

EVALUACION DE LA PRUEBA DE AGLUTINACION DIRECTA EN EL DIAGNOSTICO DEL MAL DE CADERAS EN EQUINOS

Carlos Manuel MONZON, Gladys Alicia JARA & Carlos Blás HOYOS

RESUMEN

Se evaluó la utilidad de la prueba de aglutinación directa (AD) para diagnosticar el Mal de Caderas. Se emplearon cuarenta y cuatro sueros provenientes de dos lotes de equinos naturalmente infectados con el *Trypanosoma evansi* (Lote 1 y Lote 2). La AD fue positiva (Aglutinación $\geq 1:512$) en 13 de 16 equinos (81.2%), de los que se aislaron los parásitos. En doce de estos animales (92%) se detectaron IgM anti *T. evansi* mediante la AD realizada con 2-mercaptoetanol (AD + 2-ME). La AD fue positiva en 17 de los 28 equinos que resultaron negativos al diagnóstico parasitológico.

Un tercer lote de cinco equinos infectados con *T. evansi* que presentaba elevados títulos de AD, fue tratado con Suramina Sódica (Naganol-Bayer). La AD + 2-ME evidenció en cuatro animales que, gran parte de estos anticuerpos se ubicaban en la fracción IgM. Posterior al tratamiento farmacológico y, en concordancia de la negativización de la parasitemia, la detección de la IgM anti *T. evansi* no fue posible, mientras que los anticuerpos IgG continuaron detectándose a los doce meses post-tratamiento en valores de 1:512, en tres animales.

Cincuenta sueros de equinos de una zona libre del parásito, que se emplearon como controles, fueron negativos a la AD.

Se recomienda la utilización de la AD y AD + 2-ME para el uso de rutina en el diagnóstico del Mal de Caderas de los equinos, en combinación con otros métodos parasitológicos sensibles.

UNITERMOS: *Trypanosoma evansi*; Aglutinación Directa; Mal de Caderas; Equinos.

INTRODUCCION

El *Trypanosoma evansi* produce en los equinos una enfermedad conocida como "Mal de Caderas" en Argentina^{8,9} y Brasil¹⁶. El diagnóstico de la enfermedad, mediante los métodos parasitológicos standard, tiene ciertas limitantes^{7,10}. Por ello, se utilizan también las técnicas inmunoenzimáticas que detectan antígenos de los parásitos y, las técnicas que revelan anticuerpos^{12,13,14}, aunque ninguna de ellas indican la totalidad de los animales infectados.

A diferencia de otros métodos serológicos^{5,8,9}, la

aglutinación directa (AD)¹¹, permite diferenciar los anticuerpos IgM anti *T. evansi* que aparecen asociados con el proceso infeccioso de las IgG que perduran como un recuerdo inmunológico en los animales que han superado la infección. La prueba AD para el diagnóstico del Mal de Caderas, empleando antígeno estabilizado, ha sido recientemente desarrollada¹¹, requiriéndose aún realizar mayores evaluaciones sobre la utilidad de la misma, lo que constituye el objetivo de este trabajo.

MATERIALES Y METODOS

Se realizaron diagnósticos serológicos y parasitológicos de tres lotes de equinos naturalmente infectados con *T. evansi*. Para ello se recolectaron de todos los animales, sangre con y sin anticoagulante (EDTA).

Lote N° 1: compuesto por 25 equinos, con diagnóstico clínico sospechoso para Mal de Caderas, provenientes del Departamento Formosa.

Lote N° 2: 19 equinos de una tropilla del Departamento Pirané (Provincia de Formosa).

Lote N° 3: consistió en 5 equinos infectados con *T. evansi*, provenientes de un establecimiento ganadero de la zona. Estos animales recibieron tratamiento con Suramina Sódica (Naganol-Bayer Lab.), en dosis de 2 gramos cada 100 Kg de peso vivo, repartido en tres aplicaciones cada siete días. El control parasitológico y serológico se realizó a los dos y doce meses posteriores al tratamiento farmacológico.

Diagnóstico Parasitológico: Los parásitos se detectaron mediante el Método de centrifugación de capilares microhematocrito descrito por WOO¹⁷, empleándose un tubo capilar por muestra. En forma adicional, 1 ml de sangre de cada equino fue inoculada por vía intraperitoneal en un par de ratones blancos. Los tripanosomas se buscaron en la sangre de estos roedores dos veces por semana durante un

mes, mediante observación microscópica de una gota de sangre obtenida de la punta de la cola¹⁰. Con la sangre de los ratones positivos, se realizaron frotis que se colorearon con Giemsa para identificar los parásitos.

Diagnóstico Serológico: Se preparó el antígeno de aglutinación directa de acuerdo con la técnica anteriormente descrita¹¹. Sucintamente, el antígeno consiste en una suspensión de parásitos, los cuales fueron separados de la sangre de ratones infectados, por cromatografía de intercambio iónico^{4,6}. Los tripanosomas se lavaron tres veces en buffer pH 7.3. Seguidamente, se adicionó buffer pH 7.6 con 0.2% de tripsina, dejándose 30 minutos a 37°C. Luego los parásitos se lavaron nuevamente tres veces con buffer pH 7.3 y, finalmente se suspendieron en buffer pH 7.3 con formol al 1%. El preparado se filtró dos veces por filtro de 40-60 µ. Posteriormente se ajustó la concentración a una D.O. de 0.040, utilizándose un fotocolorímetro en longitud de onda de 520 nm.

Todos los sueros fueron analizados con la prueba de AD, mediante la técnica anteriormente descrita para diagnosticar el Mal de Caderas en equinos¹¹. La AD detecta anticuerpos anti *T. evansi* en forma semicuantitativa mediante el sistema de dilución de los sueros en policubetas. La detección de los anticuerpos se considera positiva a partir de una aglutinación de 1:512. La prueba realizada con sueros previamente tratados con 2-

TABLA 1

Resultados de la prueba de aglutinación directa en el lote N° 1 de equinos

Diagnóstico parasitológico positivo				Diagnóstico parasitológico negativo			
Equino N°	AD	AD+2-ME	IgM	Equino N°	AD	AD+2-ME	IgM
1	128	N/R	N/R	1	128	N/R	N/R
2	1.024	256	-	2	256	N/R	N/R
3	32.768	128	+	3	128	N/R	N/R
4	128	N/R	N/R	4	512	32	+
5	512	32	+	5	4.086	256	+
6	32.768	256	+	6	128	N/R	N/R
7	32.768	256	+	7	512	32	+
8	16.384	32	+	8	128	N/R	N/R
9	16.384	128	+	9	1.024	32	+
10	2.048	32	+	10	512	32	+
11	4.096	32	+	11	128	N/R	N/R
12	16.384	128	+				
13	1.024	32	+				
14	1.024	32	+				

AD = Aglutinación Directa (dilución inversa).

AD + 2-ME = Aglutinación Directa con 2-Mercaptoetanol (dilución inversa).

N/R = No realizado (muestras con título de AD menor 1:512).

mercaptoetanol (AD + 2-ME), permite detectar las IgM anti *T. evansi* en base al clivaje de estos anticuerpos por el agente reductor. Una disminución de tres o mas diluciones en la capacidad aglutinante de los sueros por efecto del 2-ME, es considerada como indicativo de la presencia de IgM anti *T. evansi*.

Como controles negativos se utilizaron 50 sueros de equinos (Lote N° 4) provenientes de Buenos Aires-Argentina, zona libre de *T. evansi*.

RESULTADOS

Lote N° 1 y N° 2: Los parásitos se detectaron en 16 animales; 14 pertenecían al lote N° 1 y dos al lote N° 2. Los títulos de AD y AD + 2-ME, se encuentran en las TABLAS 1 y 2. Reacción de AD positiva ($\geq 1:512$) se obtuvo en 13 de los 16 animales en los que se detectaron los parásitos (81.2%). El empleo de 2-ME en estas trece muestras, redujo la capacidad de aglutinación de los sueros en tres a ocho diluciones, en doce casos (92%), indicando la presencia de IgM anti *T. evansi*. En tres equinos con parasitemia comprobada (N° 1 y N° 4 del lote N° 1; N° 2 del lote N° 2) la AD dió resultado negativo (18.8%).

De los 28 equinos de ambos lotes que dieron negativo al diagnóstico parasitológico, 17 resultaron

positivos a la AD, detectándose anticuerpos IgM anti *T. evansi* en 15 casos.

La correlación de resultados, obtenida entre el diagnóstico parasitológico por métodos directos y la técnica de AD, se encuentra en la TABLA 3. Una combinación de ambos métodos diagnosticó como positivos 33 animales.

Lote N° 3: En concordancia de la detección de los parásitos, todos los animales presentaron títulos positivos de AD. La AD + 2-ME detectó IgM anti

TABLA 3

Correlación entre diagnóstico parasitológico y prueba de aglutinación directa en cuarenta y cuatro equinos de dos brotes de Mal de Caderas

Diagnóstico Parasitológico	Agglutination directa		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	13	3	16
Negativo	17	11	28
Total	30	14	44

TABLA 2

Resultado de la prueba de aglutinación directa en el lote N° 2 de equinos

Equino N°	AD	AD + 2-ME	IgM	<i>T. evansi</i> *
1	8.192	8	+	+
2	64	N/R	N/R	+
3	64	N/R	N/R	-
4	128	N/R	N/R	-
5	64	N/R	N/R	-
6	4.096	1.024	-	-
7	8.192	512	+	-
8	2.048	1.024	-	-
9	16.384	128	+	-
10	2.048	128	+	-
11	32.768	2.048	+	-
12	16.384	256	+	-
13	32.768	1.024	+	-
14	1.024	64	+	-
15	2.048	128	+	-
16	1.024	128	+	-
17	64	N/R	N/R	-
18	64	N/R	N/R	-
19	1.024	8	+	-

AD; AD + 2-ME; N/R: Idem TABLA 1

*: Diagnosticado por métodos parasitológicos directos.

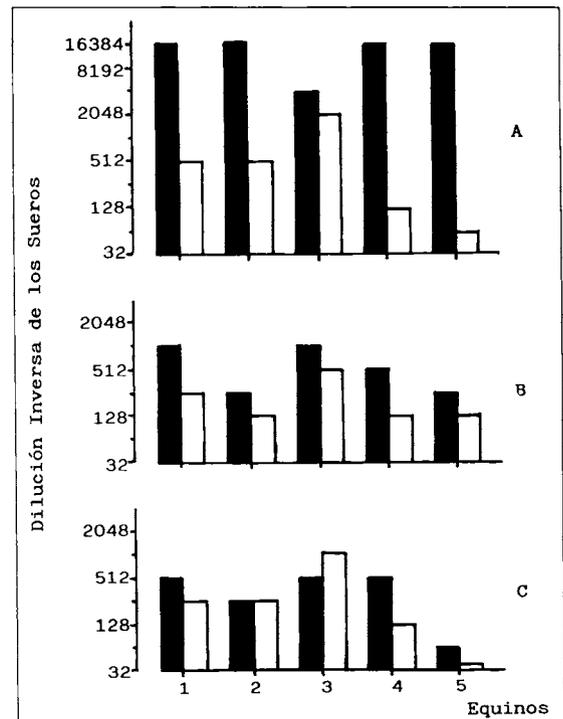


Fig. 1 - Seguimiento de los títulos séricos mediante Aglutinación Directa ■ y Aglutinación Directa + 2-Mercaptoetanol □, en cinco equinos infectados con *T. evansi* (Lote n°3). A: Aglutinación al momento de detectarse *T. evansi* en sangre. B y C: Aglutinación a los dos y once meses después del tratamiento farmacológico. En ambas ocasiones el diagnóstico parasitológico fue negativo.

T. evansi en cuatro de los cinco equinos. Posterior al tratamiento farmacológico, los controles parasitológicos fueron negativos en todos los casos. En tres animales, la AD continuó dando reacción positiva, tal como lo muestra la Figura 1. Estos títulos serológicos, hacia los doce meses, no superaron la dilución de 1:512 y no se modificaron en forma sustancial por acción del 2-ME, indicando que se trataban principalmente de anticuerpos IgG.

Lote N° 4: Todos los sueros que se emplearon como controles negativos, presentaron títulos menores de 1:512.

DISCUSION

Los resultados del presente trabajo demuestran que la AD es una prueba de utilidad para diagnosticar el Mal de Caderas de los equinos. La correlación de diagnóstico en equinos con diagnóstico parasitológico positivo y test de AD positivo, determinó una sensibilidad de 81.2%. El 18.8% restante correspondió a falsos negativos. La falta de aglutinación al emplear estos sueros se debería a las múltiples variaciones que experimenta el *T. evansi*³ o se trataría de animales que estarían cursando el estado inicial de la enfermedad, donde el tenor de anticuerpos es aún bajo. No encontramos reacciones falso positivos con los sueros provenientes de zona libre de *T. evansi*, sin embargo en un estudio anterior, la especificidad fue del 97%¹¹.

La AD indicó como positivo un número de animales (17 de 28) en los cuales no se logró aislar los parásitos. El *T. evansi* no siempre se lo detecta en la sangre de los animales infectados, porque la parasitemia puede ser sub-patente o, las cepas actantes son poco virulentas para los ratones^{7,10}. Fueron muy llamativos los resultados del lote N° 2, donde la detección de los tripanosomas se limitó a 2 de 19 animales, mientras que la AD fue positiva en 13 casos. Los títulos de AD de estos sueros fueron muy elevados, llegando a diluciones de 1:32768. El 2-ME redujo la capacidad de aglutinación de estos sueros en tres o más diluciones en la mayoría de los casos, señalando que se trataban de anticuerpos IgM anti *T. evansi*, indicadores de un proceso de infección activo¹¹. Se comprobó así que el *T. evansi* estaba infectando a la mayoría de los equinos de la tropilla N° 2. Estos resultados se repitieron con la tropilla N° 1. De esta manera, la AD permite identificar animales con *T. evansi* en los cuales parásitos no se logran aislar.

Además, se consigue evaluar la extensión de la parasitosis en las tropillas estudiadas, información de suma utilidad al momento de administrarse el tratamiento farmacológico específico.

Las IgG anti-*evansi* perduran por tiempo prolongado, aún después que los animales superan la infección, mientras que las IgM retornan rápidamente a sus valores normales^{5,11}. Para el caso del lote N° 3, en concordancia con la ausencia de parasitemia, la detección de las IgM anti *T. evansi* fue negativa hacia los dos meses posterior al tratamiento. En esta forma, se corroboró - por serología - la eliminación de la infección en los cinco animales. Por el contrario, las IgG continuaron detectándose en tres animales aunque a bajos títulos (1:512), doce meses posterior al tratamiento curativo.

A diferencia de otras enfermedades causadas por protozoarios, tales como el Mal de Chagas² y Toxoplasmosis¹, en las cuales las IgM se producen casi exclusivamente en la faz aguda de la enfermedad, en el Mal de Caderas estas inmunoglobulinas aparecen durante la mayor parte de la infección en forma ininterrumpida^{5,11}. Al interrumpirse la infección, la producción de esta inmunoglobulina cesa; de allí que su determinación se emplee como indicativo de infección¹¹. Sin embargo en el presente estudio, en un pequeño número de animales con parasitemia, la detección de IgM anti *T. evansi* no fue posible (TABLA 1 y 2), resultados que indican limitaciones de la prueba en este sentido.

OLIVEIRA et al. (1989) empleando una técnica de aglutinación directa con parásitos vivos, comprobaron también mediante el uso de 2-ME que, las IgM son la clase predominante de anticuerpos en cobayos infectados con *T. evansi*. Hemos observado en raras ocasiones que, sueros tratados con 2-ME, presentan títulos de aglutinación superior en una o dos diluciones que las muestras no tratadas con 2-ME (Fig. 1C), fenómeno del cual no tenemos explicación.

Los resultados del presente trabajo indican recomendar el empleo de la AD y AD + 2-ME para diagnosticar el Mal de Caderas de los equinos, obteniéndose mayores beneficios cuando se la emplea en combinación con métodos parasitológicos directos.

AGRADECIMIENTOS

Los Autores agradecen la colaboración de la Dra. Ana María Russo y Sra. Griselda María Malich por su

asistencia técnica y, a la Sra. Elina A. Alvarez Soloaga por la confección mecanográfica del trabajo.

SUMMARY

An evaluation of the direct agglutination test to diagnose "Mal de Caderas" disease

The usefulness of the direct agglutination test (DA) to diagnose Mal de Caderas disease was evaluated. Forty four sera samples from two lots of horses with natural *T. evansi* infection (Lot 1 and Lot 2) were used. Thirteen (81.2%) of sixteen horses in which parasites were isolated gave positive agglutination titres ($\geq 1:512$) in the DA test. Treatment of these positive sera with 2-mercaptoethanol droopes three to eight dilutions the agglutination titres in twelve samples (92%), showing the IgM nature of these antibodies. The DA test was also positive in seventeen of twenty eight horses in which parasites could not be detected.

Five *T. evansi* infected horses, Lot three, which had high antibodies levels in the DA test, were treated with Naganol (Bayer-Germany). In four animals these antibodies were mainly IgM. In agreement with negative control for parasites, two months after treatment, IgM could not be detected while IgG antibodies remained detectable in low titres 12 months in three of the five horses.

Fifty control horses sera from a *T. evansi* free area were AD negative.

The DA and DA + 2-ME are recommended as a routine method to diagnose Mal de Caderas disease in combination with parasitological diagnostic methods.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. AVERBACH, S.; AVERBACH, B.; YANOVSKY, J. F. & SCHMUÑIS, G. A. - Determinación de aglutininas en la fracción IgM como método simple en el inmunodiagnóstico de la Toxoplasmosis aguda. *Medicina (B. Aires)*, 35: 469-476, 1975.
2. GONZALEZ CAPPA, S. M.; VETTUONE, N. H.; MENES, S. & SCHMUÑIS, G. A. - Humoral antibody response and Ig characterization of the specific agglutinins in rabbits during experimental american Trypanosomiasis. *Exp. Parasit.*, 34: 32-39, 1973.
3. JONES, T. W. & Mc KINNELL, C. D. - Antigenic variation in *Trypanosoma evansi*: variable antigen type development in mice, sheep and goats. *Trop. Med. Parasit.*, 36: 53-57, 1985.
4. LANHAN, S. M. - Separation of trypanosomes from the blood of infected rats and mice by anion-exchangers. *Nature*, 218: 1273-1274, 1968.
5. LUCKINS, A. G.; GRAY, A. R. & RAE, P. - Comparison of the diagnostic value of serum immunoglobulin levels, an enzyme-linked immunosorbent assay and a fluorescent antibody test in experimental infection with *T. evansi*. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 72: 429-441, 1978.
6. MONZON, C. M. - Empleo de la cromatografía de intercambio iónico para la purificación del *Trypanosoma equinum* de sangre de ratas experimentalmente infectadas. *Rev. Med. vet. (B. Aires)*, 67: 78-80, 1986.
7. MONZON, C. M.; MANCEBO, O. A. & BREM, J. J. - Evaluación de la virulencia de tres capas de *Trypanosoma equinum* en ratones. Su aplicación al diagnóstico parasitológico. *Vet. argent.*, 3: 651-658, 1986.
8. MONZON, C. M. - Inmunodiagnóstico de la Tripanosomiasis equina o Mal de Caderas, mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta. *Rev. Med. vet. (B. Aires)*, 68: 196-204, 1987.
9. MONZON, C. M. & COLMAN, O. L. R. - Estudio sero-epidemiológico de la Tripanosomiasis equina (Mal de Caderas) mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta en la Provincia de Formosa (Argentina). Años 1983 a 1987. *Arq. bras. Med. vet. Zoot.*, 40: 279-285, 1988.
10. MONZON, C. M.; MANCEBO, O. A. & ROUX, J. P. - Comparison between six parasitological methods for diagnosis of *Trypanosoma evansi* in the subtropical area of Argentina. *Vet. Parasit.*, 36: 141-146, 1980.
11. MONZON, C. M. - Serological diagnosis of *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885) in horses, using a direct agglutination test. *Vet. Parasit.*, 47: 25-35, 1993.
12. NANTULYA, V. M.; LINDQVIST, K. J.; DIALL, O. & OLAHO-MUKANI - Two simple antigen detection enzyme immunoassay for the diagnosis of *Trypanosoma evansi* infections in the Dromedary camel (*Camelus dromedarius*). *Trop. Med. Parasit.*, 40: 415-418, 1989.
13. NANTULYA, V. M.; BAJYANA SONGA, E. & HAMERS, R. - Detection of circulating trypanosomal antigens in *Trypanosoma evansi* infected animals using a *T. brucei* group-specific monoclonal antibody. *Trop. Med. Parasit.*, 40: 263-266, 1989.
14. NANTULYA, V. M. - Trypanosomiasis in domestic animals: the problems of diagnosis. *Rev. Scient. techn. (Paris)*, 9: 357-367, 1990.
15. OLIVEIRA, T. C. G. de; SOGAYAR, R. & SALATA, E. - Estudo sorológico de infecções experimentais por *Trypanosoma evansi*, em cobaias. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 31: 95-99, 1989.
16. OSHIRO, E. T.; RODRIGUEZ, M.; BRANDÃO NUNES, V. L. & RIBEIRO, O. C. - *Trypanosoma* (Trypanozoon) *evansi* (Steel, 1885) Balbiani, 1888, infecção experimental em equino com amostra isolada de capivara, *Hydrochaeris Hydrochaeris* (Linnaeus, 1766) (Rodentia: Hydrochaeridae). *Semina (Londrina)*, 10: 51-55, 1989.
17. WOO, P. T. K. - A statistical study of the sensitivity of the haematocrit centrifuge technique in the detection of trypanosomes in blood. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 68: 319-326, 1974.

Recebido para publicação em 19/07/1993
Aceito para publicação em 17/02/1994.