

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA



Ana Lucía Peña Piedrasanta

Guatemala, octubre 2009.

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure of a woman in a red dress and white shawl, holding a staff. Above her is a golden dome. The seal is surrounded by Latin text: 'SACRAE THEOLOGIAE ACADEMIAE CAROLINAE CONSPICUA' at the top and 'UNIVERSITATIS SANCTI CAROLINI' at the bottom. The background of the seal is blue and green, with a yellow figure in the foreground.

**CONCORDANCIA ENTRE
LA PRUEBA DE cELISA Y EL FROTIS SANGUINEO
COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO PARA BABESIOSIS EQUINA
(*Babesia caballi* y *Theileria equi*)**

Tesis

Presentada a la Honorable Junta Directiva
de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la Universidad de San Carlos de Guatemala

Por:

Ana Lucía Peña Piedrasanta

Previo a conferírsele el Grado Académico de

Médica Veterinaria

JUNTA DIRECTIVA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

Decano:	Med. Vet. Leonidas Ávila Palma
Secretario:	Med. Vet. Marco Vinicio García Urbina
Vocal I:	Med. Vet. Yeri E. Véliz Porras
Vocal II:	Mag. Sc. M.V. Fredy R. González
Vocal III:	Med. Vet. y Zoot. Mario A. Motta González
Vocal IV:	Br. Set Levi Samayoa López
Vocal V:	Br. Luis Alberto Villeda Lanuza

ASESORES

Med. Vet. Blanca Zelaya de Romillo
Mag. Sc. M.V. Juan José Prem González
Med. Vet. Ludwig Figueroa

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En el cumplimiento a lo establecido por los estatutos de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a consideración de ustedes el presente trabajo de tesis titulado:

**CONCORDANCIA ENTRE
LA PRUEBA DE cELISA Y EL FROTIS SANGUÍNEO
COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO PARA BABESIOSIS EQUINA
(*Babesia caballi* y *Theileria equi*)**

Como requisito previo a optar el título profesional de

Médica Veterinaria

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores y examinadores de seminario por sus observaciones y orientaciones para guiar y mejorar mi estudio científico.

Al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad de San Carlos de Guatemala, por su valiosa colaboración en el procesamiento de las pruebas de cELISA.

Al Laboratorio de Parasitología y al Laboratorio Clínico del Hospital de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad de San Carlos de Guatemala, por su apoyo y colaboración en la realización y análisis de los Frotis Sanguíneos.

A la empresa Veterinary Medical Research and Development (VMRD), especialmente a Luke Brown por su confianza y apoyo con el patrocinio de las pruebas de cELISA utilizadas en este estudio.

Y a los dueños de los 100 caballos en estudio, que me permitieron tomarles muestra de sangre a sus nobles y bellos animales.

ACTO QUE DEDICO

A Dios; por regalarme la vida y ser mi fortaleza y esperanza.

A mis padres, Carlos Peña y Rosa María Piedrasanta; por guiarme y ayudarme; por los principios y valores que me inculcaron a través de su ejemplo y por su amor y por su apoyo incondicional.

A mis hermanas y a la Chabela.

A mis abuelitas, abuelitos, tíos y tías; por su cariño y preocupación. Especialmente a mi tía Marta Julia por su hospitalidad durante mi EPS.

A toda mi promoción y a todos mis amigos que son parte importante de mi carrera, por su ayuda, ánimo y amistad especialmente a Lorena, Nalu, Alejandro, Inge, Erick, Willy y Nadia.

A Manuel Sosa, por siempre estar allí, alegrando mi vida.

Al Hospital Veterinario de esta facultad y a todo su personal, por brindarme la oportunidad de haber realizado en él, dos años de auxiliatura inolvidables, ya que de todos, y de cada uno aprendí muchísimo.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por darme la oportunidad de estudiar y de estar hoy aquí culminando esta etapa de mi carrera.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	HIPÓTESIS	3
III.	OBJETIVOS	4
	3.1 Generales	4
	3.1 Específicos	4
IV.	REVISIÓN DE LITERATURA	5
	4.1 Babesiosis equina	5
	4.1.1 Importancia	5
	4.1.2 Agentes etiológicos	6
	4.1.3 Transmisión	7
	4.1.4 Patogénesis	9
	4.1.5 Signos clínicos	10
	4.1.6 Lesiones post mortem	11
	4.1.7 Diagnóstico	12
	4.1.8 Inmunoensayo competitivo ligado a enzimas (cELISA)	13
	4.1.9 Diagnóstico diferencial	14
	4.1.10 Tratamiento	14
	4.1.11 Prevención y control	15
	4.1.12 Salud pública	15
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	16
	5.1 Recursos	16
	5.1.1 Recursos humanos	16
	5.1.2 Recursos de campo	16
	5.1.3 Recursos de laboratorio para realizar frotis sanguíneo.....	16
	5.1.4 Recursos de laboratorio para realizar la prueba cELISA	17

5.2 Métodos	18
5.2.1 Área de estudio.....	18
5.2.2 Criterios de inclusión	18
5.2.3 Identificación de caballos y muestras	19
5.2.4 Toma de muestras de sangre y suero	19
5.2.5 Realización, coloración y observación del frotis sanguíneo...19	
5.2.6 Realización de la prueba de cELISA.....	20
5.2.7 Registro de datos y resultados	20
5.3 Análisis estadístico	20
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
VII. CONCLUSIONES	25
VIII. RECOMENDACIONES	27
IX. RESUMEN.....	28
X. BIBLIOGRAFÍA	30
XI. ANEXOS	33

I. INTRODUCCIÓN

La Babesiosis Equina es una enfermedad provocada por los hemoparásitos protozoarios *Babesia caballii* y *Theileria equi* (antes conocida como *Babesia equi*), afecta a caballos, mulas, asnos y cebras. En forma hiperaguda es fatal, provocando la muerte en 24-48 horas. Las formas subaguda y crónica provocan debilidad, anemia, fiebre, disminución de peso corporal y rendimiento atlético; además puede generar complicaciones secundarias como fallo renal, cólico, laminitis, infertilidad y aborto. La parasitosis con *B. caballii* mantiene al animal portador de uno a cuatro años y en caso de inmunosupresión puede desarrollar clínicamente la enfermedad. Los animales que se recuperan de *T. equi* serán portadores por toda su vida, si no reciben el tratamiento adecuado. (21)

La Babesiosis Equina en Guatemala se puede considerar endémica. Addair (1978) determinó, a través de la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFA), una prevalencia del 70% (*T. equi*: 22%, *B. caballii*: 18% y mixta: 30%).

Según el Censo Nacional Agropecuario 2003 la población equina en Guatemala es de 218,700 cabezas. Los caballos han tenido en los últimos años mayor importancia y relevancia en nuestro país, debido a su crianza, comercio y a su papel en el ámbito deportivo de la equitación.

Para exportar o transportar caballos, principalmente a países donde no está presente la enfermedad, se requiere de un examen serológico que afirme que el caballo está libre de Babesiosis. En Guatemala, para este diagnóstico, solamente está disponible el Frotis Sanguíneo, siendo necesario enviar las muestras al extranjero para que este tenga validez.

Al no tener un diagnóstico más sensible y específico a nivel nacional, la presencia de la enfermedad se obvia en los caballos portadores, lo cual no permite dar un tratamiento adecuado y se aumenta la propagación de esta enfermedad. De igual manera, la participación en competencias internacionales y todo el entreno previo a éstas se puede ver frustrado, si el diagnóstico serológico se realiza hasta el momento en que va a ser trasladado el equino; o peor, cuando éste se encuentra ya en cuarentena. Cada muestra que se envía para el diagnóstico serológico en el extranjero representa un gasto considerable.

En animales portadores o con enfermedad crónica es difícil detectar y diferenciar *T. equi* y *B. caballi* a través de Frotis Sanguíneo. El diagnóstico a través de Frotis Sanguíneo está sujeto a la experiencia y criterio del profesional que lo ejecuta, a la fase de la enfermedad en que se encuentre y, es a veces subjetivo.

Con el presente estudio determiné la concordancia entre el método cELISA y el Frotis Sanguíneo para el diagnóstico de Babesiosis equina y en base a éste, recomendé la implementación de cELISA como método diagnóstico de esta enfermedad en nuestro país.

II. HIPÓTESIS

No existe concordancia entre la prueba cELISA y el Frotis Sanguíneo para el diagnóstico de *Babesia caballi*.

No existe concordancia entre la prueba cELISA y el Frotis Sanguíneo para el diagnóstico de *Theileria equi*.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivos generales:

- Generar información que propicie un mejor diagnóstico de Babesiosis Equina en Guatemala.

3.2. Objetivos específicos:

- Determinar el grado de concordancia entre la prueba de cELISA y el Frotis Sanguíneo para el diagnóstico de *Babesia caballi*.
- Determinar el grado de concordancia entre la prueba de cELISA y el Frotis Sanguíneo para el diagnóstico de *Theileria equi*.
- Analizar los resultados obtenidos para el diagnóstico de *Babesia caballi* y *Theileria equi* a través del Frotis Sanguíneo.
- Analizar los resultados obtenidos para el diagnóstico de *Babesia caballi* y *Theileria equi* a través de cELISA.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Babesiosis equina

También es llamada Piroplasmosis equina y fiebre biliar. *Babesia caballi* y *Theileria equi*, sólo o combinados, son los protozoos responsables de esta enfermedad. Son transmitidos por varias especies de garrapatas del género *Dermacentor*, *Rhipicephalus* e *Hyalomma*. Todos los equinos incluyendo caballos, mulas, burros y cebras pueden ser afectados. Es más frecuente en regiones tropicales y subtropicales; sin embargo, también se presenta en climas templados donde las condiciones son aceptables para el desarrollo de las garrapatas. (3,5,18)

La babesiosis equina se considera endémica en el 90% del mundo, solamente Australia, Estados Unidos de Norteamérica, Canadá, Japón, Inglaterra e Irlanda son considerados países no endémicos de esta enfermedad. (3,5,18, 19)

4.1.1 Importancia

El diagnóstico se dificulta porque los signos clínicos son muy variables y no específicos. Pueden pasar desapercibidos, ser leves, moderados, agudos, crónicos o ser fatales. Se ha reportado mortalidad del 20% en animales nunca antes expuestos a babesiosis equina. (5, 18)

Animales afectados previamente pueden convertirse en portadores por varios meses o años, siendo una fuente de infección para garrapatas que actúan como vectores. Introducir un animal portador en áreas donde las garrapatas vectores son prevalentes puede conllevar a la diseminación epizootica de esta enfermedad. (17)

En 1961 y 1965 en Florida, Estados Unidos de Norteamérica, se presentó una epidemia de Babesiosis equina, y fue hasta 10 años después de una campaña de erradicación que se logró ser libre de esta enfermedad. En Australia se reportó casos, sin embargo, este país no se volvió endémico. Durante las Olimpiadas de 1996, en Atlanta, caballos con anticuerpos detectables a los agentes etiológicos de

Babesiosis equina (*Babesia caballi* y *Theileria equi*) fueron aislados de los demás. Se les permitió competir en eventos dentro del estadio, pero no en los eventos al aire libre o en el campo, además se tomaron estrictas medidas en cuanto al control de garrapatas. Medidas similares se utilizaron en las olimpiadas de Sydney, Australia en el año 2000. (5, 18)

El transporte internacional de caballos se afectó drásticamente y, a caballos serológicamente positivos a babesiosis equina, no se les permitió la entrada a países libres de esta enfermedad. (1, 20)

4.1.2 Agentes etiológicos

Babesia caballi

En los equinos se desarrolla dentro del citoplasma de los eritrocitos de los equinos. En la fase de merozoito, infecta a los eritrocitos y se convierte en trofozoito, que crece y madura dividiéndose en dos merozoitos capaces de infectar otro eritrocito. (17) El período de incubación para *Babesia caballi* es de 10 a 30 días; sin embargo, ha sido variable reportándose inclusive 5 días. (5, 8, 18)

Babesia caballi, a diferencia de *Theileria equi*, se desarrolla en células intestinales, en ovario y en glándulas salivales de larvas, ninfas y garrapatas adultas. Existe transmisión ovárica; transmite los parásitos a su descendencia y convierte la garrapata en uno de los principales reservorios. Estas garrapatas pueden infectar a un hospedero sin haber sido infectadas por otro hospedero. Este ciclo evolutivo varía un poco, según el tipo de garrapata que sea el vector, el ciclo descrito es para *Dermacentor nitens*. (5, 22)

Es una de las babesias más grandes, un merozoito de *Babesia caballi* dentro de un glóbulo rojo mide aproximadamente 2-5 μm de largo y 1.5-3 μm de diámetro. Los merozoitos pueden tener forma redondeada, ovalada o piriforme y son de coloración basófila. Es común observar los merozoitos en pareja, unidos del extremo posterior y formando un ángulo agudo. (8, 17)

Theileria equi

Se reproduce en tejido linfático y en el citoplasma de linfocitos circulantes de forma asexual, produciendo micro y macroesquizontes. Los macroesquizontes a su vez se convierten en macromerozoitos, que se reproducen nuevamente en linfocitos pero esta vez de manera sexual para producir microesquizontes y macroesquizontes. Los microesquizontes producen micromerozoitos que son los que infectan los glóbulos rojos. (5) El período de incubación para *Theileria equi* es de 12 a 19 días aproximadamente. (5, 18)

Theileria equi es más pequeña que *Babesia caballi* mide aproximadamente 2 μm de largo, es basófila, pleomórfica, más comúnmente redonda, ovalada o piriforme, a veces en forma anular. Posee uno o varios merozoitos, principalmente uno o cuatro; cuando se encuentran cuatro merozoitos en un glóbulo rojo se denomina "cruz de malta". (4, 8, 17)

Babesia equi fue reclasificada como *Theileria equi* en 1998. A través de varios estudios se demostró la diferencia en cuanto al ciclo de vida, proteínas superficiales y el ADN de este parásito al de los de la familia Babesidae y la similitud con los de la familia Theileridae. (5, 8)

4.1.3 Transmisión

Los caballos se infectan con *Babesia caballi* y *Theileria equi* cuando son parasitados por garrapatas portadoras de éstos; estas garrapatas adquieren estos protozoos al ingerir sangre, dentro de ella se dan varios ciclos de replicación; las células intestinales, los ovarios y las glándulas salivales se infectan. Se da una constante liberación de esporozoitos en el lumen de la glándula salival a través de la hemolinfa. Estos hemoparásitos responsables de la Babesiosis equina son transmitidos cuando las garrapatas, ya sea adultas o ninfas muerden a un equino, infectándolo. (5, 8)

La *Babesia caballi* a diferencia de *Theileria equi* posee transmisión transovárica, transmitiendo el parásito a su descendencia, convirtiendo a la garrapata en uno de los principales reservorios de este parásito. (5)

Se ha descrito que la Babesiosis equina es transmitida por varias especies de garrapatas del género *Dermacentor*, *Rhipicephalus* e *Hyalomma*. En el año 2005 Russell describe a las siguientes 12 especies de garrapatas como vectores de *Babesia caballi* y *Theileria equi* respectivamente:

Babesia equi

Rhipicephalus sanguineous

Rhipicephalus evertsi

Rhipicephalus turanicus

Rhipicephalus bursa

Dermacentor reticularis

Dermacentor marginatus

Hyalomma excavatum

Hyalomma anatolicum

Babesia caballi

Rhipicephalus sanguineous

Rhipicephalus bursa

Dermacentor nitens

Dermacentor salvarum

Dermacentor marginatus

Dermacentor reticularis

Hyalomma excavatum

Hyalomma dromedarii

La Asociación Americana de Medicina Veterinaria describió a *Dermacentor variabilis* como vector de ambos parásitos; a algunas garrapatas del género *Boophilus* como vectores de estos parásitos y además a otros insectos hematófagos. (5) Puede ser transmitida iatrogénicamente a través de agujas o instrumental quirúrgico contaminado con sangre infectada. (5, 8)

En yeguas preñadas, no se transmite al potrillo, y éste adquiere inmunidad a través del calostro; por ello, los análisis en potrillos al pie de la madre positivas también son serológicamente positivos; sin embargo, en una zona libre de garrapatas sin factores predisponentes, estos potrillos se negativizan a los 4 a 5 meses de destetados. (19)

4.1.4 Patogénesis

Se conoce poco de la patogénesis de la Babesiosis equina. Cuando los eritrocitos son parasitados ya sea por *Babesia caballi*, *Theileria equi* o ambos, se provoca estrés metabólico de estas células. Esto causa hipofosfatemia y debilitamiento de las membranas de los eritrocitos resultando en hemólisis. (19, 8)

La presencia del parásito y destrucción de eritrocitos produce activación del complemento y liberación de mediadores inflamatorios, incluyendo bradiquinina, histamina y 5-hydroxytryptamina. Algunas poseen efecto pirógeno provocando la fiebre característica de los animales con Babesiosis equina. (5, 16)

La lisis intravascular de los eritrocitos produce hemoglobinemia, hiperbilirubinemia, ictericia, hemoglobinuria, especialmente en infecciones con *Theileria equi*. (8, 19)

Al haber menos eritrocitos circulando en la sangre se reduce la capacidad de ésta para oxigenar a todos los tejidos del cuerpo del animal; por esto es que la respiración y la frecuencia cardiaca aumentan. (5) La hemólisis disminuye el hematocrito, considerándose una anemia hemolítica regenerativa. También se observa monocitosis y eosinopenia. (8, 19)

Las células afectadas se van juntando en pequeños vasos y capilares obstruyendo el fluido normal de sangre predisponiendo a causar coagulopatía intravascular diseminada (CID). Estos acúmulos de eritrocitos, al ser filtrados, dañan el riñón pudiendo causar un fallo renal. (5, 8) Debido a que el órgano encargado de remover los eritrocitos viejos, dañados o destruidos es el bazo, éste se encuentra agrandado. (5)

4.1.5 Signos clínicos

Los signos clínicos varían y dependen de varios factores como; el número de eritrocitos afectado, agente etiológico (*Babesia caballi*, *Theileria equi* o ambos), respuesta de la activación del complemento, liberación de mediadores inflamatorios y principalmente, estado inmunológico del animal. (5, 21)

Theileria equi es considerado más patógeno que *Babesia caballi* debido a que este parásito infecta normalmente más del 20% de los eritrocitos. (5, 21)

Cuando se presenta en forma hiperaguda, los caballos pueden morir súbitamente, o presentarse moribundos y morir de 24 a 72 horas. Esta forma de presentación no es muy común, se le atribuye más a *Theileria equi* o cuando se presentan ambos parásitos. (5, 8, 17, 19)

La temperatura normal de un caballo oscila entre 37.5 y 38 °C. La forma aguda se caracteriza por presentar fiebre arriba de 40 °C, anorexia, depresión, ictericia, hemoglobinemia, hemoglobinuria, mucosas pálidas y con hemorragias petequiales, taquicardia, taquipnea, depresión, decaimiento, malacia. En algunas ocasiones sudor, cólico, lagrimeo, incoordinación, murmullos cardíacos, edema subcutáneo alrededor de la cabeza, párpados y extremidades, heces fecales más pequeñas y secas de lo normal. Las hembras gestantes que contraen la enfermedad obtienen potrillos anémicos y débiles o, los abortan. (5, 8, 17, 21)

La forma subaguda presenta fiebre intermitente, anorexia, pérdida de peso, taquicardia, taquipnea, membranas mucosas pálidas y/o ictéricas con posibles hemorragias petequiales o equimóticas, estas hemorragias también pueden verse a nivel de la esclerótica, hemoglobinuria y bilirrubinuria. Hay una leve depresión de los movimientos intestinales provocando un leve cólico. (8, 12, 17)

En la forma crónica los signos son inapetencia, pérdida de peso y condición corporal, desempeño físico pobre, debilidad, leve anemia; al realizar palpación rectal, se encuentra el bazo agrandado de tamaño. (8, 17, 19)

Si el animal sobrevive la enfermedad aguda inicial, muchas veces ésta se torna crónica, convirtiéndose en equinos portadores. Los caballos infectados con *Theileria equi* se convierten en portadores, el parásito permanece en su sangre en muy pocas cantidades, pero puede seguir siendo transmitido por la garrapata. Cuando estos animales sufren inmunosupresión por enfermedad o estrés pueden llegar a desarrollar nuevamente la infección. La infección con *Babesia caballi* puede llegar a persistir por 1 a 4 años, pudiendo llegar a ser eliminadas espontáneamente luego de 12 a 42 meses, a diferencia de *Theileria equi* donde la eliminación espontánea no ocurre. (5, 19, 21)

Varias complicaciones secundarias pueden resultar de la Babesiosis equina, incluyendo fallo renal agudo, cólico, enteritis, laminitis, neumonía, infertilidad y aborto. (8)

4.1.6 Lesiones post mortem

Dentro de los hallazgos encontrados en la necropsia de animales con Babesiosis están: sangre acuosa, ictericia, efusión pericárdica, hígado color café-anaranjado y agrandado de tamaño, esplenomegalia, riñones pálidos, friables y con hemorragias petequiales, en corazón hemorragias subpericárdicas y subendocárdicas. También se observa edema en pulmones y signos de neumonía. (5, 8, 18)

4.1.7 Diagnóstico

- Clínico

A través de los signos clínicos se puede llegar a sospechar de la enfermedad; sin embargo, los signos son variables pero no son específicos. De igual manera sucede con las lesiones post mortem halladas durante la necropsia.

- Exámenes de laboratorio

- Identificación del parásito: Comúnmente se realiza a través de frotis de sangre periférica, fijados con metanol y coloreados comúnmente con Giemsa. El hallazgo de los protozoos depende de la fase parasitaria en la que se encuentre y de la cantidad de eritrocitos infectados. (4, 5, 17) Otra alternativa es la realización de un frotis sanguíneo de garrapata parasitante del caballo a muestrear, sin embargo en algunas garrapatas las formas sanguíneas de Babesia desaparecen. (8, 18) En estos casos una opción es realizar un frotis a través de la hemolinfa de la garrapata, lo cual consiste en arrancar de la garrapata a muestrear cualquier segmento de alguna de las patas, y tomar una gota de hemolinfa, se fija y colorea con Giemsa. (22)
- Examen serológico: Es de gran ayuda, especialmente en casos crónicos o de portadores. Dentro de este grupo están: fijación de complemento, inmunofluorescencia (IFA), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), reacción de polimerasa en cadena (PCR). Para el transporte internacional de caballos, IFA y ELISA son los métodos que se recomiendan.(17) A pesar de esto, los métodos más utilizados han sido, la fijación de complemento (a diferencia de IFA no diferencia las dos especies de babesias) y ELISA (puede dar falsos positivos y falsos negativos). Se ha desarrollado la prueba competitiva de ELISA (cELISA) que detecta caballos infectados con B. caballi y T. equi, específicamente.(21) Otros métodos diagnósticos incluyen pruebas de DNA y cultivos en vitro. (18)

Cuando los resultados de algún análisis serológico son dudosos, se inocula 500 ml de sangre, con anticoagulante y antibiótico, del caballo a examinar a un caballo susceptible, de preferencia esplenectomizado, el cual se mantiene en observación y se realizan frotis sanguíneos. También se pueden utilizar garrapatas especiales libres de parásitos y alimentarlas del animal a sospechar para luego ya sea examinarlas a ellas o por la transmisión a otro animal susceptible. (17, 18)

4.1.8 Inmunoensayo competitivo ligado a enzimas (cELISA)

El inmunoensayo competitivo ligado a enzimas es también es llamado ELISA competitivo, es una variedad del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) que se ha desarrollado. (12, 15)

Al igual que un ELISA, es una prueba serológica de interacción primaria, este método diagnóstico puede determinar la concentración de antígenos o de anticuerpos presentes en el suero de un animal. (12, 15)

Si el ELISA competitivo está diseñado para determinar la concentración de anticuerpos, el método se va basar en la competencia entre el anticuerpo de la muestra y un anticuerpo marcado con una enzima por la unión con el antígeno de captura. Cuanto menor sea la intensidad del color generado (menor absorbancia), mayor será la concentración de anticuerpo en la muestra problema. Habrá ausencia de color en una muestra positiva debido a que el sustrato no encontrará a la enzima porque el conjugado ha sido desplazado por el anticuerpo presente en la muestra. (14, 15)

Si el ELISA competitivo está diseñado para determinar la concentración de antígenos, el método se va basar en la competencia entre el antígeno de la muestra y un antígeno marcado con una enzima por la unión con el anticuerpo de captura (ver anexo 7). Cuanto menor sea la intensidad del color generado (menor absorbancia) mayor será la concentración de anticuerpo en la muestra problema. (14, 15)

El ELISA es una de las pruebas aprobadas para diagnosticar babesiosis equina para el transporte y comercio internacional de equinos.

4.1.9 Diagnóstico diferencial

La babesiosis equina se debe de diferenciar con: Anemia Infecciosa Equina, Púrpura hemorrágica, Leptospirosis, Tripanosomiasis, Peste Africana, Erlichiosis Granulocítica Equina e intoxicaciones con plantas o químicos. (8, 12, 18, 19)

4.1.10 Tratamiento

Cuando la Babesiosis es diagnosticada y tratada temprano existen buenas posibilidades de recuperación, las infecciones con *T. equi* son más resistentes que las infecciones causadas por *B. caballi*. (8)

Para tratar una infección por *B. caballi* se utiliza 2.2 mg/kg de Dipropionato de iminocarbamida (Imidocarb) cada 48 horas por 3 días. En un caso de *T. equi* se administran 4 mg/kg cada 72 horas por 10 días. (8) Este medicamento es muy eficaz, sin embargo tiene poco margen de seguridad en relación a la dosis para el caso de *T. equi*; en los burros esta droga está contraindicada, porque puede provocar shock anafiláctico. (5, 19)

4.1.11 Prevención y control

Para prevenir la Babesiosis equina se requiere un estricto control de garrapatas, así como evitar la transmisión de manera iatrogénica realizando todos los procedimientos médicos con asepsia.

4.1.12 Salud pública

Según un artículo de la Asociación Americana de Medicina Veterinaria e informes de la OIE, *Theileria equi* ha sido implicada en infecciones humanas, pudiéndose observar fiebre, anemia hemolítica y hemoglobinuria. (5, 18)

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Recursos

5.1.1 Recursos Humanos

- Una investigadora
- Tres asesores Médicos Veterinarios
- Un caballerango

5.1.2 Recursos de campo

- Alcohol etílico al 70%
- Algodón
- 100 agujas vacutainer (21G x 1 1/2)
- 100 tubos de ensayo estériles de 4.5 ml con anticoagulante (EDTA)
- 100 tubos de ensayo estériles de 10 ml sin anticoagulante
- Marcador permanente
- Gradillas
- Hielera
- Hielo
- Lapicero
- Hoja de identificación de caballos a muestrear (anexo 1)
- Hoja de resultados (anexo 2)

5.1.3 Recursos de laboratorio para realizar frotis sanguíneo

- 100 láminas portaobjetos
- Metanol
- Colorante de GIEMSA al 10%
- Microscopio óptico con objetivo de inmersión
- Marcador

5.1.4 Recursos de laboratorio para realizar prueba cELISA

- Lector de ELISA con filtro de 650 nm de largo de onda
- Micropipetas simples y múltiples de volumen ajustable
- Puntas plásticas para las micropipetas
- Microplacas
- Recipiente para lavar pipetas y placas
- Refrigeradora (2 a 7°C)
- Congelador (- 20 °C)
- Agua destilada
- Toallas de papel
- Masking tape
- Cronómetro
- Kit para detectar anticuerpos de *Babesia caballi* en suero, cELISA (inmunoensayo competitivo ligado a enzimas)
- Kit para detectar anticuerpos de *Theileria equi* en suero, cELISA (inmunoensayo competitivo ligado a enzimas)

Ambos Kits para 180 muestras contienen:

- Placas cubiertas de Antígeno
- Control Positivo
- Control Negativo
- Anticuerpo Primario 100X
- Conjugado Anticuerpo Secundario- Peroxidasa 100X
- Solución Buffer Diluyente de Anticuerpo
- Solución Buffer Diluyente de Suero
- Solución de Lavado Concentrada 10X
- Solución de Sustrato
- Solución de Parado

5.2 Métodos

5.2.1 Área de estudio

Tomé las muestras de sangre en:

Lugar	# Muestras tomadas
Caballerizas del Hipódromo del Sur, Finca La Aurora, Ciudad de Guatemala, Guatemala.	27
Caballerizas de la Escuela Militar de Equitación (EME), 32 Calle 18-80 zona 5, Ciudad de Guatemala, Guatemala	21
Caballerizas de La Azotea, Jocotenango, Sacatepéquez, Guatemala.	11
Finca Las Placetas, Aldea El Tule, Asunción Mita, Jutiapa, Guatemala.	6
Finca El Tule, Aldea El Tule, Asunción Mita, Jutiapa, Guatemala	5
Finca El Jicaral, Aldea El Coco, Asunción Mita, Jutiapa, Guatemala	4
Santa Elena, Petén, Guatemala	26
Total	100

5.2.2 Criterios de inclusión

Los 100 caballos muestreados cumplen con las siguientes características:

- Mayores de 1 año de edad.
- Hembras, machos sin castrar o machos castrados.
- Con condición física: buena, regular o mala

5.2.3 Identificación de caballos y muestras

Identifiqué las muestras de cada caballo con números del 1 al 100, de cada uno tomé dos muestras de sangre: A) con anticoagulante, para realizar el frotis, y B) sin anticoagulante, para obtener el suero, y realizar la prueba cELISA.

5.2.4 Toma de muestras de sangre y suero

1. Realicé la toma de muestras de sangre en el tramo de cada caballo y en algunos casos con ayuda de lazos en un potrero.
2. Antes de tomar cada muestra desinfecté el área de la vena yugular con alcohol.
3. Con aguja Vacutainer de 21G x 1½ recolecté primero en un tubo con anticoagulante 3 ml de sangre (muestra A), y luego, sin retirar la aguja de la yugular y en un tubo sin anticoagulante 7 ml de sangre (muestra B).
4. Coloqué las muestras A en una hielera protegida del sol.
5. Coloqué las muestras B en un lugar fresco alejado del sol, y en forma inclinada, luego de separado el coagulo congelé a -20°C el suero.

5.2.5 Realización, coloración y observación del frotis sanguíneo

1. Realicé los frotis sanguíneos de cada muestra A.
2. Agregué metanol por 5 minutos.
3. Teñí el frotis con el colorante Giemsa al 10% durante 15 minutos.
4. Lavé el frotis con agua destilada y sequé a temperatura ambiente.
5. Observé cada frotis con objetivo de inmersión.

5.2.6 Realización de la prueba cELISA

Realicé la prueba cELISA en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de San Carlos de Guatemala, como lo describe el fabricante de la prueba (ver anexo 8).

Realicé la lectura de la prueba con el lector de ELISA del laboratorio de Avicultura de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

Interpreté los resultados obtenidos en base a las indicaciones del fabricante de la prueba (ver anexo 8).

5.2.7 Registro de datos y resultados

Registré todos los datos de identificación de cada caballo en la Hoja de Protocolo (anexo 1) y los resultados obtenidos en la Hoja de Resultados (anexo 2).

5.3 Análisis estadístico

Determiné el grado de concordancia entre la prueba cELISA y el frotis sanguíneo para el diagnóstico de *Babesia caballi* y de *Theileria equi* en base a los márgenes propuestos por Landis y Koch, en función al índice de concordancia Kappa. (19)

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 100 muestras analizadas a través de cELISA 49% fueron negativas y 51% positivas: 39% a *T. equi* y 27% a *B. caballi*, además el 15% coincidió en ambos parásitos (tabla 1). Por medio del FS el 85% de las muestras fueron negativas y el 15% positivas, en este caso únicamente a *B.caballi* (tabla 2).

Tabla 1. Resultados de muestras analizadas a través de cELISA

Hemoparásito Diagnóstico	<i>B. caballi</i>	<i>T. equi</i>	<i>B. caballi</i> y <i>T. equi</i>	Total
POSITIVAS	27	39	15	51
NEGATIVAS	73	61	85	49

Tabla 2. Resultados de muestras analizadas a través del Frotis Sanguíneo

Hemoparásito Diagnóstico	<i>B. caballi</i>	<i>T. equi</i>	<i>B. caballi</i> y <i>T. equi</i>	Total
POSITIVAS	15	0	0	15
NEGATIVAS	85	100	0	85

A pesar de que a nivel nacional no se ha registrado ni se tienen antecedentes del diagnóstico por medio del FS, el no detectar *T. equi* microscópicamente, contrasta totalmente con reportes serológicos y con otros estudios realizados. Desde 1978, Addair, a través de Inmunofluorescencia Indirecta (IFA) determinó 70% de prevalencia de Babesiosis Equina: 52% de *T. equi* y 48% de *B. caballi*, y en el presente estudio, a través de cELISA, fué de 39% para *T. equi*.

Lógicamente, la prueba de cELISA diagnostica mayor cantidad de muestras positivas que un FS, debido a que los anticuerpos, detectados por cELISA, se mantienen desde que los caballos son parasitados hasta por varios años después, e inclusive, si es por *T. equi*, hasta de por vida. Sin embargo no es lógico que teniendo una prevalencia tan alta no se halla podido diagnosticar *T. equi*, en nuestro país, a través de un FS. *B. caballi*, con una prevalencia menor sí ha sido diagnosticada comúnmente, a tal punto, que hay quienes piensan que éste es el único hemoparasito que realmente afecta a los equinos en nuestro medio.

Además de la prevalencia, Ali *et al* (1996) y OIE (2005) destacan que la detección microscópica de *T. equi* es más fácil y común que la de *B. caballi*, debido a que la parasitemia es mayor (*T. equi*: 1-20%, *B. caballi*: 0.1-10%) y que así como otras Theilerias, *T. equi* se mantiene durante períodos de tiempo largos en el torrente sanguíneo, por lo que debería de ser más probable su detección en FS.

Con esta información, y teniendo en cuenta que cuatro muestras fueron positivas a *B. caballi* en FS, pero en cELISA únicamente a *T. equi* (tabla 3), aumenta la posibilidad de muestras mal diagnosticadas. La equivocación se puede deber a distintas razones:

- La presencia de artefactos, la mala coloración del FS o si el colorante está precipitado puede generar confusión y dar como resultado un falso positivo.
- El diagnóstico del FS es positivo cuando se detecta microscópicamente el parásito a través de la observación, pero el criterio, la experiencia y la capacidad de quien lo realiza varía haciendo que esta prueba sea subjetiva.
- Para diagnosticar una muestra positiva a de *T. equi*, requerí encontrar en el FS la forma característica de presentación de los merozoitos, denominada “Cruz de Malta”, a pesar que estos pueden presentarse de múltiples formas; ovaladas, redondas, elípticas, etc, ya que estas otras presentaciones son

típicas de *B. caballi*. Sin embargo, los FS de este estudio pudieron haber contenido merozoitos de *T. equi* solamente en formas ovaladas, redondas o elípticas y no en cruz de malta, pudiendo dar un resultado falso negativo.

- La búsqueda tanto de *T. equi* como de *B. caballi* en los FS la prioricé a nivel de glóbulos rojos, pero si tomamos en cuenta que AVMA (2006) y Russell (2005) reportan que en la primera etapa se puede observar parasitemia en linfocitos o a nivel extracelular, el análisis de los FS fué incompleto y pudo repercutir en un diagnóstico equivocado.

Por otro lado la prueba de cELISA ha sido descrita como altamente confiable por ser altamente específica y sensible por lo que la probabilidad de un falso positivo o un falso negativo es muy baja.

Tabla 3. Resultados del Frotis Sanguíneo y cELISA para cada situación presentada.

Frotis Sanguíneo		cELISA		Muestras
<i>B. caballi</i>	<i>T. equi</i>	<i>B. caballi</i>	<i>T. equi</i>	
+	-	+	+	8
+	-	+	-	2
+	-	-	+	4
-	-	+	+	7
-	-	+	-	10
-	-	-	+	20
+	-	-	-	1
-	-	-	-	48

Por todo lo expresado anteriormente, principalmente la poca sensibilidad y especificidad del Frotis Sanguíneo para el diagnóstico de Babesiosis Equina, en contraste con la alta sensibilidad y especificidad de cELISA, sobretodo en caballos portadores determiné una concordancia baja entre la prueba de cELISA y del Frotis Sanguíneo para el diagnóstico de *B. caballi*, donde $K=0.34$, y para *T. equi* una concordancia insignificante, ya que $K=0$ (tabla 4).

Tabla No. 4 Concordancia a través del Índice de Kappa entre la prueba de cELISA y el Frotis Sanguíneo para *Babesia caballi* y *Theileria equi*

Hemoparásito	Índice de Kappa	Grado de concordancia *
<i>Babesia caballi</i>	$K = 0.34$	Baja
<i>Theileria equi</i>	$K = 0$	Insignificante

* Grados propuestos por Landis y Koch (19)

VII. CONCLUSIONES

1. La concordancia entre el diagnóstico de *Babesia caballi* a través de la prueba de cELISA y el Frotis Sanguíneo fue baja y para el diagnóstico de *Theileria equi* fué insignificante, principalmente porque al ser una enfermedad de alta prevalencia, un alto porcentaje de los caballos muestreados son portadores o presentaron la enfermedad de forma subclínica.
2. Por medio de la prueba de cELISA, 36% más caballos fueron positivos a Babesiosis Equina que los diagnosticados por el Frotis Sanguíneo.
3. La prevalencia de Babesiosis Equina para los caballos muestreados, en base a los resultados de la prueba de cELISA fué del 51%: 39% de *Theileria equi*, 27% de *Babesia caballi* y 15% mixto.
4. *Theileria equi* es el hemoparásito con mayor presencia y participación en la Babesiosis Equina de los caballos muestreados, a pesar de que se creía que su participación como agente etiológico de Babesiosis Equina en el país era poco frecuente.
5. *Theileria equi* puede confundirse con *Babesia caballi* a través del diagnóstico del Frotis Sanguíneo debido a que, no siempre *T. equi* se presenta en la clásica forma de cruz de malta, y la diferencia del tamaño entre ambos parásitos, por sus distintas fases evolutivas, no es determinante para hacer la diferenciación.

6. El diagnóstico de Babesiosis Equina a través del Frotis Sanguíneo es muy subjetivo y poco confiable, principalmente para los caballos portadores y que este sea el único método diagnóstico disponible en nuestro país es inapropiado de acuerdo a las necesidades y requerimientos actuales para el comercio y transporte de caballos.

7. La prueba de cELISA por su alta sensibilidad y especificidad es una prueba confiable para el diagnóstico de Babesiosis Equina, tanto para *Babesia caballi* como para *Theileria equi*, y su implementación en nuestro país, sería de gran ayuda tanto a nivel nacional como a nivel regional.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Implementar cELISA como método diagnóstico de Babesiosis Equina para mejorar el control y difusión de esta enfermedad en nuestro país, así como para disminuir riesgos y costos en equinos que se desea exportar o transportar hacia otros países.
2. Realizar otros estudios relacionados, donde se tome en cuenta la parasitemia de *Theileria equi* en linfocitos y en su fase extracelular en un Frotis Sanguíneo o comprobar la utilidad del Frotis de la hemolinfa de garrapata para diagnóstico de Babesiosis Equina.

IX. RESUMEN

Concordancia entre la prueba cELISA y el Frotis Sanguíneo como método diagnósticos para Babesiosis Equina

Tomé muestras de sangre a 100 caballos de razas y sexos diferentes, comprendidos entre 2 a 12 años de edad, originarios de cuatro departamentos de Guatemala (Ciudad de Guatemala, Sacatepéquez, Jutiapa y Petén). Con cada muestra realicé un Frotis Sanguíneo (FS) y una prueba de cELISA para diagnosticar *Babesia caballi* o *Theileria equi*. Según el índice de Kappa y los márgenes de Landis y Koch la concordancia entre ambas pruebas para el diagnóstico de *B. caballi* fue baja ($k= 0.34$) y para el diagnóstico de *T. equi* fue insignificante ($k=0$). La prevalencia en base a cELISA fue del 51% (24% *T.equi*, 12% *B.caballi* y 15% para ambos parásitos). La prueba de cELISA por su alta sensibilidad y especificidad permitió diagnosticar 36% más caballos positivos que los diagnosticados por Frotis Sanguíneo.

Palabras clave: Babesiosis Equina, *Babesia caballi*, *Theileria equi*, cELISA, Frotis Sanguíneo.

ABSTRACT

Blood Smears and cELISA test Concordance as diagnostic method for Equine Babesiosis

I took blood samples of 100 horses of different races and sexes, ranging from 2 to 12 years old, from four departments of Guatemala (Guatemala City, Sacatepéquez, Jutiapa and Petén). For each sample I performed a Blood Smears and a cELISA test to diagnose *Babesia caballi* or *Theileria equi*. According to Kappa index and the margins of Landis and Koch, concordance between both tests for diagnosis of *B.caballi* was low ($k = 0.34$) and for diagnosis of *T. equi* was negligible ($k = 0$). Based on cELISA results the prevalence was 51% (24% *T. equi*; 12% *B. caballi* and 15% for both parasites). The cELISA test with its high sensitivity and specificity, diagnosed 36% more positive horses than those diagnosed by Blood Smear.

Key Words: Equine Babesiosis, *Babesia caballi*, *Theileria equi*, cELISA test, Blood Smears.

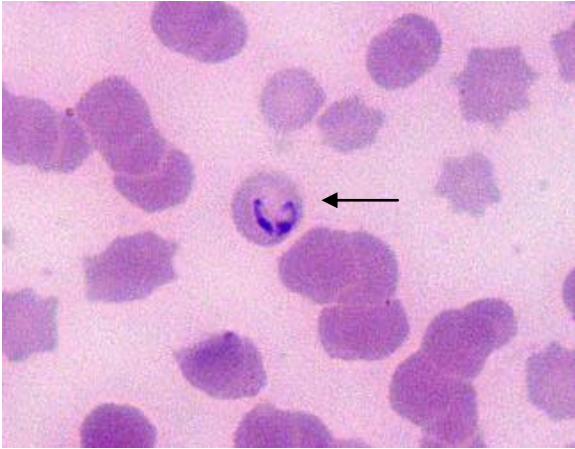
X. BIBLIOGRAFÍA

1. AHC (American Horse Council, US). 2005. Import testing problems related to piroplasmosis (en línea). Washington, US. Consultado 18 sep. 2006. Disponible en <http://www.horsecouncil.org/APRIL%202005%20IMPORT%20TESTING%20PROBLEMS%20RELATED%20TO%20PIROPLASMOSIS.doc>.
2. Adair, WE. 1978. Prevalencia de Piroplasmosis Equina *B. equi* y *B. caballi* en la República de Guatemala. Guatemala. pp 15-16.
3. Ali, S; Sugimoto, C; Onuma, M. 1996. Equine Piroplasmosis. JA . Review v.7, no.4: 67-77.
4. Antipin, DN; Ershov, VS; Zolotarev, NA; Salyaev, VA. 1960. Parasitology and parasitic diseases of livestock. Trad. A Birrion; HG Hechter; JI Lengy. Ed. VS Ershov. Jerusalem, IL. p. 233- 241
5. AVMA (Asociación Americana de Medicina Veterinaria). 2006. Equine piroplasmosis (en línea). s.l. Consultado 18 sep. 2006. Disponible en http://www.avma.org/reference/backgrounders/equine_piroplasmosis_bgnd.asp
6. Borchert, A. 1981. Parasitología veterinaria. Trad. MC del Campillo. s.n.t Zaragoza, ES. p. 648-651
7. Camacho, AT; Telford, SR; Spielman, A. s.f. Atlas of medical parasitology: report: *Babesia caballi* (en línea). s.l. Consultado 20 oct. 2006. Disponible en <http://www.cdfound.to.it/html/camacho3.htm>

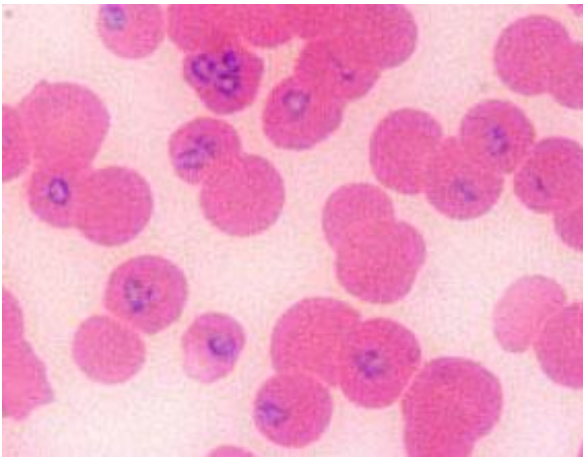
8. Edwards, RZ; Moore, H; LeRoy, BE; Latimer, KS. 2005. Equine babesiosis – a review (en línea). Georgia, US. Consultado 18 sep. 2006. Disponible en <http://www.vet.uga.edu/vpp/clerk/edwards/index.php>
9. Estadística. s.f. (en línea). Consultado 20 mayo. 2008. Disponible en <http://www.seh-lilha.org/concor2.htm>
10. Fiebiger, J. 1942. Los parásitos animales del hombre y de los animales domésticos. Trad. CL de Cuenca; R Reichert. 3 ed. Madrid, ES, Imprenta y Editorial Viuda de Juan Pueyo. p. 104-113
11. Guimarãesl, AM; Limall, JD; Ribeiroll, MFB. 2002. Ultrastructure of babesia equi trophozoites isolated in Minas Gerais, Brazil (en línea). Brasil. Consultado 20 oct. 2006. Disponible en http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2003000300002
12. Hall, HTB. 1986. Diseases and parasites of livestock in the tropics. Ed. WJA Payne. 2 ed. s.p. Longman Scientific and technical. p 181-182
13. INE (Instituto Nacional de Estadística, GT). 2003. Censo nacional agropecuario (en línea). Guatemala. Consultado 01 mayo. 2008. Disponible en: http://www.ine.gob.gt/descargas/censoagro/htm/tom_4/TomoIV_archivos/frame.htm
14. Lützelchwab, C. 2005. Anexo 2: pruebas de interacción primaria (en línea). Buenos Aires, AR. Consultado 18 oct. 2006. Disponible en <http://www.vet.unicen.edu.ar/catedras/Inmunologia/Anexo2.pdf>
15. Malpica, C; Donat's, C. 2002. Estandarización de la prueba de ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos IgG en sueros de humanos para el virus Phlebotomus fever (en línea). Lima, PE. Consultado 18 oct. 2006. Disponible en http://sisbib.unmsm.edu.pe/Bibvirtual/tesis/Salud/Cruz_M_C/generalidades.htm

16. Manley, WG. 2004. El caballo con piroplasmosis (en línea). España. Consultado 18 sep. 2006. Disponible en http://www.spillers.es/art_EL%20CABALLO%20CON%20PIROPLASMOSIS.htm
17. OIE (Organización mundial de sanidad animal). 2005. Equine piroplasmosis (en línea). Cap. 2.5.6. Consultado 18 sep. 2006. Disponible en http://www.oie.int/eng/normes/MANUAL/A_00084.htm
18. _____; Iowa State University. 2005. Equine piroplasmosis (en línea). Consultado 18 sep. 2006. Disponible en http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/equine_piroplasmosis.pdf
19. Ribotta, F. 2003. Piroplasmosis equina (en línea). The peruvian paso horse magazine ed 19. Consultado 18 sep. 2006. Disponible en <http://www.madeinperumagazine.net/PiroplasmosisEquina1.html>
20. Robb, B. 2002. Photo gallery (en línea). s.p. Consultado 20 oct. 2006. Disponible en http://www.goldenvetlab.co.za/photo_gallery.htm
21. Schering-Plough Veterinaria. s.f. Imizol (en línea). México. Consultado 18 sep. 2006. Disponible en <http://mexico.spah.com/mexico/products/fulldescr.cfm?prodid=500&slD=0>
22. Smith, RD. 1978. Ciclo biológico de babesia en la garrapata (en línea). México. Consultado 18 sep. 2006. Disponible en <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol2/CVv2c9.pdf>
23. Sokal, R; Rohlf, J. 1995. Biometry. 3 ed. New York, US, Freeman. 887 pp.
24. VMRD. 2006. Assay instructions for catalog numbers: 274-2 and 274-5 (en línea). Consultado 20 oct. 2006. Disponible en http://www.vmr.com/docs/tk/Babesia_equi/B_equi_cELISA_060531.pdf

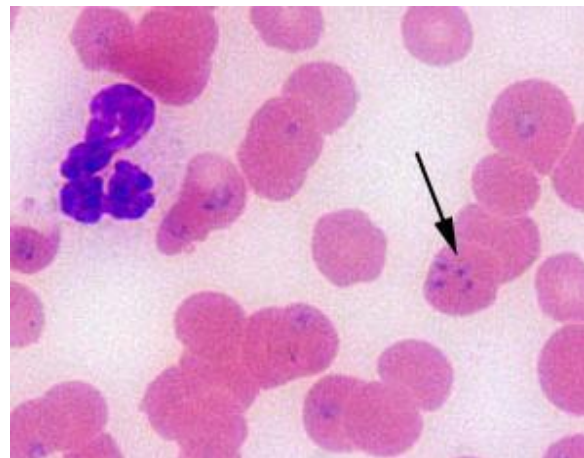
XI. ANEXOS

Anexo 3. Frotis Sanguíneo con *Babesia caballi* y *Theileria equi*

Merozoitos de *Babesia caballi* en frotis sanguíneo

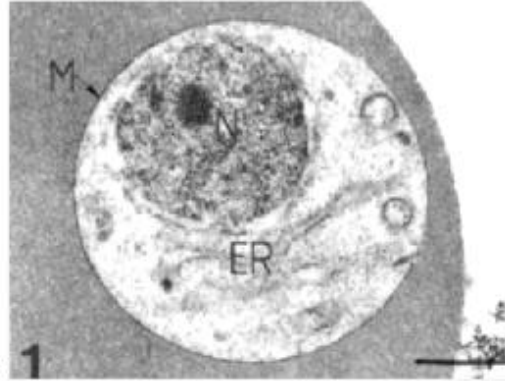


Merozoitos de *Babesia equi* en frotis sanguíneo

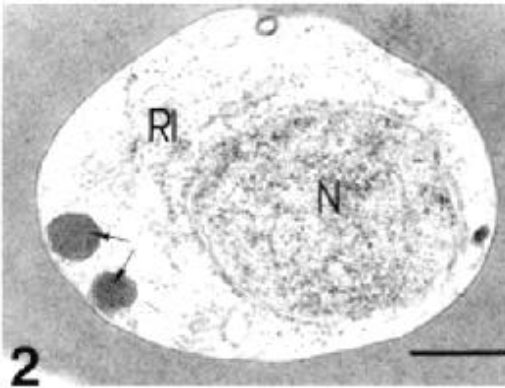


Merozoito de *Babesia equi* en forma de "Cruz de Malta"

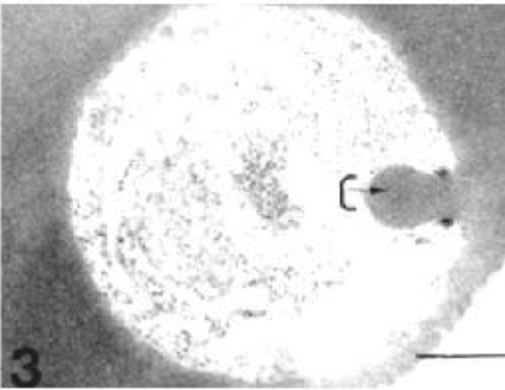
Anexo 4. Micrografía electrónica de *Theileria equi*



Trofozoito rodeado de una membrana simple (M).
N=núcleo, ER=retículo endoplasmático.



Trofozoito dentro de un eritrocito de caballo. N=núcleo, Ri=ribosomas distribuidas dentro del citoplasma del parásito. Las flechas muestran dos vacuolas.

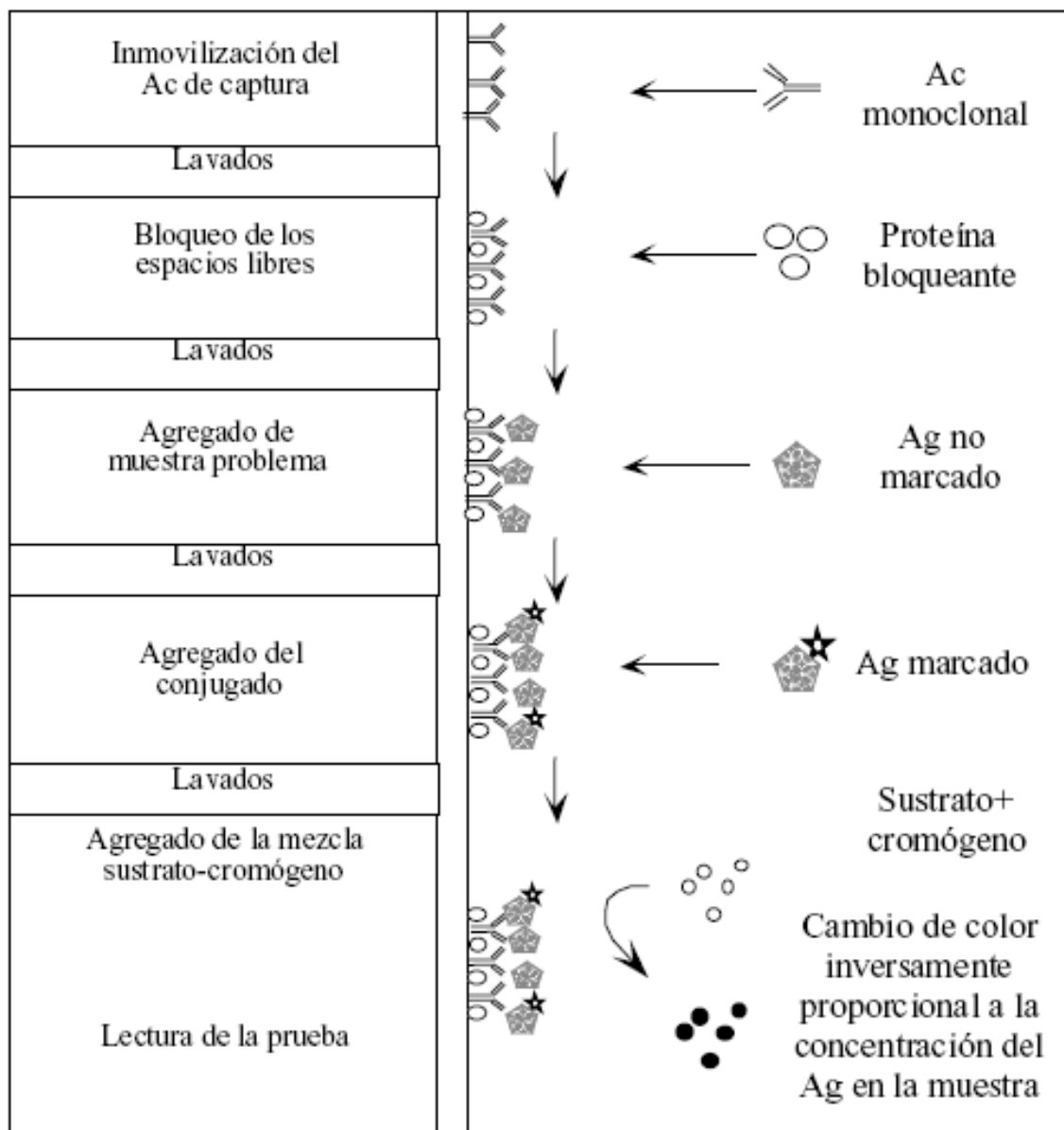


Un trofozoito mostrando un cistosoma.

Fuente: 11

Anexo 5. Determinación de concentración de antígenos en una muestra a través del método de ELISA competitivo.

ELISA competitivo



Fuente: 14

Anexo 6. Instrucciones para la preparación, procedimiento, validación e interpretación de resultados del KIT cELISA para la determinación de anticuerpos de *Babesia caballi* y *Theileria equi*

Preparación

1. **Entibiar los reactivos:** Colocar los reactivos, sueros y placas a temperatura ambiente previo a empezar a trabajar.
2. **Preparación de controles y muestras:** Los controles positivos y negativos y las muestras de suero deben de ser diluidas 1:2 con la solución Buffer de dilución de suero para poder ser usadas en la prueba. Se recomienda hacer esta dilución en placas estériles que no estén recubiertas de ningún antígeno ni anticuerpo. Siempre el control positivo se corre dos veces y el negativo tres veces, sin importar el número de muestras a trabajar, cuando se usan placas completas es mejor colocar los controles en pozos separados. Los controles y la identificación de cada muestra deben de anotarse en una ficha.
3. **Preparación de placas:** Sacar las placas y colocar en el marco de la placa solamente las tiras que se van a utilizar, numerándolas e identificándolas en el extremo superior de cada tira.
4. **Preparación del Anticuerpo Primario:** Preparar Anticuerpo Primario 1X, diluyendo 1 parte de Anticuerpo Primario 100X con 99 partes de solución Buffer de dilución de anticuerpo. Se necesitan 50 μ l para cada pozo, sin embargo se debe de hacer un poco más de la solución requerida debido al desperdicio que siempre se da. Para 96 pozos recomiendan preparar 6 ml de Anticuerpo Primario 1X (60 μ l de Anticuerpo Primario 100X + 5,940 μ l de Solución Buffer de dilución de anticuerpos).
5. **Preparación del Conjugado Anticuerpo-Peroxidasa:** Preparar conjugado Anticuerpo-Peroxidasa 1X, diluyendo 1 parte de conjugado Anticuerpo-Peroxidasa 100X con 99 partes de solución Buffer de dilución de anticuerpo. Se necesitan 50 μ l para cada pozo, sin embargo se debe de hacer un poco más de la solución requerida debido al desperdicio que siempre se da. Para 96 pozos recomiendan preparar 6 ml de Anticuerpo Primario 1X (60 μ l de conjugado Anticuerpo-Peroxidasa 100X + 5,940 μ l de Solución Buffer de dilución de anticuerpos).
6. **Preparación de la solución de lavado:** Preparar una Solución de Lavado 1X, diluyendo 1 parte de Solución de Lavado Concentrada 10X con 9 partes de agua destilada. Se necesita aproximadamente 1.8 ml por pocito, pero preparar solución extra.

Procedimiento

1. **Colocar controles y muestras de suero:** Usando una pipera de 50 μ l transferir los sueros y controles diluidos a la placa recubierta con antígeno, según el orden anotado. Somatar la placa para que la muestra llegue al fondo de los pocitos, teniendo cuidado de no mezclar los sueros. Incubar la placa por 30 minutos a temperatura ambiente (21-25°C).
2. **Lavado de Pocitos:** Botar el contenido de los pocitos en el lavamanos invirtiendo la placa totalmente y colocándola en toallas de papel, sacudiendo esta cuatro veces en áreas limpias. Llenar los pocitos con la Solución de Lavado 1X, ya sea con jeringa, botella de lavado o con una pipeta multicanal. Botar nuevamente el contenido de los pocitos dos veces más para completar 3 lavadas en total.

3. **Agregar Anticuerpo Primario:** Agregar 50 µl del Anticuerpo Primario 1X diluido, a cada pocito, somatar un par de veces la placa para que el anticuerpo llegue al fondo del pocito. Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
4. **Lavado de Pocitos:** Lavar nuevamente 3 veces todos los pocitos, como en el paso 2.
5. **Agregar el Conjugado Anticuerpo-Peroxidasa:** Agregar 50 µl del conjugado Anticuerpo-Peroxidasa 1X diluido, a cada pocito, somatar un par de veces la placa para que el anticuerpo llegue al fondo del pocito. Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
6. **Lavado de Pocitos:** Lavar nuevamente 3 veces todos los pocitos, como en el paso 2.
7. **Agregar la solución de sustrato:** Agregar 50 µl de Solución de Sustrato a cada pocito, somatar un par de veces la placa para que la solución de sustrato llegue al fondo del pocito. Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente, evitando dejar con la luz solar directa.
8. **Agregar solución de parado:** Agregar 50 µl de Solución de Parado a cada pocito, somatar un par de veces la placa para que la solución de sustrato llegue al fondo del pocito.
9. **Leer y anotar resultados:** Inmediatamente después de agregar la solución de parado leer la placa en el lector a una densidad óptica de 650 nm, calibrando previamente el lector ya sea con el aire o con un pocito vacío, al que no se le ha agregado ningún reactivo.
10. Todos los reactivos deben de ser tapados adecuadamente y guardados nuevamente a 27 °C.

Prueba de Validación:

- Los controles negativos deben de producir una densidad óptica >0.300 y <2.000
- Los controles positivos deben de producir una inhibición de ≥ 40%

Cálculo del porcentaje de inhibición (%I):

$$\%I = 100 - ((DO \text{ de muestra} \times 100) / (DO \text{ del principal control negativo}))$$

DO= Densidad óptica

Interpretación de Resultados:

Las muestras se consideran como:

Positivo: si produce ≥ 40% de inhibición.
Negativo: si produce < 40% de inhibición.

Fuente: 24

Anexo 7. Índice de Concordancia Kappa.

$$K = \frac{PO - PE}{1 - PE}$$

$$PO = \frac{a + d}{N}$$

$$PE = \frac{((a+b)(a+c)) + ((c+d)(b+d))}{N^2}$$

PO = Proporción de concordancia observada
PE = Proporción de concordancia esperada

Fuente: 9 y 23.

Anexo 8. Márgenes propuestos por Landis y Koch para valorar el grado de acuerdo en función del Índice Kappa.

Kappa	Grado de acuerdo
< 0	Sin acuerdo
0 – 0.2	Insignificante
0.2 – 0.4	Bajo
0.4 – 0.6	Moderado
0.6 – 0.8	Bueno
0.8 – 1	Muy Bueno

Fuente: 9