frotis debe inocularse sobre placas de agar ("chocolate") al 5% (v/v) producidas mediante el calentamiento a 70–80°C durante 12 minutos del medio líquido que contiene la sangre. Cuando se enfria a 45–50°C, se añaden al medio trimetropim (1 µg/ml), clindamicina (5 µg/ml), y anfotericina B (5 µg/ml), como describen Timoney *et al.* (31). La timidina, que inactivará al trimetoprim, está presente en los medios de cultivo que contiene peptona, por lo tanto, es importante añadir sangre de caballo lisada al 5% en esta etapa. La sangre de caballo lisada contiene fosforilasa de timidina, que inactivará la timidina y por tanto, permitirá que el trimetoprim produzca su efecto selectivo. Este es el medio preferido para aislar *T. equigenitalis*; se ha empleado con éxito para aislar los dos biotipos de este patógeno y para impedir el crecimiento de muchas bacterias comensales. Como los inhibidores pueden prevenir el aislamiento de algunas cepas de *T. equigenitalis*, los frotis también deberían inocularse sobre placas con agar ("chocolate") al 5% con una base enriquecida de peptona suplementada con cisteína (0.83 mM), sulfato sódico (1.59 mM) y un fungicida (5 µg/ml de anfotericina B). *Taylorella equigenitalis* crecerá en el agar sangre, pero puede tolerar unas condiciones inferiores a las óptimas cuando crece en agar sangre, como se describió anteriormente. Algunos fabricantes¹ producen una base de agar con peptona cuya calidad se controla por su capacidad para permitir el crecimiento de *T. equigenitalis*. La calidad del agar comercial debería confirmarse mediante pruebas de laboratorio. Una propiedad importante de todos los medios favorables para el aislamiento de *T. equigenitalis* consiste en la ausencia de carbohidratos fermentables. Estos compuestos no favorecen el crecimiento de *T. equigenitalis*, pero su fermentación por otras bacterias inhibe su crecimiento (4, 15). A veces se utiliza un tercer medio que contiene sulfato de estreptomicina (200 µg/ml), ya que algunos aislamientos de *T. equigenitalis* son resistentes frente a esta concentración del antibiótico, lo que sirve para reducir el nivel de crecimiento de otras bacterias que, por otra parte, podrían ocultar la presencia de pequeñas cantidades de *T. equigenitalis* (28). Sin embargo, actualmente la cepa aislada más común es un biotipo sensible a la estreptomicina y no se detectará en este medio; consecuentemente, debería utilizarse solamente junto con un medio sin estreptomicina. Sin embargo, el crecimiento de otras bacterias, por ejemplo, *Proteus mirabilis*, puede ser tan extenso que el laboratorio debería indicar que no pueden emitir un resultado negativo para la prueba. En este caso, deben requerirse más frotis con la esperanza de que el problema no se repita.

Todos los medios de cultivo deben someterse a un control de calidad y deben mantener el crecimiento del microorganismo sospechoso a partir de un inóculo pequeño antes de utilizarse en muestras sospechosas. La cepa de referencia de *T. equigenitalis* también debe cultivarse en paralelo con las muestras de prueba para asegurar que las condiciones del cultivo son óptimas para el aislamiento del microorganismo.

La naturaleza compleja de *T. equigenitalis* dificulta su aislamiento. Se han utilizado empleado pruebas realizadas en manadas de sementales para aumentar la sensibilidad en la detección del estado portador como una ayuda valiosa al exámen de los cultivos. La cantidad de *Taylorella* transportada mecánicamente por los sementales puede ser muy baja y puede perderse mediante los frotis de cultivo, pero puede ser detectada después de la multiplicación en las yeguas cuyas crías han sido examinadas. El uso de las pruebas de la manada como una herramienta de diagnóstico puede ser especialmente importante en países que están considerados libres de la metritis equina contagiosa.

Ocasionalmente, las membranas urogenitales de los sementales y las yeguas pueden ser colonizadas de manera persistente por otra bacteria que interfiere con el diagnóstico, y será necesario eliminarla mediante un

¹ Por ejemplo, Mast Diagnostics, Mast House, Cerby Road, Bootle, Merseyside L20 1EA, Reino Unido (UK), y Lab M, Tonley House, Wash lane, Bury BL9 6AU, UK

lavado y el tratamiento con antibióticos. La recogida del frotis para el aislamiento de *T. equigenitalis* no deberá comenzar hasta al menos 7 días después de que el tratamiento se ha detenido.

La utilización del medio Timoney (31), descrito anteriormente, podría superar esta dificultad en la mayoría de los casos. Es importante resaltar que, junto a cada una de las pruebas diarias, las placas adicionales deben inocularse con un cultivo de *T. equigenitalis* para comprobar que cada lote de medio permitirá el crecimiento.

Las placas deben incubarse a 35–37°C en una atmósfera del 5–10% (v/v) de CO₂, o mediante el uso de una jarras de anaerobios. Normalmente, se necesitan al menos 72 horas antes de que las colonias de *T. equigenitalis* se hagan visibles y, después de ese tiempo, es necesario realizar una inspección diaria. La detección visual de las colonias puede llevar hasta 24 días (35). Es aconsejable un periodo estándar de incubación de 7 días después de las primeras 24 horas de incubación. Las colonias de *T. equigenitalis* pueden ser de hasta 2–3 mm de diámetro, suaves, con el borde entero, brillantes y amarillo/grisáceas. Los laboratorios deberían estar informados de que algunos países requieren el periodo de incubación prolongado como procedimiento estándar, y deberían, por lo tanto, establecer, los requisitos concretos para la importación y/o indicar el periodo de incubación en el que se basa la evidencia obtenida en los cultivos.

Taylorella equigenitalis es un bacilo o coco-bacilo Gram-negativo inmóvil que a menudo es pleomórfico (hasta 6 µm de largo) y puede presentar una tinción bipolar. Es catalasa positiva, fosfatasa positiva y oxidasa positiva muy fuerte (ver la ref. 5 para encontrar los métodos para determinar las actividades catalasa, fosfatasa y oxidasa). Por otra parte, es inerte en las pruebas de actividad bioquímica. Si se aísla un microorganismo de crecimiento lento que cumple la descripción en cuanto a la morfología celular y que es oxidasa positivo fuerte, debería ensayarse para comprobar su reacción con un antisuero específico de *T. equigenitalis*.

Se han diseñado un número de pruebas de serotipificación que varían en cuanto a su complejidad desde la aglutinación en porta hasta la inmunofluorescencia indirecta. Cada método tiene sus ventajas e inconvenientes. La desventaja de la prueba de aglutinación en porta es que, ocasionalmente, tiene lugar la autoaglutinación de los aislamientos; el cultivo, en presencia de atmósfera de CO₂, en contraposición a la jarras de anaerobiosis, puede reducir la autoaglutinación (29). Se ha sugerido que la inmunofluorescencia puede emplearse para identificar los aislados autoaglutinantes; algunos técnicos han descrito reacciones cruzadas con *Mannheimia haemolytica*, pero son muy poco frecuentes. Si se sospecha la existencia de una reacción cruzada, puede ser necesario repetir la prueba empleando antisuero adsorbido (29). La prueba de inmunofluorescencia puede mejorarse mediante el empleo de anticuerpos monoclonales, disponibles actualmente².

El antisuero se produce mediante la vacunación de conejos con células muertas de *T. equigenitalis*. Pueden emplearse distintos regímenes de inmunización, oscilando entre aquellos que se utilizaron para producir antisueros para la tipificación de *Escherichia coli* (26), o la inmunización junto con un adyuvante, como el adyuvante incompleto de Freund. Se encuentran disponibles comercialmente anticuerpos monoclonales que permiten una forma muy específica de detección de *T. equigenitalis*. Debería utilizarse para la inmunización una cepa estándar, como la NCTC1184³. Sin embargo, la consideración más importante es la especificidad del antisuero producido. Debería aglutinar *T. equigenitalis*, pero no debería hacerlo con otras bacterias que podrían ser cultivadas a partir de las membranas urogenitales del caballo, incluso si su presencia es escasa. Concretamente, no debería aglutinar ningún bacilo Gram negativo y oxidasa positivo, como *Mannheimia haemolytica*, *Actinobacillus equuli*, *Bordetella bronchiseptica* (con la que *T. equigenitalis* se encuentra estrechamente relacionado, ver ref. 9), y *Pseudomonas aeruginosa*. Recientemente se ha aislado en los EE.UU otra especie de *Taylorella*, *T. asinigenitalis*, (17) a partir de un caballo semental en Europa (6). Esta nueva bacteria recientemente descrita, que no ha sido asociada con la enfermedad que ocurre de forma natural, se encuentra en el tracto genital de los burros y puede contagiar a los burros y a los caballos durante la cópula. Además las colonias poseen una morfología y unas características de cultivo similares, sino idéntica, y los mismos resultados en las pruebas bioquímicas que los utilizados para confirmar la identidad de *T. equigenitalis*. Existe incluso una reacción cruzada serológica entre los dos microorganismos. En el National Veterinary Services Laboratories (NVSL), Ames; Iowa, USA⁴, y en Veterinary Laboratories Agency (VLA), Bury St Edmunds, United Kingdom⁴, es posible la diferenciación entre *T. asinigenitalis* y *T. equigenitalis* utilizando la reacción en cadena de la polimerasa. (PCR).

Puede adquirirse un sistema de aglutinación con bolas de latex para la identificación antigénica de *T. equigenitalis*, y se basa en el empleo de anticuerpos policlonales que se preparan utilizando métodos similares a los descritos anteriormente. Este método se utiliza ampliamente por los laboratorios de análisis rutinario para la confirmación de la identidad de las colonias que crecen en el medio selectivo, y que dan una reacción bioquímica consistente con *T. equigenitalis*. Como *T. equigenitalis* es relativamente diferente antigénicamente, y durante la

2 Institut Pourquier, 326 rue de la Galera, Parc Euromedicine, 34090 Montpellier, France. E-mail: info@institut-pourquier.fr

3 Se puede obtener de National Collection of Type Cultures, Colindale, London, UK.

4 Para más información, contáctese con NVSL en NVSL, P.O. Box 844, Ames, Iowa 50010, USA. E-mail: NVSL_Concerns@aphis.usda.gov o VLA en VLA, Rougham Hill, Bury St Edmunds, IP33 2RX, UK. E-mail: bury-st-edmunds@vla.defra.gsi.gov.uk

producción del reactivo se adsorben fácilmente pequeñas cantidades del anticuerpo de reacción cruzada, la prueba ha mostrado ser muy específica y sensible. Debería insistirse en que esta prueba no diferenciará necesariamente las cepas de *T. equigenitalis* de las de *T. asinigenitalis*.

En Holanda y Japón se ha utilizado un método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar *T. equigenitalis*, y se ha comparado con los métodos de cultivo (2, 7, 10). En los correspondientes estudios se encontró un grado mucho más alto de detección mediante la PCR que en cultivo, incluso entre los caballos importados de un lugar sin evidencia previa de la infección o la enfermedad clínica por *T. equigenitalis*. Los autores propusieron que la transferencia se encuentra mucho más diseminada de lo que previamente se creía, y que la variación genética entre las cepas descubiertas recientemente (8, 18) puede relacionarse con las diferencias de patogenicidad. La PCR también se ha utilizado en el Reino Unido (11). Ha sido muy específica y capaz de detectar un número muy pequeño de *T. equigenitalis* en presencia de un gran número de bacterias, incluyendo la flora contaminante aislada en placas con medio de cultivo inoculadas con muestras del tracto urogenital equino. Recientemente en Japón se ha evaluado la aplicación de la técnica de la PCR en el campo para la erradicación de la metritis equina contagiosa. Se demostró que la PCR fue mucho más sensible que el cultivo para la detección en el campo de *T. equigenitalis* a partir de frotis genitales de caballos (2, 3, 19, 20). En 2004–2005 se desarrolló en el Reino Unido una PCR en tiempo real para utilizarla directamente en frotis genitales, y se comparó con los cultivos (34). No hubo una diferencia significativa entre la realización de la PCR directa y el cultivo, pero la PCR tuvo la ventaja añadida de la rapidez del resultado y sirvió para diferenciar a *T. equigenitalis* de *T. asinigenitalis*. Es necesario evaluar esta prometedora técnica de una forma más amplia y completa, especialmente para la detección del estado de portador en los sementales.

2. Pruebas serológicas

Ninguna prueba serológica descrita hasta la fecha podrá por sí misma, detectar la infección de manera fiable con vistas al diagnóstico y el control. Sin embargo, la prueba de la fijación del complemento se ha empleado con éxito como ayuda al cultivo de *T. equigenitalis* para el análisis de las yeguas entre los 21 y los 45 días después de ser cruzadas con un semental portador sospechoso.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y EL MATERIAL DE DIAGNÓSTICO

No existen todavía vacunas disponibles que protejan frente a la metritis equina contagiosa o prevengan la colonización por *T. equigenitalis*.

REFERENCIAS

1. ANON (1979). Report of an International CEM meeting. *Vet. Rec.*, **105**, 337–338.
2. ANZAI T., EGUCHI M., SEKIZAKI T., KAMADA M., YAMAMOTO K. & OKUDA T. (1999). Development of a PCR test for rapid diagnosis of contagious equine metritis. *J. Vet. Med. Sci.*, **61**, 1287–1292.
3. ANZAI T., WADA R., OKUDA T. & AOKI T. (2002). Evaluation of the field application of PCR in the eradication of contagious equine metritis from Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, **64**, 999–1002.
4. ATHERTON J.G. (1983). Evaluation of selective supplements used in media for the isolation of the causative organism of contagious equine metritis. *Vet. Rec.*, **113**, 299–300.
5. BARROW G.I. & FELTHAM R.K.A. (1993). Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria, Third Edition. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
6. BAVERUD V., NYSTROM C. & JOHANSSON K.-E. (2006). Isolation and identification of *Taylorella asinigenitalis* from the genital tract of a stallion, first case of a natural infection. *Vet. Microbiol.*, **116**, 294–300.
7. BLEUMINK-PLUYM N.M.C., HOUWERS D.J., PARLEVLIET J.M. & COLENBRANDER B. (1993). PCR-based detection of CEM agent. *Vet. Rec.*, **133**, 375–376.
8. BLEUMINK-PLUYM N.M.C., TER LAAK E.A. & VAN DER ZEIJST B.A.M. (1990). Epidemiologic study of *Taylorella equigenitalis* strains by field inversion gel electrophoresis of genomic restriction endonuclease fragments. *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 2012–2016.

9. BLEUMINK-PLUYM N.M.C., VAN DIJK L., VAN VLIET A.H., VAN DER GIJSEN J.W. & VAN DER ZEIJST B.A. (1993). Phylogenetic position of *Taylorella equigenitalis* determined by analysis of amplified 16S ribosomal DNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **43**, 618–621.
10. BLEUMINK-PLUYM N.M.C., WERDLER M.E.B., HOUWERS D.J., PARLEVLIET J.M., COLENBRANDER B. & VAN DER ZEIJST B.A.M. (1994). Development and evaluation of PCR test for detection of *Taylorella equigenitalis*. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 893–896.
11. CHANTER N., VIGANO F., COLLIN N.C. & MUMFORD J.A. (1998). Use of a PCR assay for *Taylorella equigenitalis* applied to samples from the United Kingdom. *Vet. Rec.*, **143**, 225–227.
12. CROWHURST R.C. (1977). Genital infection in mares. *Vet. Rec.*, **100**, 476.
13. CROWHURST R.C., SIMPSON D.J., GREENWOOD R.E.S. & ELLIS D.R. (1979). Contagious equine metritis. *Vet. Rec.*, **104**, 465.
14. DAWSON F.L.M., BENSEN J.A. & CROXTON-SMITH P. (1978). The course of serum antibody development in two ponies experimentally infected with contagious metritis. *Equine Vet. J.*, **10**, 145–147.
15. FERNIE, BATTY I., WALKER P.D., PLATT H., MACKINTOSH M.E. & SIMPSON D.J. (1980). Observations on vaccine and post-infection immunity in contagious equine metritis. *Res. Vet. Sci.*, **28**, 362–367.
16. HORSERACE BETTING LEVY BOARD (2005). Code of Practice on Contagious Equine Metritis, Equine Viral Arteritis, Equine Herpesvirus, and Guidelines on Strangles. Horserace Betting Levy Board, London, UK. <http://www.hblb.org.uk/hblbweb.nsf/Codes%20of%20Practice%202005.pdf>
17. JANG S.S., DONAHUE J.M., ARATA A.B., GORIS J., HANSEN L.M., EARLEY D.L., VANDAMME P.A., TIMONEY P.J. & HIRSH D.C. (2001). *Taylorella asinigenitalis* sp. nov., a bacterium isolated from the genital tract of male donkeys (*Equus asinus*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**, 971–976.
18. LAPAN G., AWAD-MASALMEH M., HARTIG A. & SILBER R. (1991). Investigations on *Taylorella equigenitalis*; cell wall proteins, DNA fingerprints, plasmids, adhesion and cytotoxicity. *J. Vet. Med. [B]*, **38**, 589–598.
19. MISEREZ R., FREY J., KRAWINKLER M. & NICOLET J. (1996). Identifikation und Diagnostik von *Taylorella equigenitalis* mittels einer DNA-Amplifikationsmethode (PCR). *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, **138**, 115–120.
20. MOORE J.E., BUCKLEY T.C., MILLAR B.C., GIBSON P., CANNON G., EGAN C., COSGROVE H., STANBRIDGE S., ANZAI T., MATSUDA M. & MURPHY P.G. (2001). Molecular surveillance of the incidence of *Taylorella equigenitalis* and *Pseudomonas aeruginosa* from horses in Ireland by sequence-specific PCR. *Equine Vet. J.*, **33**, 319–322.
21. PLATT H., ATHERTON J.G., DAWSON F.L.M. & DURRANT D.S. (1978). Developments in contagious equine metritis. *Vet. Rec.*, **102**, 19.
22. PLATT H., ATHERTON J.G., SIMPSON D.J., TAYLOR C.E.D., ROSENTHAL R.O., BROWN D.F.J. & WREGHITT T.G. (1977). Genital infection in mares. *Vet. Rec.*, **101**, 20.
23. ROGERSON B.A., CONDRON R.J., BAKER J. & CRAVEN J.A. (1984). Experimental infection of mares with *Haemophilus equigenitalis*. *Aust. Vet. J.*, **61**, 392–395.
24. SAHU S.P., DARDIRI A.H., ROMMEL F.A. & PIERSON R.E. (1979). Survival of contagious equine metritis bacteria in transport media. *Am. J. Vet. Res.*, **40**, 1040–1042.
25. SCHLUTER H., KULLER H., FREIDREICH U., SELBITZ H., MARWITZ T., BEYER C. & ULLRICH E. (1991). Epizootiology and treatment of contagious equine metritis (CEM), with particular reference to the treatment of infected stallions. *Prakt. Tierarzt.*, **72**, 503–511.
26. SOJKA W.J. (1965). *Escherichia coli* in Domestic Animals and Poultry. *Commonwealth Review Series No.7*.
27. SWANEY L.M. & SAHU S.P. (1978). CEM: bacteriological methods. *Vet. Rec.*, **102**, 43.
28. SWERCZEK T.W. (1978). Inhibition of the CEM organism by the normal flora of the reproductive tract. *Vet. Rec.*, **103**, 125.

29. TER LAAK E.A. & WAGENAARS C.M.F. (1990). Autoagglutination and the specificity of the indirect fluorescent antibody test applied to the identification of *Taylorella equigenitalis*. *Res. Vet. Sci.*, **49**, 117–119.
30. TIMONEY P.J. & POWELL D.G. (1982). Isolation of the contagious equine metritis organism from colts and fillies in the United Kingdom and Ireland. *Vet. Rec.*, **111**, 478–482.
31. TIMONEY P.J., SHIN S.J. & JACOBSON R.H. (1982). Improved selective medium for isolation of the contagious equine metritis organism. *Vet. Rec.*, **111**, 107–108.
32. TIMONEY P.J., WARD J. & KELLY P. (1977). A contagious genital infection of mares. *Vet. Rec.*, **101**, 103.
33. TIMONEY P.J., WARD J. & MCARDLE J.F. (1978). CEM and the foaling mare. *Vet. Rec.*, **102**, 246–247.
34. WAKELEY P.R., ERRINGTON J., HANNON S., ROEST H.I.J., CARSON T., HUNT B. & HEATH P. (2006). Development of a real time PCR for the detection of *Taylorella equigenitalis* directly from genital swabs and discrimination from *T. asinigenitalis*. *Vet. Microbiol.*, **118**, 247–254.
35. WARD J., HOURIGAN M., MCGUIRK J. & GOGARTY A. (1984). Incubation times for primary isolation of contagious equine metritis organism. *Vet. Rec.*, **114**, 298.

*
* *

NB: Existen laboratorios de referencia de la OIE para la metritis equina contagiosa (Véase el cuadro en la parte 3 de este *Manual de animales terrestres* o consultese la lista más actualizada en la página web de la OIE: www.oie.int).

CAPÍTULO 2.5.8.

MUERMO

RESUMEN

*El muermo es una enfermedad contagiosa fatal de los caballos, burros y mulas, y es causada por la infección con la bacteria *Burkholderia mallei* (este nombre ha sustituido recientemente al de *Pseudomonas mallei*, y la bacteria se ha clasificado previamente como *Pfeifferella*, *Loefflerella*, *Malleomyces* o *Actinobacillus*). La enfermedad provoca nódulos y ulceraciones en el tracto respiratorio superior y en los pulmones. También se presenta una forma de la enfermedad que afecta a la piel y se conoce como "farcy". El control del muermo requiere ensayos en los casos clínicos sospechosos, el examen de los équidos aparentemente normales y la eliminación de los animales positivos. Se transmite a los humanos, por lo que todo el material infectado o potencialmente infectado debe manejarse en un laboratorio que cumpla los requisitos para la Contención de los Patógenos del Grupo 3.*

Identificación del agente: Los frotis obtenidos a partir de material fresco pueden revelar la presencia de bacilos Gram-negativos, no esporulados y no encapsulados. Se ha demostrado la existencia de una cubierta parecida a una cápsula mediante microscopía electrónica. La bacteria crece de forma aeróbica y prefiere los medios de cultivo que contienen glicerol. A diferencia de las especies de *Pseudomonas*, *Burkholderia mallei* no es móvil. Los cobayas son fuertemente susceptibles, y los machos se utilizan para ensayar la presencia de material potencialmente infectado. Se administran inyecciones intraperitoneales para intentar provocar la reacción de Strauss (orquitis).

Pruebas serológicas y de la maleína: La prueba de la maleína es un ensayo clínico sensible y específico para detectar el muermo. La maleína, una fracción proteica del organismo, se inyecta intradermopalpebralmente o se administra mediante gotas. En los animales infectados el párpado se hincha de forma clara en 1-2 días. Los ensayos serológicos más precisos y fiables para su empleo en el diagnóstico son un ensayo de fijación del complemento y un enzimoinmunoensayo. Recientemente se ha desarrollado en Rusia un ensayo de aglutinación con rosa de bengala que sólamente se ha validado en este país.

Requisitos para las vacunas y los materiales de diagnóstico: No existen vacunas. Actualmente, el derivado proteico purificado de maleína se encuentra disponible comercialmente en institutos de los Países Bajos y Rumanía (ver nota al pie 1).

A. INTRODUCCIÓN

El muermo es una enfermedad bacteriana con potencial zoonósico conocida desde tiempos antiguos, que afecta a los perisodáctilos o los ungulados con pezuña no partida, y que es causada por la infección con la bacteria *Burkholderia mallei* (este nombre ha sustituido recientemente al de *Pseudomonas mallei* (25), y la bacteria se clasificó previamente como *Pfeifferella*, *Loefflerella*, *Malleomyces* o *Actinobacillus*). Pueden aparecer brotes de esta enfermedad en miembros de la familia de los gatos que viven de forma silvestre o en los parques zoológicos. Se ha demostrado la existencia de susceptibilidad al muermo en los camellos, osos, lobos y perros. Los carnívoros pueden infectarse mediante ingestión de carne contaminada, pero el ganado vacuno, ovino y porcino son resistentes (16). La forma aguda del muermo se da con mayor frecuencia en los burros y las mulas, los cuales sufren de fiebre alta y presentan síntomas respiratorios (orificios nasales hinchados, disnea y neumonía); la muerte se produce en pocos días. En los caballos, el muermo sigue generalmente un curso crónico y los animales pueden sobrevivir durante varios años. Los casos crónicos y subclínicos "ocultos" constituyen fuentes peligrosas de infección.

En los orificios nasales de los caballos se desarrollan nódulos inflamados y úlceras que dan lugar a una secreción amarilla pegajosa, acompañada de un aumento del tamaño de los nódulos linfáticos submaxilares. Después de la cicatrización de las úlceras, aparecen cicatrices estrelladas. La formación de abscesos nodulares en los pulmones se presenta acompañada de una debilidad progresiva, episodios de fiebre, tos y disnea. También pueden aparecer diarrea y poliuria. En su forma epitelial (“farcy”), los nódulos linfáticos están agrandados y se desarrollan abscesos nodulares (“yemas”) de 0,5 a 2,5 cm, que se ulceran y liberan un pus amarillo graso. Las secreciones del tracto respiratorio y la piel son infectivas, y, la transmisión entre animales, que se ve facilitada por el contacto estrecho, tiene lugar mediante inhalación, ingestión de material contaminado (p. ej. a partir de comederos con alimentos y agua contaminados), o mediante inoculación (p. ej. por medio de un arnés). El periodo de incubación dura desde unos pocos días hasta muchos meses (17).

El muermo es transmisible a los humanos por contacto directo con animales enfermos u objetos infectados. En la enfermedad aguda sin tratar puede producirse un 95% de mortalidad en tres semanas. Sin embargo es posible la supervivencia si la persona infectada se trata pronto y de manera agresiva con un terapia antibiótica múltiple y sistémica (11, 19). También tiene lugar una forma crónica de la enfermedad con abscesos. Cuando se manejen animales infectados sospechosos, conocidos, o fomites, deberían tomarse precauciones estrictas para prevenir la autoinfección o la transmisión de la bacteria a otros équidos. Las muestras de laboratorio deberían almacenarse de manera segura, mantenerse frías y transportarse como se indica en el Capítulo I.1.1. de este *Manual de animales terrestres*. Todas las manipulaciones con material potencialmente infectado deben realizarse en un laboratorio que cumpla los requisitos para la Contención de los patógenos del Grupo 3, como se indica en el Apéndice I.1.6.1 del Capítulo I.1.6 de este *Manual de animales terrestres*.

El muermo ha sido erradicado de muchos países de manera legal, mediante la eliminación de los animales infectados y restricciones en la importación. Persiste en algunos países asiáticos, africanos y de América del Sur.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

1. Identificación del agente

Los casos destinados a la investigación específica del muermo deberían distinguirse de otras infecciones crónicas de la mucosa nasal o los senos nasales, y de la papera equina (infección con *Streptococcus equi*), linfangitis ulcerosa (*Corynebacterium pseudotuberculosis*), pseudotuberculosis (*Yersinia pseudotuberculosis*) y sporotrichosis (*Sporotrichium* spp.) mediante pruebas clínicas. El muermo debería descartarse definitivamente en los casos sospechosos de linfangitis epizoótica (debida a *Histoplasma farciminosum*), con la que presenta muchas similitudes. En concreto, en los seres humanos el muermo debería distinguirse de la melioidosis (infección por *B. pseudomallei*), que es debida a un organismo con gran parecido a *B. mallei* (16).

a) Morfología de *Burkholderia mallei*

Los organismos son bastante numerosos en los frotis de las lesiones frescas, aunque en las lesiones viejas son escasos (22). Deberían teñirse con azul de metileno o con la tinción de Gram. Los organismos son bacilos Gram-negativos bastante claros, principalmente extracelulares y con los extremos redondeados, de 2–5 µm de largo y 0,3–0,8 µm de ancho y con inclusiones granulares de varios tamaños; a menudo se tiñen irregularmente y no tienen cápsulas ni forman esporas. Mediante microscopía electrónica se ha establecido la presencia de una cubierta similar a una cápsula. Esta cápsula está compuesta por carbohidratos neutros y sirve para proteger a la célula frente a factores ambientales desfavorables. A diferencia de otros organismos del grupo *Pseudomonas*, *Burkholderia mallei* no tiene flagelos y por tanto no es móvil (13). Los organismos son difíciles de mostrar en secciones de tejido, donde pueden presentar una apariencia globular (15). En los medios de cultivo varía su apariencia, que depende de la edad del cultivo y el tipo de medio. En los cultivos viejos existe un pleomorfismo claro. Forman filamentos ramificados en la superficie de los medios de cultivo.

b) Características de cultivo

Es preferible intentar el aislamiento a partir de lesiones no abiertas y sin contaminar (15). El organismo es aeróbico y, opcionalmente, anaerobio solamente en presencia de nitrato (6, 13), creciendo de forma óptima a 37°C (14). Crece bien aunque lentamente en medios de cultivo ordinarios y se recomienda la incubación de los cultivos durante 48 horas; el enriquecimiento con glicerol es particularmente útil. Después de unos pocos días en agar con glicerol se observa un crecimiento confluyente con un color ligeramente cremoso, de aspecto liso, húmedo y viscoso. El cultivo se engrosa si la incubación es prolongada, y se vuelve marrón oscuro y duro. También crece bien en agar-glicerol-patata y en caldo con glicerol, en los que forma unas bolitas viscosas. En agar nutritivo, el crecimiento es mucho menos exuberante, y, en gelatina, el crecimiento es pobre (20).

Deberían utilizarse aislamientos frescos para las reacciones de identificación porque pueden surgir alteraciones en las propiedades de los cultivos *in-vitro*. *B. mallei* acidifica ligeramente la leche tornasolada, y puede producir su coagulación después de una incubación larga. El organismo reduce los nitratos. Aunque algunos investigadores han descrito que la glucosa es el único carbohidrato fermentable, otros han mostrado que si se emplean un medio y un indicador adecuados, *B. mallei* fermenta consistentemente la glucosa y otros carbohidratos como la arabinosa, fructosa, galactosa y manosa (5). *B. mallei* no produce indol, no hemoliza la sangre de caballo y los cultivos no producen pigmentos difusibles (13). Puede utilizarse un sistema de ensayo comercial de laboratorio (p. ej. API [Indice de Perfil Analítico]: Analytab Products, BioMerieux o Biolog [Hayward, California]) para realizar una confirmación sencilla de que el organismo pertenece al grupo *Pseudomonas*. La falta de movilidad tienen entonces una relevancia especial. Existe un bacteriófago específico disponible para fagotipar *B. mallei* (23).

Todos los medios de cultivo preparados deberían someterse a un control de calidad y favorecer el crecimiento del organismo a partir de un inóculo pequeño. La cepa de referencia debería sembrarse en paralelo con las muestras sospechosas para asegurar que los ensayos están funcionando correctamente.

El suplemento de los medios con sustancias que inhiben el crecimiento de organismos Gram positivos (p. ej. cristal violeta, proflavina) ha resultado ser útil en las muestras contaminadas, al igual que el pretratamiento con penicilina (1.000 unidades/ml durante 3 horas a 37°C) (22). Se ha desarrollado un medio selectivo (24) compuesto por polimixina E (1.000 unidades), bacitracina (250 unidades) y actidiona (0,25mg) incorporadas en agar triptona (0,1%), o en agar nutritivo (100 ml), que contiene glicerina (4%), suero de burro o caballo (10%) y hemoglobina ovina.

Fuera del cuerpo, el organismo presenta poca resistencia frente a la desecación, el calor, la luz o los reactivos químicos, de manera que es poco probable su supervivencia después de dos semanas. Sin embargo, probablemente puede sobrevivir unos pocos meses en condiciones favorables. *Burkholderia mallei* puede permanecer viable en el agua corriente durante al menos 1 mes (20). El cloruro de benzalconio o "roccal" (1/2.000), hipoclorito sódico (500 ppm como cloro disponible), yodo, cloruro mercuríco en alcohol y el permanganato potásico han demostrado ser muy efectivos para la desinfección de *B. mallei* (14). Los desinfectantes fenólicos son menos efectivos.

c) Inoculación en animales de laboratorio

Cuando ha sido necesario se han utilizado cobayas, hamsters y gatos para el diagnóstico. Si se considera inevitable el aislamiento en un animal de laboratorio, el material sospechoso se inocula intraperitonealmente en un cobaya macho. El material positivo provocará peritonitis severa localizada y orquitis (la reacción de Strauss). El número de organismos y su virulencia determina la gravedad de las lesiones. Cuando la muestra de prueba se encuentra fuertemente contaminada, se emplean pasos adicionales (7). La reacción de Strauss no es específica del muermo ya que otros organismos pueden provocarla. El examen bacteriológico de los testículos infectados, debería confirmar la especificidad de la respuesta obtenida.

d) Otros métodos

Se han producido avances recientes en la aplicación de las técnicas de biología molecular para la detección del muermo. Se ha desarrollado una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección específica del ADN de *B. mallei* (2), y que permite la diferenciación entre *B. mallei* y *B. pseudomallei*. La técnica todavía no ha sido validada por completo ni ha conseguido una aceptación amplia. Sin embargo, la PCR presenta el potencial de ser un método rápido y seguro para confirmar la infección. Los métodos para distinguir entre *B. mallei* y *B. pseudomallei* son muy importantes, ya que dicha distinción no puede conseguirse con precisión con las pruebas serológicas actuales.

2. Pruebas serológicas y de la maleína

a) Prueba de la maleína (prueba prescrita para el comercio internacional)

El derivado proteico purificado (DPP) de la maleína, que se encuentra disponible comercialmente, consiste en una solución de fracciones proteicas solubles en agua de *B. mallei* tratadas con calor. El ensayo depende de que los caballos infectados sean hipersensibles a la maleína. Los casos clínicos avanzados en caballos y los casos agudos en los burros y las mulas pueden proporcionar resultados no concluyentes que necesiten el empleo de métodos adicionales de diagnóstico (1).

• **El ensayo intradermoparpebral**

Es el ensayo más sensible, fiable y específico para detectar perisodáctilos o ungulados de pezuña no partida infectados, y ha desplazado mayoritariamente a los ensayos oftálmico y subcutáneo (3): se inyectan

intradérmicamente en el párpado inferior 0,1 ml de concentrado DPP de maleína, y la prueba se lee a las 24 y 48 horas. La reacción positiva se caracteriza por una hinchazón edematosas marcada del párpado, y puede presentarse una secreción purulenta desde el canthus interno o la conjuntiva. Normalmente, ello viene acompañado por un aumento en la temperatura. Normalmente, en una respuesta negativa no existe reacción, o sólo se observa una ligera hinchazón del párpado inferior.

- **El ensayo oftálmico**

Es menos fiable que el ensayo intradermoparpebral. Se depositan unas gotas de maleína sobre el ojo en el canthus. En un animal infectado se hinchan los párpados y, a veces, un lado de la cara, y puede presentarse una pequeña secreción en el ojo. La reacción puede ocurrir también en el ojo opuesto, aunque en menor proporción.

- **El ensayo subcutáneo**

Esta prueba interfiere con diagnósticos serológicos posteriores, por lo que son preferibles los otros dos ensayos de la maleína. Además, puede que este ensayo no sea aceptable en algunos países. La temperatura de los caballos debe encontrarse por debajo de los 38,8°C (104°F) el día anterior al ensayo, en el momento de la inyección, y 9, 12 y 15 horas después de la inyección. Se trasquila un pedazo de piel de 10 cm cuadrados del medio del cuello y se desinfecta; se inyectan subcutáneamente en el centro de la piel 2,5 ml de maleína diluida. En un ensayo positivo, el caballo desarrolla una pirexia de 40°C (120°F) o más elevada durante las primeras 15 horas, y, en 24 horas, se desarrolla una hinchazón dolorosa con los bordes elevados en el sitio de la inyección. En los caballos que no padecen muermo la hinchazón local transitoria no existe o es mínima. Los animales dudosos pueden reensayarse después de 14 días empleando una dosis doble de maleína.

b) Prueba de fijación de complemento (FC) (prueba prescrita para el comercio internacional)

Aunque nos es tan sensible como la prueba de la maleína, la prueba FC constituye un ensayo serológico preciso que se ha empleado durante muchos años para el diagnóstico del muermo (3). Se ha descrito que posee un 90–95% de exactitud, y los sueros son positivos dentro de la primera semana posterior a la infección y siguen siéndolo en caso de exacerbarse el proceso crónico (20).

- **Preparación del antígeno (10)**

- Se inoculan frascos que contienen infusión de carne más un 3% de glicerol con un cultivo en fase exponencial de *B. mallei*, y se incuban a 37°C durante 8–12 semanas.
- Los cultivos se inactivan exponiendo los frascos a corriente de vapor (100°C) durante 60 minutos.
- El sobrenadante se decanta y se filtra. El filtrado se calienta otra vez mediante exposición a corriente de vapor durante 75 minutos en tres días consecutivos, y se clarifica mediante centrifugación.
- El producto clarificado se concentra a un décimo de su volumen original mediante evaporación en un baño de agua o vapor.
- El antígeno concentrado se envasa en botellas opacas para protegerlo de la luz y se almacena a 4°C. Se ha demostrado que el antígeno es estable durante al menos 10 años en forma concentrada.
- Se preparan lotes de antígeno diluyendo el antígeno concentrado 1/20 con tampón salino estéril más fenol al 0,5%. El antígeno diluido se dispensa en viales de vidrio opaco y se almacena a 4°C. La dilución final de trabajo se determina mediante titulación en serie. La dilución final de trabajo para su empleo en la prueba de FC se prepara en el momento en que se realiza el ensayo.

El antígeno resultante contiene fundamentalmente lipopolisacárido. Un procedimiento alternativo consiste en emplear cultivos jóvenes, creciendo el organismo en tubos inclinados con agar–glicerol y lavándolos con suero salino. Se calienta una suspensión del cultivo durante 1 hora a 70°C y la suspensión bacteriana tratada con calor se emplea como antígeno. La desventaja de este método de preparación de antígeno es que contiene todos los componentes de la célula bacteriana. Debería comprobarse la inocuidad del antígeno inoculando placas de agar–sangre.

- **Procedimiento del ensayo (18)**

- El suero se diluye 1/5 en tampón salino con veronal (ácido barbitúrico) que contiene gelatina al 0,1% (VBSG) o DFC (diluyente para fijación de complemento–disponible en forma de tabletas) sin gelatina.
- El suero diluido se inactiva durante 30 minutos a 56°C. (El suero de otros équidos distintos al caballo debería inactivarse a 63°C durante 30 minutos.)

- iii) Se preparan diluciones medias de los sueros en placas de microtitulación con fondo redondo.
- iv) El complemento del cobaya se diluye en el tampón escogido (elegido) y se emplean 5 (u opcionalmente 4) unidades hemolíticas-50% de complemento (HC_{50}).
- v) Los sueros, el complemento y el antígeno se mezclan en las placas y se incuban 1 hora a 37°C. (Un procedimiento aceptable es la incubación durante toda la noche a 4°C.)
- vi) Se añade una suspensión al 2% de células rojas de oveja sensibilizadas y lavadas.
- vii) Las placas se incuban durante 45 minutos a 37°C, y a continuación se centrifugan durante 5 minutos a 600 g.

Una muestra que produce un 100% de hemólisis a la dilución 1/5 es negativa, 25–75% de hemólisis es sospechosa, y la ausencia de hemólisis (100% de fijación) es positiva. Desafortunadamente, pueden producirse falsos positivos, y *B. mallei* y *B. pseudomallei* presentan reacción cruzada y no pueden diferenciarse mediante serología (3). Además, los caballos sanos pueden dar una reacción FC de falso positivo durante un tiempo variable después de un ensayo intradérmico de maleína.

c) Enzimoinmunoensayos

Se han descrito enzimoinmunoensayos (ELISAs) tanto en placa como en membrana (“blot”) para el serodiagnóstico del muermo, pero ninguno de estos protocolos ha podido diferenciar serológicamente entre *B. mallei* y *B. pseudomallei*. La aproximación mediante transferencia (“blotting”) ha supuesto el empleo de métodos de transferencia tipo “Western” en línea y a partir de muestras separadas electroforéticamente (8, 21). También se ha desarrollado un ELISA competitivo que utiliza un anticuerpo monoclonal anti-lipopolisacárido y ha mostrado un rendimiento similar al de la prueba de FC (9). El desarrollo de anticuerpos monoclonales específicos frente a componentes antigenicos de *B. mallei* ofrece el potencial para la consecución futura de ELISAs más específicos que ayudarán a resolver resultados cuestionables en caballos importados sometidos a cuarentena (4, 12). De momento, no se ha validado ninguna de estas pruebas.

d) Otras pruebas serológicas

Se ha descrito un ELISA de transferencia con avidina-biotina (21), pero todavía no se ha utilizado extensamente ni se ha validado. El antígeno consiste en un cultivo bacteriano inactivado por calor que ha sido concentrado y purificado. Se deposita una gota de este antígeno en una tira de nitrocelulosa que se emplea para detectar anticuerpo frente a *B. mallei* en el suero equino. Empleando tiras con antígeno y prebloqueadas el ensayo se puede completar en aproximadamente 1 hora. Pueden emplearse suero o sangre entera para realizar el ensayo, y la hemólisis parcial no produce ningún color de fondo en la zona cargada con el antígeno sobre la nitrocelulosa.

Se ha descrito un ensayo de aglutinación en placa con rosa bengala (RBT) para el diagnóstico del muermo en caballos y otros animales susceptibles; dicho ensayo sólo ha sido validado en Rusia. El antígeno consiste en una suspensión bacteriana coloreada con rosa de bengala y se emplea en un ensayo de aglutinación en placa.

La precisión de los ensayos de aglutinación y precipitina no es adecuada para su empleo en programas de control. Los caballos con muermo crónico y los de salud debilitada dan lugar a resultados negativos o no concluyentes.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y LOS MATERIALES DE DIAGNÓSTICO

No existen vacunas disponibles.

El DPP de maleína que se utiliza en los ensayos intradermoparpebral y oftálmico es producido comercialmente por dos institutos¹.

El ID-Lelystad ha proporcionado la siguiente información sobre los requerimientos para el DPP de maleína.

¹ Institute for Animal Science and Health (ID-Lelystad), Edelhertweg 15, 8219 PH, Lelystad, Países Bajos, y Min Agr Si Industr. Institut Die Cercertari Si Biopreparate “Pasteur”, R-7000-Bucuresti, 77.826 SOS Giulesti Nr 333, Rumania.

1. Control del inóculo

Se emplean tres cepas de *Burkholderia mallei* para la producción de DPP de maleína, la cepa Bogor (originaria de Indonesia), la cepa Mukteswar (India) y la cepa Zagreb (Yugoslavia). El material del inóculo se mantiene como un concentrado de cultivos congelados. Las cepas se cultivan en agar glicerol a 37°C durante 1–2 días. Las cepas pueden pasarse por cobayas para mantener la virulencia y antigenicidad.

2. Método de fabricación

El medio de Dorset–Henley enriquecido con la adición de elementos traza se utiliza para la producción del DPP de maleína. El medio líquido se inocula con una suspensión salina densa de *B. mallei* crecido en agar glicerol. El medio de producción se incuba a 37°C durante aproximadamente 10 semanas. Las bacterias se matan por corriente de vapor durante 3 horas en un autoclave. El fluido se pasa a través de una capa de algodón para quitar los grumos de bacterias. El fluido turbio resultante se clarifica mediante filtración a través de membrana, y a nueve partes de filtrado se les añade inmediatamente una parte de ácido tricloroacético al 40%. La mezcla se deja en reposo durante la noche, depositándose un precipitado parduzco a grisáceo.

El líquido sobrenadante se pipetea y se desecha. El precipitado se centrifuga durante 15 minutos a 2.500 **g** y la capa de precipitado se lava tres o más veces en una solución de NaCl al 5% pH 3, hasta que el pH es de 2,7. El precipitado lavado se disuelve agitando con un volumen mínimo de un solvente alcalino. El fluido es marrón oscuro y debería conseguirse un pH final de 6,7. El precipitado de maleína tiene que centrifugarse cuidadosamente y el sobrenadante se diluye con un volumen igual de un tampón glucosado. El contenido en proteína de este producto se estima mediante el método de Kjeldahl, y se liofiliza una vez dispensado en ampollas.

3. Control del proceso

Durante el periodo de incubación se inspeccionan los frascos con frecuencia para observar cualquier signo de contaminación, y se desechan los frascos sospechosos. Un crecimiento típico de cultivos de *B. mallei* muestra turbidez, sedimentación, algún crecimiento en superficie con tendencia al hundimiento, y la formación de un anillo llamativo de color ligeramente anaranjado a lo largo del margen sobre la superficie del medio.

4. Control del lote

Cada lote de DPP de maleína se ensaya en cuanto a su esterilidad, inocuidad, presencia de conservantes, contenido en proteína y potencia.

El ensayo de esterilidad se realiza de acuerdo con las instrucciones de la Farmacopea Europea.

El examen de la inocuidad se lleva a cabo en 5–10 caballos normales y sanos, realizando el ensayo intradermoparpebral. La hinchazón resultante debería ser, apenas detectable y transitoria, sin signo alguno de flujo conjuntival.

Los preparados que contienen fenol como conservante no deberían contener más de un 0,5% (w/v) de fenol. El contenido en proteína no debería ser menor de 0,95 mg/ml ni mayor de 1,05 mg/ml.

El ensayo de potencia se realiza en cobayas y caballos. Los animales se sensibilizan mediante inyección subcutánea con una suspensión concentrada de *B. mallei* en aceite de parafina o adyuvante de Freund incompleto e inactivada por calor. En lugar de los caballos también puede utilizarse el ganado vacuno. El lote de producción se ensaya *in vivo* frente a un DPP de maleína estándar mediante inyección intradérmica de dosis de 0,1 ml, de manera completamente aleatoria.

Se miden las distintas superficies con eritema en los cobayas después de 24 horas, y el aumento en el grosor de la piel en los caballos se mide mediante calibradores. Los resultados se valoran estadísticamente, empleando métodos estadísticos estándar para ensayos en paralelo.

REFERENCIAS

1. ALLEN H. (1929). The diagnosis of glanders. *J. R. Army Vet. Corps*, **1**, 241–245.
2. BAUERNFEIND A., ROLLER C., MEYER D., JUNGWIRTH R. & SCHNEIDER I. (1998). Molecular procedure for rapid detection of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 2737–2741.

3. BLOOD D.C. & RADOSTITS O.M. (1989). Diseases caused by bacteria. *En: Veterinary Medicine*, Seventh Edition. Balliere Tindall, London, UK, 733–735.
4. BURTNICK M.N., BRETT P.J. & WOODS D.E. (2002). Molecular and physical characterization of *Burkholderia mallei* O antigens. *J. Bacteriol.*, **184**, 849–852.
5. EVANS D. (1966). Utilization of carbohydrates by *Actinobacillus mallei*. *Can. J. Microbiol.*, **12**, 625–639.
6. GILARDI G.L. (1985). *Pseudomonas*. *En: Manual of Clinical Microbiology*, Fourth Edition, Lenette E.H., Bulawo A., Hausler W.J. & Shadomy H.J., eds. American Society for Microbiology, Washington DC, USA, 350–372.
7. GOULD J.C. (1950). Mackie and McCartney's Handbook of Bacteriology, Eighth Edition, Cruickshank R., ed. E. & S. Livingstone, Edinburgh, UK, 391–394.
8. KATZ J.B., CHIEVES., 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.
9. KATZ J., 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.
10. KELSER R.A. & REYNOLDS F.H.K. (1935). Special veterinary laboratory methods, complement fixation test for glanders. *En: Laboratory Methods for the United States Army*, Simons J.S. & Gantzkow C.J., eds. Lea and Febiger, Philadelphia, USA, 973–987.
11. KHAN A.S. & ASHFORD D.A. (2001). Ready or not – Preparedness for bioterrorism. *New Engl. J. Med.*, **345**, 287–289.
12. KHRAPOVA N.P., TIKHONOV N.G., PROKHVATILOVA E.V. & KULAKOV M.I. (1995). The outlook for improving the immunoglobulin preparations for the detection and identification of the causative agents of glanders and melioidosis. *Med. Parazitol.*, **4**, 49–53.
13. KRIEG N.R. & HOLT J.G., EDS (1984). Gram-negative aerobic rods and cocci. *En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, USA & London, UK, 174–175.
14. MAHADERAN S., DRAVIDAMANI S. & DARE B.J. (1987). Glanders in horses. *Centaurus*, **III**, 135–138.
15. MILLER W., PANNEL L., CRAVITZ L., TANNER A. & INGALLS M. (1948). Studies on certain biological characteristics of *Malleomyces mallei* and *Malleomyces pseudomallei* I. Morphology, cultivation, viability, and isolation from contaminated specimens. *J. Bacteriol.*, **55**, 115–126.
16. MINETT F.C. (1959). Glanders (and melioidosis). *En: Infectious Diseases of Animals*. Vol. 1. Diseases due to Bacteria, Stableforth A.W. & Galloway I.A., eds. Butterworths Scientific Publications, London, UK, 296–309.
17. MONLUX W.S. (1984). Diseases affecting food and working animals. *En: Foreign Animal Diseases*. United States Department of Agriculture, US Government Printing Office, Washington DC, USA, 178–185.
18. NATIONAL VETERINARY SERVICES LABORATORIES (1997). Complement Fixation Test for Detection of Antibodies to *Burkholderia mallei* – Microtitration Test. United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, National Veterinary Services Laboratories, Ames, Iowa, USA.
19. SRINIVASAN A., KRAUS C.N., DESHAZER D., BECKER P.M., DICK J.D., SPACEK L., BARTLETT J.G., BYRNE W.R. & THOMAS D.L. (2001). Glanders in a military research microbiologist. *New Engl. J. Med.*, **345**, 256–258.
20. STEELE J.H. (1980). Bacterial, rickettsial and mycotic diseases. *En: CRC Handbook Series in Zoonoses*, Section A, Vol. I, Steele J.H., ed. CRC Press, Boca Raton, USA, 339–351.
21. VERMA R.D., SHARMA J.K., VENKATESWARAN K.S. & BATRA H.V. (1990). Development of an avidin–biotin dot enzyme–linked immunosorbent assay and its comparison with other serological tests for diagnosis of glanders in equines. *Vet. Microbiol.*, **25**, 77–85.

22. WILSON G.S. & MILES A.A. (1964). Glanders and melioidosis. En: Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity. E. Arnold, London, UK, 1714–1717.
23. WOODS D.E., JEDDELOH J.A., FRITZ D.L. & DESHAZER D. (2002). *Burkholderia thailandensis* E125 harbors a template bacteriophage specific for *Burkholderia mallei*. *J. Bacteriol.*, **184**, 4003–4017.
24. XIE X., XU F., XU B., DUAN X. & GONG R. (1980). A New Selective Medium for Isolation of Glanders Bacilli. Collected papers of veterinary research. Control Institute of Veterinary Biologics, Ministry of Agriculture, Peking, China (People's Rep. of), **6**, 83–90.
25. YABUCHI E., KOSAKO Y., OYAIZU H., YANO I., HOTTA H., HASHIMOTO Y., EZAKI T. & ARAKAWA M. (1992). Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol. Immunol.*, **36**, 1251–1275.

*
* *

CAPÍTULO 2.5.6.

PIROPLASMOsis EQUINA

RESUMEN

La piroplasmosis equina o babesiosis es una enfermedad de caballos, mulas, asnos y cebras, producida por protozoos y transmitida por garrapatas. Los agentes etiológicos son parásitos de la sangre llamados Theileria equi y Babesia caballi. Anteriormente Theileria equi se designaba como Babesia equi. Los animales infectados pueden ser portadores de estos parásitos por mucho tiempo y actuar como fuentes de infección para las garrapatas, que actúan como vectores de transmisión. Los parásitos se localizan dentro de los eritrocitos de los animales infectados.

La introducción de animales portadores en áreas con prevalencia de garrapatas vectoras puede conducir a una distribución epizoótica de la enfermedad.

Identificación del agente: Los caballos infectados se pueden identificar por demostración de los parásitos en sangre teñida o en frotis de órganos. Los métodos de tinción tipo Romanovsky, como el de Giemsa, dan los mejores resultados. El bajo nivel de parasitemia en animales portadores hace muy difícil la detección de parásitos, especialmente en el caso de infecciones por B. caballi, aunque a veces se pueda demostrar su presencia utilizando una técnica de frotis fuertes de sangre.

Una característica diagnóstica de la infección por B. caballi es la presencia de parejas de merozoitos unidos por su extremo posterior. Los merozoitos de T. equi presentan una longitud inferior a 2-3 µm, y son redondos o de forma ameboide. Una característica de T. equi es la disposición de cuatro parásitos formando una tétrada o "Cruz de Malta".

Cuando las pruebas serológicas proporcionan resultados equívocos, la inoculación de una gran cantidad de sangre completa por transfusión a un caballo susceptible y esplenectomizado puede ayudar en el diagnóstico. El caballo receptor se observa en cuanto a la aparición de síntomas clínicos de la enfermedad y se examinan sus eritrocitos para investigar la presencia de parásitos. Alternativamente, se deja alimentar una garrapata específica, que actúe como vector, sobre un animal sospechoso y luego se puede identificar Babesia/Theileria en el vector o mediante la transmisión por el vector a otro animal susceptible.

Pruebas serológicas: La mejor manera de demostrar la infección en animales portadores es estudiar sus sueros para analizar la presencia de anticuerpos específicos.

En la actualidad, la prueba de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpo (IFI) y los enzimoinmunoensayos (ELISAs) son las pruebas prescritas para el comercio internacional. La prueba IFI puede utilizarse para distinguir entre infecciones por T. equi y B. caballi. Los ensayos de tipo ELISA pueden usarse para detectar anticuerpos frente a ambas especies en caballos infectados, pero existen reacciones cruzadas entre T. equi y B. caballi, de modo que esta prueba no puede recomendarse aún como prueba diagnóstica diferencial. No obstante, parecen ser muy prometedores los avances recientes con pruebas ELISA de inhibición competitiva, utilizando proteínas recombinantes de los merozoitos de T. equi y B. caballi y anticuerpos monoclonales contra estas proteínas. La prueba ELISA competitiva puede ser superior a las pruebas de tipo FC, en especial para detectar animales infectados por largo tiempo donde el título de FC ha disminuido aunque aún son seropositivos por IFI.

Requisitos para las vacunas y los materiales de diagnóstico: No existen productos biológicos disponibles.

A. INTRODUCCIÓN

La piroplasmosis equina o babesiosis es una enfermedad de caballos, mulas, asnos y cebras producida por protozoos y transmitida por garrapatas. Los agentes etiológicos de la piroplasmosis equina son *Theileria equi* y *Babesia caballi*. Se han identificado 12 especies de garrapatas de tipo ixódico en los géneros *Dermacentor*, *Rhipicephalus* y *Hyalomma* como vectores horizontales de *B. caballi* y *T. equi*, aunque ocho de estas especies fueron también capaces de transmitir las infecciones por *B. caballi* transováricamente (4, 28, 35, 36). Los animales infectados pueden permanecer como transportadores de estos parásitos sanguíneos por largos períodos de tiempo y actuar como fuentes de la infección para las garrapatas que actúan como vector.

Estos parásitos se presentan en el sur de Europa, Asia, países de la Unión de Estados Independientes (Commonwealth), África, Cuba, Sudamérica y América Central, y ciertas partes del sur de los Estados Unidos de América. *Theileria equi* se ha descrito también en Australia (aunque en apariencia nunca se ha establecido en esta región) y se piensa que tiene una distribución general más amplia que *B. caballi*.

Durante el ciclo de vida de *Babesia*, los merozoitos invaden los eritrocitos (RBCs) y se transforman allí en trofozoitos (7,29). En esta situación los trofozoitos crecen y se dividen en dos merozoitos redondos, ovales o piriformes. Los merozoitos maduros son capaces entonces de infectar nuevos eritrocitos y luego, el proceso de división se repite.

Babesia caballi: en los eritrocitos los merozoitos son piriformes, de 2-5 µm de longitud y 1.3-3.0 µm de diámetro (20). Los pares de merozoitos unidos por sus extremos terminales son una característica diagnóstica propia de la infección por *B. caballi* (25).

Theileria equi: los merozoitos de este microorganismo son relativamente pequeños, con una longitud menor de 2-3 µm, y de forma redonda o ameboide. Se suelen encontrar juntos cuatro parásitos dispuestos en forma de una tétrada o la llamada "Cruz de Malta". Ésta es una característica propia de *T. equi* (10).

Se ha demostrado que los esporozoitos inoculados en caballos a través de picadura de garrapata invaden los linfocitos (32). Los esporozoitos se desarrollan en el citoplasma de estos linfocitos y eventualmente forman esquizontes semejantes a *Theileria*. Los merozoitos liberados de estos esquizontes penetran en los eritrocitos. La posición taxonómica de *T. equi* ha sido polémica y tan solo recientemente se ha re-descrito y admitido como una *Theileria* (26). Más evidencia para apoyar una estrecha relación con especies de *Theileria* deriva de la homología encontrada entre las proteínas de superficie de 30 y 34 kDa de *T. equi* y las proteínas de tamaño similar de otras especies de *Theileria* (15,17). Sin embargo, la comparación de los genes para el ARN de la subunidad pequeña ribosomal en varios parásitos de los géneros *Babesia*, *Theileria* y *Cytauxzoon* indica que *T. equi* se encuentra en un grupo distinto diferente a los grupos de *Babesia* y de *Theileria* (1).

Habitualmente los síntomas clínicos de la piroplasmosis equina no son específicos, y la enfermedad se puede confundir fácilmente con otras enfermedades.

La piroplasmosis se puede presentar en forma hiperaguda, aguda o crónica. Los casos agudos son los más comunes, y se caracterizan por fiebre que suele superar los 40°C, apetito reducido y malestar, elevación del pulso y de la actividad respiratoria, congestión de las membranas mucosas, y deposiciones fecales más pequeñas y secas de lo normal.

En los casos subagudos los signos clínicos son similares. Además, los animales afectados muestran pérdida de peso, y la fiebre es a veces intermitente. Las membranas mucosas varían de color rosa pálido a rosa, o de amarillo pálido a amarillo fuerte. En las membranas mucosas también se puede apreciar petequias (pequeñas hemorragias superficiales) y/o equimosis (extravasación sanguínea bajo la mucosa). Los movimientos normales del intestino pueden estar ligeramente reducidos y los animales pueden mostrar síntomas de un cólico ligero. A veces se presenta un ligero hinchamiento edematoso del extremo distal de las patas.

Los casos crónicos presentan síntomas clínicos inespecíficos como inapetencia ligera, pobre comportamiento y un descenso de masa corporal. Por examen rectal el bazo se detecta normalmente agrandado.

Se ha descrito una forma hiperaguda rara en la que los caballos aparecen muertos o moribundos (21).

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

1. Identificación del agente

Los caballos ya infectados pueden identificarse demostrando los parásitos en frotis teñidos de sangre o de órganos. Los métodos de tinción de tipo Romanovsky, como el de Giemsa, normalmente proporcionan los mejores resultados (34).

Los bajos niveles de parasitemia en los animales portadores hacen extremadamente difícil la detección de los parásitos en los frotis, especialmente en el caso de infecciones con *B. caballi*. Cuando se presentan niveles tan bajos, los analistas con experiencia pueden a veces detectarlos utilizando una técnica de frotis gruesos de sangre (23). Se preparan extensiones densas colocando una pequeña gota de sangre (aproximadamente 50 µl) sobre un porta de vidrio limpio. Esta gota se seca al aire, se fija a 80°C durante 5 minutos, y se tiñe con Giemsa al 5% por 20-30 minutos. A veces es deseable una identificación precisa de la especie, ya que con frecuencia se presentan infecciones mixtas de *T. equi* y de *B. caballi*.

Como resulta difícil diagnosticar en animales portadores la piroplasmosis equina por detección de los parásitos en sangre, son preferibles los métodos serológicos (ver más adelante). Sin embargo, se pueden encontrar reacciones falsas negativas o positivas en el desarrollo de las pruebas serológicas (5, 6, 38). En tales casos, aunque constituye un ejercicio incómodo y costoso, la transfusión de sangre completa es una técnica muy útil para determinar la verdadera situación. Se transfieren a un caballo susceptible, preferentemente esplenectomizado, grandes cantidades de sangre completa (500 ml). Este animal se mantiene luego bajo observación estrecha para detectar síntomas clínicos de la enfermedad. El diagnóstico se confirma por la presencia de parásitos en sus eritrocitos.

En una técnica adicional, se deja alimentar sobre un animal sospechoso una garrapata específica aislada, y la presencia del microorganismo puede identificarse en la garrapata misma, o mediante la transmisión del microorganismo a otro animal susceptible por medio de la garrapata vector.

Para identificar a los portadores de los parásitos, una alternativa que complementa los métodos anteriores puede ser el lograr establecer *in vitro* cultivos duraderos de *T. equi* y de *B. caballi* (11, 12, 42, 43). Se han logrado cultivar parásitos de *Babesia caballi* de la sangre de dos caballos que dieron negativa la prueba de fijación de complemento (FC) (12). De modo análogo, se ha podido cultivar *T. equi* a partir de caballos que no mostraban ninguna parasitemia patente al tiempo de iniciación de los cultivos (42,43).

Se han descrito técnicas moleculares para la detección de *T. equi* y *B. caballi* (2) que incluyen el uso de una sonda de ADN marcada con biotina en una prueba basada en la reacción en cadena de la polimerasa para detectar *T. equi* (31).

2. Pruebas serológicas

Resulta muy difícil diagnosticar la presencia de los microorganismos en animales portadores por examen microscópico de los frotis de sangre. Además, este sistema no es práctico a gran escala. Por consiguiente, se recomienda el análisis serológico de los animales como el método preferido de diagnóstico, en especial cuando los caballos se destinan a importación a países donde no se presenta la enfermedad, pero que está presente el vector.

Los sueros se deben recoger y enviar a los laboratorios de diagnóstico siguiendo las especificaciones de dichos laboratorios. Los caballos para exportación que hayan sido sometidos a pruebas serológicas y que estén libres de la infección deben ser mantenidos en ausencia de garrapatas para evitar infecciones accidentales.

En el diagnóstico de la piroplasmosis se han utilizado varias técnicas serológicas, como la prueba de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpo (IFI), el enzimoinmunoensayo (ELISA) y la prueba FC.

a) Prueba de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpo (prueba ordenada para el mercado internacional)

La prueba IFI se ha aplicado con éxito en el diagnóstico diferencial de infecciones por *T. equi* y *B. caballi* (22). Los animales portadores no son adecuados para la producción de antígeno puesto que ya han producido anticuerpos. Se recoge sangre (unos 15 ml) en 235 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,2. Los eritrocitos se lavan tres veces con PBS frío (1.000 g durante 10 minutos a 4°C). El sobrenadante y la capa celular blanca de leucocitos se eliminan después de cada lavado. Después del último lavado, los eritrocitos empaquetados en el precipitado después de la centrifugación se reconstituyen al volumen normal con una solución al 4% de la fracción V de seroalbúmina bovina preparada en PBS, es decir, el volumen de células empaquetadas se considera un 30% del original, de modo que alrededor de un tercio sean eritrocitos. Si el volumen original era 15 ml, entonces 5 ml de eritrocitos empaquetados + 10 ml de seroalbúmina bovina al 4% en PBS constituyen el antígeno. Después de mezclar bien, el antígeno se coloca en pocillos preparados sobre un porta excavado mediante una plantilla o una jeringa (27). Alternativamente, las células se pueden extender cuidadosamente sobre portas para microscopio, cubriendo por completo el porta con una capa uniforme y moderadamente gruesa. Estos portas se dejan secar, se envuelven en papel suave y se sellan en bolsas de plástico o se envuelven en papel de aluminio, guardándose a -20°C hasta por 1 año.

- **Procedimiento de la prueba**
 - i) Cada muestra de suero se ensaya frente a antígeno de *B. caballi* y de *T. equi*,
 - ii) Antes de uso, los frotis de antígeno se retiran de su lugar de mantenimiento a -20°C y se incuban a 37°C durante 10 minutos.
 - iii) Los frotis de antígeno se sacan luego de su cubierta protectora y se fijan en acetona con hielo seco (-20°C) durante 1 minuto. Existen portas comerciales disponibles que están prefijados.
 - iv) Si se trata de frotis, se forman cuadrículas sobre el frotis de antígeno con esmalte para uñas o un medio de montaje de secado rápido (como Cytoseal) (se dibujan 14-21 cuadrículas en total, es decir 2-3 filas de 7 en cada una).
 - v) Se diluyen de 1/80 a 1/1280 con PBS los sueros a ensayar y los sueros de control positivo y negativo. Los sueros de control negativo y positivo se incluyen en cada prueba.
 - vi) Se aplican los sueros (10 µl de cada uno) a las diluciones apropiadas en los diferentes pocillos o cuadrículas sobre el frotis de antígeno, se incuba 30 minutos a 37°C, y se lava varias veces con PBS y una vez con agua.
 - vii) Se diluye en PBS una inmunoglobulina anti-caballo preparada en conejos y conjugada con isotiocianato de fluoresceína (este conjugado está disponible comercialmente) y se aplica al frotis, que se incuba y se lava luego como antes.
 - viii) Despues de el lavado final, se colocan en cada frotis dos gotas de una solución que contiene glicerina y PBS a partes iguales, y monta con un cubre para observación microscópica.
 - ix) Los frotis se examinan luego al microscopio para observar parásitos fluorescentes. Los sueros diluidos 1/80 o más, que den fluorescencia fuerte, se consideran por lo general positivos, aunque hay que tener también en cuenta el tipo de fluorescencia que presentan los controles positivos y negativos.

b) Enzimoinmunoensayo (prueba ordenada para el mercado internacional)

Se ha descrito la producción de antígenos recombinantes para uso en técnicas ELISA. En *Escherichia coli* se ha producido la proteína recombinante (EMA-1) del merozoito de *T. equi* (18), y también en células de insectos mediante baculovirus (41). También se ha producido en *E. coli* como antígeno el producto recombinante del gen *Be 82* de *T. equi* fusionado con la proteína de la glutatión-S-transferasa (9). Igualmente, en *E. coli* se ha logrado producir un antígeno de *B. caballi* relacionado con la proteína del orgánulo secretor de estos parásitos (rhoptry) (13,14). Los antígenos recombinantes producidos en *E. coli* o por baculovirus presentan la ventaja obvia de eliminar la necesidad de infectar caballos para la producción de antígenos, y suponen una fuente lógica de antígeno para su distribución y estandarización a nivel internacional. Estos antígenos recombinantes se han utilizado en métodos ELISA indirectos (13) y en métodos ELISA de inhibición competitiva (C-ELISA) (40).

El antígeno EMA-1, y un anticuerpo monoclonal específico (Mab) que define el epítopo de esta proteína superficial del merozoito, se han utilizado en ensayos C-ELISA para *T. equi* (18). Éste método evita el problema de la pureza del antígeno, ya que la especificidad de esta prueba depende solo del Mab empleado. En la detección de anticuerpos frente a *T. equi* se observó una correlación del 94% entre las pruebas C-ELISA y FC. Los sueros que dieron resultados discrepantes se ensayaron en cuanto a su capacidad para inmunoprecipitar los productos de la traducción *in vitro* del ARN mensajero del merozoito de *T. equi* marcados radiactivamente con ³⁵S-metionina. Sin embargo, los resultados de la inmunoprecipitación con las muestras de suero que fueron negativos en C-ELISA y positivos en FC no fueron concluyentes. Los datos limitados hasta la fecha parecen sugerir que la prueba C-ELISA es específica para *T. equi* (19). Esta prueba C-ELISA fue también recientemente validada para *T. equi* en Marruecos y en Israel, presentando una similitud del 91% y del 95,7%, respectivamente, con la prueba IFI (30, 33).

Un método C-ELISA similar se ha desarrollado utilizando la proteína1 recombinante (RAP-1) de *B. caballi*, que es un componente asociado al orgánulo secretor (rhoptry), y un Mab que reacciona con un péptido del epítopo del antígeno de 60 kDa de *B. caballi* (14). Los resultados de 302 muestras de suero ensayados por C-ELISA y FC mostraron un 73% de concordancia. De las 72 muestras que fueron FC negativas y C-ELISA positivas, 49 (el 67%) fueron IFI positivas, mientras que cuatro de cinco muestras que fueron FC positivas y C-ELISA negativas fueron positivas en la prueba IFI (14).

Se ha descrito un procedimiento para C-ELISA en la piroplasmosis equina y se ha utilizado en estudios adicionales de validación (16,20). La aparente especificidad de los ensayos C-ELISA para *T. equi* y *B. caballi* cae dentro del 92,2%-99,5% cuando se utilizan sueros de 1000 caballos que se suponen libres de piroplasmosis. La sensibilidad diagnóstica aparente de ambas pruebas aplicadas a más de 1.000 caballos de origen extranjero y de estado infeccioso desconocido originó la detección neta de un 1,1% (*T. equi*) y un

1,3% (*B. caballi*) más de animales seropositivos que por la prueba FC, según lo confirmado mediante la prueba IFI por dos observadores independientes. Ocho caballos infectados experimentalmente (cuatro con *T. equi* y cuatro con *B. caballi*) se ensayaron de modo seriado de los 4 a los 90 días después de la exposición. Para la detección de los animales infectados, se apreció de nuevo que ambos ensayos C-ELISA fueron más sensibles que la prueba FC; estos resultados se confirmaron por la prueba IFI. La seroconversión se detectó por la prueba C-ELISA tan pronto como por la prueba FC o más pronto. Ambas pruebas fueron muy reproducibles pocillo a pocillo, placa a placa y día a día, con variaciones globales de $\pm 1,2\%$ y $\pm 1,6\%$, para las pruebas de *T. equi* y *B. caballi*, respectivamente.

Un ejemplo de procedimiento para C-ELISA se presenta a continuación.

- **Soluciones**

Tampón de revestimiento de antígeno: preparar el volumen necesario de tampón de revestimiento de antígeno usando las siguientes cantidades de ingredientes para cada litro: 2.93 g de bicarbonato sódico; 1.59 g de carbonato sódico; suficiente agua ultrapura para disolver lo anterior, y llevar a un volumen de 1 litro con agua ultrapura. Ajustar el pH a 9.6.

Solución de lavado para C-ELISA (diluyente de alta salinidad): preparar el volumen necesario de solución de lavado para C-ELISA usando las siguientes cantidades de ingredientes para cada litro: 29.5 g de cloruro sódico; 0,22 g de fosfato sódico monobásico; 1,19 g de fosfato sódico dibásico; 2 ml de Tween 20; suficiente agua ultrapura para disolver lo anterior, y llevar a un volumen de 1 litro con agua ultrapura. Mezclar bien. Ajustar el pH a 7,4. Esterilizar en autoclave a 121°C.

- **Producción de antígeno**

Un cultivo congelado de células transformadas de *E. coli* se inocula a una dilución 1/10,000 en cualquier medio líquido no selectivo estándar para permitir el crecimiento bacteriano (por ejemplo, caldo de Luria) y que contenga carbenicilina (100 µg/ml) e isopropil-β-D-1-tiogalactósido (IPTG, 1 mM). Los cultivos se incuban en un agitador orbital a 200 rpm a 37°C toda la noche. Las células crecidas después de ese período se recogen por centrifugación (5.000 **g** por 10 minutos), se lavan con tampón Tris-HCl 50 mM y ácido etilén diamino tetra-acético (EDTA), pH 8,0, y se colectan de nuevo como antes. (El antígeno está disponible en los National Veterinary Services Laboratories, P.O. Box 844, Ames, Iowa 50010, USA).

Las células se resuspenden al 10% de su volumen original en el tampón Tris-ClH, al que se añade 1 mg/ml de lisozima, y se mantienen en hielo 20 minutos. Luego se añade el detergente Nonidet P-40 (NP-40) a una concentración final del 1% (v/v), se agita con vórtex, y se deja la muestra en hielo 10 minutos. El material se sonica a continuación con cuatro ciclos de 4 segundos a 100 vatios, en hielo, con intervalos de 2 minutos entre cada ciclo de sonicación para evitar el calentamiento de la muestra. El sonicado se centrifuga a 10,000 **g** por 20 minutos. El sobrenadante que resulta se distribuye en tubos de microcentrifuga en alícuotas de 0,5 ml y puede conservarse durante años a -70°C.

- **Procedimiento de la prueba**

- Se preparan placas de microtitulación revistiendo los pocillos con 50 µl de antígeno de *T. equi* o de *B. caballi* diluido en tampón de revestimiento de antígeno. Se determina la dilución usada por técnicas estándar de titulación serológica. La placa se sella con su tapadera, se guarda durante la noche a 4°C y se congela a -70°C.
- La IgG anti-ratón marcada con biotina se diluye con agua estéril siguiendo las indicaciones del fabricante, se guarda a 4°C, y, al tiempo de ser usada, se diluye de nuevo hasta 1/200 con solución de lavado para C-ELISA a la que se añade 2% (v/v) de suero equino normal. El conjugado enzimático avidina-fosfatasa alcalina se diluye al 1/43 (v/v) en solución de lavado para C-ELISA, y el substrato cromogénico para el enzima se mezcla siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Las placas se descongelan a temperatura ambiente, se decanta la solución de revestimiento, y se lavan dos veces con solución de lavado para C-ELISA.
- Se añade a los pocillos suero de caballo sin diluir (50 µl/pocillo). El suero no debería ser precalentado. Cada suero se ensaya en pocillos duplicados. Las placas se incuban a 37°C durante 40 minutos en una cámara húmeda.
- A continuación todos los pocillos reciben 50 µl/pocillo de líquido peritoneal murino (ascitis) monoclonal anti-*T. equi* o anti-*B. caballi* (Mab se puede obtener de los National Veterinary Services Laboratories, P.O. Box 844, Ames, Iowa 50010, USA). Las placas se incuban 30 minutos a 37°C en una cámara húmeda, y luego se lavan 4 veces con solución de lavado para C-ELISA.

- vi) Se añade a los pocillos una dilución de IgG anti-ratón marcada con biotina (50 µl/pocillo). Las placas se incuban 20 minutos a 37°C en una cámara húmeda y luego se lavan cuatro veces con solución de lavado para C-ELISA.
- vii) A todos los pocillos se añade el conjugado avidina-fosfatasa alcalina (50µl/pocillo). Las placas se incuban cubiertas durante 15 minutos a temperatura ambiente y luego se lavan cuatro veces con solución de lavado para C-ELISA.
- viii) Se añade a los pocillos el substrato cromogénico para el enzima (50µl/pocillo), y las placas se incuban a temperatura ambiente con agitación durante la aparición del color.
- ix) El desarrollo del color se detiene añadiendo a todos los pocillos 50µl de solución de parada con EDTA (2,5% [p/v] de una solución de EDTA en agua ultrapura) cuando los pocillos del control de suero negativo tengan una densidad óptica de 0,2-0,7 a una longitud de onda de 590 nm (OD_{590}).
- x) Las placas se leen a 590 nm. Se calcula la OD_{590} media del par de pocillos para cada uno de todos los sueros. Para que un ensayo sea válido. La OD_{590} media del control positivo no debe exceder el 30% de la OD_{590} media del control de suero negativo, y los coeficientes de variación de los sueros control negativos y positivos no debe superar el 10%.
- xi) Si la OD_{590} media de las muestras es menor o igual que la OD_{590} del control positivo, el problema se considera positivo. Si la OD_{590} media de las muestras es mayor que la OD_{590} del control positivo, el problema se considera negativo. Si la OD_{590} promedio de las muestras está muy próxima a la del control positivo, las muestras se pueden catalogar como indeterminadas o sospechosas.

c) **Fijación de complemento**

La prueba de FC es la principalmente utilizada en algunos países para certificar caballos de importación (37). Se dispone de una detallada descripción de la producción del antígeno y del procedimiento de la prueba, como la ofrecida por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) (3, 6, 39). Debido a que puede que la prueba FC no identifique a todos los animales infectados, especialmente si han sido tratados, y debido a las reacciones anti-complementarias de algunos sueros, y a la incapacidad para fijar complemento de la IgG (T) (el principal isótipo de las inmunoglobulinas de los équidos), también se acepta el uso de la prueba IFI como ensayo de diagnóstico en el mercado internacional. Un ejemplo de procedimiento para la prueba FC se presenta a continuación.

• **Soluciones**

Solución de Alsever: se prepara 1 litro de solución de Alsever disolviendo 20,5 g de glucosa; 8,0 g de citrato sódico; y 4,2 g de cloruro sódico en suficiente cantidad de agua. Se ajusta el pH a 6,1 utilizando ácido cítrico y se ajusta hasta 1 litro con agua destilada. Se esteriliza por filtración.

Stock de tampón veronal (5 x): disolver los siguientes componentes en 1 litro de agua destilada: 85,0 g de glucosa; 3,75 g de 5,5 dietil barbiturato sódico; 1,68 g de cloruro magnésico ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$); y 0,28 g de cloruro cálcico. Disolver 5,75 g de ácido 5,5 dietil barbitúrico en 0,5 litros de agua destilada caliente (casi hirviendo). Enfriar esta solución de ácido y añadirla a la anterior solución de sales. Llevar el volumen a 2 litros con agua destilada y guardar a 4°C. Para preparar una solución de trabajo, añadir una parte de solución stock a cuatro partes de agua destilada. El pH final debe estar entre 7,4 y 7,6.

• **Producción de antígeno**

La sangre se obtiene de caballos con alta parasitemia (por ejemplo, 3-7% para *B. caballi* y 60-85% para *T. equi*), y se mezcla con un volumen idéntico de solución de Alsever como anticoagulante. Cuando los eritrocitos se han decantado al fondo del recipiente, se retira el sobrenadante que contiene el plasma y la solución de Alsever, y la capa de leucocitos. Los eritrocitos se lavan varias veces con tampón veronal frío y luego se lisán. El antígeno se recoge del lisado por centrifugación a 30.900 **g** durante 30 minutos.

El antígeno recuperado se lava varias veces en tampón veronal frío mediante centrifugación a 20.000 **g** por 15 minutos. Se añade como estabilizador polivinil pirrolidona 40.000 (1-5%[p/v]) y la preparación se mezcla bien en un agitador magnético por 30 minutos, se tamiza a través de una doble capa de gasa estéril, se distribuye en volúmenes de 2 ml y se liofiliza. El antígeno se puede conservar a continuación por debajo de -50°C durante varios años.

• **Procedimiento de la prueba**

- i) Debe comprobarse la especificidad y potencia de cada lote de antígeno frente a antisueros estándar de especificidad y potencia conocida. Se determinan también las diluciones óptimas del antígeno en una titulación primaria por el sistema de tablero de ajedrez o tabla de doble entrada.

- ii) Los sueros de ensayo se inactivan 30 minutos a 56°C (los sueros de asnos y mulas se inactivan a 62,5°C durante 35 minutos) y se prueban a diluciones de 1/5 a 1/5120. Para todas las diluciones se utiliza tampón veronal.
- iii) El complemento se prepara y se titula espectrofotométricamente para determinar la dosis hemolítica media (C'H₅₀) (36) y se utiliza en la prueba a valores de 5 veces C'H₅₀. El sistema hemolítico consta de partes iguales de una suspensión al 2% de eritrocitos de oveja (RBC) y de tampón veronal con 5 dosis hemolíticas mínimas (MDHs) de hemolisina (amboceptor) (40). Algunos laboratorios utilizan el 100% de la dosis hemolítica, que da una sensibilidad equivalente.
- iv) La prueba se ha adaptado a placas de microtitulación (8). El volumen total del ensayo es 0,125 ml, formado por fracciones iguales (0,025 ml) de antígeno, complemento (cinco veces C'H₅₀) y suero diluido. La incubación se realiza a 37°C por 1 hora.
- v) Se añade una fracción doble (0,05 ml) del sistema hemolítico y se incuban las placas por otros 45 minutos a 37°C con agitación después de 20 minutos.
- vi) Las placas se centrifugan a 200 **g** durante 1 minuto antes de proceder a la lectura sobre un espejo.
- vii) Se considera como resultado positivo una lisis del 50%, y el título es la dilución mayor de suero que produce un 50% de lisis. Un título de 1/5 se considera como suero positivo. En cada ensayo se debe incluir un juego completo de controles (sueros positivos y negativos) así como un control de antígeno preparado de eritrocitos (RBCs) de un caballo normal (no infectado).

Las muestras que no dan la reacción del complemento se examinan por la prueba IFI. Los sueros de asno son frecuentemente negativos para la reacción del complemento.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y LOS MATERIALES DE DIAGNÓSTICO

En la actualidad no existen productos biológicos disponibles.

REFERENCIAS

1. ALLSOPP M.T.E.P., CAVALIER-SMITH T., DE WAAL D.T. & ALLSOPP B.A. (1994). Phylogeny and evolution of the piroplasms. *Parasitol.*, **108**, 147–152.
2. BASHIRUDDIN J.B., CAMMA C. & REBELO E. (1999). Molecular detection of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horse blood by PCR amplification of part of the 16S rRNA gene. *Vet. Parasitol.*, **84**, 75–83.
3. BROWN G.M. (1979). Equine piroplasmosis complement fixation test antigen production. USDA, APHIS, National Veterinary Services Laboratories. Diagnostic Reagents Laboratory, Ames, Iowa. USA NVSL Diagnostic Production Guide No. R-72/73/74.
4. DE WAAL D.T. & POTGIETER F.T. (1987). The transstadial transmission of *Babesia caballi* by *Rhipicephalus evertsi evertsi*. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **54**, 655–656.
5. DONNELLY J., JOYNER L.P., GRAHAM-JONES O. & ELLIS C.P. (1980). A comparison of the complement fixation and immunofluorescent antibody titres in a survey of the prevalence of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horses in the Sultanate of Oman. *Trop. Anim. Health Prod.*, **12**, 50–60.
6. FRERICHS W.M., HOLBROOK A.A. & JOHNSON A.J. (1969). Equine piroplasmosis: Complement-fixation titres of horses infected with *Babesia caballi*. *Aust. J. Vet. Res.*, **30**, 697–702.
7. FRIEDHOFF K. (1970). Studies on the fine structure of *Babesia bigemina*, *B. divergens* and *B. ovis*. Proceedings of the Second International Congress of Parasitology, *J. Parasitol.*, **56**, Section 2 (1), 110.
8. 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 test technique in bovine brucellosis, Johne's disease, dourine, equine piroplasmosis and Q fever serology. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **52**, 279–282.
9. HIRATA H., XHAU X., YOKOYAMA N., YOUSIFUMI N., KOZO F., SUZUKI N. & IGARASHI I. (2003). Identification of a specific antigenic region of the P82 protein of *Babesia equi* and its potential use in serodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 547–551.

10. HOLBROOK A.A., JOHNSON A.J. & MADDEN B.S. (1968). Equine piroplasmosis: Intraerythrocytic development of *Babesia caballi* (Nuttall) and *Babesia equi* (Laveran). *Am. J. Vet. Res.*, **29**, 297–303.
11. HOLMAN P.J., CHIEVES L., FRERICHS W.M., OLSON D. & WAGNER G.G., 1994. *Babesia equi* erythrocytic stage continuously cultured in an enriched medium. *J. Parasitol.*, **80**, 232–236.
12. HOLMAN P.J., FRERICHS W.M., CHIEVES L. & WAGNER G.G. 1993. Culture confirmation of the carrier status of *Babesia caballi*-infected horses. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 698–701.
13. IKADAI H., NAGAI A., XUAN X., IGARASHI I., KAMINO T., TSUJI N., OYAMADA T., SUZUKI N. & FUJISAKI K. (2002). Seroepidemiologic studies on *Babesia caballi* and *Babesia equi* infection in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, **64**, 325–328.
14. KAPPMAYER L.S., PERRYMAN L.E., HINES S.A., BASZLER T.V., KATZ J.B., HENNAGER S.G. & KNOWLES D.P. (1999). Detection of equine antibodies to *Babesia caballi* recombinant *B. caballi* rhoptry-associated protein 1 in a competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 2285–2290.
15. KAPPMAYER L.S., PERRYMAN L.E. & KNOWLES D.P (1993). A *Babesia equi* gene encodes a surface protein with homology to *Theileria* species. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **62**, 121–124.
16. KATZ J., 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.
17. KNOWLES D.P. KAPPMAYER, L.S. & PERRYMAN L.E. (1997). Genetic and biochemical analysis of erythrocyte-stage surface antigens belonging to a family of highly conserved proteins of *Babesia equi* and *Theileria* species. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **90**, 69–79.
18. KNOWLES D.P., KAPPMAYER, L.S., STILLER D., HENNAGER S.G. & PERRYMAN L.E. (1992). Antibody to a recombinant merozoite protein epitope identifies horses infected with *Babesia equi*. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 3122–3126.
19. KNOWLES D.P., PERRYMAN L.E. & KAPPMAYER L.S. (1991). Detection of equine antibody to *Babesia equi* merozoite proteins by a monoclonal antibody-based competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 2056–2058.
20. LEVINE N.D. (1985). Veterinary protozoology. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.
21. LITTLEJOHN A. (1963). Babesiosis. *En: Equine Medicine and Surgery*, Bone J.F., Catcott E.J., Gabel A.A., Johnson L.E. & Riley W.F., eds. American Veterinary Publications, California, USA, 211–220.
22. MADDEN P.A. & HOLBROOK A.A. (1968). Equine piroplasmosis: Indirect fluorescent antibody test for *Babesia caballi*. *Am. J. Vet. Res.*, **29**, 117–123.
23. MAHONEY D.F. & SAAL J.R. (1961). Bovine babesiosis: Thick blood films for the detection of parasitaemia. *Aust. Vet. J.*, **37**, 44–47.
24. MCGUIRE T.C., VAN HOOSIER G.L. JR & HENSON J.B. (1971). The complement-fixation reaction in equine infectious anemia: demonstration of inhibition by IgG (T). *J. Immunol.*, **107**, 1738–1744.
25. MEHLHORN H. & SCHEIN E. (1984). The piroplasms: Life cycle and sexual stages. *Adv. Parasitol.*, **23**, 37–103.
26. MELHORN H. & SCHEIN E. (1998). Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi*. *Parasitol Res.*, **84**, 467–475.
27. MORZARIA S.P., BROCKLESBY D.W. & HARRADINE D.L. (1977). Evaluation of the indirect fluorescent antibody test for *Babesia major* and *Theileria mutans* in Britain. *Vet. Rec.*, **100**, 484–487.
28. NEITZ W.O. (1956). Classification, transmission and biology of piroplasms of domestic animals. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **64**, 56–111.
29. POTGIETER F.T. & ELS H.J. (1977). The fine structure of intra-erythrocytic stages of *Babesia bigemina*. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **44**, 157–168.

30. RHALEM A., SAHIBI H., LASRI S., JOHNSON W.C., KAPPMAYER L.S., HAMIDOUCH A., KNOWLES D.P. & GOFF W.L. (2001). Validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosing *Babesia equi* infections of Moroccan origin and its use in determining the seroprevalence of *B. equi* in Morocco. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **13**, 249–251.
31. SAHAGUN-RUIZ A., WAGNELA S.D., HOLMAN P.J., CHIEVES L.P. & WAGNER G.G. (1997). Biotin-labeled DNA probe in a PCR-based assay increases detection sensitivity for the equine hemoparasite *Babesia caballi*. *Vet. Parasitol.*, **73**, 53–63.
32. SCHEIN E., REHBEIN G., VOIGT W.P. & ZWEYGARTH E. (1981). *Babesia equi* (Leveran, 1901). Development in horses and in lymphocyte culture. *Tropenmed Parasitol.*, **32**, 223–227.
33. SHKAP V., COHEN I., LEIBOVITZ B., SAVITSKY, PIPANO E., AVNI G., SHOFER S., GIGER U., KAPPMAYER L. & KNOWLES D. (1998). Seroprevalence of *Babesia equi* among horses in Israel using competitive inhibition ELISA and IFA assays. *Vet. Parasitol.*, **76**, 251–259.
34. SHUTE P.G. (1966). The staining of malaria parasites. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **60**, 412–416.
35. STILLER D. & FRERICHS S.W.M. (1979). Experimental transmission of *Babesia caballi* to equids by different stages of the tropical horse tick, *Anocentor nitens*. *Recent Adv. Acarol.*, **2**, 262–268.
36. STILLER D., FRERICHS W.M., LEATCH G. & KUTTLER K.L. (1980). Transmission of equine babesiosis and bovine anaplasmosis by *Dermacentor albipictus* (Packard) (Acari: Ixodidae). *J. N.Y. Ent. Soc.*, **88**, 75–76.
37. TAYLOR W.M., BRYANT J.E., ANDERSON J.B. & WILLERS K.H. (1969). Equine piroplasmosis in the United States – A review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **155**, 915–919.
38. TENTER A.M. & FREIDHOFF K.T. (1986). Serodiagnosis of experimental and natural *Babesia equi* and *B. caballi* infections. *Vet. Parasitol.*, **20**, 49–61.
39. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) ANIMAL AND PLANT HEALTH INSPECTION SERVICE, VETERINARY SERVICES (1997). Complement fixation test for the detection of antibodies to *Babesia caballi* and *Babesia equi* – microtitration test. USDA, National Veterinary Services Laboratories, Ames, Iowa, USA.
40. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) ANIMAL AND PLANT HEALTH INSPECTION SERVICE, VETERINARY SERVICES (2003). Competitive ELISA for Serodiagnosis of Equine Piroplasmosis (*Babesia equi* and *Babesia caballi*), and Production of Recombinant *Babesia equi* and *Babesia caballi* cELISA Antigens. USDA, National Veterinary Services Laboratories, Ames, Iowa, USA.
41. XUAN X., LARSEN A., IDADAI H., TNANKA T., IGARASHI I., NAGASAWA H., FUJISAKI K., TOYODA Y., SUZUKI N. & MIKAMI T. (2001). Expression of *Babesia equi* merozoite antigen 1 in insect cells by recombinant baculovirus and evaluation of its diagnostic potential in an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 705–709.
42. ZWEYGARTH E., JUST M.C. & DE WAAL D.T. (1995). Continuous *in vitro* cultivation of erythrocytic stages of *Babesia equi*. *Parasitol. Res.*, **81**, 355–358.
43. ZWEYGARTH E., JUST M.C. & DE WAAL D.T. (1997). *In vitro* cultivation of *Babesia equi*: detection of carrier animals and isolation of parasites. *Onderstepoort J. Vet Res.*, **64**, 51–56.

*
* *

CAPÍTULO 2.5.7.

RINONEUMONITIS EQUINA

RESUMEN

La rinoneumonitis equina RE es un término colectivo que designa cualquiera de las enfermedades clínicas agudas y muy infecciosas que pueden ocurrir a consecuencia de la infección por uno de los dos herpesvirus que están estrechamente relacionados, los herpesvirus equinos 1 y 4 (EHV-1 y EHV-4).

La infección por EHV-1 o por EHV-4 se caracteriza por producir una enfermedad primaria del tracto respiratorio, de gravedad variable, que depende de la edad y del estado inmunológico del animal infectado. Las infecciones por EHV-1, en particular, son capaces de progresar más allá de la mucosa respiratoria y originar las manifestaciones más serias de la enfermedad en forma de aborto, muerte perinatal de los potros, o disfunción neurológica.

Identificación del agente: El método estándar de identificación de los herpesvirus causantes de RE continúa siendo el aislamiento de los virus en el laboratorio a partir de material clínico adecuado o de necropsias, seguido por la confirmación serológica de su identidad. Los virus se pueden aislar fácilmente en cultivos celulares equinos de muestras nasofaríngeas de caballos tomadas durante el estado febril de la infección del tracto respiratorio, de hígado, pulmón, bazo, o timo de fetos abortados y de potros muertos prematuramente, y de la fracción de leucocitos de la sangre de animales con enfermedad aguda por EHV-1. La identificación positiva de aislamientos virales como EHV-1 o EHV-4 se puede lograr por inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales específicos para cada tipo.

Se puede hacer un diagnóstico rápido y preliminar del aborto debido a rinoneumonitis por detección del antígeno viral mediante inmunofluorescencia directa en secciones de tejidos congelados de fetos abortados utilizando un antisuero políclonal conjugado.

Recientemente se han desarrollado métodos sensibles y fiables para la detección de EHV-1/4 por la reacción en cadena de la polimerasa o por tinción con inmunoperoxidasa, que se pueden usar como complemento a las técnicas estándar de cultivo de los virus para el diagnóstico de la RE.

La demostración post-mortem de las lesiones histopatológicas características de EHV-1 en tejidos de fetos abortados, en casos de muerte perinatal de potros o en el sistema nervioso central de animales con afecciones neurológicas complementa el diagnóstico de laboratorio de la ER RE.

Pruebas serológicas: Debido a que muchos caballos poseen algún nivel de anticuerpos contra EHV-1/4, la detección de la presencia de anticuerpos específicos en el suero procedente de una muestra única de sangre no es suficiente para diagnosticar positivamente un caso reciente y activo de RE. Para detectar un aumento notable en el título de anticuerpos específico contra los virus, se deben analizar en paralelo sueros tanto de la forma aguda como de la convaleciente de animales sospechosos de estar infectados con HEV-1 o HEV-4 mediante fijación de complemento (FC), neutralización vírica o enzimoinmunoensayo. Si sólo se dispone de sueros de animales convalecientes, la FC será la prueba que proporcione más información.

Requisitos para las vacunas y los materiales de diagnóstico: Hay tanto vacunas virales vivas atenuadas como vacunas virales inactivadas comercialmente disponibles que pueden utilizarse para favorecer el control de la ER. Aunque la vacunación resulta útil para reducir la incidencia de abortos en yeguas y para mejorar la gravedad de los síntomas clínicos de la infección respiratoria en caballos jóvenes, no debería considerarse como una práctica sustitutiva del cumplimiento estricto de los principios bien establecidos en las prácticas de producción, que se ha demostrado, reducen el riesgo de rinoneumonitis. Se recomienda una revacunación a intervalos frecuentes

independientemente del tipo de vacuna utilizada, ya que la duración de la inmunidad inducida por las vacunas actualmente disponibles es relativamente corta.

Los estándares para la producción y licencia de las vacunas atenuadas e inactivadas que contienen EHV se establecen por las pertinentes agencias veterinarias reguladoras en los países de producción y uso de las vacunas. No existe un único sistema de estándares para vacunas contra RE reconocido internacionalmente. Sin embargo, en cada caso, la producción de la vacuna se basa en el sistema de un detallado esquema de producción que emplea una línea celular bien caracterizada y un lote de inóculo original de virus vacunal que ha sido validado en cuanto a identidad vírica, inocuidad, pureza vírica, inmunogenicidad, y ausencia de agentes microbianos indeseables.

A. INTRODUCCIÓN

La rinoneumonitis equina RE es un término que históricamente describe una constelación de distintas enfermedades en caballos que pueden incluir enfermedades respiratorias, aborto, neumonitis neonatal de los potros, o mieloencefalopatía (1, 2, 5, 7). Desde hace más de 60 años se considera que la enfermedad es un reto a la industria equina internacional, y está causada por cualquiera de dos miembros de la familia Herpesviridae, los herpesvirus 1 y 4 (EHV-1 y EHV-4). EHV-1 y EHV-4 son alfaherpesvirus equinos muy próximos con una identidad en la secuencia nucleotídica de genes homólogos individuales del 55% al 84%, e identidad en la secuencia de aminoácidos entre el 55% y el 96% (13, 14). En todos los países en los que se mantienen grandes poblaciones de caballos como parte de la tradición cultural o de la economía agrícola, los dos herpesvirus son enzooticos. No se ha descrito evidencia alguna de que los dos herpesvirus de la RE supongan riesgos para la salud humana en personas que trabajan con tales agentes.

Entre caballos susceptibles, la RE es muy contagiosa, con transmisión vírica entre animales mediante inhalación de aerosoles de secreciones respiratorias con virus. El uso extensivo de las vacunas no la ha eliminado las infecciones por EHV, y las pérdidas económicas anuales a nivel mundial a causa de estos patógenos equinos son inmensas.

En caballos menores de 3 años, la ER clínica toma la forma de una enfermedad respiratoria aguda y febril que se extiende rápidamente a todo el grupo de animales. Los virus infectan y se multiplican en las células epiteliales de la mucosa respiratoria. Los síntomas de la infección aparecen 2-8 días después de la exposición al virus y se caracterizan por fiebre, inapetencia, depresión y descarga nasal. La gravedad de la enfermedad respiratoria varía con la edad del caballo y el nivel de inmunidad que resulta de la vacunación previa o de la exposición natural. Son corrientes las infecciones subclínicas con EHV-1/4, incluso en animales jóvenes. Aunque la mortalidad es rara en la RE sin complicaciones y lo normal es la recuperación completa después de 1-2 semanas, la infección respiratoria es una causa muy frecuente e importante en la interrupción de las actividades de caballos mantenidos para aprendizaje, carreras o acontecimientos ecuestres competitivos. La inmunidad protectora que provoca la infección es de corta duración, y los animales convalecientes son susceptibles a la reinfección por EHV-1/4 después de varios meses. Aunque las reinfecciones por los dos herpesvirus causan enfermedades respiratorias menos graves o clínicamente poco aparentes, los riesgos de aborto y/o de enfermedad del sistema nervioso central (CNS) no están eliminados. Los mayores riesgos clínicos planteados por la RE en caballos de cría, de carreras o de recreo, son las secuelas potenciales de aborto y de trastornos neuronales después de la infección respiratoria por HEV-1.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

1. Identificación del agente (3)

Los métodos de diagnóstico rápido son importantes debido a que la ER es una enfermedad muy contagiosa y con potencial para generar brotes explosivos con alta mortalidad y secuelas de aborto y neurológicas. Aunque recientemente se han descrito varias técnicas diagnósticas nuevas y rápidas, basadas en el enzimoinmunoensayo (ELISA), reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tinción inmunohistológica con peroxidasa, o sondas de hibridación con ácidos nucleicos, su uso suele estar limitado a laboratorios especializados de referencia, y el método elegido para el diagnóstico de ER en laboratorios diagnósticos de virología que manejan continuamente muchas muestras continúa siendo la metodología tradicional del aislamiento en cultivo celular seguido por la identificación de los virus aislados. El lograr el aislamiento de EHV-1/4 en el laboratorio depende del seguimiento estricto de ciertos métodos relativos a la toma de muestras y a su procesamiento en el laboratorio.

a) Toma de muestras

Las mejores muestras para el aislamiento del virus son los exudados nasofaríngeos de los caballos en los estados febres más tempranos de la enfermedad respiratoria, y se toman por vía nasal mediante frotis del área nasofaríngea con una gasa absorbente de 5 x 5 cm fijada al extremo de un alambre flexible de acero inoxidable de 50 cm de longitud que está protegido por un tubo de goma de látex. También se puede utilizar un dispositivo similar a los escobillones de algodón con funda usados en los frotis uterinos. Después de la toma del frotis, la gasa absorbente se separa del alambre y se transporta inmediatamente al laboratorio de virología en 3 ml de medio líquido muy frío (pero no helado) (MEM [medio mínimo esencial] libre de suero y con antibióticos). La infectividad de los virus se puede prolongar por adición de seroalbúmina bovina o gelatina al 0,1% (p/v),

El examen virológico de tejidos fetales en el caso de aborto sospechoso por EHV tiene mayor eficacia diagnóstica cuando se lleva a cabo en muestras tomadas asepticamente del hígado, los pulmones, el timo y el bazo. Las muestras tisulares deben transportarse al laboratorio y mantenerse a 4°C hasta su inoculación en cultivos de tejidos. Las muestras que no puedan procesarse en unas horas deben guardarse a -70°C. En los casos *ante-mortem* de enfermedad neurológica por EHV-1, el virus puede aislarse a menudo de la fracción de leucocitos de la sangre de caballos con infección aguda o, con menor frecuencia, de la nasofaringe del animal afectado o animales de compañía. Para intentar aislar el virus de los leucocitos de la sangre, se deben transportar de inmediato al laboratorio 20 ml de sangre estéril recogida en citrato, EDTA (ácido etilén diamino tetra-acético), o heparina como anticoagulante, en hielo pero no congelada. Aunque ocasionalmente el virus se ha aislado post-mortem en casos de enfermedad neurológica por EHV-1, mediante el cultivo de muestras de cerebro y médula espinal, tales intentos de aislamiento suelen ser infructuosos.

b) Aislamiento de virus

Para un aislamiento primario eficaz de EHV-1/4 de caballos con enfermedad respiratoria, se deben utilizar cultivos celulares de origen equino. Tanto EHV-1 como EHV-4 se pueden aislar de muestras nasofaríngeas utilizando células primarias de riñón equino fetal o líneas celulares de fibroblastos equinos derivados de tejido dérmico (E-Derm) o pulmonar. Como se indicará después, EHV-1 también puede aislarse en otros tipos celulares. El frotis nasofaríngeo y sus 3 ml de medio para el transporte se pasan al cuerpo de una jeringa estéril de 10 ml. Utilizando el émbolo de la jeringa, el líquido se pasa del frotis a un tubo estéril. Una parte del líquido se filtra luego a través de una unidad de filtración compuesta por una jeringa estéril con un filtro de 0,45 µm y se recoge en un segundo tubo estéril. La filtración disminuye la contaminación bacteriana pero también decrece el título del virus. En recipientes para cultivos de tejidos de 25 cm², se inoculan monocapas celulares de preparación reciente con 0,5 ml del extracto de frotis nasofaríngeo filtrado, así como del no filtrado. También pueden utilizarse placas con varios pocillos. Mediante incubación a 37°C en una plataforma circular durante 1,5–2 horas, se permite que el virus se una a la monocapa inoculada. Se deben incubar en paralelo monocapas de células control no inoculadas que contengan sólo medio de transporte estéril.

Al final del período de unión, se retira el exceso de inóculo y las monocapas de lavan dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) para eliminar el anticuerpo neutralizante que pueda estar presente en las secreciones nasofaríngeas. Los recipientes se incuban a 37°C después de añadir 5 ml de medio de mantenimiento supplementado (MEM que contiene 2% se suero fetal bovino [FCS] y el doble de la concentración estándar de antibióticos [penicilina, estreptomicina, gentamicina y anfotericina B]). El uso de muestras como control positivo del virus para validar el procedimiento del aislamiento corre el riesgo de provocar una eventual contaminación de las muestras a diagnosticar. El riesgo se puede reducir utilizando precauciones rutinarias y buenas técnicas de laboratorio, incluyendo el uso de cabinas de bioseguridad, inoculando los controles positivos después de las muestras a diagnosticar, descontaminando las superficies de la cabina durante la adsorción del inóculo y utilizando un control positivo de título relativamente bajo. Los recipientes inoculados deben examinarse a diario en el microscopio para observar la aparición del efecto citopático (ECP) característico de los herpesvirus (redondeamiento focalizado, aumento de la refractabilidad, y separación de las células). Los cultivos que después de 1 semana no muestren evidencia de ECP deben ser pasados a nuevas monocapas celulares recién preparadas utilizando como inóculo pequeñas alícuotas tanto del medio como de las células. Los pases posteriores no suelen ser productivos.

Para el aislamiento de HEV-1 de tejidos de fetos abortados o de casos post-mortem de enfermedad neurológica se pueden utilizar varios tipos celulares (por ejemplo, riñón de conejo [RK-13], riñón de hamster neonato [BHK-21], riñón bovino de Madin-Darby [MDBK], riñón de cerdo [PK-15], etc.), pero los cultivos de células de origen equino son más sensibles y deben utilizarse si se desean detectar los casos infrecuentes de aborto por EHV-4. Para el aislamiento del virus se utiliza en torno al 10% (p/v) de los homogenados tisulares del hígado, pulmón, timo y bazo (de fetos abortados) o de tejido del CNS (en casos de enfermedad neurológica). Éstos se preparan cortando primero, con tijeras de disección estériles, pequeños fragmentos del tejido en cubos de 1 mm en una placa Petri estéril, y macerando luego los trozos de tejido en medio de cultivo sin suero y con antibióticos por medio de un triturador mecánico de tejidos (por

ejemplo, Ten-Broeck o Stomacher). Después de centrifugar a 1.200 **g** durante 10 minutos, se extrae el sobrenadante y se inoculan por duplicado 0,5 ml en monocapas celulares contenidas en recipientes de 25 cm². Después de incubar las células inoculadas a 37°C durante 1,5–2 horas, se eliminan los inóculos y se lavan las monocapas dos veces con PBS. Después de añadir 5 ml de medio de mantenimiento suplementado, los recipientes se incuban a 37°C durante 1 semana o hasta que se observe ECP.

El cultivo de leucocitos sanguíneos periféricos para detectar la presencia de EHV-1 tiene con frecuencia éxito en caballos en la fase inicial de los cuadros clínicos que cursan con parálisis. Al llegar al laboratorio de diagnóstico, el tubo con la sangre enfriada, con citrato o heparina como anticoagulante, se mezcla por inversión y se deja estar 1 hora a temperatura ambiente. Se extrae la capa superior del plasma, rica en leucocitos, y se centrifuga a 600 **g** durante 15 minutos. Se decanta el sobrenadante y el precipitado de leucocitos se resuspende en un pequeño volumen de sobrenadante residual poniendo un instante el tubo en un vórtex. Las células resuspendidas se lavan a continuación dos veces con 10 ml de PBS estéril por centrifugación (300 **g** durante 10 minutos) y resuspensión. Después de la última centrifugación, el precipitado de los leucocitos se resuspende en 1 ml de MEM que contiene 2% de FCS. Luego, se añaden por duplicado 0,5 ml de la suspensión celular a monocapas de fibroblastos equinos, células equinas fetales o células RK-3 en recipientes de 25 cm² con 8–10 ml de medio fresco de mantenimiento añadido. Los recipientes se incuban a 37°C durante 1 semana; el inóculo no se elimina. Como puede ser difícil detectar el ECP en presencia del inóculo masivo de leucocitos, cada recipiente con células se congela y descongela después de 7 días de incubación. Finalmente, se transfieren 0,5 ml del extracto acelular del medio de cultivo de cada recipiente a monocapas celulares recientes. Éstas se incuban y observan para ECP durante al menos 5–6 días antes de eliminarlas como negativas.

c) Seroconfirmación de la identidad del virus

La base para la identificación de cualquier herpesvirus aislado de muestras de casos sospechosos de ER es su inmunoreactividad con antisueros específicos. Se puede hacer de forma rápida y simple la identificación específica de un aislamiento como EHV-1 o EHV-4 por detección inmunofluorescente del antígeno vírico en los cultivos celulares infectados mediante el uso de anticuerpos monoclonales específicos de tipo (MAbs), que están disponibles en los Laboratorios de Referencia de la OIE para rinoneumonitis. La prueba, que es específica de tipo y fiable, se puede realizar en una pequeña alícuota de células infectadas del mismo recipiente inoculado con material clínico o recogido post-mortem. En un laboratorio que carezca de MAbs se puede confirmar un aislamiento como EHV-1/4 utilizando un antisuero políclonal específico de tipo o por PCR (ver sección B.1.f).

Las monocapas infectadas con el aislamiento se recogen por raspado de los recipientes cuando se evidencia al menos un 75% de ECP. Las células se sedimentan del medio de cultivo y se resuspenden en 0,5 ml de PBS. Se colocan 50 µl de la suspensión celular en dos pocillos de un porta excavado para microscopía con varios pocillos, se deja secar al aire y se fija con acetona al 100% durante 10 minutos. En pocillos del mismo porta también se depositan por duplicado suspensiones celulares control (no infectadas, e infectadas por EHV-1 o por EHV-4). Las células control se pueden preparar de antemano y mantenerse congeladas en pequeñas alícuotas. A un pocillo de cada par se añade una gota de una dilución apropiada de MAb específico para EHV-1 y al otro de cada par se añade otra gota de MAb específico para EHV-4. Después de 30 minutos de incubación a 37°C en una cámara húmeda, se elimina el anticuerpo que no ha reaccionado con los lavados de 10 minutos con PBS. Los MAbs unidos al antígeno del virus pueden detectarse con Ig anti-ratón obtenida en cabra conjugada con isoftiocianato de fluoresceína (FITC). A cada pocillo se añade una gota de conjugado diluido y, después de 30 minutos a 37°C, los pocillos se lavan de nuevo dos veces con PBS. Las células se examinan en un microscopio de fluorescencia, y la fluorescencia positiva con el anticuerpo de especificidad apropiada indica el tipo de virus.

d) Detección de virus por inmunofluorescencia directa

La detección de antígenos de EHV-1 por inmunofluorescencia directa en muestras de tejido post-mortem de fetos equinos abortados supone un método indispensable en el laboratorio de diagnóstico veterinario para hacer un rápido diagnóstico preliminar de aborto por herpesvirus (9). Las comparaciones en paralelo de las técnicas de inmunofluorescencia y de aislamiento en cultivo celular en más de 100 casos de aborto equino proporcionan evidencia de que la fiabilidad diagnóstica de la tinción por inmunofluorescencia directa de tejidos fetales obtenidos en necropsias se aproxima a la del aislamiento de los virus en los mismos tejidos. En los Estados Unidos de América (EE.UU.), se suministra con este fin a los laboratorios de diagnóstico veterinario un antisuero políclonal específico y potente contra EHV-1, preparado en cerdo y conjugado con FITC, a través de los Laboratorios Nacionales de Servicios Veterinarios del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA). El antisuero presenta reacciones cruzadas con EHV-4 y por tanto no es útil para el serotipado. Las muestras de reciente disección de tejido fetal (en piezas de 5 x 5 mm) (pulmón, hígado, timo y bazo) se congelan, se seccionan en un criostato a -20°C, se montan en portas para microscopía y se fijan con acetona al 100%. Después de secar, las secciones se incuban a 37°C durante 30 minutos en una atmósfera húmeda con una dilución apropiada de anticuerpo de cerdo conjugado frente a EHV-1. El exceso de anticuerpo no reaccionante se elimina con dos lavados en PBS y, a continuación, las

secciones de tejido se cubren con un medio de montaje acuoso y un cubreobjetos, y se observa para la presencia de células fluorescentes que indican la presencia de antígeno de EHV. Cada prueba debe incluir un control positivo y negativo con secciones de tejidos fetales que se sepa que están infectados o no infectados por EHV-1.

e) Detección de virus por tinción con inmunoperoxidasa

Los métodos inmunohistoquímicos de tinción enzimática (IH) (por ejemplo, con peroxidasa) se han desarrollado recientemente como procedimientos para detectar antígeno de EHV-1 en tejidos incluidos en parafina de fetos equinos abortados o de caballos con afección neurológica (12, 19). Tales técnicas auxiliares de IH para detectar antígeno puede facilitar la identificación del virus en muestras tisulares archivadas o en casos clínicos en que los métodos tradicionales de laboratorio de detección de EHV-1 no han tenido éxito. La tinción inmunoenzimática de EHV-1 es particularmente útil para la evaluación simultánea de lesiones morfológicas y la identificación del agente infeccioso. En cada prueba de inmunoperoxidasa deben incluirse controles adecuados para considerar tanto la especificidad del método como la especificidad del anticuerpo.

f) Detección del virus por la reacción en cadena de la polimerasa

La PCR se puede utilizar para una rápida amplificación y detección diagnóstica de los ácidos nucleicos del EHV-1 y 4 en muestras clínicas, tejidos conservados incluidos en parafina o cultivos celulares inoculados (4, 10, 11, 16,17). Se han diseñado una variedad de cebadores específicos de cada tipo para distinguir entre la presencia de EHV-1 y EHV-4. La correlación entre PCR y las técnicas de aislamiento de virus para el diagnóstico de EHV-1 y EHV-4 es elevada (16). El diagnóstico de RE por PCR es rápido, sensible, y no depende de la presencia de virus infecciosos en la muestra clínica. Constituye ahora una parte integral de la batería de pruebas diagnósticas para RE disponibles actualmente, cada una con sus propias ventajas y limitaciones.

Para el diagnóstico de infecciones activas por EHV, los métodos de PCR son mas fiables con muestras de fetos abortados o con frotis nasofaríngeos de potros y caballos de un año; son más útiles en epizootias explosivas de abortos o enfermedades del tracto respiratorio en las que una rápida identificación del virus puede ser un factor crítico para emplear estrategias de control. La interpretación de la amplificación de fragmentos genómicos de EHV-1 o EHV-4 por PCR en tejidos de caballo adulto (nódulos linfáticos, leucocitos de sangre periférica o CNS) se complica por la elevada frecuencia de ADN de EHV-1 y EHV-4 latentes en los linfocitos circulantes y en el ganglio trigémino de dichos animales (18).

Se ha descrito un simple ensayo múltiple de PCR para la detección simultánea de EHV-1 y EHV-4 (17). Un protocolo más sensible para la detección de EHV-1 o EHV-4 por PCR semi-secuencial en muestras clínicas o patológicas (secreciones nasales, leucocitos sanguíneos, tejidos fetales, etc.) es como sigue (16):

- i) *Preparación del ADN molde de las muestras de ensayo:* Despues de la homogenización de las muestras y la lisis de las células (y de los viriones) en presencia de una sal caotrópica, los ácidos nucleicos se unen selectivamente a gel de sílice o resinas catiónicas. Los ácidos nucleicos unidos a estos substratos se purifican por una serie de pasos de lavados rápidos seguidos por su recuperación mediante elución a baja salinidad. Los reactivos para realizar tales pasos de aislamiento rápido de ácidos nucleicos están disponibles en formatos de varias fuentes comerciales (por ejemplo, High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, USA; QIAamp DNA Kit, Qiagen, Valencia, USA).
- ii) *Secuencias cebadoras semi-secuenciales específicas para EHV-1 (16):*
EHV1-gH-F = 5'-AAG-AGG-AGC-ACG-TGT-TGG-AT-3'
EHV1-gH-R = 5'-TTG-AAG-GAC-GAA-TAG-GAC-GC-3'
EHV1-gH-RN = 5'-AGT-AGG-TCA-GGC-CGA-TGC-TT-3'
- iii) *Secuencias cebadoras semi-secuenciales específicas para EHV-4 (16):*
EHV4-gB-F = 5'-CTG-CTG-TCA-TTA-TGC-AGG-GA-3'
EHV4-gB-R = 5'-CGT-CTT-CTC-GAA-GAC-GGG-TA-3'
EHV4-gB-RN = 5'-CGC-TAG-TGT-CAT-CAT-CGT-CG-3'
- iv) *Condiciones de PCR para la primera fase de la amplificación:* El ADN molde de la muestra (5 µl) se añade una mezcla de PCR (volumen final de 25 µl) que contiene 1 x tampón de PCR (50 mM de KCl, 10 mM de Tris/HCl, pH 9.0, 0,1% de Tritón X-100), 200 µM de cada uno de los trifosfatos de desoxinucleótidos (dNTP), 2,5 mM de MgCl₂, 2,0 µM de cada uno de los cebadores externos (EHV1-gH-F y EHV1-gH-R para detección de EHV-1 y, en una mezcla de reacción separada, EHV4-gB-F y EHV4-gB-R para detección de EHV-4) y 0,5 u de ADN polimerasa Taq. Los parámetros de ciclación

son: desnaturización inicial a 95°C durante 5 minutos; 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto; con una extensión final a 72°C durante 5 minutos. Se deben preparar y amplificar mezclas de reacción separadas que contengan ADN viral conocido o sin ADN (agua) como controles positivos y negativos.

- v) *Condiciones de PCR para la segunda fase (semi-secuencial) de la amplificación:* Se añade medio μ l del producto de la primera amplificación a una mezcla nueva de PCR (volumen final de 25 μ l) que contiene 1 x tampón de PCR, 200 μ M de cada dNTP, 2,5 mM de MgCl₂, 2,0 μ M de cada cebador (EHV1-gH-F y EHV1-gH-RN para detección de EHV-1 y, en una mezcla de reacción separada, EHV4-gB-F y EHV4-gB-RN para detección de EHV-4) y 0,5 u de ADN polimerasa Taq. Los parámetros de ciclación son: desnaturización inicial a 95°C durante 5 minutos; 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto; con una extensión final a 72°C durante 5 minutos.
- vi) *Análisis en gel de los productos amplificados:* Se someten a electroforesis 5 μ l de cada uno de los productos finales amplificados, incluyendo los controles, en un gel de agarosa al 2% en tampón de recorrido Tris/acetato, junto con un ADN de referencia de 100 pares de bases (pb). El gel se tiñe con bromuro de etidio y se observa en un transiluminador para productos con 287 pb para EHV-1 o 323 pb para EHV-4.

g) Histopatología

El examen histopatológico de secciones de muestras de tejidos fijadas con formalina e incluidas en parafina, procedentes de fetos abortados o de caballos con afecciones neurológicas, es una parte esencial del diagnóstico de laboratorio de estas dos manifestaciones clínicas de la RE. En los fetos abortados, las lesiones patológicas de EHV-1 son los típicos cuerpos de inclusión intranucleares de las infecciones herpéticas en el epitelio bronquial o en células periféricas de las áreas de necrosis hepáticas. La lesión microscópica característica que se asocia con la neuropatía por EHV-1, aunque no es patognomónica, es una vasculitis trombótica degenerativa de los pequeños vasos sanguíneos del cerebro o la médula espinal (desgarro perivasculares e infiltración por células inflamatorias, proliferación endotelial y necrosis, y formación de trombos).

2. Pruebas serológicas

Debido a la ubicuidad de los virus causantes de la RE y a la elevada seroprevalencia de los caballos en la mayor parte del mundo, la demostración de un título negativo de anticuerpos frente a EHV-1/4 por pruebas serológicas en caballos para exportación no forma parte de las regulaciones veterinarias actuales que tratan de evitar la extensión de las enfermedades contagiosas en los caballos. No obstante, las pruebas serológicas pueden ser un procedimiento adicional de ayuda en el diagnóstico de la RE en caballos. La serodiagnóstico de la RE se basa en la detección de aumentos notables en los títulos de anticuerpos en sueros pareados tomados durante las fases aguda y de convalecencia de la enfermedad. Los resultados de pruebas realizadas con sueros de una toma individual puntual suelen ser imposibles de interpretar con cierta seguridad. La muestra de suero inicial (fase aguda) debe tomarse lo antes posible después de la aparición de los síntomas clínicos, y la segunda muestra de suero (fase de convalecencia) debe tomarse 3–4 semanas después. En la enfermedad neurológica por EHV-1 también puede tener valor para la serodiagnóstico el tomar muestras del líquido cerebroespinal. Los sueros de la "fase aguda" de las yeguas después de abortos o de los caballos con enfermedad neurológica debida a EHV-1 pueden contener ya los títulos máximos de anticuerpo contra EHV-1, sin que haya aumento detectable en el título de sueros recogidos con posterioridad. En estos casos, el aumento de los títulos de anticuerpos contra EHV-1/4 en muestras de otros miembros de la manada sin sintomatología clínica, puede proporcionar información útil para el diagnóstico retrospectivo de RE dentro de la explotación. Finalmente, la detección serológica de anticuerpos contra EHV-1 en la sangre del corazón, o del cordón umbilical o en otros líquidos de los fetos equinos puede tener valor diagnóstico en los casos raros de fetos abortados como resultado de la infección por EHV-1 que se comportan virológicamente como negativos.

Los niveles de anticuerpo contra EHV-1/4 en el suero se pueden determinar mediante pruebas ELISA (8), pruebas de neutralización de los virus (NV) (15), o pruebas de fijación de complemento (FC) (15). Si la única muestra disponible es un suero de convaleciente, la prueba FC es la más útil para diagnosticar una infección reciente por los herpesviruses, ya que los títulos de anticuerpos fijadores de anticuerpos contra EHV-1/4 se convierten en negativos a los pocos meses de la recuperación de la infección. La prueba FC con sueros de caballos con la forma paralítica de la infección por EHV-1 es también útil para hacer el diagnóstico rápido que se requiere para iniciar las debidas medidas de control de la extensión de esta enfermedad contagiosa. Debido a que no hay reactivos o técnicas internacionalmente estandarizadas para realizar pruebas serológicas para detectar anticuerpos frente a EHV-1/4, las determinaciones del título de anticuerpos en un mismo suero pueden ser diferentes de un laboratorio a otro. Además, todas las pruebas serológicas mencionadas detectan anticuerpos que tienen reacciones cruzadas entre EHV-1 y EHV-4. Sin embargo, la detección por cualquiera de estas pruebas de un aumento de cuatro veces o más en el título de anticuerpos frente a EHV-1 o EHV-4 a lo largo de la enfermedad es una confirmación serológica de infección reciente con uno de los virus. La prueba ELISA y la de FC tienen la ventaja de que dan resultados rápidos y no requieren servicios de cultivos celulares.

Recientemente se ha desarrollado un ensayo ELISA específico de tipo que puede distinguir entre anticuerpos contra EHV-1 y EHV-4 y que está comercialmente disponible (6). La prueba de microneutralización es un ensayo serológico sensible que se utiliza ampliamente para detectar anticuerpos contra EHV-1/4 y, por tanto, se describe aquí.

a) Prueba de neutralización de virus

Esta prueba serológica se suele hacer en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano (grado de cultivo de tejidos) utilizando una dosis constante de virus y diluciones dobles de sueros equinos de ensayo. Se requieren al menos dos pocillos duplicados por cada dilución de cada suero. A lo largo del proceso se utiliza MEM sin suero como diluyente. Los stocks de virus de título conocido se diluyen inmediatamente antes de uso para contener 100 DICT₅₀ (dosis infectiva media en cultivo de tejidos) en 25 µl. Se dispersan monocapas de células E-Derm o RK-13 con EDTA/tripsina y se resuspenden a una concentración de 5×10^5 células /ml. Adviéntase que las células RK-13 se pueden utilizar con EHV-1 pero no dan un ECP claro con EHV-4. En cada ensayo se deben incluir controles positivos y negativos para viabilidad celular, infectividad vírica y prueba de citotoxicidad del suero. Los títulos finales de anticuerpos por neutralización de virus (NV) se calculan determinando el inverso de la dilución más alta de suero que protege al 100% de la monocapa celular de la destrucción por el virus en los dos pocillos duplicados.

Un procedimiento adecuado para la prueba es el siguiente:

- i) Inactivar los sueros de ensayo y de control durante 30 minutos en un baño con agua a 56°C.
- ii) Añadir 25 µl de MEM sin suero a todos los pocillos de las placas de ensayo de microtitulación.
- iii) Pipetear 25 µl de cada suero de ensayo en pocillos duplicados de las filas A y B de la placa. La primera fila sirve como control de la citotoxicidad del suero y la segunda como la primera dilución del ensayo. Hacer diluciones seriadas dobles de cada suero empezando con la fila B y siguiendo hacia abajo en la placa por mezcla y transferencia secuencial de 25 µl a cada fila subsiguiente de pocillos. En cada placa se pueden ensayar seis sueros.
- iv) Añadir a cada pocillo 25 µl del stock de virus EHV-1 o EHV-2 convenientemente diluido (100 DICT₅₀/pocillo) excepto a los de la fila A, que son los pocillos de control de suero para analizar la citotoxicidad del suero en las células indicadoras. Adviéntase que las diluciones finales de suero, después de la adición del virus, van de 1/4 a 1/256.
- v) Se debería incluir una placa control con la titulación de suero positivo y negativo de caballo de título conocido, el control de células (sin virus), el control de virus (sin suero) y una titulación de virus para calcular la cantidad real de virus usado en la prueba.
- vi) Incubar las placas 1 hora a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂.
- vii) Añadir a cada pocillo 50 µl de la suspensión de células E-Derm o RK-13 preparadas (5×10^5 células/ml) en MEM/10% de FCS.
- viii) Incubar las placas 4–5 días a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire.
- ix) Examinar las placas microscópicamente para ECP y anotar los resultados en una hoja de trabajo. Alternativamente, las monocapas celulares se pueden analizar en cuanto a ECP después de fijar y teñir del modo siguiente: después de quitar el líquido del cultivo, se sumergen las placas durante 15 minutos en una solución que contiene 2 mg/ml de cristal violeta, 10% de formalina, 45% de metanol, y 45% de agua. Luego, lavar las placas vigorosamente bajo un chorro de agua del grifo.
- x) Los pocillos que contienen monocapas intactas se tiñen de azul, mientras que las monocapas destruidas por el virus no se tiñen. Comprobar que los pocillos del control de células, del control positivo de suero y del control de citotoxicidad del suero, se tiñen de azul, que los pocillos del control de virus y del control negativo de suero no se tiñen, y que la cantidad real de virus añadida a cada pocillo está entre 10^{1.5} y 10^{2.5} TCDI₅₀. Los pocillos se consideran positivos si permanece intacta el 100% de la monocapa celular. La mayor dilución de suero que origina neutralización completa del virus (no existe ECP) en los dos pocillos duplicados es el título final de dicho suero.
- xi) Se calcula el título de neutralización para cada suero ensayado, y se comparan los títulos del suero de la fase aguda y de la fase convaleciente de cada animal para detectar aumentos de 4 veces o superiores.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y LOS MATERIALES DE DIAGNÓSTICO

Se dispone de vacunas vivas atenuadas y de vacunas inactivadas como productos autorizados y preparados para utilización comercial como ayuda profiláctica en la reducción de los casos de enfermedad causada por la infección de EHV-1/4. La experiencia clínica ha demostrado que ninguna de las preparaciones de vacuna suministra un grado absoluto de protección contra la ER. Los fabricantes respectivos recomiendan dosis múltiples, con repetición anual, de las vacunas contra la ER comercializadas en la actualidad, con cronologías de vacunación que varían dependiendo de la vacuna en particular.

Las normas sobre la producción de vacunas veterinarias se presentan en el Capítulo I.1.7. *Principios de producción de vacunas veterinarias*. Las directrices dadas aquí y en el Capítulo I.1.7 intentan ser de naturaleza general y pueden suplementarse con requisitos nacionales y regionales.

Al menos 16 productos se comercializan en la actualidad como vacunas contra la ER por 5 fabricantes de material veterinario, y cada una contiene combinaciones diferentes de EHV-1, EHV-4, y de los dos subtipos del virus de la influenza equina.

Las indicaciones clínicas que se indican en el prospecto de uso de las varias vacunas disponibles contra la ER señalan enfermedades respiratorias asociadas con herpesvirus, aborto, o ambas cosas. Solo cuatro vacunas han cumplido los requisitos exigidos para demostrar eficacia en cuanto a que suministran protección frente al aborto inducido por herpesvirus como resultado de vacunaciones con éxito y experimentos de desafío en yeguas preñadas. Ninguna de las vacunas se ha probado en lo que respecta a su capacidad para evitar la aparición de la enfermedad neurológica que a veces se asocia con la infección por EHV-1.

1. Control del inóculo

a) Características y cultivo

El inóculo primario de virus (MSV) o las vacunas contra la RE se deben preparar de cepas de EHV-1 y/o EHV-4 que hayan sido identificadas de modo positivo e inequívoco mediante pruebas serológicas y genéticas. El inóculo de virus debe propagarse en una línea celular aprobada para producción de vacunas equinas por una agencia de control apropiada. Tanto para las preparaciones de inóculo original de virus como de células que se emplean en la producción de vacunas se debe llevar un historial completo de la fuente original, el número de pases, el medio usado en la propagación, etc. Se debe demostrar que los stocks almacenados permanentemente, tanto de MSV como del inóculo primario de células (MCS), usados en la producción de vacunas, son puros, seguros, y en el caso de MSV, también inmunogénicos. En general, los pases más altos permitidos para la producción de vacunas son el quinto para el MSV y el vigésimo para MCS. Los resultados de todas las pruebas de control de calidad sobre los inóculos originales deben guardarse y constituyen parte de la documentación permanente de la autorización.

b) Validación como vacuna

i) Pureza

Las pruebas de pureza del inóculo original incluyen procedimientos obligados que demuestren que los stocks de inóculo de virus y de células están libres de bacterias, hongos, micoplasmas y virus indeseables. Se deben realizar pruebas especiales para confirmar la ausencia del virus de la arteritis equina, del virus de la anemia infecciosa equina, del virus de la gripe equina, de los herpesvirus equinos 2 y 5, de rinovirus equinos, de los alfavirus de la encefalomielitis equina, del virus de la diarrea bovina viral (BVDV – un contaminante frecuente del suero bovino) y del parvovirus porcino (PPV – un contaminante potencial de la tripsina de cerdo). La comprobación de la pureza también debería incluir la exclusión de la presencia de EHV-1 del MSV de EHV-4 y viceversa.

ii) Inocuidad

Las muestras de cada lote de MSV que se usen para la preparación de vacunas vivas atenuadas contra la ER deben probarse para inocuidad en caballos susceptibles al virus virulento natural, incluyendo yeguas preñadas en los 4 últimos meses de gestación. La inocuidad de la vacuna debe demostrarse en un "ensayo de inocuidad de campo" en caballos de diferentes edades de tres áreas geográficas distintas. Debería realizarse por veterinarios independientes utilizando un lote pre-autorizado de vacuna. Las vacunas con EHV-1 que indican eficacia contra el aborto deben probarse en cuanto a inocuidad en un número significativo de yeguas preñadas en gestación avanzada siguiendo la cronología de vacunación indicada por el fabricante del producto final de la vacuna.

iii) Inmunogenicidad

Las pruebas de inmunogenicidad de los stocks del MSV de EHV-1/4 deben realizarse en caballos con una vacuna experimental de prueba preparada del pase más alto del MSV permitido para uso en la producción de vacunas. La prueba ordenada para determinar la inmunogenicidad del MSV consiste en

la vacunación de caballos con bajos títulos frente a EHV-1/4, con la dosis de la vacuna ensayada que se recomienda en el prospecto del producto final. Se debe obtener una segunda muestra de suero y comprobar el aumento significativo del título de anticuerpos neutralizantes contra el virus, 21 días después de la dosis final.

iv) **Eficacia**

Una parte importante del proceso de validación es la capacidad de un lote de vacuna pre-autorizada contra la ER para provocar, cuando se siguen las recomendaciones del fabricante, un nivel de protección clínica notable en caballos frente a la manifestación particular de la enfermedad por la infección de EHV-1/4, contra la que se oferta la vacuna. Los datos serológicos no resultan aceptables para establecer la eficacia de las vacunas contra la ER. Los estudios de eficacia deben estar diseñados para asegurar una aleatoriedad apropiada de los animales probados en los grupos tratados, un análisis ciego de las observaciones clínicas, y el uso de suficientes animales como para permitir una evaluación estadística de la eficacia en la eliminación o reducción de la enfermedad clínica especificada. Los estudios deben realizarse en productos de vacuna experimental completamente formulada (a) que estén producidas de acuerdo con el "Diseño de Producción", (b) con la potencia antigenica mínima especificada en el "Diseño de Producción", y (c) producida con el pase más alto de MSV y MCS que permite el "Diseño de Producción" aprobado (ver Sección C.2.). La eficacia de la vacuna se demuestra vacunando un mínimo de 20 caballos susceptibles a EHV-1/4 que tengan bajos títulos de anticuerpos neutralizantes, seguido de pruebas de desafío con virus virulento en los caballos vacunados y en 10 caballos control no vacunados. Se debe mostrar una diferencia significativa en cuanto a síntomas clínicos de la RE entre los caballos vacunados y los caballos no vacunados del control. Los trabajos de vacunación y desafío deben hacerse en un número igual de yeguas preñadas y analizar los abortos cuando el prospecto de la vacuna indica "para prevención de" o "como ayuda en la prevención de" aborto causado por EHV-1.

2. Método de producción

Debe reunirse, aprobarse y cumplirse un Diseño de Producción autorizado por la agencia apropiada que reúna un detallado protocolo de los métodos de producción que se siguen en la preparación de vacunas contra la RE. Los detalles de los métodos de producción de vacunas contra la RE varían según el tipo (vivas o inactivadas) y la composición (EHV-1 solo, EHV-1 y EHV-4, EHV-4 y virus de la gripe equina, etc.) de cada producto individual, y también según el fabricante.

3. Control interno

Tanto las células, como los virus, el medio de cultivo, y los aditivos del medio de origen animal que se utilizan para preparar la producción de los lotes de vacuna deben proceder de stocks que superen las pruebas ordenadas en cuanto a esterilidad sobre bacterias, hongos y micoplasmas; ausencia de tumorigenicidad; y ausencia de virus indeseables.

4. Control de los lotes

El contenido de cada lote de producción de vacuna contra la RE debe superar pruebas de esterilidad, inocuidad y potencia inmunogénica.

a) **Esterilidad**

Las muestras de cada lote finalizado de vacuna se analizan para detectar contaminación por bacterias, hongos y micoplasmas. También se requieren procedimientos para establecer que las vacunas están libres de virus indeseables; tales pruebas deben incluir la inoculación de cultivos celulares que permitan la detección de los virus equinos más comunes, así como técnicas para la detección de BVDV y PPV en los ingredientes de origen animal que se utilizan en la producción del lote de la vacuna.

b) **Inocuidad**

Las pruebas para asegurar la inocuidad de cada lote de vacuna contra la RE deben demostrar la inactivación completa del virus (en el caso de vacunas inactivadas) así como un nivel residual del agente inactivador de los virus que no excede el límite máximo permitido (por ejemplo, 0,2% en el caso del formaldehído). También se requieren pruebas de inocuidad en animales de laboratorio.

c) **Potencia**

El control de los lotes en cuanto a potencia antigenica se puede ensayar midiendo la capacidad de diluciones de la vacuna para proteger a hámsters de las inoculaciones con una dosis letal de virus EHV-1 adaptado a hámsters. Aunque las pruebas de potencia en los lotes de vacunas contra la RE también se pueden realizar vacunando caballos susceptibles y una posterior estimulación de desafío o por ensayos de

seroconversión, la nueva disponibilidad de MAbs específicos para el tipo viral ha permitido el desarrollo de inmunoensayos *in vitro* para la potencia antigenica que son menos costosos y más rápidos. El fundamento de esos ensayos *in vitro* para la potencia de vacunas contra la RE es la determinación, mediante el MAb específico, de la presencia en cada lote de vacuna de al menos la cantidad mínima de antígeno que se correlaciona con el debido nivel de protección (o de tasa de seroconversión) en una prueba estandarizada de potencia en animales.

d) Duración de la inmunidad

No se requieren pruebas para establecer la duración de la inmunidad frente a EHV-1/4 mediante inmunización con cada lote de vacunas. Los resultados de muchas observaciones indican que la inmunidad inducida por las vacunas frente a EHV-1/4 no dura más que unos cuantos meses; estas observaciones se reflejan en la frecuencia de revacunaciones que se recomienda en los prospectos de las vacunas contra la ER.

e) Estabilidad

Antes de alcanzar una conclusión sobre la estabilidad de la vacuna se deben ensayar al menos tres lotes de vacuna respecto a caducidad. Cuando se mantienen a 4°C, los productos de las vacunas inactivadas suelen conservar su potencia antigenica original durante al menos 1 año. Las preparaciones liofilizadas de las vacunas vivas son también estables después de la conservación a 4°C durante 1 año. Después de la reconstitución, las vacunas con virus vivos son inestables y no se pueden conservar sin pérdida de potencia.

5. Pruebas sobre el producto final

Antes de su marcaje, empaquetamiento y distribución comercial, se deben probar por métodos establecidos tres viales llenos del producto final, seleccionados al azar, en cuanto a ausencia de contaminación e inocuidad en pruebas de laboratorio con animales.

a) Inocuidad

Ver Sección C.4.b.

b) Potencia

Ver Sección C.4.c.

REFERENCIAS

1. ALLEN G.P. & BRYANS J.T. (1986). Molecular epidemiology, pathogenesis and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. *En: Progress in Veterinary Microbiology and Immunology*, Vol. 2, Pandey R., ed. Karger, Basel, Switzerland & New York, USA, 78–144.
2. ALLEN G.P., KYDD J.H., SLATER J.D. & SMITH K.C. (1999). Recent advances in understanding the pathogenesis, epidemiology, and immunological control of equid herpesvirus-1 (EHV-1) abortion. *Equine Infect. Dis.*, **8**, 129–146.
3. ALLEN G.P., KYDD J.H., SLATER J.D. & SMITH K.C. (2004). Equid herpesvirus-1 (EHV-1) and -4 (EHV-4) infections. *En: Infectious Diseases of Livestock*, Coetzer J.A.W., Thomson G.R. & Tustin R.C., eds. Oxford University Press, Cape Town, South Africa (in press).
4. BORCHERS K. & SLATER J. (1993). A nested PCR for the detection and differentiation of EHV-1 and EHV-4. *J. Virol. Methods*, **45**, 331–336.
5. BRYANS J.T. & ALLEN G.P. (1988). Herpesviral diseases of the horse. *En: Herpesvirus Diseases of Animals*, Wittman G., ed. Kluwer, Boston, USA, 176–229.
6. CRABB B.S., MACPHERSON C.M., REUBEL G.H., BROWNING G.F., STUDDERT M.J. & DRUMMER H.E. (1995). A type-specific serological test to distinguish antibodies to equine herpesviruses 4 and 1. *Arch. Virol.*, **140**, 245–258.
7. CRABB B.S. & STUDDERT M.J. (1995). Equine herpesviruses 4 (equine rhinopneumonitis virus) and 1 (equine abortion virus). *Adv. Virus Res.*, **45**, 153–190.

8. DUTTA S.K., TALBOT N.C. & MYRUP A.C. (1983). Detection of equine herpesvirus-1 antigen and the specific antibody by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Vet. Res.*, **44**, 1930–1934.
9. GUNN H.M. (1992). A direct fluorescent antibody technique to diagnose abortion caused by equine herpesvirus. *Irish Vet. J.*, **44**, 37–40.
10. LAWRENCE G.L., GILKERSON J., LOVE D.N., SABINE M. & WHALLEY J.M. (1994). Rapid, single-step differentiation of equid herpesvirus 1 and 4 from clinical material using the polymerase chain reaction and virus-specific primers. *J. Virol. Methods*, **47**, 59–72.
11. O'KEEFE J.S., JULIAN A., MORIARTY K., MURRAY A. & WILKS C.R. (1994). A comparison of the polymerase chain reaction with standard laboratory methods for the detection of EHV-1 and EHV-4 in archival tissue samples. *N.Z. Vet. J.*, **42**, 93–96.
12. SCHULTHEISS P.C., COLLINS J.K. & CARMAN J. (1993). Use of an immunoperoxidase technique to detect equine herpesvirus-1 antigen in formalin-fixed paraffin-embedded equine fetal tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **5**, 12–15.
13. TELFORD E.A.R., WATSON M.S., McBRIDE K. & DAVISON A.J. (1992). The DNA sequence of equine herpesvirus-1. *Virology*, **189**, 304–316.
14. TELFORD E.A.R., WATSON M.S., PERRY J., CULLINANE A.A. & DAVISON A.J. (1998). The DNA sequence of equine herpesvirus 4. *J. Gen. Virol.*, **79**, 1197–1203.
15. THOMSON G.R., MUMFORD J.A., CAMPBELL J., GRIFFITHS L. & CLAPHAM P. (1976). Serological detection of equid herpesvirus 1 infections of the respiratory tract. *Equine Vet. J.*, **8**, 58–65.
16. VARRASSO A., DYNON K., FICORILLI N., HARTLEY C.A., STUDDERT M.J. & DRUMMER H.E. (2001). Identification of equine herpesviruses 1 and 4 by polymerase chain reaction. *Aust. Vet. J.*, **79**, 563–569.
17. WAGNER W.N., BOGDAN J., HAINES D., TOWNSEND H.G.G. & MISRA V. (1992). Detection of equine herpesvirus and differentiation of equine herpesvirus type 1 from type 4 by the polymerase chain reaction. *Can. J. Microbiol.*, **38**, 1193–1196.
18. WELCH H.M., BRIDGES C.G., LYON A.M., GRIFFITHS L. & EDINGTON N. (1992). Latent equid herpesviruses 1 and 4: detection and distinction using the polymerase chain reaction and cocultivation from lymphoid tissues. *J. Gen. Virol.*, **73**, 261–268.
19. WHITWELL K.E., GOWER S.M. & SMITH K.C. (1992). An immunoperoxidase method applied to the diagnosis of equine herpesvirus abortion, using conventional and rapid microwave techniques. *Equine Vet. J.*, **24**, 1012.

*
* *

NB: Existe un laboratorio de referencia de la OIE para la Rinoneumonitis equina (ver Cuadro en la Parte 3 de este *Manual de animales terrestres* o consultar el sitio Web de la OIE para encontrar el listado más actualizado: www.oie.int).

CAPÍTULO 2.10.4.

SARNA

RESUMEN

La sarna es una forma de dermatitis ectoparasitaria desencadenada y mantenida por varias especies de ácaros, y caracterizada por la formación de costras, alopecia y prurito de la piel. Los ácaros y las garrapatas son una subclase de los Arachnida y están divididos en dos superórdenes, los Parasitiformes (Mesostigmata) y los Acariformes. Los Acariformes contienen tres órdenes: los Astigmata (Acaridida, no poseen estigmas), los Prostigmata (Actinedida, poseen estigmas detrás del gnatosoma) y los Oribatida (Cryptostigmata). Todas las principales especies de los ácaros de la sarna se encuentran contenidas dentro de los órdenes Astigmata y Prostigmata. El diagnóstico de la sarna en animales domésticos se basa en las manifestaciones clínicas y la demostración de ácaros o sus estadios de desarrollo en raspados de piel.

Identificación del agente: La sarna puede ser el resultado de la infestación por ácaros astigmátidos, por ejemplo *Chorioptes*, *Knemidokoptes*, *Notoedres*, *Otodectes*, *Psoroptes*, y *Sarcoptes* o los ácaros prostigmátidos, por ejemplo, *Cheyletiella*, *Demodex* o *Psorobia*. Todos los ácaros de la sarna se clasifican por su estructura. Deben consultarse claves ilustradas especializadas para identificar el organismo causante.

Requisitos para las vacunas y los materiales de diagnóstico: Actualmente no existen vacunas comerciales disponibles.

A. INTRODUCCIÓN

La sarna es una forma de dermatitis ectoparasitaria desencadenada y mantenida por varias especies de ácaros, y caracterizada por formación de costras, alopecia y prurito de la piel. Los ácaros y las garrapatas constituyen los Acarina, una subclase de los Arachnida. Dentro de esta subclase los ácaros están a su vez divididos en dos superórdenes: los Parasitiformes y los Acariformes. Los Acariformes contienen tres órdenes: los Astigmata (acaridida, no poseen estigmas), los Prostigmata (actinedida, poseen estigmas detrás del gnatosoma) y los Oribatida (cryptostigmata) (3). Todas las especies principales de los ácaros de la sarna están contenidas dentro de los órdenes Astigmata y Prostigmata. Astigmata es un grupo bien definido de ácaros de movimiento lento y débilmente esclerotizados, incluyendo las familias de importancia médica o veterinaria- Sarcoptidae y Psoroptidae. Prostigmata es el orden de ácaros más heterogéneo, con adultos con tamaño oscilando desde 100 µm hasta 16 mm (21). Incluidos en los Prostigmata se encuentran los Trombiculidae (ácaros de la cosecha), parásitos como larvas pero predadores de vida libre en los estados de niña o adulto, y las familias de ácaros propiamente dichas, Psorergatidae (*Psorobia* [*Psorergates*] sp.), Demodicidae (*Demodex* sp.) y Cheyletiellidae (*Cheyletiella* sp.) (3).

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la sarna en animales domésticos se basa en las manifestaciones clínicas y la demostración de ácaros o sus estadios de desarrollo en raspados de piel (19). Deben consultarse claves ilustradas especializadas para identificar el organismo causante.

1. Identificación del agente

La sarna puede ser el resultado de la infestación por ácaros astigmátidos, por ejemplo *Chorioptes*, *Knemidokoptes*, *Notoedres*, *Otodectes*, *Psoroptes*, y *Sarcoptes*, o por los ácaros prostigmátidos, por ejemplo *Cheyletiella*, *Demodex* y *Psorobia*.

A) Astigmata

Los Astigmata son ácaros pequeños de piel fina, generalmente carentes de cubiertas protectoras evidentes. Las bases de las coxas están hundidas en el cuerpo y se denominan epímeros cuando se encuentran fuera del cuerpo y apodemas cuando se encuentran dentro del cuerpo. El empodio es parecido a una pinza y el pedicelos es pedunculado o sésil. No se encuentran pinzas verdaderas. Los huevos fertilizados emergen a través de una abertura antero-ventral, la abertura ovípara o genital. La mayoría de las especies con importancia médica o veterinaria se encuentran en la división Psoroptidia, que agrupa a los Psoroptoidea (Sarcoptidae y Psoroptidae), los Analgoidea (Knemidokoptidae, Cytoditidae y Laminosoptidae) y los Pyroglyphoidea (Pyroglyphidae). La división Acaridae contiene los ácaros de los productos almacenados, que pueden causar sarna transitoria y ser una fuente importante de alérgenos.

i) Sarcoptidae

Los ácaros sarcóptidos (sarcoptiformes) son parásitos obligados, que anidan en la piel de los mamíferos. Son ácaros globosos con la superficie ventral aplanada y la cutícula finamente estriada. Los quelíceros están adaptados para cortar y pelar.

a) *Sarcoptes scabiei*

El ácaro (*Sarcoptes scabiei*) es la causa de la sarna o prurito sarcóptico en humanos y un amplio rango de mamíferos salvajes y domésticos (tanto carnívoros como herbívoros) en todo el mundo, afectando generalmente a las partes del cuerpo escasamente pobladas de pelo. El número de especies dentro del género está aún sujeto a debate. Estudios de poblaciones de ácaros *Sarcoptes* en un amplio rango de hospedadores han sugerido que solamente existe una especie tipo (*Sarcoptes scabiei*), con un número de variantes que infestan un amplio rango de hospedadores mamíferos (14). Investigaciones recientes basadas en el análisis molecular del gen ITS-2 del ARNr sugieren que el género *Sarcoptes* es monoespecífico (37). Los humanos se infestan fácilmente, particularmente en condiciones de pobreza o hacinamiento (35).

Sarcoptes puede ser identificado por su tamaño, y morfología. El contorno de los ácaros adultos es circular y de aproximadamente 250 µm de longitud, aunque cuando se desarrollan los ovarios en la hembra, puede incrementar su tamaño hasta 300 a 500 µm de longitud. La cutícula (tegumento) es estriada, soportando en el dorso un parche central de púas erectas y estructuras similares a ganchos que disminuye su densidad de manera posterolateral. Las patas se encuentran desarrolladas débilmente y en ambos sexos los pretarsos de las patas I y II soportan pinzas empodiales, pero los aparatos de succión ambulacrales se encuentran sobre pedicelos largos no segmentados (pedúnculos). Los epímeros (apodemas) del primer par de patas están fundidos en forma de "Y". Las patas III y IV de la hembra (identificable por la abertura transversal de deposición de huevos [oviporo] en el medio de la superficie ventral) son cortas y terminan en ventosas largas y carecen de pedicelio pedunculado. Se encuentran situadas en la superficie ventral y no son visibles en perspectiva dorsal. Los machos son más pequeños y distinguibles por la presencia de un pedicelio pedunculado en las patas IV, entre las cuales se encuentra un patente aparato genital esclerotizado. Las ninfas son parecidas a la hembra, aunque más pequeñas y sin oviporo. Las larvas recuerdan a las ninfas, pero tienen solamente tres pares de patas. Un ácaro similar, *Trixacarus caviae*, se encuentra en cobayas, pero es más pequeño y el ano es dorsal. Las reacciones inmunes secundarias pueden producir una erupción en sitios alejados del área infestada.

b) *Notoedres spp.*

Notoedres también anida en la epidermis del hospedador y es similar a *Sarcoptes*, pero puede distinguirse por la ausencia de espinas dorsales y por el ano dorsal. Se han descrito unas 20 especies de *Notoedres* de las cuales el ácaro de la sarna del gato, *Notoedres cati*, presenta interés veterinario, produciendo una sarna altamente contagiosa e intensamente pruriginosa en los gatos (y a veces en perros y conejos). Normalmente las infestaciones comienzan en la cabeza del gato, a partir de donde pueden diseminarse. *Notoedres muris* se encuentra en ratas y *N. musculi* en el ratón doméstico. *Notoedres cati* es similar a *S. scabiei* al presentar en todos los estadios pedicelos largos no segmentados con ventosas terminales en las patas I y II, y en la pata IV en el macho. *Notoedres cati* es considerablemente más pequeño, la hembra es de 225 µm y el macho 150 µm. El ano se encuentra localizado sobre la superficie dorsal y no existen espinas proyectadas, aunque las estrías rompen en un patrón parecido a escamas en posición dorsal media y las ventosas macizas sustituyen a las ventosas cónicas de *S. scabiei* similares a ganchos.

ii) Analgoidea

Los Analgoidea incluyen 12 especies de los ácaros de la sarna *Knemidokoptes* (Knemidokoptidae), el ácaro del saco aéreo de las aves de corral (*Cytodites nudus*: Cytoditidae) y los Laminosoptidae, representados por *Laminosoptes cysticola*, que infesta el tejido celular subcutáneo de pavos y pollos.

a) *Knemidokoptes* sp.

Tres especies de *Knemidokoptes* son importantes en veterinaria: *K. mutans*, que infesta la epidermis de las patas de las aves de corral (causando la “pata descamada”), *K. gallinae* (*Neoknemidokoptes gallinae*, *Mesoknemidokoptes laevis gallinae*), el “ácaro desplumante”, que infesta la piel de las aves de corral cerca de la base de las plumas, y *K. pilae* que infesta los barrotes de la jaula y los pájaros (causando la “cara escamosa”). Los *Knemidokoptes* hembra tienen 400 µm de largo, y las escamas dorsales, si están presentes, son débiles e irregulares. *Knemidokoptes gallinae* (*Mesoknemidokoptes*) no tiene ninguna escama (3). En la superficie dorsal media anterior están presentes dos bandas esclerotizadas, casi paralelas, y conectadas en posición posterior por una banda transversal poco desarrollada. En el macho, los epímeros (apodemas) del primer par de patas están unidos en forma de “Y”, y en la hembra, los epímeros (apodemas) están unidos en forma de “U”. Todas las patas de los machos y las larvas tienen almohadillas pedunculadas, pero se encuentran ausentes en el estado de ninfa y en las hembras. El ano está situado en posición terminal. La hembra es vivípara y existen dos estados de ninfa y uno de larva.

iii) **Psoroptidae**

Los miembros de la familia Psoroptidae son ácaros ovales, parásitos de la piel de los mamíferos, que no anidan dentro de la piel. La cutícula (tegumento) es estriada, las patas III y IV son habitualmente visibles desde arriba, los epímeros (apodemas) de la pata I no están fusionados, y no existen ventosas verticales en el prodosoma. El macho posee aparatos succionadores adanales prominentes que se acoplan con los tubérculos copuladores de la tritonina hembra (“hembra pubescente”). El oviporo invertido con forma de U sobresale en la región ventral de la hembra, y es posterior a la pata II. Tres géneros tienen importancia veterinaria: *Psoroptes*, *Chorioptes* y *Otodectes*.

a) *Psoroptes* spp.

Los *Psoroptes* spp. tienen patas fuertemente desarrolladas que portan, en todas las fases, ventosas con forma de embudo sobre pedicelos largos trisegmentados. La hembra es de color blanco perla y tiene 750 µm de longitud. El macho tiene un par de lóbulos opistosomales y un par de aparatos copuladores. Los ácaros *Psoroptes* causan una dermatitis debilitante que acarrea pérdida de lana/pelo y formación de una costra con prurito. Se reconocen cinco especies de *Psoroptes* (33): *Psoroptes ovis*, un ácaro del cuerpo que causa sarna en ovejas, ganado vacuno y caballos, *P. equi*, un ácaro del cuerpo de los équidos, *P. natalensis*, un ácaro del cuerpo de ganado vacuno y caballos, *P. cuniculi*, el ácaro del oído de los conejos, cabras, caballos y ovejas, y *P. cervinus*, un ácaro del oído del muflón de las Rocosas, alce y wapiti. Una sexta especie no validada es *P. auchiniae*, un ácaro del oído de los camélidos del Nuevo Mundo. *Psoroptes natalensis* y *P. equi* se pueden distinguir morfológicamente por la longitud de la cuarta ventosa opistosomal (L_4OOS) del macho (33). En *P. natalensis* la ventosa es espatulada, igual que el L_4OOS más corto del macho de *P. cervinus* (22). Es difícil separar *P. ovis* y *P. cuniculi* por su morfología. Igual que en el género *Sarcoptes*, el número de especies en el género *Psoroptes* esta sujeto a debate (25). *P. ovis* y *P. cuniculi* pueden ser variantes de la misma especie (4).

b) *Chorioptes*

Las patas de los ácaros *Chorioptes* poseen ambulacras amplias con forma de cuenco que nacen sobre pedicelos muy cortos no segmentados, excepto sobre las patas III de la hembra, que finalizan en dos setas largas. Los *C. bovis* hembras son más pequeños que *Psoroptes*, y tienen 400 µm de largo. El macho de *C. bovis* tiene pedicelos en los cuatro pares de patas, un par de lóbulos opistosomales cuadrados a rectangulares, y un par de ventosas copuladoras en posición anterior. Los lóbulos opistosomales portan dos pelos espatulados (parecidos a palas), junto con tres ventosas normales de longitud variable. Las partes de la boca son amplias y redondeadas, adaptadas para masticar. *C. bovis* infesta ganado vacuno, cabras, caballos, ovejas, camélidos y conejos, y *C. texanus* ha sido encontrado en cabras, renos y ganado vacuno (28, 32). Una tercera especie, *C. panda*, ha sido encontrada infestando el Panda Gigante (15). Los lóbulos opistosomales de *C. texanus* tienen un perfil más triangular que *C. bovis* y la pareja de cerdas opistosomales espatuladas son mucho más largas. *C. texanus* habita generalmente las partes bajas de la pata en cabras, caballos y camellos, de la misma forma que *C. bovis* en las ovejas, aunque en el último caso también puede encontrarse infestado el escroto, lo que ha sido relacionado con infertilidad en los carneros. En el ganado vacuno la sarna coriáptica se manifiesta comúnmente en la base de la cola, el perineo y la parte trasera de la ubre. El ácaro se alimenta en la superficie externa de la piel causando inflamación, exudación y formación de costra. Las infestaciones fuertes pueden ocasionar enfermedad, lo que puede conducir a la emaciación y daño en las pieles (35).

c) *Otodectes*

Los machos de *Otodectes* son similares a *Chorioptes*, aunque los lóbulos opistosomales son mucho menos visibles, los aparatos copuladores se encuentran presentes y los pelos son menos espatulados. Los epímeros que se extienden desde las bases de las patas I y II se encuentran unidos. El macho posee ambulacras amplias con forma de cuenco que nacen sobre pedicelos muy cortos no segmentados en todas

las patas, pero solamente las patas I y II de la hembra tienen pedicelos y ambulacros. Las patas III de la hembra terminan en dos ventosas largas y las patas IV son cortas (3). *Otodectes cynotis* se encuentra en los oídos (y ocasionalmente en otras partes del cuerpo), causando otitis parasitaria en perros domésticos, gatos, zorros y hurones junto con un otros carnívoros silvestres (34). *Otodectes cynotis* se alimenta en la superficie externa de la piel causando inflamación y exudación. Una exudación excesiva puede conducir a eczema húmedo sobre las superficies de piel adyacentes. La membrana timpánica puede perforarse y se puede desarrollar otitis media y signos nerviosos (por ejemplo convulsiones).

iv) Ácaros astigmados de vida libre

Los ácaros astigmatidos de vida libre ("en el forraje") pueden encontrarse en gran número en alimentos almacenados, cereales, alimento de aves de corral, etc. Su ingestión puede conducir a trastornos gastrointestinales. Los ácaros también pueden ser causa de sarna accidental en mamíferos a través del contacto con el material antigeníco presente en el alimento infestado o en el ambiente. Los trabajadores que manejan alimento almacenado infestado pueden desarrollar reacciones frente a los ácaros y sufrir de prurito, dermatitis, rinitis o asma (35). La causa de la respuesta no ha sido establecida pero se asume que es alérgica o debida a mordeduras. La característica más obvia de los ácaros del forraje más comunes (Acaridae) es la posesión de muchos "pelos", los cuales son más largos que los de las formas parasitarias, y pueden ser simples, ramificados o espatulados. A menudo en algunos géneros (por ejemplo *Glycyphagus*) los pelos posteriores llegan a enredarse en los desechos. *Acarus siro*, probablemente el más común de estos ácaros, tiene pelos más cortos.

B) Prostigmata

Los ácaros prostigmatidos se encuentran débilmente esclerotizados, y cuando existe un sistema respiratorio los estigmas se abren sobre el gnatosoma o la parte anterior del propodosoma. Los palpos se encuentran normalmente libres y altamente desarrollados, bien como cierres con forma de pinza u órganos sensoriales. Normalmente los quelíceros están modificados para perforar (3, 35). Se encuentran incluidos en los Prostigmata los Trombiculidae (ácaros de la cosecha o "chigger"), parásitos como larvas, aunque predadores de vida libre en los estados de ninfa y adulto, y las familias de ácaros de la sarna propiamente dichas Psorergatidae (*Psorobia* [*Psorergates*] sp.), Demodicidae (*Demodex* sp.) y Cheyletiellidae (*Cheyletiella* sp.) (3).

i) *Psorobia* (*Psorergates*) spp.

Se han aislado dos especies de *Psorobia* a partir de animales domésticos y una especie en animales de laboratorio: *P. bos*, el "parásito benigno" de ganado vacuno, *P. ovis*, la especie más importante que se encuentra en la oveja Merina, y *Psorergates simplex* (*Psorergates muricola*) a partir de animales de laboratorio (3). Las larvas de *Psorobia* salen del huevo con las patas cortas, y se vuelven progresivamente más grandes en cada una de las tres mudas de la ninfa, mientras que durante el estado adulto las patas se encuentran bien desarrolladas y los ácaros son móviles. Los adultos de ambos sexos son muy pequeños (200 µm), y se pueden reconocer por las patas colocadas radialmente alrededor de un cuerpo más o menos circular. Cada pata tiene sobre cada fémur una espina curvada hacia dentro. La mayoría de los ácaros se encuentran bajo el extracto córneo y en las capas superficiales de la piel de los costados, flancos y muslos del hospedador, alimentándose del líquido exudado. El área infestada se encuentra seca y sucia, las fibras de lana se rompen fácilmente, y la lana restante se junta en forma de mechones rotos. La irritación provoca que las ovejas se froten, golpeen el área afectada y mastiquen su lana, lo que resulta en el "trastorno de los mechones" y la pérdida de valor de la lana.

ii) *Cheyletiella* spp.

Los *Cheyletiella* (ácaros de la piel) son ácaros grandes (385 µm) con pinzas palpales grandes curvadas y un peritremo respiratorio o estoma visible en las bases de los quelíceros con forma de "M". *Cheyletiella* es un parásito obligado, que habita en la capa de queratina de la epidermis. Los ácaros se desarrollan rápidamente, dando lugar al término "caspa andante". Tres especies tienen importancia veterinaria, causando dermatitis benigna no supurativa en mamíferos y dermatitis transitoria en humanos: *C. parasitovorax* se encuentra en gatos, la región escapular de los conejos, y ocasionalmente en humanos, *C. yasguri* origina una infestación altamente infecciosa de los cachorros (con los perros adultos como portadores), y *C. blakei* causa una dermatitis leve en gatos. *Cheyletiella parasitovorax* tiene un órgano sensorial oval (con forma de pala) o seta (solenidio) sobre el pliegue de la primera pata, mientras que el de *C. yasguri* está dividido apicalmente (con forma de corazón) (3).

iii) *Demodex* spp.

Los *Demodex* se reconocen fácilmente por su forma anular y vermiforme ("parecida a un gusano"), pero pueden ser pasados por alto debido a su pequeño tamaño de 100–400 µm. *Demodex* habita en los folículos capilares y las glándulas sebáceas y meibomianas de la piel de un gran número de mamíferos domésticos y silvestres, incluidos los humanos. Los machos de *Demodex* viven cerca o en la superficie de la piel y las

hembras en los folículos. Se encuentran distintas especies en diferentes hospedadores, y se puede encontrar más de una especie en el mismo hospedador, por ejemplo *D. folliculorum* y *D. brevis* en humanos (12). La sarna demodéctica tiene gran importancia en perros (especialmente en razas de pelo corto), cabras y cerdos, y es menos importante en ganado vacuno, caballos, ovejas y gatos. Normalmente no existe irritación o estados patológicos, pero en algunos individuos la cantidad y propagación de los ácaros del hospedador aumenta hasta convertirse en una demodicosis clínica. En el ganado se manifiesta como nódulos planos en la piel con un aumento masivo de las glándulas sebáceas que contienen una gran cantidad de ácaros de *Demodex*. Las infestaciones en los perros pueden hacerse generalizadas como una forma escamosa, asociada con pérdida de pelo y engrosamiento de la piel. La demodicosis pustular es la forma más grave en los perros y se encuentra complicada por infecciones bacterianas secundarias. El diagnóstico de la demodicosis depende de la recuperación de ácaros a partir de raspados profundos de la piel. Los ácaros se pueden identificar fácilmente como *Demodex*, aunque se necesitan claves especializadas para la identificación de la especie (23).

2. Diagnóstico de la escabiosis o sarna

El diagnóstico definitivo de la escabiosis o sarna debe basarse en la recuperación e identificación del ácaro a partir de los hospedadores afectados. El examen visual de una lesión sospechosa de sarna puede revelar los ácaros más grandes (por ejemplo *Psoroptes*), pero en la mayoría de los casos es necesario tomar raspados de piel a partir del borde de las lesiones visibles. Se deben consultar claves especializadas para identificar el organismo causante (3).

Un indicio de la presencia de ácaros de *Psoroptes* es la respuesta del hospedador al arañado o frotado de la piel afectada por parte del operario, al responder mediante un reflejo de mordisco y/o rasguño contra si mismo. El ejercicio forzado seguido de trote incrementará el calor corporal y la absorción percutánea asociada de antígenos /irritantes del ácaro, provocando la manifestación de signos clínicos. Los raspados de piel se recogen a partir del área afectada. Cuando se diagnostica escabiosis sarcóptica hay que recordar que la distribución de la erupción no tiene relación con la distribución de los ácaros. La lana o el pelo deben ser esquilados (y almacenados para el diagnóstico diferencial de otros ectoparásitos o micosis). El área seleccionada para raspar debe ser la parte húmeda del borde de la lesión. Si se sospecha sarna sarcóptica, el raspado se debe tomar a partir del área sin pelo o donde se observen prurito o granos. En la sarna psoróptica de las ovejas (costra de las ovejas) el área seleccionada es el borde de la lesión en progresión, pero se pueden recoger raspados a partir de cualquier parte de la lesión en infestaciones por *Psoroptes* en conejos o ganado vacuno. En general, para los ácaros que viven en la superficie de la piel (por ejemplo *Psoroptes* o *Chorioptes*), los raspados deben ser recogidos con la hoja del escalpelo situada en un ángulo agudo, afeitando más que raspando la epidermis externa. *Demodex*, *Psorobia* o *Sarcoptes* se encuentran anidando dentro de la piel, y la hoja del escalpelo debe mantenerse en ángulo recto y rasparse la piel hasta que rezume sangre. Una gota de glicerina o parafina líquida colocada sobre la piel o la hoja del escalpelo antes de que la piel sea raspada ayudará en la recogida de ácaros (29). En la sarna pustular demodéctica los ácaros son generalmente abundantes y pueden ser evidenciados mediante el examen del contenido cremoso de una pústula abierta o cortada. En el caso de lesiones escamosas, puede ser necesario un raspado profundo. En casos de sarna del oído ("canker") en gatos, perros o conejos el material costoso del interior del oído externo se puede despegar con pinzas de extremos romos. Se ha visto que una técnica para recoger ácaros mediante limpieza por vacío es útil y más sensible que el raspado de la piel (21). Estos autores encontraron *Cheyletiella*, *Sarcoptes*, *Psoroptes*, *Otodectes*, *Demodex* y ácaros del forraje a partir de perros, ovejas o cerdos infestados, empleando un tratamiento con KOH al 10% del material recogido por vacío antes del examen microscópico. Ocasionalmente se puede hacer un diagnóstico de sarna cuando los ácaros se encuentran en muestras fecales, pos ejemplo a partir de perros con prurito.

En casos sospechosos de otoacariosis (*Otodectes* o *Psoroptes*) en los oídos de gatos, perros, conejos, ovejas y cabras, los ácaros vivos se pueden observar mediante examen auroscópico del canal auditivo externo (EAC), aunque esta técnica puede ser difícil si se aplica a animales grandes o a gran número de animales. En esta situación puede ser necesario taponar el canal auditivo externo. Se insertan bastoncillos de algodón de tamaño adecuado dentro del EAC hasta que se encuentra resistencia, se giran entonces lentamente y se quitan. Se debe tener cuidado de que los bastoncillos entren en el EAC y no en las sacos ciegos del tragus. También se debe tener cuidado con los animales jóvenes.

Los raspados de piel o bastoncillos de algodón del oído deben ser transferidos inmediatamente a tubos pequeños que se pueden tapar firmemente, o a botellas de plástico con tapadera. El envío de sobres sellados no es recomendable ya que pueden secarse o perderse. Los *Chorioptes*, *Otodectes*, *Psoroptes* y *Sarcoptes* vivos se pueden observar fácilmente durante el examen directo del raspado original de la piel o bastoncillo de algodón en un microscopio de disección (40 x), con iluminación incidente. Los ácaros estarán activos después de la incubación de la muestra a 37°C durante 30 minutos y se pueden transferir fácilmente a portas de microscopio utilizando una aguja de montaje.

Los ácaros se pueden montar directamente en líquido de Berlese (goma cloral), líquido de Vitzmunis, medio de Hoyer o el medio PVA modificado de Heinze (13). Se coloca una gota de medio en el centro del porta, se

transfiere el espécimen en su interior mediante un cepillo fino o una aguja entomológica, y se eliminan las burbujas de aire con una aguja. Se coloca el cubreobjetos sobre el canto en un lado del medio, se dejar caer lentamente empleando una aguja, y se presiona entonces ligeramente con la aguja. Si hay demasiado medio la presión forzará la salida de alguna cantidad de medio. Si hay demasiado poco medio, se añaden pequeñas gotas, una cada vez, dejándolas fluir bajo el cubreobjetos. Después de montar, se dejan secar los portas a temperatura ambiente durante 5–7 días antes de rodearlos con esmalte de uñas u otro sellador insoluble. El tiempo de secado puede disminuirse colocando los portas en un horno (40–45°C) durante al menos 2 días.

Para localizar ácaros vivos y muertos de especies más pequeñas (por ejemplo *Demodex*) el raspado deberá procesarse con hidróxido potásico. Se pueden colocar grandes cantidades de material (hasta 5,0 g) en un tubo de ensayo y cubrirse con hidróxido potásico al 10%. El tubo se coloca entonces en un recipiente con agua, el cual se lleva gradualmente a ebullición durante 5–10 minutos. Un método igual de efectivo y más seguro es calentar a 37°C durante un periodo de tiempo más largo. La digestión se deja enfriar y se centrifuga entonces a 600 g (2.000 rpm) durante 10 minutos. Se debería evitar un hervido prolongado ya que con el tiempo los ácaros pueden desintegrarse. Puede ser necesaria una centrifugación más rápida para las especies más pequeñas. El sobrenadante se decanta rápidamente y el sedimento se examina al microscopio. Se ha sugerido que un procedimiento de flotación sobre el sedimento después de decantar el sobrenadante puede aumentar enormemente la recuperación de ácaros. Alternativamente se puede colocar un pequeño número de especímenes en ácido láctico sobre un porta excavado (dentado). El porta se pasa constantemente sobre un Bunsen o un mechero de alcohol. Se debe tener cuidado de que el porta no se caliente demasiado, ya que los gases expulsados del cuerpo de los ácaros pueden hacer que estos "salten". Si aparece humo en la superficie del fluido el proceso está siendo demasiado caliente. Estos métodos son necesarios para aclarar el contenido del cuerpo con vistas a preparar los ácaros para el examen microscópico. Es aconsejable llevar a cabo estos métodos en una campana con extractor debido a los humos cáusticos que se liberan. La tinción utilizando rosa lignina o negro clorazol puede ayudar a resaltar estructuras o a identificar ácaros embebidos en el tejido del hospedador (3).

Pueden aparecer problemas potenciales de zoonosis cuando se manejan animales infestados o material de diagnóstico que contiene *Cheyletiella*, *Sarcoptes*, *Notoedres* o *Trixacarus*. Los restos cuticulares o las heces de cualquier especie de ácaro pueden ser un riesgo para aquellos predispuestos a desarrollar alergia al ácaro del polvo (*Dermatophagoides pteronyssinus*).

3. Pruebas serológicas

En Suecia se utiliza un enzimoinmunoensayo (ELISA) para el diagnóstico serológico de la sarna sarcóptica en perros y cerdos (1, 2, 8, 9), y se utiliza actualmente en campañas de erradicación de escabiosis porcina en Suecia (18) y Suiza (20). Actualmente hay un kit ELISA disponible comercialmente para el serodiagnóstico de la sarna sarcóptica en cerdos y perros (sarcoptes-ELISA 2001® PIG; DOG). Se han desarrollado técnicas ELISA para controlar infestaciones por *Psoroptes* en ovejas, ganado vacuno y animales no domesticados (10, 11, 16, 17, 22, 24, 36), pero ninguna se encuentra disponible comercialmente.

Sin embargo, las técnicas ELISA son de uso rutinario por los investigadores para la detección de anticuerpos específicos frente a *S. scabiei* (1, 2).

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y LOS MATERIALES DE DIAGNÓSTICO

No existen actualmente vacunas comerciales disponibles para proteger a los animales frente a los ácaros de la sarna. Las vacunas de ácaros, a) reducirían la necesidad de acaricidas químicos, b) reducirían la polución ambiental, c) producirían pocos residuos en carne/leche/lana, y d) reducirían el riesgo de resistencia. En ovejas (5–7, 26, 30, 31) y ganado vacuno (27) se ha investigado el potencial del control inmunológico de *Psoroptes ovis*. Todos estos estudios demostraron que, bajo condiciones experimentales, las fracciones solubles de *P. ovis* redujeron significativamente la patología de la escabiosis de la oveja e inhibieron el incremento en la población de *P. ovis*.

REFERENCIAS

1. ARLIAN L.G., MORGAN M.S., RAPP C.M. & VYSZENSKI-MOHER D.L. (1996). The development of protective immunity in canine scabies. *Vet. Parasitol.*, **62**, 133–142.
2. ARLIAN L.G., MORGAN M.S., VYSZENSKI-MOHER D.L. & STEMMER B.L. (1994). *Sarcoptes scabiei*: The circulating antibody response and induced immunity to scabies. *Exp. Parasitol.*, **78**, 37–50.

3. BAKER A.S. (1999). *Mites and Ticks of Domestic Animals. An Identification Guide and Information Source.* The Natural History Museum, London. Her Majesty's Stationery Office, UK.
4. BATES P.G. (1999). Inter- and intra-specific variation within the genus *Psoroptes* (Acarina: Psoroptidae). *Vet. Parasitol.*, **83**, 201–217.
5. BATES P.G. (2000). Differences between primary and secondary infestations with sheep scab. *Vet. Rec.*, **146**, 528–529.
6. BATES P.G. (2000). *Sheep Scab Vaccines. A Practical Approach.* Proceedings of the Sheep Veterinary Society, 24, 127–134, SVS Secretariat, Moredun Research Institute, International Research Centre, Pentlands Science Park, Bush Loan, Penicuik, Midlothian EH26 0PZ, UK.
7. BATES P.G., SMITH W.D., PETTIT D., VAN DEN BROEK A., HUNTLEY J., GROVES B., RANKIN M. & TAYLOR M. (2000). Attempts to immunise sheep against *Psoroptes ovis* (Sheep Scab). *Res. Vet. Sci.*, **68**, (Supplement A), 28.
8. BORNSTEIN S. & ZAKRISSON G. (1993). Humoral antibody response to experimental *Sarcoptes scabiei* var *vulpes* infection in the dog. *Vet. Dermatol.*, **4**, 107–110.
9. BORNSTEIN S. & ZAKRISSON G. (1993). Clinical picture and antibody response in pigs infected by *Sarcoptes scabiei* var *suis*. *Vet. Dermatol.*, **4**, 123–131.
10. BOYCE W.M., JESSUP D.A. & CLARK R.K. (1991). Serodiagnostic antibody responses to *Psoroptes* spp. Infestations in bighorn sheep. *J. Wildl. Dis.*, **27**, 10–15.
11. BOYCE W.M., MAZET J.A.K., MELLIES J., GARDNER I., CLARK R.K. & JESSUP D.A. (1991). Kinetic ELISA for the detection of antibodies to *Psoroptes* sp. (Acarina: Psoroptidae) in bighorn sheep (*Ovis canadensis*). *J. Parasitol.*, **77**, 692–696.
12. DESCH C.E. & NUTTING W.B. (1972). *Demodex folliculorum* (Simon) and *D. brevis* Akbulatova of man. redescription and reevaluation. *J. Parasitol.*, **58**, 169–177.
13. EVANS G.O. (1992). *Principles of Acarology.* CAB International, Wallingford, Oxon OX10 8DE, UK.
14. FAIN A. (1968). Etude de la variabilite de *Sarcoptes scabiei* avec une revision des Sarcoptidae. *Acta Zool. Pathol. Antwerp.*, **47**, 1–196.
15. FAIN A. & LECLERC M (1975). Sur un cas de gale chez le Panda Geant produit par une nouvelle espece du genre *Chorioptes* (Acarina: Psoroptidae). *Acarologia*, **17**, 177–182.
16. FISHER W.F. (1983). Development of serum antibody activity as determined by Enzyme linked Immunosorbent assay in *Psoroptes ovis* (Acarina: Psoroptidae) antigens in cattle infested with *P. ovis*. *Vet. Parasitol.*, **13**, 1218–1219.
17. FISHER W.R., GUILLOT F.S. & COLE N.A. (1986). Development and decline of serum antibody activity to *Psoroptes ovis* antigens and infested cattle in an endemic and non-endemic scabies area of Texas. *Exp. Appl. Acarol.*, **2**, 239–248.
18. JACOBSON M., BORNSTEIN S. & WALLGREN P. (1999). The efficacy of simplified eradication strategies against sarcoptic mange mite infections in swine herds monitored by an ELISA. *Vet. Parasitol.*, **81**, 249–258.
19. KETTLE D.S. (1995). *Medical and Veterinary Entomology*, Second Edition. CAB International, Wallingford, Oxon OX10 8DE, UK.
20. KIRCHER P. & ZIMMERMANN W. (1999). Serologische Bestandesuntersuchung und Sanierungsüberwachung der *Sarcoptes scabiei* var *suis* Infektion: eine seroepidemiologische Studie in raudefreien und chronisch infizierten Betrieben. *Schweiz. Arch. Tierheil.*, **144**, 567–573.
21. KLAYMAN E. & SCHILLHORN VAN VEEN T.W. (1981). Diagnosis of Ectoparasitism. *Mod. Vet. Pract.*, **62**, 767–771.
22. LONNEUX J.F., NGUYEN T.Q., DELHEZ M. & LOSSON B.J. (1997). Antibody response after treatment in cattle affected with *Psoroptes ovis*. *Res. Vet. Sci.*, **63**, 57–60.

23. NUTTING W.B. (1967). Hair follicle mites (*Demodex* spp.) of medical and veterinary concern. *Cornell Vet.*, **66**, 214–231.
24. OCHS H., LONNEUX J.F., LOSSON B.J. & DEPLAZES P. (2001). Diagnosis of psoroptic sheep scab with an improved enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet. Parasitol.*, **96**, 233–242.
25. OCHS H., MATHIS A. & DEPLAZES P. (1999). Single nucleotide variation in rRNA ITS-2 differentiates *Psoroptes* isolates from sheep and rabbits from the same geographical area. *Parasitology*, **119**, 419–424.
26. PETTIT D., SMITH W.D., RICHARDSON J. & MUNN E.A (2000). Localisation and characterisation of ovine immunoglobulin within the scab mite, *Psoroptes ovis*. *Vet. Parasitol.*, **898**, 231–239.
27. PRUETT J.H., TEMEYER K.B., FISHER W.F., BEETHAM P.K. & KUNZ S.E. (1998). Evaluation of natural *Psoroptes ovis* (Acarina: Psoroptidae) soluble proteins as candidate vaccine immunogens. *J. Med. Entomol.*, **35**, 861–871.
28. ROSEN S., YERUHAM I. & HADANI A. (1989). *Chorioptes texanus* (Hirst 1924), Psoroptidae on cattle in Israel. *Acarologia*, **30**, 373–376.
29. SMITH E.K. (1988). How to detect common skin mites through skin scrapings. *Vet. Med.*, 165–170.
30. SMITH, W.D., BATES, P., PETTIT, D.M., BROEK, A. VAN DEN., TAYLOR, M.A (2002). Attempts to immunize sheep against the scab mite, *Psoroptes ovis*. *Parasite Immunol.*, **24**, 303–310.
31. STELLA M., BRAUN M. & NUNEZ J.L. (1997). Effect of pre-immunisation with *Psoroptes ovis* extracts on experimental mange. Abstracts of the 16th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, 10–15 August 1997, Sun City, Republic of South Africa.
32. SWEATMAN G.K. (1957). Life history, non-specificity and revision of the genus *Chorioptes*, a parasitic mite of herbivores. *Can. J. Zool.*, **35**, 641–689.
33. SWEATMAN G.K. (1958). On the life history and validity of the species in *Psoroptes*, a genus of mange mites. *Can. J. Zool.*, **36**, 905–929.
34. SWEATMAN G.K. (1958). The biology of *Otodectes cynotis*, the ear canker mite of carnivores. *Can. J. Zool.*, **36**, 849–862.
35. WALKER A. (1994). Arthropods of Humans and Domestic Animals. A Guide to Preliminary Identification. Chapman and Hall, London, UK.
36. WASSALL D.A., KIRKWOOD A.C., BATES P.G. & SINCLAIR I.J. (1978). Enzyme linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to the sheep scab mite *Psoroptes ovis*. *Res. Vet. Sci.*, **43**, 34–35.
37. ZAHLER M., ESSIG A., GOTHE H. & RINDER H. (1999). Molecular analyses suggests monospecificity of the genus *Sarcoptes* (Acarina: Sarcoptidae). *Int. J. Parasitol.*, **29**, 759–766.

*
* *

TRYPANOSOMA EVANSI INFECTIONS (INCLUDING SURRA)

Aetiology Epidemiology Diagnosis Prevention and Control References

AETIOLOGY

Classification of the causative agent

Order Kinetoplastida; family Trypanosomatidae; Genus *Trypanosoma*; Subgenus Trypanozoon, Species *Trypanosoma evansi*. *T. equinum* in South America is a dyskinetoplastic variant of *T. evansi* and not a separate species.

Transmitted mechanically from infected blood of animals, and is not capable of cyclical development in tsetse *Glossina* spp. Morphologically indistinguishable from *T. brucei*.

Resistance to physical and chemical action

Chemicals/Disinfectants: Controlling arthropod vectors and preventing access to host species is important in preventing new infections. Disinfection does not prevent spread of disease (blood-borne parasite). One minute exposure to ultraviolet light prevents infection.

Survival: Trypanosomes only survive short periods outside the host. *T. evansi* disappears quickly from the carcass after death. Flies no longer transmit the parasites after 8 hours.

EPIDEMIOLOGY

T. evansi has a wide host range. In some countries incidence of surra increases significantly during the rainy season when biting fly populations have greatly increased. Surra affects mainly camels and horses but buffaloes and cattle are also affected. Other species that develop severe disease include donkeys, mules, deer, llamas, dogs, cats, cattle and buffalo. Sheep, goats, pigs and elephants may occasionally develop mild or chronic disease.

Camel raising in Africa and buffalo production in Asia are severely affected.

Hosts

- Pathogenic in most domesticated animals and some wild animals
- Domesticated animals: Horses, mules, donkeys, cattle, buffalo, camels (dromedary and Bactrian), llamas, pigs, sheep, goats, dogs and cats
- Most important single cause of morbidity and mortality in camels
- Wild animals: deer, capybara (reservoir host) and other species
- New world camelids in South America are experimentally susceptible but natural disease has not been reported despite presence in cattle and horses
- Reservoir hosts to camels and horses: cattle, buffalo, capybara, and vampire bat
- Rats and mice are highly susceptible as experimental hosts for detecting subclinical (nonpatent) infections

Transmission

- Direct life cycle with no intermediate host
- Agent is transmitted from animal to animal mechanically by hematophagous flies, including *Tabanus* spp. and *Musca* spp.
 - Also *Lyperosia*, *Stomoxyx* and *Atylotus* genera. Tabanids (horse flies) are the most significant vectors
- Vampire bats in South and Central America are hosts, reservoirs and vectors of *T. evansi*; they transmit *T. evansi* mechanically in their saliva, and may develop high parasitaemia which may kill the bat. Recovered bats serve as carriers

- Carnivores may become infected after ingesting infected meat
- Transmission in milk and during coitus has been documented

Sources of infection

- Blood from infected animals; occasionally meat and milk
- *T. evansi* frequently localises extravascularly in tissues including the central nervous system

Occurrence

T. evansi has a wide distribution in Asia, North Africa (extending into tsetse areas with *T. brucei* infections) and Central and South America.

The main host species varies with the geographical region. Horses are most often affected in South America; horses, mules, buffalo, and deer in China (People's Rep. of); horses, cattle, and buffalo in South-East Asia; and camels in the Middle East and Africa.

For more recent, detailed information on the occurrence of this disease worldwide, see the OIE World Animal Health Information Database (WAHID) Interface
[\[http://www.oie.int/wahis/public.php?page=home\]](http://www.oie.int/wahis/public.php?page=home) or refer to the latest issues of the *World Animal Health* and the *OIE Bulletin*.

DIAGNOSIS

Clinical diagnosis

Morbidity and Mortality: Camels living in northeastern Africa may have infection rates of 20–70%. Case fatality rate in untreated horses and camels is nearly 100%. Surra in cattle and buffalo tends to be chronic with a much lower CFR. Animals subjected to stress, like malnutrition, pregnancy, and physical labour, are more susceptible to disease.

The disease is often rapidly fatal in camels, buffaloes, horses, cattle, llama and dogs, but mild and subclinical infections can also occur in these species. Dogs may also have nervous signs that resemble rabies. Infections in deer are usually chronic with oedema, anaemia, emaciation and nervous signs.

Clinical signs are suggestive but diagnosis must be confirmed by a laboratory.

The disease in susceptible animals, including cattle, buffalo, camels (dromedary and bactrian), horses, pigs, sheep and goats, is manifested by:

- Incubation period in horses, mules, donkeys and camels varies from 5–60 days
- Fever, directly associated with parasitaemia – recurrent episodes occur during the course of disease
- Progressive anaemia, weight loss and icterus
- Progressive weakness and lethargy
- Oedematous swellings of the lower parts of the body: legs, briskets and abdomen (gravity dependent)
- Urticular plaques in the skin
- Petechial haemorrhages of the serous membranes (eyelids, nostrils and anus)
- Abortions reported in buffaloes and camels
- Immunodeficiency
- Death may occur in 2 weeks to 4 months, chronic infections may last up to 2 years

Lesions

Post-mortem lesions are nonspecific and may include:

- emaciation of the carcass
- anaemia
- petechial haemorrhages on some internal organs

- hydrothorax and ascites
- enlarged lymph nodes and spleen

Differential diagnosis

- Horses: African horse sickness, equine viral arteritis, equine infectious anaemia, chronic parasitism, dourine
- Camels: tsetse-transmitted trypanosomosis, anthrax, chronic parasitism
- Cattle: babesiosis, anaplasmosis, theileriosis (East Coast Fever), haemorrhagic septicaemia, anthrax, chronic parasitism, malnutrition
- Dogs: rabies if neurological signs

Laboratory diagnosis

Samples

Parasite identification

- Dried thick and thin blood smears during the febrile phase stained with Giemsa
- Dried thick and thin smears from needle biopsies of prescapular and precrural lymph node aspirates
- Smears from any skin exudates
- Anticoagulated blood in EDTA and/or heparin (10 ml)
- Cerebrospinal fluid
- Impression smears of lungs, liver, and kidney at post mortem

Serological tests

- Serum samples (10–20 ml of serum)

Procedures

Identification of the agent

- Direct identification of the parasite in stained thick or thin blood films or wet mounts.
 - Diagnostic sensitivity is increased significantly by concentrating the parasites in the buffy coat layer of a heparinised microhaematocrit tube
 - The buffy coat is then examined directly at low power (Woo's method) or in a wet preparation with phase-contrast or dark-ground microscopy (Murray's method)
 - Sensitivity is also increased when used at the herd versus individual animal level
 - Parasitaemias are highly variable during the course of infection: high during early infection, low during chronic infection, and almost nil in healthy carriers
 - Mini-anion exchange centrifugation technique: simplified method for detecting low parasitaemia by separating salivarian trypanosomes from host red blood cells
- Direct identification of the parasite in lymph node biopsy smears from fine needle aspirates
- Animal inoculation to reveal subclinical infections: rats or mice
- Recombinant DNA probes: detect trypanosomes in infected blood or tissue; experimental
- Polymerase chain reaction (PCR)
 - More sensitive test than direct identification and similar sensitivity to mouse inoculation
 - False negatives can occur when parasitaemias are very low, which occurs frequently with chronic infections

Serological tests

- Antibody detection ELISA: very useful for large-scale surveys
 - ELISA using variable surface glycoproteins from a *T. evansi* RoTat 1.2 clone successfully differentiated *T. evansi* from *T. brucei*. Protocols are available for equines, camelidae and water buffaloes
- Card agglutination test: also makes use of *T. evansi* RoTat 1.2 clone
- Latex agglutination test: also makes use of *T. evansi* RoTat 1.2 clone

There are OIE Reference Laboratories for Surra (see OIE Web site: http://www.oie.int/eng/OIE/organisation/en_listeLR.htm).

For more detailed information regarding laboratory diagnostic methodologies, please refer to Chapter 2.1.17 *Trypanosoma evansi infections* (including surra) the latest edition of the *OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* under the heading “Diagnostic Techniques”.

PREVENTION AND CONTROL

Surra is one of the most important diseases of camels. Camel raising in Africa and buffalo production in Asia are severely affected by surra. As in tsetse-transmitted trypanosomosis, losses are due to reduced productivity, mortality and cost of treatment. Control of surra can be difficult as there is no vector specificity and a wide range of hosts.

Sanitary prophylaxis

- Control measures are aimed at the host rather than vector, unlike Nagana
- Control measures include detection and treatment of infected animals, prophylactic treatment of susceptible animals, and protection of animals from biting flies and vampire bats

Medical prophylaxis

- Drugs such as suramin, prothridium and isometamidium chloride (as a prophylactic) and diminazene aceteturate (curative) can be used although drug resistance has been reported
- For camels melarsomine (cymelarsan) is very effective (curative) against *T. evansi*
- So far this drug is only registered for use in camels
- No vaccines are available nor likely in the near future because of the ability of trypanosomes to rapidly change their surface glycoproteins to avoid the immune response

For more detailed information regarding safe international trade in terrestrial animals and their products, please refer to the latest edition of the *OIE Terrestrial Animal Health Code*.

REFERENCES AND OTHER INFORMATION

- Brown C. & Torres A., Eds. (2008). - USAHA Foreign Animal Diseases, Seventh Edition. Committee of Foreign and Emerging Diseases of the US Animal Health Association. Boca Publications Group, Inc.
- Coetzer J.A.W. & Tustin R.C. Eds. (2004). - Infectious Diseases of Livestock, 2nd Edition. Oxford University Press.
- Kahn C.M., Ed. (2005). - Merck Veterinary Manual. Merck & Co. Inc. and Merial Ltd.
- Radostits O.M., Gay C.C., Hinchcliff K.W. & Constable P.D. (2007) - Veterinary Medicine, 10th Edition. Saunders Ltd.
- Spickler A.R. & Roth J.A. Iowa State University, College of Veterinary Medicine - <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseasesInfo/factsheets.htm>
- World Organisation for Animal Health (2008). - Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.1.17. OIE, Paris.
- World Organisation for Animal Health experts and laboratories: (http://www.oie.int/eng/OIE/organisation/en_listeLR.htm).

*
* *

The OIE will periodically update the OIE Technical Disease Cards. Please send relevant new references and proposed modifications to the OIE Scientific and Technical Department (scientific.dept@oie.int). Last updated October 2009.