AA98608

TESIS
ED2007
E6

REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO
FACULTAD DE HUMANIDADES Y EDUCACIÓN
ESCUELA DE EDUCACIÓN
MENCIÓN BIOLOGÍA Y QUÍMICA

COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS SERÓLOGICOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE PIROPLASMOSIS EQUINA EN VENEZUELA

Trabajo Especial de Grado para optar al Título de Licenciado en Educación

Universidad Católica Andrés Bello
BIBLIOTECA
Caracas

Autora: Br. América Escalona
Tutora: Dra. Trina Perrone

Caracas, marzo de 2007

En mi carácter de Tutor del Trabajo de Grado titulado: **COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS SERÓLOGICOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE PIROPLASMOSIS EQUINA EN VENEZUELA** realizado por: América Isabel Escalona Estévez para optar al Título de Licenciado en Educación, Mención Biología y Química, considero que dicho trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a su defensa oral y evaluación por parte del Jurado examinador designado.

En Caracas, a los 13 días del mes de marzo de 2007

Dra. Trina Perrone

C.I.: 6.892.528

DEDICATORIA

A ti, que formas parte de mi y de todo, me acompañas en este camino; en cada paso que doy me muestras tu inmensidad, tu amor y la esperanza en los hombres..

A mi familia, muestra de esfuerzo, sacrificio, amor y perseverancia, base de quien soy.

A mis amigos ángeles guías, fuentes de luz y compañía, que me acompañan en todo momento

Con mucho cariño..

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecerte a ti primero, por mostrarme que aunque el camino este lleno de obstáculos y dolor, tu presencia, apoyo y amor esta en todo lo que tocamos, vemos y escuchamos, solo tenemos que prestar atención a tus señales.

A mis padres por su amor, sacrificio y apoyo; durante todo este tiempo me han enseñado que mientras exista fuerza y voluntad se puede llegar hasta el final de los objetivos que nos planteemos. Los amo

A mi hermano por apoyarme y cuidarme desde mi infancia, mi gran compañero de juegos y enfermero. Te amo por quien eres.

A mis amigos, Maritza por ser la hermana que nunca tuve y mi ángel de la guarda, Diego enseñarme tu visión del mundo, Yahaira por tus consejos y por ser mi gran madrina, Sandra por tu dulzura de niña que aun conservas, Jenny por tu personalidad diferente, Iralis por tu entusiasmo y humor ante todo y a Chuo por sus buenas intenciones con todos a quien conoce.

Al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) por permitirme usar sus instalaciones para el desarrollo de esta investigación.

A mi tutora Dra. Trina Perrone por darme la oportunidad de aprender de su trabajo, de su forma de ver la vida y por guiarme en este proceso.

Al Dr. Luis Segundo Jordán por ayudarme y enseñarme que el alma siempre es joven en todo momento y que las ganas de vivir esta en nosotros.

A Nancy Linares por sus consejos de madre y por su amistad en este proceso de aprendizaje

A Roschman por su amistad, ayuda y por enseñarme la otra cara de la estadística que nunca pensé en disfrutar.

A Nereida por enseñarme la dedicación y paciencia que hay que tener en el estudio de las ciencias y por las horas del te.

A Meyerling por brindarme su amistad y ayudarme en este poco tiempo que llevamos de conocernos.

A mis profesores por enseñarme que ser persona es honrar, servir y proteger nuestros principios y que esto esta por encima de todo el conocimiento que podamos alcanzar, puesto que lo primero se experimenta, se lleva en nuestra

mente y corazón; y lo segundo se obtiene gracias a lo primero y solo así logra ser significativo. A todos muchas Gracias.

INDICE GENERAL

	Pág.
Indice de Tablas y Figuras	**IV**
RESUMEN	**VI**
CAPÍTULO I	
Planteamiento del Problema	**1**
Justificación de la Investigación	**3**
Objetivos de la Investigación	**4**
CAPÍTULO II	
Marco Teórico	**5**
Antecedentes de la Investigación	**5**
Características Generales de los Protozoos	**7**
Características Generales del Phylum Sporozoa o Apicomplexa	**8**
Descripción Anatómica	**11**
Ciclo de Vida	**13**
Babesiosis Equina o Piroplasmosis	**17**
Mecanismo de Transmisión	**18**

Síntomas de la Babesiosis o Piroplasmosis..... 18

Patogénesis..... 19

Inmunofluorescencia Indirecta (Principio de la Técnica)..... 20

Ensayo de Inmuno Absorción Enzimático(Principio de la Técnica). 20

CAPÍTULO III

Materiales y Método..... 22

Muestreo..... 22

Manejo Tipo A..... 22

Manejo Tipo B..... 22

Manejo Tipo C..... 22

Ensayo Inmuno Enzimatico..... 22

Técnica de Inmuno Fluorescencia Indirecta(IFI)..... 25

Análisis Estadísticos..... 26

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

Comparación del Método cELISA e IFI..... 29

Análisis Estadísticos..... 31

Seroprevalencia de P.E por el método de cELISA..... 33

DISCUSIÓN.....

Comparación de cELISA e IFI..... **44**

Método de Cohen –Kappa..... ..... **45**

Seroprevalencia por el Método cELISA..... **47**

CONCLUSIONES..... **50**

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... **52**

Índice de Tablas y Figuras

Tablas

Tabla-1 Cuadro representativo de todas las especies de Babesias..... 10

Tabla-2 Tabla de Concordancia..... 26

Tabla-3 Cuadro que representa el % de positivos y negativos para *B.caballi* y *T.equi*..... 29

Tabla-4 Tabla de Concordancia para B.caballi y T.equi para las técnicas IFI Y cELISA..... 31

Tabla-5. Resultados Obtenidos para la S,E, VP+ y VP-, correspondientes a *B.caballi* y *T.equi*..... 31

Tabla-6. Distribución de los Sueros Equinos según Estados y Sistema de Crianza sometidos a la Prueba de cELISA..... 33

Tabla-7.Tabla Representativa de los tres sistemas de manejo..... 34

Pág

Figuras

Figura-1. Árbol Filogenético de las uniones entre varias especies de Piroplamas 11

Figura-2.*B.caballi* en un glóbulo rojo..... 12

Figura-3. Merozoito de *B.equi* 13

Figura-3. Merozoito de *B.equi* 13

Figura-4.Merozoitos formando la Cruz de Malta..... 13

Figura-5.Ciclo de vida de *Babesia spp*..... 15

Figura-6. Proceso de Invasión de una *Babesia spp*..... 16

Figura-7. Representación del Proceso de fijación de los anticuerpos en el pozo de la placa..... 24

Figura-8. % de individuos positivos utilizando la técnica de cELISA e IFI..... 35

Figura-.9. Seroprevalencia de *T.equi* y *B.caballi* en equinos del Dto. Federal..... 36

Figura.10- Seroprevalencia de *T.equi* y *B.caballi* en equinos del Edo. Miranda..... 37

Figura.11- Seroprevalencia de *T.equi* y *B.caballi* en equinos del Edo.Carabobo..... 38

Figura.12- Seroprevalencia de *T.equi* y *B.caballi* en equinos del Edo Apure..... 39

Figura.13- Seroprevalencia de *T.equi* y *B.caballi* en equinos del Edo Guarico..... 40

Figura-14. % de Sueros positivos a *T.equi* y *B.caballi* (infección mixta) Distribuido por Estado..... 41

Figura.15- Seroprevalencia de P.E en los Estados muestreados y analizados en este estudio..... 42

Figura.16- Seroprevalencia de Piroplasmosis Equina en los diferentes tipos de manejo..... 43

UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO
FACULTAD DE HUMANIDADES Y EDUCACIÓN
ESCUELA DE EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA Y QUIMICA

COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS SERÓLOGICOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE PIROPLASMOSIS EQUINA EN VENEZUELA

Autor: Br. América Escalona

Tutora: Dra. Trina Perrone

Año: 2007.

RESUMEN

La Piroplasmosis equina (P.E) es una enfermedad causada por *T.equi* y *B.caballi*, entre los síntomas que puede desarrollar el hospedador se encuentran: anorexia, perdida de peso hemoglobinuria e ictericia, en casos crónicos puede causar la muerte. En Venezuela la técnica más utilizada para diagnosticar la enfermedad es la IFI; actualmente se han desarrollado métodos sencillos como la técnica cELISA, a nivel internacional ha sido recomendada por la OIE para el diagnóstico de P.E. En nuestro país esta técnica no ha sido implementada hasta ahora, es por ello se propuso comparar ambas técnicas con la finalidad de determinar la confiabilidad de cELISA en cuanto a sensibilidad (S) y especificidad (E), así mismo, determinar si puede sustituir la IFI por el método Cohen-Kappa. Se utilizaron 60 muestras de sueros equinos aleatorias de diversos estados de Venezuela, se calculó la S y E, utilizando como Gold Estándar la IFI para ambos especies. Los resultados obtenidos, sugieren que la técnica cELISA para *B.caballi* diagnostica animales verdaderamente positivos y negativos a P.E. Por otro lado, para el cELISA de *T.equi* plantea una alta capacidad de diagnostico en seropositividad, mas no para considerar animales negativos. Los resultados obtenidos por la escala del método Cohen-Kappa colocan al cELISA para *B.caballi* como técnica aceptable y el cELISA para *T.equi* como regular, lo que sugiere que ambos ELISA detectan anticuerpos para ambos parásitos. Por la facilidad que ofrece el cELISA se determinó las seroprevalencia para ambos parásitos de 600 sueros de equinos aproximadamente, provenientes de tres tipos de manejo de los estados Dto. Federal, Carabobo, Miranda, Apure y Guárico. Con este estudio se muestra que la técnica cELISA para ambos parásitos es una alternativa en el diagnóstico de P.E en nuestro país.

Palabras claves: Piroplasmosis, *B.caballi*, *T.equi*, IFI; cELISA

CAPÍTULO I
EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

La Piroplasmosis equina (P.E) es una enfermedad provocada por los hemoparásitos perteneciente al phylum Sporozoo o Apicomplexa, género *Babesia*. Existen dos especies en equinos, *Babesia caballi* y *Theileria equi(Babesia equi)*. El primero sólo infecta los glóbulos rojos, mientras que el segundo invade en su primer estadio de multiplicación a los linfocitos, para luego infectar a los eritrocitos. Esta enfermedad es transmitida principalmente por la garrapata (específicamente los géneros *Rhipicephalus, Dermacentor* e *Hyalomma*) que son sus vectores más eficaces. En los casos agudos los síntomas más comunes son: fiebre, anemia, pérdida de peso, depresión, anorexia, ictericia, taquicardia y hemorragias en las membranas mucosas (Knowles, 1996).

El curso de la enfermedad se manifiesta en dos fases: una fase aguda y una fase crónica; cuando los caballos infectados superan la fase aguda se convierten muchas veces en portadores asintomáticos, pudiendo sufrir recaídas y causar la muerte o trastornos del comportamiento (Botteon y col, 2002).Bajo condiciones de estrés puede desencadenar la infección aguda, lo cual aumenta la probabilidad de transmisión.

En países como Estados Unidos, Rusia, India, Australia y en Islas Caribeñas han sido reportado casos de Babesiosis equina (Knowles, 1994), lo cual obliga que dichos animales para entrar a EEUU pasen por una rigurosa inspección por parte de las autoridades sanitarias para permitir la entrada de los ejemplares.

Debido al gran desarrollo de competencias deportivas a nivel mundial, las autoridades sanitarias deben mantener un estricto control cuando deseen introducir animales provenientes de áreas endémicas que pudiesen generar la

enfermedad, porque si bien no la tienen, poseen los vectores potenciales de la localidad. Los EEUU obligan a los ejemplares que ingresan poseer como requisito indispensable estar libres de *Babesia spp.*

Existen varias pruebas serológicas para diagnosticar *Theileria equi o Babesia caballi* en equinos. La más clásica es la observación de los parásitos por frotis sanguíneo; sin embargo, esta técnica no es lo suficientemente sensible por la dificultad de observar estos organismos en muestras *in vivo.* Las técnicas más sensibles son las inmunológicas en la cual los anticuerpos pueden ser detectados.

En Venezuela las pruebas serológicas como: Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y la de Fijación de complemento (FC) han sido las más utilizadas hasta el momento. Recientemente se han desarrollado técnicas más específicas como la de ELISA indirecto (de sus siglas en inglés) (Bose y Peumann en 1994), para la detección de *Babesia caballi*. De estas tres técnicas, el cELISA (ELISA competitivo) presenta mayor sensibilidad y especificidad en comparación con IFI y FC. Debido a la exactitud y especificidad de la cELISA la hacen la técnica más ampliamente utilizada hoy en día; así como también en el diagnóstico de una gran cantidad de microorganismos en general y de la Babesiosis en particular.

En la actualidad se dispone de estuches comerciales los cuales son de fácil uso y son más específicos para la detección de este parásito en el caballo. En Venezuela recientemente esta siendo utilizada la técnica de cELISA, sin embargo es importante compararla con la IFI, que es la técnica de rutina utilizada para el diagnóstico de estas enfermedades. Un aspecto importante es determinar si el estuche comercial es capaz de detectar animales serologicamente positivos infectados con cepas venezolanas de ambas especies. Ante estos planteamientos, surgen las siguientes interrogantes:

¿Cuál es la sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA competitiva y la de IFI?

¿Cuáles son las ventajas de introducir en Venezuela esta nueva técnica para el diagnóstico de Piroplasmosis equina (P.E)?

Justificación de la Investigación

En Venezuela son escasas las investigaciones realizadas para las infecciones causadas por *Theileria equi y Babesia caballi* en caballos, los reportes existentes son de países cercanos como Brasil o Colombia o de otro continente. Aspectos importantes que determinan la epidemiología de la Piroplasmosis equina como la prevalencia, estudios del vector (garrapata) en Venezuela, el tipo de contagio, tratamientos utilizados en el país, son muy pocos conocidos.

Es importante considerar que los síntomas clínicos son comunes y pueden ser confundidos con otro tipo de enfermedad. El estrés al que esté sometido el equino puede agudizar la Piroplasmosis en caso de padecerla y llevarlo a la muerte.

Disponer de un diagnóstico certero y precoz es una ventaja para el control de la Piroplasmosis; hoy en día, existen diferentes tipos de diagnósticos inmunológicos, con suficiente sensibilidad y especificidad para determinar bajas parasitemias.

Venezuela es un país con un moderado incremento de las poblaciones de equinos, los cuales son de gran importancia para el desarrollo económico debido a su uso en las actividades agropecuarias en haciendas o fincas y en competiciones ecuestres nacionales e internacionales

Por estas razones, la salud de los caballos es muy importante para lograr en lo posible tener ejemplares que puedan cumplir con sus funciones específicas. Las enfermedades como la Piroplasmosis pueden crear pérdidas de ingresos tanto en los aspectos de trabajo diario, en las actividades deportivas, sin mencionar las pérdidas de ingresos por el costo de los tratamientos veterinarios a los cuales deben ser sometidos.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Comparar dos métodos serológicos para el diagnóstico de Piroplasmosis Equina en Venezuela.

Objetivos Específicos

Determinar animales serologicamente positivos y negativos por cELISA e IFI.

Determinar la sensibilidad y la especificidad del cELISA para *T.equi* y para *B.caballi.*

Evaluar el método cELISA como prueba de sustitución por medio del método de Cohen-Kappa.

Determinar la seroprevalencia de Piroplasmosis Equina (P.E) por medio de cELISA en diferentes Estados de Venezuela.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Antecedentes de la Investigación

Bôse y Peymann (1994), diagnosticaron la presencia de *Babesia caballi* por métodos de ELISA, Electro-transferencia e Inmuno-tinción y por IFI; los resultados mostraron un 98,3%, 94.9% y 96,6% encontrando mayor sensibilidad por el método (ELISA) en comparación con las otras técnicas. En Venezuela la técnica utilizada para el diagnostico de la Babesiosis es la IFI.

Oliveira (2001), determinaron la Seroprevalencia de Babesiosis Equina en Caballos Pura Sangre de Carrera en HARAS de los distintos municipios de los Estados Aragua y Carabobo; utilizando esta técnica. La prevalencia obtenida fue de 23,67%; por municipio fue de 21,02% (Mcpio.Zamora), 28,76% (Mcpio. Urdaneta) del Estado Aragua y 29,48%(Mcpio. Carlos Arvelo) y 18,50% (Mcpio. San Joaquín), del estado Carabobo. Observaron diferencias significativas al comparar la seroprevalencia en diferentes grupos etarios, con valores más altos en los animales de 2 a 4 años. Al comparar por sexos los resultados fueron similares en ambos grupos muestreados, sin observar diferencias estadísticas significativas para este parámetro. La relación de esta parasitosis con los factores de manejo estudiados tal como frecuencia en el control de vectores y en la asistencia veterinaria, no mostraron diferencias significativas.

Asimismo Simoes (2001), realizo estudios de Piroplasmosis equina en los caballos de pura sangre de carrera (PSC) del Hipódromo de Santa Rita, determinando la seroprevalencia total y por especie y su relación con algunos factores epidemiológicos, así como la relación que existe entre la enfermedad con parámetros hematológicos clínicos. Se utilizo como técnicas de diagnostico el frotis sanguineo y la tecnica de inmuno-fluorescencia indirecta. Por medio del Frotis sanguineos los resultados fueron de 0% y por el método de inmnuno-

fluorescencia indirecta una seroprevalencia total de 26,19%.Por especie, para *B.caballi* fue de 11,3% y en el segundo de 26,2% en tanto que para *B.equi* en el primer muestreo fue de 20,2% y en el segundo de 33,3%. A diferencia de los estudios realizados con los factores de edad y sexo para el primer y segundo muestro no mostraron diferencias significativas. En cuanto a la asociación de diagnostico serologico de *B.equi* presentaron un menor parámetro de hematocrito, mostrando diferencia significativa con respecto al valor de equinos seronegativos.

En Brasil también es usada la IFI para estudiar la seroprevalencia de estas enfermedades, Botteon y col, (2002) trabajando con la seroprevalencia de *Babesia equi* en tres diferentes sistemas de crianza, en Río de Janeiro, recolectaron muestras de sangre de equinos mantenidos en tres sistemas de crianza: confinamiento, semi-confinamiento y extensivo. El suero de estos animales fue analizado por la técnica de inmuno-fluorescencia indirecta contra *Babesia equi* (*T.equi*). Los resultados, mostraron una prevalencia del 89,58%, 87,09% y 45,24% de muestras positivas provenientes de animales mantenidos en sistemas extensivos, semi-confinados y confinados respectivamente. Por el examen directo en frotis sanguíneo, se observaron una prevalencia de 16,67 %, 16,13% y 4,78% de muestras positivas, respectivamente en los mismos tipos de sistemas, indicando la poca sensibilidad de los métodos parasitológicos en comparación con los serológicos.

Posteriormente, con el avance de la Biología Molecular, técnicas como el ELISA fueron mejoradas, Xuan y col (2002), trabajaron con el Diagnóstico de piroplasmosis (babesiosis) equina en la provincia de Xinjiang de China por ELISA usando antígenos recombinantes. Un total de 70 muestras de suero fueron tomadas de caballos de pastos de tres granjas en el este de Xinjiang; y fueron examinadas para *Babesia equi* (B *equi*) y *Babesia caballi* (B *caballi*), usando merozoitos de (*equi* antígeno 1(EMA-1)) y un antígeno recombinante (P48), respectivamente. De las 70 muestras, 28 (40,0%) y 17 (24,3%) fueron positivos para infecciones de B. *equi* y B *caballi*. Los resultados indican que la

piroplasmosis (Babesiosis) equina se está extendiendo y por lo tanto puede causar complicaciones al este de Xinjiang. Este es el primer reporte que describe la piroplasmosis en Xinjiang, China.

La importancia de contar con un sistema de diagnostico sensible, especifico, económico, practico y universal se traduce en un control mas efectivo y en el uso de drogas especificas que puedan mejorar la calidad de vida del animal.

Características Generales de los Protozoos

Los protozoarios son organismos unicelulares eucariotas, rodeados de una membrana celular, presentan semejanzas con los animales por ser móviles y ser autótrofos, sin embargo, manifiestan características muy diferentes a los animales superiores. Presentan una gran variedad de orgánulos o estructuras esqueléticas, lo que les proporciona un gran poder de adaptabilidad para sobrevivir. En la actualidad el término protozoo se utiliza para designar a los protistas móviles unicelulares. (Barnes, R, 1996)

Por lo general la mayoría de los protozoarios son organismos solitarios, aunque muchos pueden llegar a formar colonias; los que son de vida libre se pueden encontrar donde quiera que haya humedad: en el mar, agua dulce y el suelo. Hay también especies comensales y parásitas. La mayoría de los protozoos se distinguen en parte por su forma de moverse, gracias a los orgánulos locomotores como son los flagelos, pseudópodos o cilios, y esto permite clasificarlos en los diferentes phylum (Barnes, R, 1996)

Por otra parte, el modo de vida determina el tipo de nutrición, las sustancias entran en las células de lo protozoos de muchas maneras. Los canales de proteína de la membrana celular favorecen la difusión pasiva de agua, iones y pequeñas moléculas, como las de azúcares y aminoácidos. Algunas funcionan como bombas que requieren energía, transportando activamente ciertas moléculas, o moviendo iones a favor o en contra su gradiente de concentración; también se pueden mencionar procesos como la pinocitosis, la endocitosis

mediante receptores y la fagocitosis. Por lo tanto, la digestión es intracelular, y se realiza en las vacuolas digestivas. (Barnes, R, 1996)

Por su gran diversidad los protozoarios, se han clasificado, en flagelados, amebas y similares, productores de esporas y ciliados, siendo de mayor importancia los pertenecientes a los filos Kinetoplastidia y Apicomplexa o Sporozoa, ya que son parásitos del aparato digestivo de insectos y parásitos sanguíneos de vertebrados entre ellos el hombre.

Características Generales del Phylum Sporozoa o Apicomplexa

Dentro del filo Apicomplexa o Sporozoa se encuentran ubicados unos 4000 especies de protozoos endoparásitos, siendo su principal característica poseer en su ciclo de vida estados semejantes a esporas; estos microorganismos carecen de flagelos o pseudópodos y viven dentro de las células de su hospedadores invertebrados o vertebrados. Reciben el nombre Apicomplexa o Sporozoa, por presentar un complejo anular de organelos filamentosos, tubulares, en el extremo anterior, es visible únicamente a microscopio electrónico. La función de dicho complejo es dudosa; no obstante, permite la penetración en la célula huésped. (Barnes, R, 1996)

Los organismos pertenecientes a este grupo son haploides excepto el cigoto; su ciclo de vida implica una fase asexuada y una sexuada. De la meiosis resulta un estado infectivo esporiforme, denominado esporozoito. Fisiones múltiples subsecuentes producen más esporozoitos. Estos invaden al hospedador y se convierten en un trofozoito. En algunos esporozoos los trofozoitos sufren fisiones múltiples (esquizogamia) produciendo individuos denominados merozoitos, cada uno de los cuales puede dar lugar a su vez ciclos adicionales de esquizogamia. Asímismo el trofozoito se divide por fisión múltiple (gamogonia) y forma gametos que se fusionan para formar un cigoto; éste realiza el proceso de meiosis para dar inicio al ciclo.

Dentro de este filo se encuentran tres clases que son:

Gregarinea*:* Se caracteriza por el tamaño de sus trofozoitos maduros, los cuales presentan un gran tamaño, se desarrollan en el tubo digestivo o cavidades corporales del hospedador. Son parásitos exclusivamente de anélidos y artrópodos.

Coccidea*:* A diferencia del anterior sus trofozoitos maduros son muy pequeños e intracelulares.

Piroplasmea*:* A diferencia de las dos clases anteriores los microorganismos de este grupo son parásitos de glóbulos rojos de los vertebrados, transmitidos por ácaros invertebrados e insectos. El nombre piroplasma se refiere a la forma de pera que poseen algunas formas intra-eritrocitos de alguna especies. En su ciclo de vida no presentan esporas. Sus representantes significativos: *Theileria* y *Babesia.*

Las babesias han sido agrupadas en dos grupos las pequeñas babesias (trofozoitos de 1,0 a 2,5µm; cuyas especies están incluidas *B.gibsoni*, *B microti* y *B. rodhaini*) y las grandes babesias (2,5 a a 5,0 µm estas especies incluyen a *B.bovis* y *B.caballi* y *B.canis*)(Tabla-1). Esta clasificación morfológica es generalmente consistente con la caracterización filogenéticamente basada en l secuencia del ADN de la pequeña subunidad ribosomal (nss-DNA), las pequeñas babesias se encuentran relacionadas con las *Theilerias spp*, que con las grandes babesias.(Fig-1)

Las *Theileria equi* (*B.equi*) y *Babesia caballi* (*B.caballi*), son dos especies de hemoparásitos exclusivos de los *equidae* (caballos, burros, mulas, cebras), produciendo en sus huéspedes la Piroplasmosis equina.

Table 1
Babesia species of domestic animals (simplified)[a]

Species	Domestic host(s)	Vector genus	Distribution
B. beliceri	Cattle	*Hyalomma*	Russia
B. bigemina	Cattle, buffalo	*Boophilus, Rhipicephalus*	Africa, America, Asia, Australia, Europe
B. bovis	Cattle, buffalo	*Boophilus, Rhipicephalus*	Africa, America, Asia, Australia, Europe
B. divergens	Cattle	*Ixodes*	Europe
B. jakimovi	Cattle, reindeer	*Ixodes*??	Siberia
B. major	Cattle	*Haemaphysalis*	Europe
B. occultans	Cattle	*Hyalomma*	Africa
B. ovata	Cattle	*Haemaphysalis*	Asia
B. orientalis	Buffalo	*Rhipicephalus*	Asia
B. crassa	Sheep, goats	Unknown	Asia
B. motasi	Sheep, goats	*Haemaphysalis*	Africa, Asia, Europe
B. ovis	Sheep, goats	*Rhipicephalus*	Africa, Asia, Europe
B. caballi	Horse, donkey, mule	*Dermacentor, Hyalomma, Rhipicephalus*	Africa, America, Asia, Europe
B. perroncitoi	Pig	Unknown	Africa, Europe
B. trautmanni	Pig	*Rhipicephalus*	Africa, Europe
B. canis	Dog, cat?	*Dermacentor*	Europe
B. rossi	Dog	*Haemaphysalis*	Africa
B. vogeli	Dog	*Rhipicephalus*	Africa, America, Asia, Australia, Europe
Babesia sp.[b]	Dog	?	USA
B. gibsoni and other small piroplasms of dogs[c]	Dog	*Haemaphysalis, Rhipicephalus*	Africa, America, Asia, Europe
B. (canis) presentii	Cat	Unknown	Asia (Israel)
B. felis[d]	Cat	Unknown	Africa, Europe?

[a] Not all these species are recognized by all scientists, some may not be valid.
[b] This is the 4th large species reported in the dog (Birkenheuer et al., 2004).
[c] Some of these may not even belong to the genus *Babesia*.
[d] This name may well include more than one species, which may not even belong to the genus *Babesia*.

Tabla-1. Cuadro representativo de de todas la especies de Babesias. En esta figura no se considera a *B.equi* (*T.equi*). (Uilinberg; 2006).

Por lo anteriormente expuesto se puede clasificar de la siguiente forma:

Phylum: Apicomplexa o Sporozoo

Clase: Aconoidasida o Piroplamea

Orden: Piroplasmidae

Familia Babesiidae

Theileriidae

Genero *Babesia*

Theileria

Especie *Theileria equi*

Especie *Babesia caballi*

(Homer y col, 2000)

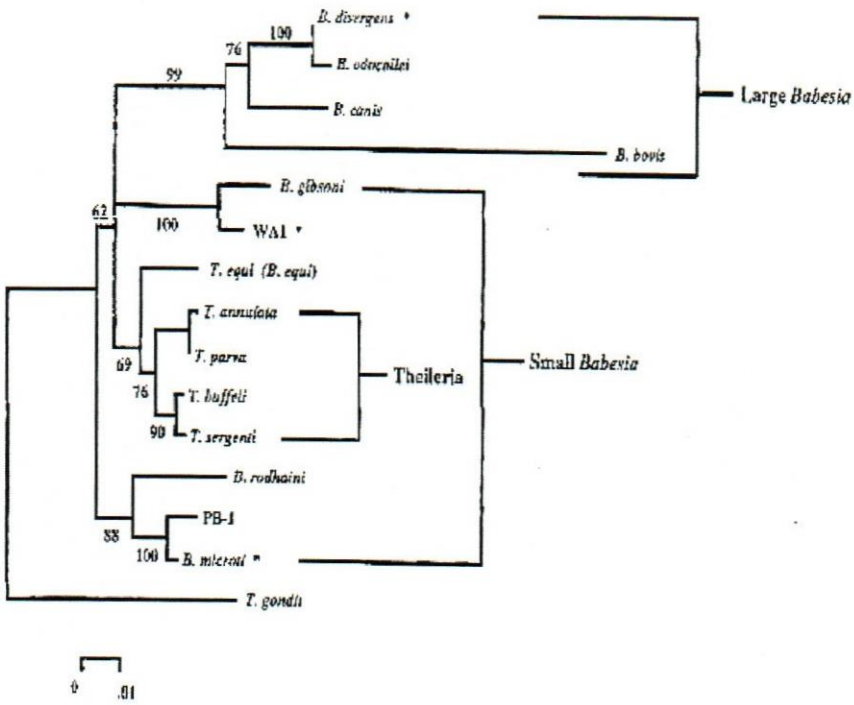

Fig-1. Árbol filogenético de las uniones entre los varias especies de piroplasmas (Tomado de Homer y col, 2000)

Descripción Anatómica

Babesia caballi: Es una especie de tamaño grande se presenta bajo formas redondas, ovales o periformes y estas últimas pueden estar por pareja y unidas por sus extremos agudos (Fig-2). Cuando están en parejas ambos elementos forman un ángulo agudo: en un mismo glóbulo pueden haber hasta cuatro elementos, dispuestos sin orden. El núcleo es alargado o fragmentado y el protoplasma presenta vacuolas y fragmentaciones de la cromatina. (Parásitos domésticos de Venezuela, tomo I ;1970). Los merozoitos en los glóbulos rojos pueden alcanzar una medida de 2-5µm de largo y 1,3-3 µm de ancho (www.oie.int)

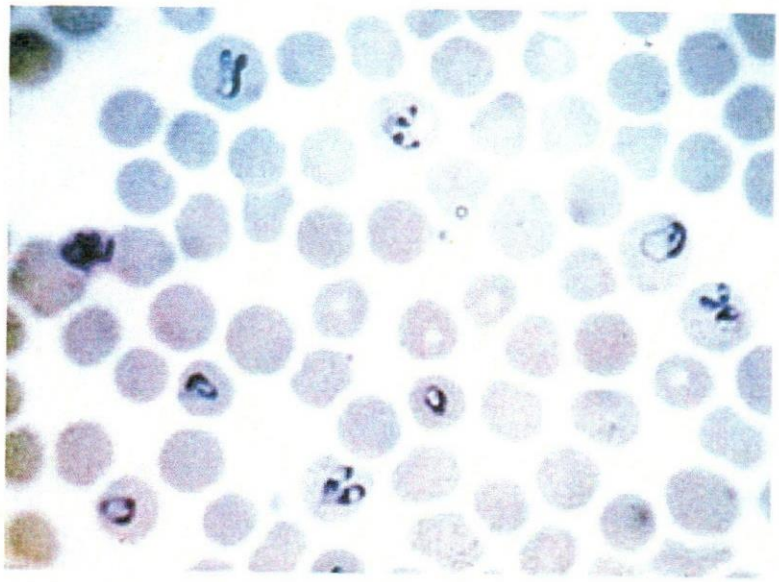

Fig-2.*B.caballi* en un glóbulo rojo (Tomada de la Pag web:www.vet.uga.edu/.../ticks/exo_dis/e_bab01a.htm

Theileria equi: Presenta un menor tamaño comparado con *B.caballi*, en todos los estadios de crecimiento presenta un núcleo prominente y bien desarrollado retículo liso y rugoso, presenta un citostoma y una estructura tubular relacionada con la alimentación (Guimarae, Lima y Ribeiro; 2003); los merozoitos (Fig-3) de estos organismos son relativamente pequeños 2-3 μm de largo pueden ser redondos o ameboides. Generalmente se encuentran cuatro de estos parásitos formando una tétrada que también es llamada cruz de malta (Fig-4) lo cual es característico de este grupo (www.oie.int). Anteriormente se consideraba dentro del grupo de las grandes Babesias(Fig-1), sin embargo fue re-ubicado taxonomicamente por la similitud que presentaba con la familia *Theileriidae*, ejemplo de ello es el ciclo pre-eritrocitico que se desarrolla en las células linfáticas en los hospedadores vertebrados, sin mencionar que esta especie no realiza la fase trans-estadio (del huevo a la larva) (Mehlrorn y Schein;1998).

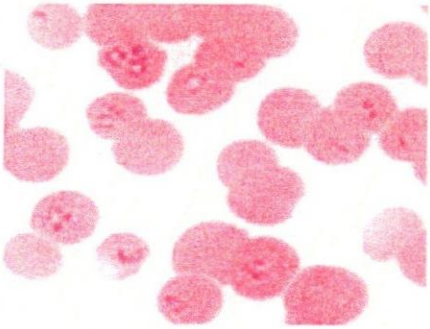

Fig-3 Merozoitos de *B.equi*

(fotografía tomada de la Pag web: www.vet.uag.edu/VPP/clerk/edwards/fig02.jpg)

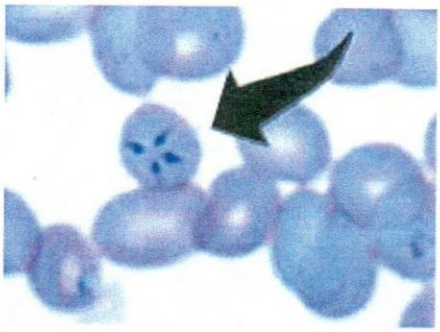

Fig-4. Merozoitos formado la cruz De malta

(fotografía tomada de la Pag web: http://www.goldenvetlab.co.za/photo_gallery.htm)

Ciclo de Vida

Los apicomplexas o Esporozoarios pueden llegar a tener al menos tres estadios de reproducción:

- Gametogonia: Formación y fusión de gametos dentro del intestino de la garrapata.
- Esporogonia: Reproducción asexual en las glándulas salivales
- Merogonias: Reproducción en los huésped vertebrados.

Desarrollo en la Garrapata:

Los organismos son detectables en la garrapata 10 horas después de que haya comenzado a comer y haya infectado al vertebrado. Después de 46 a 60 h de la ingesta, los parásitos todavía son detectables en los eritrocitos consumidos, pero algunos de ellos (los gametocitos) (Fig-5a) comienzan a desarrollar nuevos organelos, el más notable es el desarrollo de unas prolongaciones o protuberancias denominadas cuerpos ray; estas estructuras están involucradas en la fusión de los gametos (Fig-5b). El cigote resultante usa dicha estructura para entrar en las células epiteliales del intestino (Fig-5c), aproximadamente 80 h de que la garrapata haya comenzado a alimentarse. De

las células epiteliales los parásitos se mueven a las glándulas salivales a través de la Hemolinfa (Fig-5.d) (Homer y col; 2000).

El desarrollo de los esporozoitos en las glándulas salivales están divididos en tres estadios; en el primer estadio el parásito se expande y llena la célula hipertrofiada del hospedante, formando un esporoblasto multi-nucleado el cual es relativamente indiferenciado (Fig-5.e)

El segundo paso comienza solo cuando la garrapata comienza a alimentarse de nuevo, se inicia el desarrollo de los organelos especializados de los futuros esporozoitos (micronemas, roptrias y una doble membrana segmentada por debajo membrana plasmática) (Fig-5.e). Y en el último estadio, los esporozoitos están maduros (poseen una forma de pera, contienen un retículo endoplasmático, ribosomas libres, un mitocondrión como organelo, una sola roptrias y varios micronemas) salen del esporoblasto (Fig-5.F).Una sola célula puede producir aproximadamente 5000 a 10000 esporozoitos.

La eficiencia en la transmisión de la parasitosis es atribuida a la saliva de la garrapata, la cual probablemente facilita la infección por su actividad farmacológica antiflamatoria e inmunosupresiva. (Homer y col; 2000)

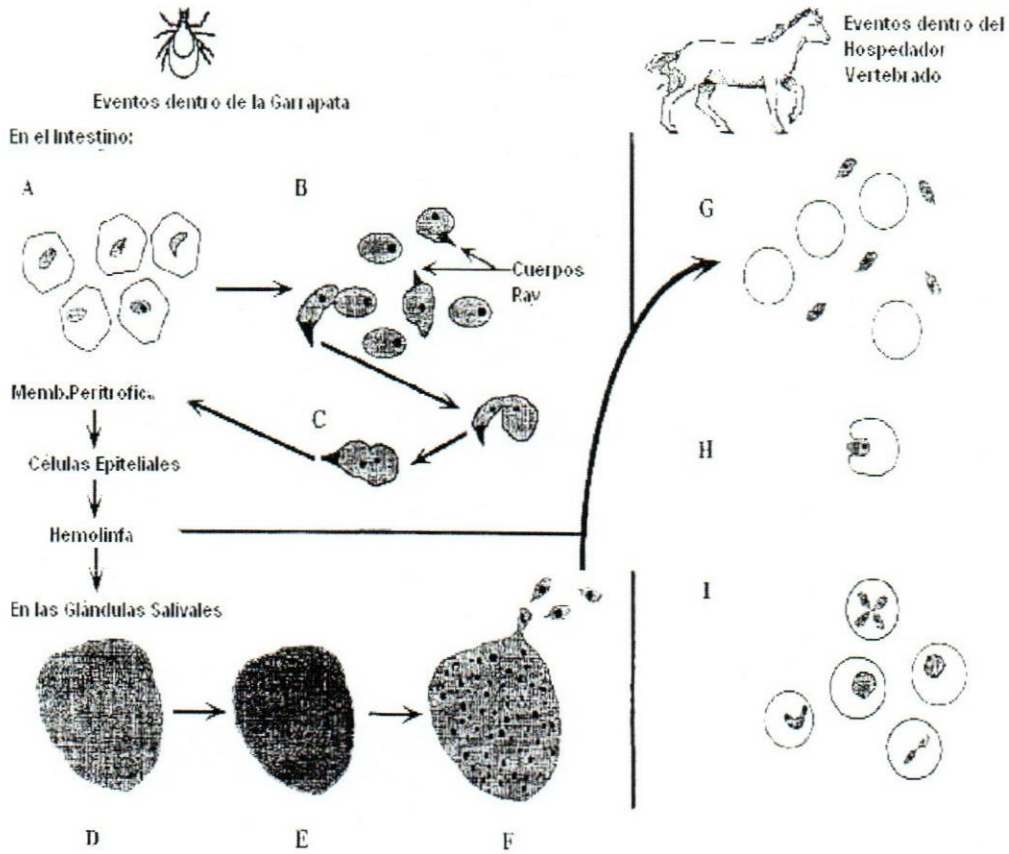

Fig-5. Ciclo de vida de *Babesia* spp. El ciclo inicia cuando los parásitos son visibles en los eritrocitos (A) Algunos comienzan el desarrollo con la formación de cuerpos ray (B). Los gametos comienzan a fusionarse (B). El cigoto se dirige e hacia las glándulas salivales (C). Una vez en la glándula salival comienza a multiplicarse y se transforma en un esporoblasto indiferenciado (D).Una vez que la garrapata los organelos de los futuros esporozoitos comienzan a formarse (E) .Finalmente los esporozoitos maduros salen del esporoblasto (F). Cuando la garrapata se alimenta nuevamente los esporozoitos son inoculados en las células huésped (G) No se muestra el proceso pre-eritrocitico de la *Theileria spp* y *T.equi* (*B.equi*).((Modificado de Homer y col;2000)

Desarrollo en el Vertebrado

Una vez en el vertebrado, los esporozoitos infectan los eritrocitos (Fig-5G), excepto en el caso de *Theileria* y algunos tipos de *Babesia*, los cuales invaden primero los linfocitos y luego se diferencian en múltiples esquizontes, estos se desarrollan y se convierten en merozoitos ocasionando lisis en la célula al salir para infectar otros eritrocitos (Homer y col; 2000).

Los merozoitos invaden la célula hospedadora (Fig-6) a través de un proceso de invaginación, inicialmente el parásito queda en el interior de una

vacuola parasitaria que pierde posteriormente su membrana, permaneciendo el parásito en estado trófico y listo para dividirse asexualmente por fisión binaria (Habela, Corchero, Peña y Sevilla; 2002)

Para realizar dicho proceso los merozoitos se valen de moléculas (ligandos) en el proceso de invasión. Los merozoitos que se encuentran afuera de los glóbulos rojos realizan su anclaje a la célula huésped y penetran su membrana a través de varias interacciones moleculares entre los ligandos del protozoario y los receptores que se encuentran en la superficie de la célula(Fig-6).(Yokohama, Okamura e Igarashi;2006)

Durante este proceso las moléculas de la superficie de los merozoitos pueden funcionar como factores de reconocimiento del huésped, los organelos que se encuentran ubicados en la zona anterior del parásito, donde este complejo de organelo es llamado complejo apical, el cual comprende las roptrias , los micronemas o los gránulos densos, intervienen en este proceso, los productos que segregan dichos organelos son agregados al punto donde se realiza el contacto con la membrana del huésped, en donde posteriormente se realizará el anclaje y luego la internalización del parásito, estos deben corresponder a los receptores que se encuentran en la superficie del glóbulo rojo.(Yokohama, Okamura e Igarashi;2006)

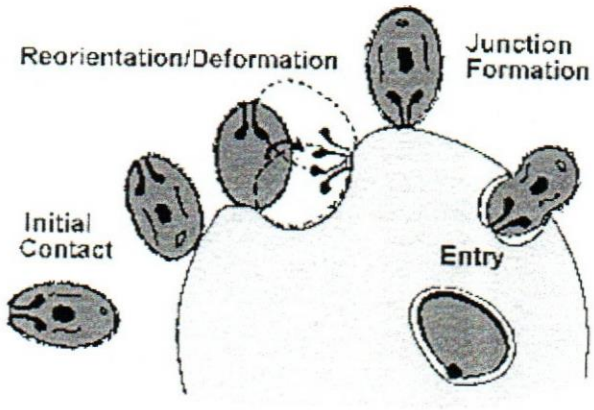

Fig -6. Proceso de Invasión de una *Babesia spp.* A un eritrocito Reorientación y anclaje del parásito en la célula huésped (Tomado de la Pág. web:www.tulane.edu/~wiser/malaria.cmb.pdf)

En los merozoitos de *B.bovis* se conocen al menos cinco glico-proteínas en su superficie, y estas moléculas pertenecen a una familia de antígenos variables de superficie del merozoito (VMSA, de sus siglas en inglés). Los miembros de la familia de VMSA consisten en un antígeno de superficie del merozoito 1 (MSA-1:42kDa), $MSA2a_1$, $MSA\text{-}2^a{}_2$, MSA-2b y MSA-2c, las cuales están definidas por: un hidrófobo amino-terminal, una región central hidrofílica y una región de carboxilo terminal la cual contiene glicosil-fosfatotidilinositol (GPI, por sus siglas en inglés). (Yokohama, Okamura e Igarashi; 2006)

Esta reproducción asexual reproducirá más merozoitos se dividirán por fisión binaria los cuales lisarán la célula e infectarán a más eritrocitos. (Homer y col; 2000)

Algunos de los trofozoitos pueden transformarse en gametocitos (Gm), o gametos, los cuales son responsables de reiniciar el ciclo de infección en los vectores. (Edward y col; 2005)

La *B.divergens* y *B.canis*, son capaces de invadir varios órganos y experimentar más lejos una replicación. La penetración más notable es la invasión a los ovarios y huevos permitiendo así una transmisión a la progenie de la garrapata.

Babesiosis Equina o Piroplasmosis

La Piroplasmosis Equina (P.E) es una enfermedad, como se mencionó anteriormente causada por *T.equi* y *B.caballi*. Esta enfermedad es endémica de las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Bôse y Peymann, 1993), se han reportado datos de Babesiosis equina en países como Estados Unidos, parte de Asia, Rusia, India, el medio-este de Europa, Australia, África, Sur América, Centro América, México y algunas Islas del Caribe. Esto obliga a restringir el movimiento internacional de los equinos (Knowles, 1996) a zonas libres de esta enfermedad. Solo Estados Unidos (excepto Florida), Australia, Japón, son

consideradas zonas no-endémicas (Nicolaiewsky y col, 2001), por tanto la importación de equinos es muy estricta.

Mecanismo de Transmisión

Los caballos son infectados con *Babesia spp* y *Theileria spp* cuando son parasitados por garrapatas (de los géneros *Rhipicephalus, Dermacentor* y *Hyalomma*) que poseen en sus glándulas salivales esporozoitos. Las garrapatas adquieren el organismo, cuando se alimentan de un caballo enfermo. Los parásitos se replican en la garrapata infectada, a nivel de las células epiteliales del intestino y en las glándulas salivales.

La replicación implica la liberación de esporozoitos en el lumen de las glándulas salivales de la garrapata. Cuando la progenie alcanza a alimentarse llega al estado de ninfa. La transmisión al caballo ocurre cuando la garrapata infectada en su estado de ninfa introduce los esporozoitos dentro del nuevo hospedador en el instante en que se está alimentando. Por lo tanto se puede decir que la transmisión es mecánica. (Edward y col; 2005)

La garrapata es un vector eficaz para *B.caballi* y para *T.equi*. Por otro lado la transmisión de la Piroplasmosis o Babesiosis también puede ocurrir por agujas con sangre contaminada o instrumentos quirúrgicos. Hasta hoy no se ha encontrado que sea transmitido por insectos. (Edward y col; 2005)

Síntomas de la Babesiosis o Piroplasmosis

Los síntomas clínicos de la Babesiosis generalmente se presentan después de un período de incubación entre 5 a 21 días.

La enfermedad se puede manifestar en una forma aguda, en la cual el caballo presenta un cuadro clínico caracterizado por fiebre, anorexia, depresión, malestar, ictericia, hemoglobinemia/hemoglobinuria, una palidez en las mucosas y taquicardia. También se puede presentar en el equino, sudoración, cólicos, lacrimación, falta de coordinación del animal, soplo cardíaco, y edemas alrededor de la cabeza y en los párpados.

Asimismo se puede presentar una forma no aguda, está caracterizada por fiebres intermitentes, anorexias, pérdida de peso, taquicardia, hemoglobinuria y bilirrubina. Por otro lado la forma crónica presenta una gran variabilidad en su sintomatología, incluyendo pérdida de peso, debilidad, y una anemia leve.

De los dos organismos causantes de la P.E, *T.equi* se considera la más patógena. Se ha encontrado que *B.caballi* causa una forma menos severa de la enfermedad en sólo 1% de los glóbulos rojos que son infectados. La enfermedad puede no ser aparente, pero puede persistir de 1 a 4 años. Esta puede estar asociada con pérdida del apetito, un bajo rendimiento del animal, y pérdida de peso. A diferencia de *T.equi* que infecta un 20% aproximadamente de los glóbulos rojos, conduciendo a síntomas más severos de la piroplasmosis, desarrolla una gran incidencia de hemoglibinuria y muerte. Una gran variedad de complicaciones secundarias pueden ser resultado de la Piroplasmosis, complicaciones que pueden incluir una falla renal aguda, cólicos, enteritis, laminitas, neumonía, infertilidad y aborto. (Edward y col; 2005)

Patogénesis

La patogénesis de P.E no es conocida completamente, aunque el estrés metabólico en los eritrocitos parasitados puede causar debilidad de la membrana celular del eritrocito causando hemólisis (Edward y col, 2005).Las células rojas parasitadas intravascularmente producen hemoglobinemia en las fases aguda de la enfermedad. La hemólisis intravascular causa una marcada hiperbilirubinemia e ictericia la cual puede ser pronunciada en muchos casos.

Al parecer la Hemoglobinuria ocurre frecuentemente en infecciones con *B.equi*; sin embargo, puede ser observada con otras especies. Adicionalmente a la regeneración de la anemia hemolítica, una significante monocitosis y eosinopenia puede ser observada en caballos con Babesiosis. En la forma severa de la enfermedad, la hemólisis intravascular producida por la infección, puede causar un disturbio capilar en el flujo de la sangre, trayendo como consecuencia

una diseminación de la coagulación intravascular (DIC) y resultando en síntomas de coagulopatía.

Inmuno-fluorescencia Indirecta (Principio de la técnica)

Los ensayos de inmuno-fluorescencia indirecta (IFI) consisten en tornar visible una reacción antígeno/anticuerpo por medio de una antinmuno-globulina marcada con fluorocromos. Estas son sustancias que tienen capacidad de absorber energía luminosa, presentando un color por un determinado período de tiempo (10^{-9} a 10^{-7} seg.), para emitir enseguida fluorescencia y después retornando a su estado normal (Madruga y col, 2001)

Ensayo de inmuno-absorción enzimático (ELISA, siglas en inglés) (Principio de la Técnica)

El ensayo de inmuno-absorción enzimático (ELISA), es una prueba de reconocimiento de antígeno por parte de un anticuerpo, fundamentado en una reacción calorimétrica mediante el uso de un anticuerpo marcado con una enzima, esta puede ser detectada o medida por especto-fotometría.

Estas técnicas, normalmente utilizan una superficie sólida para inmovilizar el antígeno o el anticuerpo, permitiendo que se realice una remoción de los componentes que no intervienen en la reacción (Madruga y col, 2001). Así como existe una gran variedad en cuanto al antígeno a utilizar también la hay en relación a los conjugados, de los cuales se derivan los diversos tipos de ELISA que existen actualmente, siendo los más utilizados:

ELISA directo: cuando los anticuerpos conjugados a la enzima son dirigidos directamente contra antígeno unido a la placa. (Perrone y Reyna, 2005)

ELISA indirecto: cuando los anticuerpos conjugados son dirigidos contra inmunoglobulinas humanas o de animales que sufren la enfermedad en cuestión (Perrone y Reyna, 2005)

ELISA sándwich: cuando se utilizan dos anticuerpos específicos que reconocen un mismo antígeno, uno de ellos marcado radiactivamente o unido a una enzima. Este tipo de ensayo permite la captura de antígenos circulantes (solubles) (Perrone y Reyna, 2005).

Para la estandarización del cELISA para *B.caballi* y *T.equi* se utilizaron proteínas recombinantes del antígeno. La proteína recombinante del merozoito de *T.equi* (EMA-1) ha sido producida en *Escherichia coli* (*E.coli*) y en células de insectos de baculovirus. Los productos antigénicos de los genes recombinantes de *T.equi* Be 82 fueron fusionados con glutation S-transferasa, los cuales también fueron producidos en *E.coli*. La proteína antigénica recombinate asociada a roptrias de *B.caballi* (RAP-1) también ha sido producida en *E.coli* .Los antígenos recombinantes producidos en *E.coli* o por baculovirus tienen la ventaja de poder sustraer lo que se necesita para ser utilizados en la infección de los caballos para la producción del antígeno (www.ioe.int/eng/normes/mmanual/A_00084.htm).

La proteína RAP-1 contiene varios epitopes inmuno-génicos responsables por inducir la inmunidad humoral, y su estructura es altamente conservada entre diversos aislados. Adicionalmente, es detectable en todos los estadios de desarrollo de los parásitos intracelulares (en las formas de anillo y en forma periforme) y en los merozoitos extracelulares durante el desarrollo asexual del ciclo de vida de *B.bovis* ((Yokohama, Okamura e Igarashi; 2006)

Los antígenos recombinantes han sido utilizados para ELISA indirecto y para ELISA competitivo (cELISA). La proteína EMA-1 y su anticuerpo monoclonal (Mab) tienen un epitope específico para las proteínas de superficie del merozoito y han sido utilizados en ELISA competitivos para *T.equi*; asimismo se ha desarrollado un cELISA usando la proteína RAP-1 de *B.caballi* y su anticuerpo monoclonal Mab con un epitope específico(www.ioe.int/eng/normes/mmanual/A_00084.htm).

CAPÍTULO III
MATERIALES Y MÉTODO

Muestreo

Con la finalidad de comparar la IFI y el cELISA se utilizaron 60 sueros de equinos provenientes de distintos estados de Venezuela (Dto. Federal y se sometieron a la cELISA y a IFI.)

De cada equino se tomaron dos muestras de sangre de la vena yugular con agujas estériles utilizando tubos al vacío vacutainer® (Becton-Dickinson), una con anticoagulante (EDTA 15%) para la determinación parasitológica a través de frotis y otra sin anticoagulante para la obtención de suero.

Los equinos utilizados en este estudio fueron clasificados según el tipo de manejo en A, B y C. Las características de cada uno se describen a continuación:

Manejo tipo A: Animales confinados a potreros, salen únicamente a ejercitarse, se encuentra bajo un riguroso control sanitario. El alimento utilizado para estos animales se limita a heno más suplementación constante alimentos concentrados. Dentro de este manejo se encuentran los caballos pura sangre.

Manejo tipo B: Animales parcialmente confinados, salen de los potreros a determinadas horas de acuerdo al horario impuesto por la finca. La alimentación de estos equinos esta constituida principalmente por alternancia de pastos más una suplementación esporádica. Dentro de este grupo se encuentran incluidos los cuartos de milla y mestizo con criollo.

Manejo tipo C: Animales apotreros, de pastoreo libre utilizados como animales de trabajo para el manejo de ganado. Su alimentación es de exclusivamente pasto criollo. Dentro de este grupo se encuentran los criollos venezolanos.

Ensayo Inmuno-enzimático:

Para el desarrollo del ELISA competitivo se utilizó el estuche comercial. (*VMRD, Inc*).El procedimiento se describe a continuación:

Contenido del estuche:

Componentes	274-5
A Placas sensibilizadas con anticuerpos de *Babesia*	2 plate
B Control Positivo	2ml
C Control Negativo	2ml
D 100X Anticuerpo Primario	300µl
E 100X Anticuerpo Secundario	300µl
F Buffer diluyente del Anticuerpo	60ml
G Buffer diluyente del suero	9ml
H 10X Solución concentrada de lavado	120ml
I Solución del sustrato	30ml
J Solución Stop	30ml

Pasos del Protocolo del cELISA

1. Se colocaron las muestras de suero problema a temperatura ambiente en una gradilla y se diluyeron 1:2 en un tampón diluyente las muestras, también se diluyeron los controles positivo y negativo proporcionados por el estuche y se incubaron en las placas sensibilizadas **(A)** por 30 min
2. Finalizado el tiempo de incubación se hicieron tres lavados por tres minutos cada uno con la solución de lavado. (H)
3. Se incubo con el anticuerpo primario (D) incluido en el estuche
4. Se hicieron tres lavados como en el paso (2)
5. Se agregó el anticuerpo secundario en 1/100 de tampón diluyente. Esta dilución se hizo de acuerdo a la cantidad de muestras, al igual que se hizo con el para el anticuerpo primario.
6. Se realizaron los tres lavados nuevamente como en el paso (2).
7. Se agregó el sustrato I (50µl) por un tiempo de 15 minutos.

8. Finalmente se añadió (50µl) de la solución stop y se le determinó la D.O en un lector ELISA a 620nm por 10seg.
9. Luego se procedió al análisis de resultados, mediante el cálculo de % de inhibición:

   %=100-{(D.O. de las muestras x 100)÷(Media de la D.O del control negativo)}

Los valores por encima de 40% fueron considerados positivos y el resto negativo.

10. Se calculó la seroprevalencia como el % sueros que presentaron un valor > 40 % de inhición.

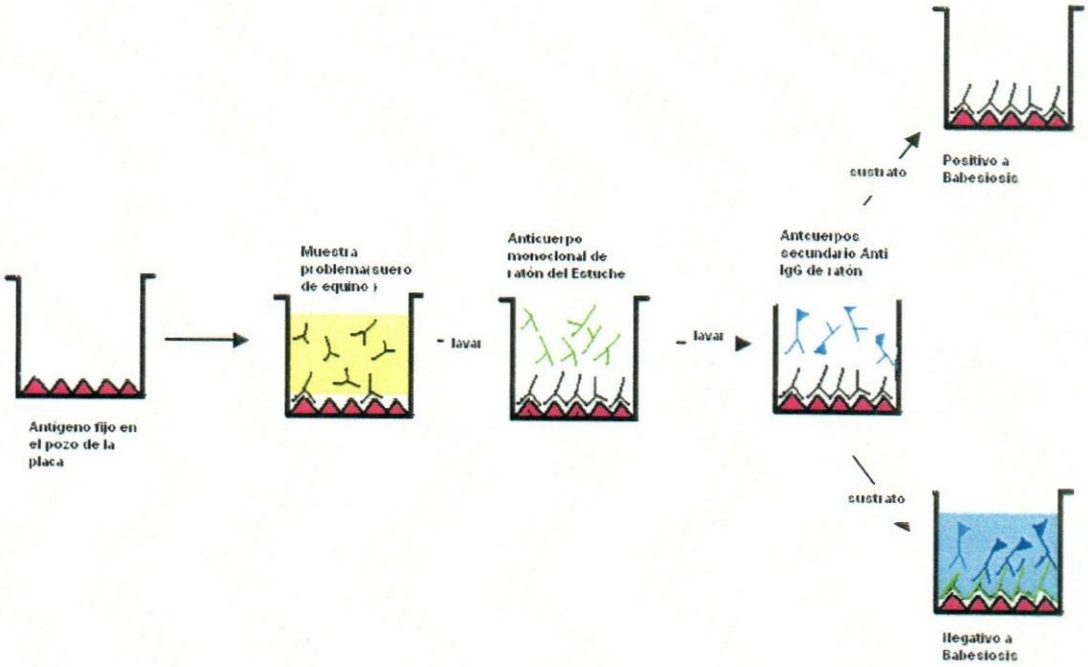

Fig-7.Representación del proceso de fijación de los anticuerpos en el pozo de la placa (Realizado por América Escalona, 2006)

Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

Una réplica de 60 sueros utilizados para el cELISA fueron enviados a la Dra. Ana Teresa Guillén del Instituto de Investigaciones Agrícolas (INIA) para su procesamiento por IFI.

El método utilizado se describe brevemente, a continuación:

Producción del Antígeno

Para obtener el antígeno se utilizó sangre de caballos esplenectomizados con una alta parasitemia (2-5%). Aproximadamente 15 ml de sangre fue recolectada en 235ml del tampón fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés), pH 7,2. Los glóbulos rojos fueron lavados tres veces en frío con PBS (1000g por 10 minutos a 4°C). El sobrenadante y la capa de células blancas son removidas después de cada lavado.

Después del último lavado, el paquete glóbulos rojos se resuspendió en un volumen normal con 4% de albúmina sérica bovina diluida en PBS. 5 µl de la mezcla fueron extendidos en un cubreobjetos cubriéndola por completo, formando una película relativamente gruesa. Estas láminas fueron envueltas en papel suave, y selladas en bolsas plásticas o envueltas en hojas de aluminio, y almacenadas a -20 °C hasta su uso.

Procedimiento de la Prueba

- Cada muestra de suero fue probada contra un antígeno de *B.caballi* y uno de *T.equi* .
- Antes de usar, las muestras del antígeno fueron descongelada de -20°C e incubada a 37°C por 10 minutos.
- Las placas con el antígeno son removidas de su cubierta protectora y fijadas en acetona a -20°C por un minuto.

- Los sueros problemas y los controles tanto positivos como negativos fueron diluidos de 1/80 a 1/1280 en PBS; y revelados con conjugados acoplado a isotiocianato de fluoresceína.
- Las láminas fueron visualizadas al microscopio de fluorescencia.

Análisis Estadísticos

Una vez obtenidos los resultados de los ensayos de diagnóstico se procedió a realizar los análisis estadísticos utilizando como prueba "gold estándar" la IFI, con la finalidad de obtener la sensibilidad y especificidad del método cELISA en ambos parásitos, para ello se utilizaron los siguientes:

Se procedió a clasificar los resultados en una tabla de concordancia, ya que esta se utiliza para comparar diversos métodos clínicos entre sí , cuando son aplicados a un mismo grupo de individuos como se realizó en este estudio(Azzimonti,2005).

	Método 1		
Método 2	(+)	(-)	Total
(+)	a	b	a + b
(-)	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	N

Tabla-2. Tabla de concordancia (Azzimonti, 2005).

Donde el significado de cada frecuencia es el siguiente:

a: Los sujetos que muestran ambos resultados (+) (concordancia en positivos).

b: Los sujetos que muestran (-) con el primer método y (+) con el otro (discordancia)

c: Los sujetos que muestran (+) con el primer método y (-) con el otro (discordancia).

d: Los sujetos que muestran ambos resultados (-) concordancia en negativos)

Nivel de concordancia (tasa de concordancia):$\lambda=(a + d)/ N$ (expresado como porcentaje).

Sensibilidad: Es la proporción de individuos enfermos identificados por la prueba (Molinero, 2002).La sensibilidad es, por lo tanto, la capacidad que posee el ensayo para determinar la enfermedad.(Fernández y Díaz,2003)

$$S = \frac{a}{a + c}$$

Especificidad: Es la proporción de verdaderos negativos (individuos sanos) identificados por la prueba total de sanos.

$$E = \frac{d}{b + d}$$

Los conceptos de sensibilidad y especificidad permiten, por lo tanto, valorar la validez de una prueba diagnóstica, no obstante, en la práctica carecen de utilidad ya que lo único que nos brinda la sensibilidad y la especificidad es una información acerca de la probabilidad de obtener un resultado concreto (positivo o negativo), así que para descartar que el animal diagnosticado por el ensayo como enfermo se encuentre sano o por el contrario que el animal diagnosticado como sano por el ensayo esté realmente enfermo, se procedió a calcular los valores predictivos.

Valor Predictivo positivo (VP+): Es la probabilidad de padecer la enfermedad si se obtiene un resultado positivo en el test. El valor predictivo positivo puede estimarse, por tanto, a partir de la proporción de pacientes con un resultado positivo en la prueba que finalmente resultaron estar enfermos (Fernández y Díaz, 2003)

$$VP+= \frac{a}{a - b}$$

Valor Predictivo negativo (VP-): Es la probabilidad de que un sujeto con un resultado negativo en la prueba esté verdaderamente sano. Se estima dividiendo

el número de verdaderos negativos entre el total de pacientes con un resultado negativo en la prueba (Fernández y Díaz, 2003).

$$VP- = \frac{d}{c - d}$$

Después de realizados los se procedió a comparar ambos métodos, con la finalidad de observar si la técnica IFI, puede ser sustituida por cELISA, esto se realizó mediante el Método Cohen-Kappa.

Método de Cohen Kappa: Este es un método altamente difundido en la estadística clínica (Azzimonti, 2005), ya que permite evaluar la concordancia entre dos pruebas de diagnóstico. La prueba evalúa la similitud entre las coincidencias de las dos pruebas analizadas, mediante el uso de la teoría de probabilidades determina la significancia de dicha concordancia. El resultado de la prueba de Kappa varia des

de uno positivo (+1) a uno negativo (-1), donde:

+ 1 significa que los dos observadores concuerdan perfectamente. Ellos clasifican a todos en la misma forma.

0 Significa que no hay relación entre las clasificaciones de los dos observadores.

- 1 significa que los dos observadores clasifican exactamente lo opuesto. Si un observador dice si, el otro siempre dice no.

Y puede decirse que:

Kappa > 0.80 es considerado excelente

Kappa 0.60 - 0.80 es considerado bueno

Kappa 0.40 - 0.60 es considerado regular

Kappa < 0.40 es considerado pobre

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

Comparación del método cELISA e IFI

En Venezuela se utiliza como prueba de referencia la IFI y considerando la importancia de la técnica cELISA como prueba de diagnóstico, en el presente trabajo se compararon ambas pruebas en cuanto a la especificidad y la sensibilidad con la finalidad de establecer criterios para la aplicación de cELISA como método de sustitución de la IFI.

Para ello se tomaron aleatoriamente 60 muestras de suero de equinos con sus duplicados correspondientes, provenientes de diversas localidades de Venezuela. Una vez analizados por ambas técnicas los datos fueron tabulados en positivos, negativos e infección mixta (Tabla-3) y posteriormente graficado(Fig.-8),para *B.caballi* y *T.equi*.

	cELISA						IFI					
	(+)	%	(-)	%	Inf. Mixta	%	(+)	%	(-)	%	Inf. Mixta	%
T.equi	15	25	32	53	13	21,6	4	6,6	43	71,6	13	21,6
B.caballi	15	25	32	53			21	35	26	43,3		

Tabla 3- Cuadro representa el % de positivos y negativos para *B.caballi* y *T.equi* de los 60 sueros muestreados de diversas localidades de Venezuela.

En la Figura 8 gráfica se observa los resultados obtenidos por ambos métodos de diagnóstico, donde se muestran los porcentajes de equinos positivos y negativos con infección mixta obtenido por cELISA (A). Tanto para *T.equi* (barra azul) como para *B.caballi* (barra roja) el porcentaje de seropositividad fue el mismo, 25% de seropositividad, y la infección mixta obtenida fue de 21,6%.

En la Figura .B se observa los resultados obtenidos por la prueba de IFI. A diferencia de los resultados obtenidos por cELISA, la cantidad de equinos seropositivos para *T.equi* fue mucho menor con un porcentaje 4,6% mientras que para *B.caballi* fue de 35%, a diferencia de aquellos que mostraron ser negativos los cuales obtuvieron un porcentaje de 71,6% y 43,3% respectivamente, la infección mixta obtuvo 21,6% resultado que coincide con el obtenido por el método de cELISA.

Posteriormente con las 60 muestras de suero, se realizó una tabla de concordancia para comparar ambas técnicas. Los sueros se clasificaron de la siguiente manera:

- (+) por ambas técnicas
- (-) por ambas técnicas
- (+) por cELISA y (-) por IFI
- (-) por cELISA y (+) por IFI.}

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4. La Tabla 4.a- muestra los resultados obtenidos para *B.caballi*. Ambas técnicas muestran como seropositivos a 26 equinos, animales negativos 24; 2 son positivos por cELISA y negativos por IFI y 8 negativos por cELISA y considerados positivos por IFI. Se observa que hay una menor proporción de equinos considerados positivos por el estuche de cELISA que por Inmunofluorescencia indirecta, a diferencia de los considerados negativos ya que hay mayor proporción de negativos por cELISA que por IFI.

La Tabla 4.b- muestra los resultados obtenidos para *T.equi*, donde ser observa que ambas técnicas consideran positivos a 15 animales y a 30 negativos respectivamente. Por cELISA 13 son considerados positivos mientras que la IFI los considera negativos y 2 animales son considerados negativos por cELISA y positivos por IFI. A diferencia de los resultados obtenidos anteriormente se muestra que hay una mayor proporción de equinos considerados positivos por el cELISA que por IFI, sin embargo IFI muestra una mayor proporción de equinos considerados negativos.

		IFI		
		positivos	negativos	
cELISA	positivo	26	2	28
	negativo	8	24	32
		34	26	60

Tabla-4.a- Tabla de Concordancia de *B.caballi* para las técnicas IFI y cELISA.

		IFI		
		positivos	negativos	
cELISA	positivo	15	13	28
	negativo	2	30	32
		17	43	60

Tabla 4.b- Tabla de Concordancia de *T.equi* para las técnicas IFI y cELISA

Análisis Estadísticos

Se tomó como prueba Gold Estándar la IFI que es la utilizada en nuestro país, por lo tanto con los valores obtenidos en las Tablas 2.a y 2.b. se calculó la **E, S, VP+** y **VP-,** para *B.caballi* y *T.equi.* Estos valores fueron calculados mediante las ecuaciones mostradas en la metodología.

La Tabla-5 . Muestran los resultados obtenidos para la **E, S, VP+** y **VP-,** respectivamente.

	S	*E*	*VP+*	*VP-*
T.equi	0,882	0,698	0,536	0,938
B.caballi	0,765	0,923	0,929	0,75

Tabla- 5. Resultados Obtenidos para la **S, E, VP+** y **VP-**; correspondientes a *B.caballi* y *T.equi*

El valor de S para *B.caballi* (Tabla-5) fue alto por lo que se considera que los equinos analizados son verdaderamente positivos, asimismo el valor de E fue alto por lo que los sueros analizados para P.E son verdaderos negativos. Para garantizar los resultados, se realizaron los cálculos de la (VP+) la cual fue similar a la sensibilidad, lo que indica una mayor probabilidad de que haya animales verdaderamente enfermos, en los sueros analizados. De igual

forma el (VP-) obtenido fue considerablemente alto lo cual sugiere que los existen animales verdaderamente sanos, por tanto coincide con el valor de E obtenido.

Los resultados obtenidos para *T.equi* (Tabla-5) muestran una alta sensibilidad, por lo que la prueba cELISA tiene una alta capacidad para considerar equinos enfermos, más no tiene una alta capacidad para determinar cantidad de caballos verdaderamente sanos, debido al valor de E obtenido, esto se puede observar en la cantidad de sueros negativos obtenidos por IFI y considerando que es la prueba de referencia fue de 43/60 a diferencia de los obtenidos por cELISA que fue 32/60(Tabla-4b). Observando la discrepancia obtenida se procedió a calcular la proporción de verdaderos positivos y verdaderos negativos a la P.E mediante el Valor Predictivo (VP+).

El Valor Predictivo Positivo (VP+) obtenido difiere al valor obtenido para la sensibilidad ya que es mucho menor, lo que nos indica que existe la probabilidad de que hayan falsos positivos para T.*equi* por el método cELISA (Tabla-5).

Por el contrario el valor predictivo negativo (VP-) presenta una mayor proporción, lo cual indica que existe mayor cantidad de equinos sanos por lo que la especificidad obtenida no refleja esta condición.

Método Cohen-Kappa

Aunque los resultados estadísticos por las pruebas anteriores muestran ciertas diferencias entre ambos cELISA en cuanto a la especificidad y sensibilidad, el método puede considerarse confiable para determinar la seroprevalencia de P.E, no obstante, la técnica IFI sigue siendo la técnica de referencia, se compararon ambas técnicas por medio del método Cohen-Kappa en *T.equi* y en *B.caballi*, con ello se quiso determinar si el cELISA puede sustituir a la IFI, los resultados obtenidos se analizaron por medio de la escala ya mencionada en materiales y métodos.

Los resultados obtenidos por este método para *T.equi* fue una concordancia de, 0,485±0,133, lo cual coloca a la técnica según la escala de Cohen-Kappa como regular, por tanto las técnicas concuerdan, es decir, ambas detectan anticuerpos contra *T.equi*, la obtenida por *B.caballi* fue de 0,670±0,128; por lo que la técnica es considerada buena según la misma escala y por tanto este método detecta anticuerpos en contra de la infección.

Seroprevalencia de P.E por el método de cELISA

Una vez realizados estos resultados y por la facilidades que ofrece la técnica cELISA, se prefirió utilizar este método en este trabajo de investigación, es por ello que se determinó la seroprevalencia de P.E de alrededor de 600 equinos, en los estados Apure, Carabobo, Dto. Federal, Miranda y Monagas (Tabla-6) para cada uno de los parásitos, y también se clasifico en los diferentes sistemas de cría (Tabla-6).

Los valores obtenidos fueron evaluados según % de inhibición que estipula la casa comercial, los valores iguales o superiores al 40% de inhibición fueron considerados positivos y los menores de este porcentaje negativos.

La seroprevalencia de los sueros por equinos muestreados por Estado fue la siguiente: para los caballos del Dto. Federal, *B.caballi* 30%(85/283), *T.equi* 9,95% (31/283)(Fig-9).En el Edo. Miranda fue 16,6%(7/42) y 11,9%(5/42) respectivamente (Fig-10). En el Edo Carabobo 14%(14/120) y 11,6%(8/120) (Fig-11). En el Edo. Apure 20,7%(6/29); 31,03%(9/29)(Fig-12) y en El Edo. Guarico 26,3%(31/118) y 12,71%(15/118)(Fig-13).

Estado	Tipo de Manejo	*(+)B.caballi*	%	*(+)B.equi*	%	Inf Cruzada	%	Total
Dto. Federal	A	85	30	31	19,95	9	3,18	283
Carabobo	A	14	11,6	8	6,6	4	3,33	120
Miranda	A	7	16,6	5	11,9	8	19	42
Guarico	B	31	26,3	15	12,71	60	50,8	118
Apure	C	6	20,7	9	31,03	5	17,2	29

Tabla-6. Distribución de los Sueros Equinos según Estado y Sistema de Crianza sometidos a la Prueba de cELISA. Los equinos muestreados fueron clasificados de acuerdo al tipo actividad y cuidados recibidos en A, B y C según se describe en materiales y métodos.

También se registraron infecciones cruzadas en los mismos Estados 3,18%(9/283) en Dto Federal, 3,33%(4/120) Carabobo ,19%(8/42) Miranda, 17,2%(5/29) Apure y 50,8% (60/118) Guarico, respectivamente (Fig-14).

La Fig-15 representa el mayor porcentaje de sueros reactivos a ambos parásitos, este fue obtenido en las muestras del Estado Guarico, mientras que la mayor seroprevalencia para *B.caballi* fue obtenida en las muestras del Dto. Federal, seguida por el Edo.Guárico. Mientras que la seroprevalencia más alta para *T.equi* fue la obtenida por el Edo Apure, seguida del Guarico.

Una vez obtenido el porcentaje de seropositividad por Estados, los resultados obtenidos por cELISA fueron clasificados de acuerdo al sistema de manejo de los animales en tipo A, B y C (Tabla.6) y (Tabla 7), según los criterios descritos en Materiales y Métodos.

En la Fig-16 se representa la seropositividad de *B.caballi* (Azul) y *T.equi* (Rojo) fue la siguiente: en el Sistema de Manejo A 23,82%(106/445) y 9,87%(44/445); para el B 26,3%(31/118) y 12,71%(15/118); y para C 20,7%(6/29); 31,03%(9//29)(Fig-9) para *B.caballi* y *T.equi*, respectivamente.

Por sistema de manejo también se reportó infecciones cruzadas(Tabla-7) (amarillo), siguiendo el orden anteriormente señalado; el porcentaje fue el siguiente: en sistema de manejo A 4,71%(21/445), en B 50,8%(60/118) y en C 17,2%(5/29) (Fig-16).

Tipo de Manejo	Total Poblacion	*(+)B.caballi*	%	*(+)T.equi*	%	Inf.Cruzada	%
A	445	106	23,82	44	9,8	21	4,71
B	118	31	26,3	15	12,71	60	50,8
C	29	6	20,7	9	31,03	5	17,2

Tabla-7. Tabla Representativa de los tres sistemas de manejo. Los equinos muestreados fueron clasificados de acuerdo al tipo de actividad y cuidados recibidos en A, B, C según se describe en Materiales y Métodos

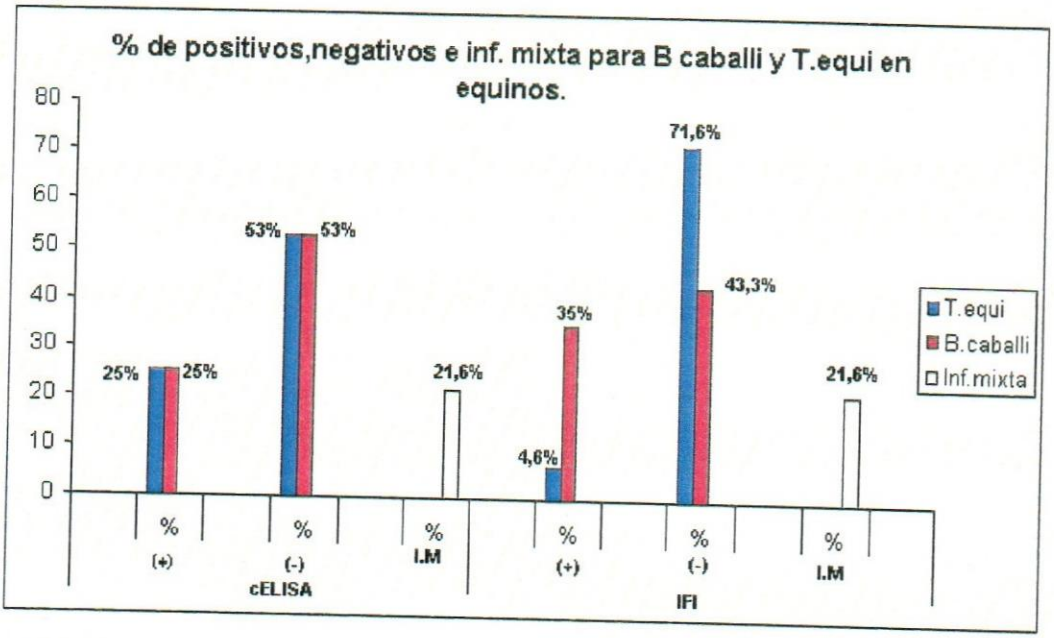

Fig.8-% de individuos positivos utilizando la técnica de cELISA(A) e IFI(B) para la detección de *T.equi* (barras azules) y B.caballi (barras rojas). Las barras amarillas muestran el % de animales con infecciones mixtas.

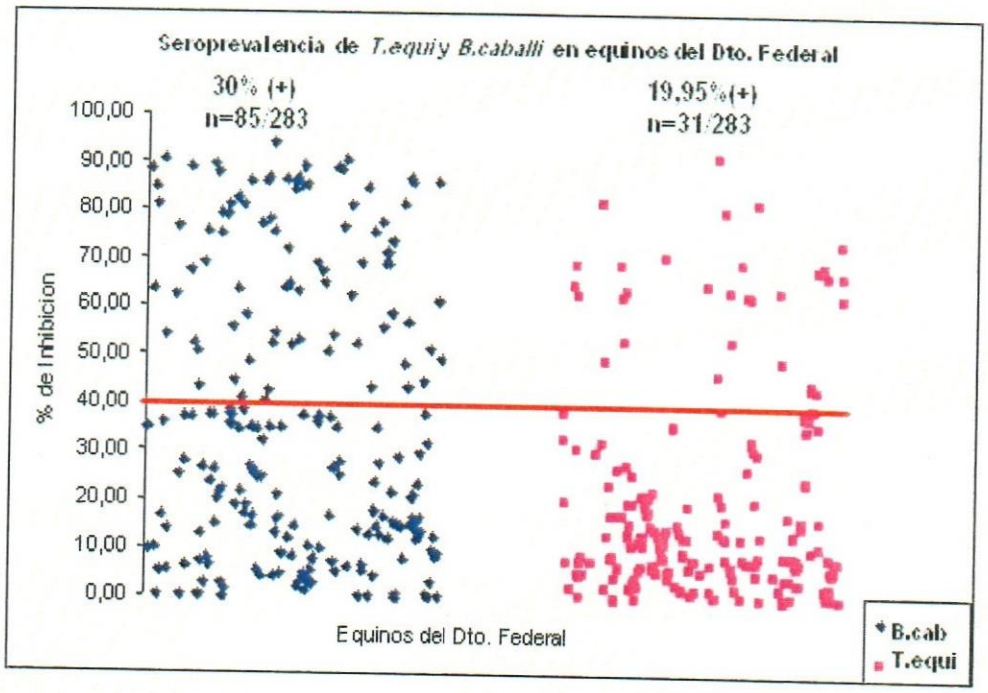

Fig.9- Seroprevalencia de *T.equi* y *B.caballi* en equinos del Dto. Federal. Los puntos en la gráfica representan los sueros de equinos sometidos a la técnica de cELISA para *T.equi* (puntos rosa) y para B.caballi (azul). La Línea roja representa el punto de corte. Por encima del punto de corte los sueros son considerados positivos y por debajo de la línea se consideran negativos.

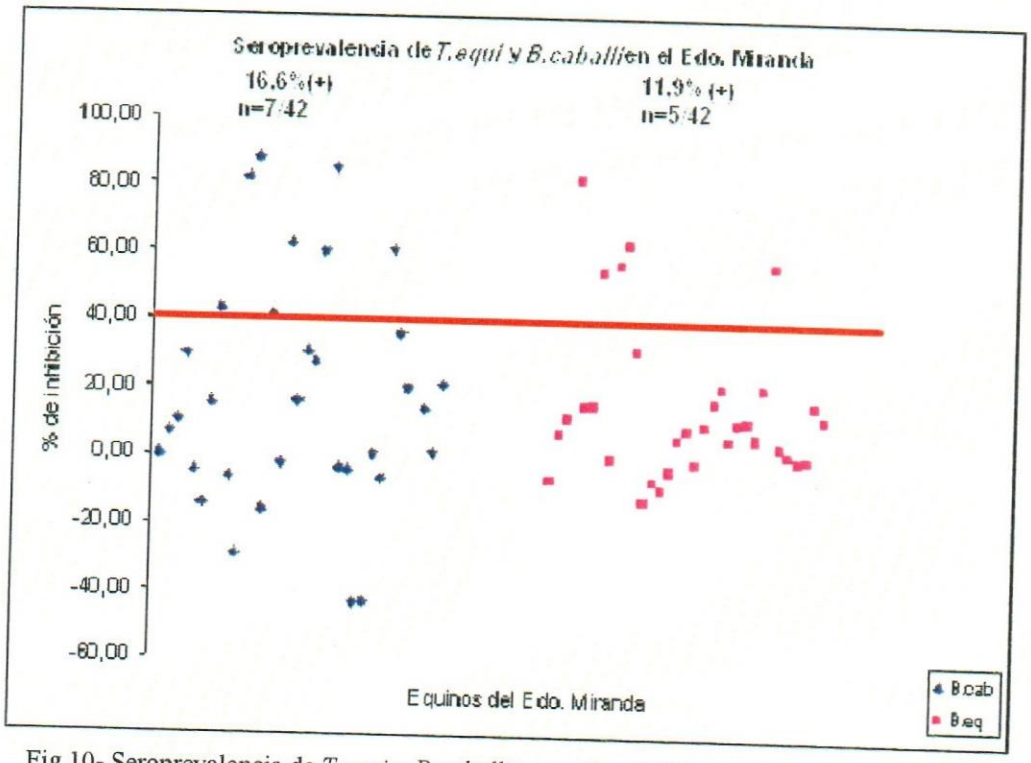

Fig.10- Seroprevalencia de *T.equi* y *B.caballi* en equinos del Edo. Miranda. Los puntos en la gráfica representan los sueros de equinos sometidos a la técnica de cELISA para *T.equi* (puntos rosa) y para B.caballi (azul). La Línea roja representa el punto de corte. Por encima del punto de corte los sueros son considerados positivos y por debajo de la línea se consideran negativos.

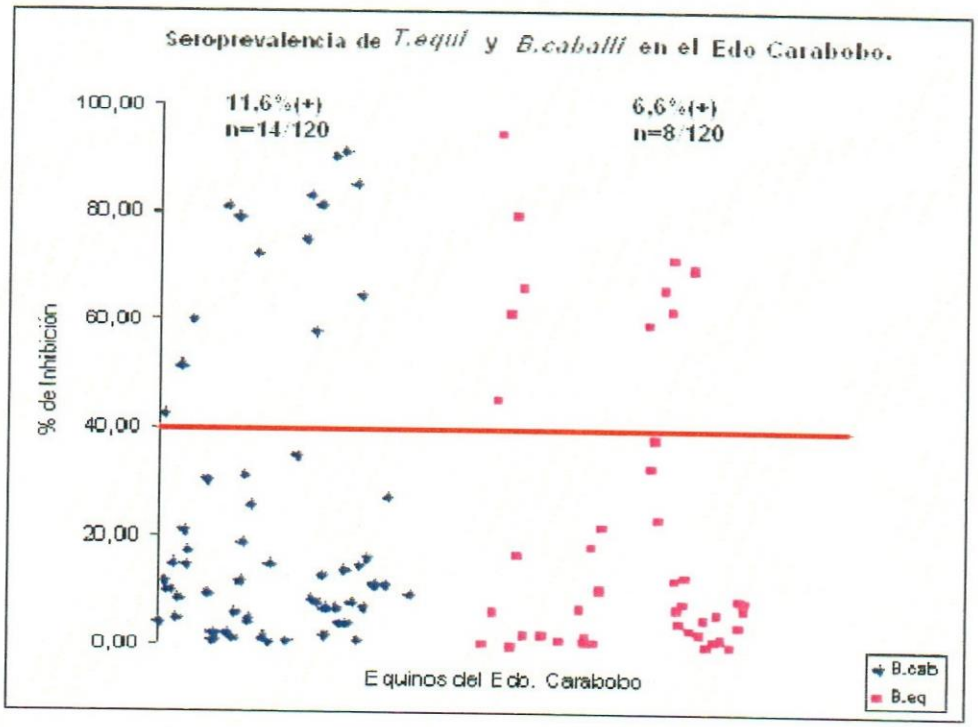

Fig.11- Seroprevalencia de *T.equi* y *B.caballi* en equinos del Edo.Carabobo. Los puntos en la gráfica representan los sueros de equinos sometidos a la técnica de cELISA para *T.equi* (puntos rosa) y para B.caballi (azul). La Línea roja representa el punto de corte. Por encima del punto de corte los sueros son considerados positivos y por debajo de la línea se consideran negativos.

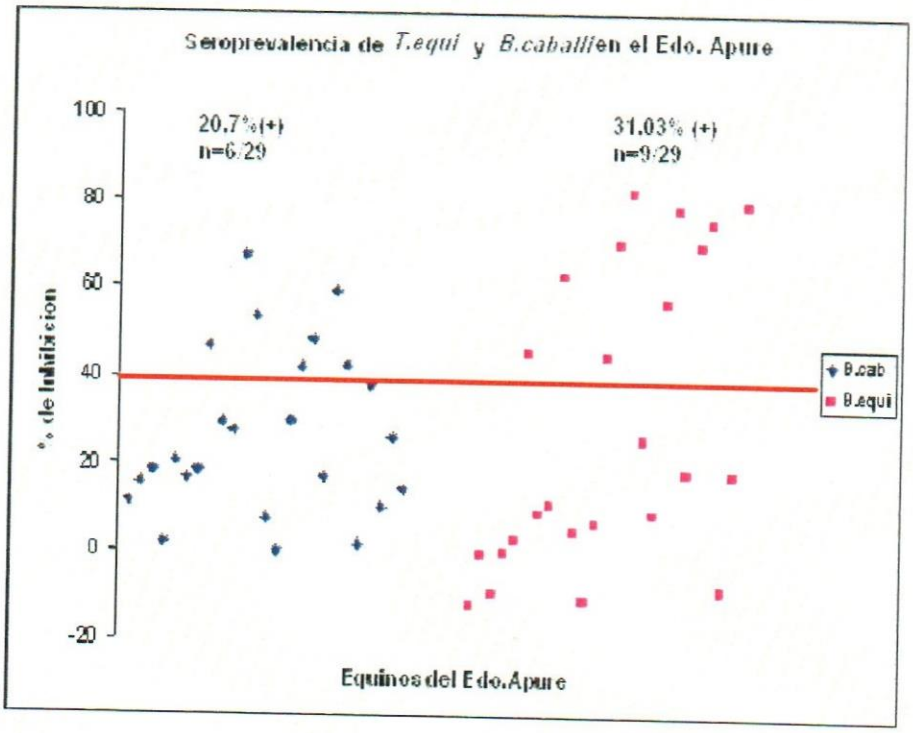

Fig.12- Seroprevalencia de *T.equi* y *B.caballi* en equinos del Edo Apure. Los puntos en la gráfica representan los sueros de equinos sometidos a la técnica de cELISA para *T.equi* (puntos rosa) y para B.caballi (azul). La Línea roja representa el punto de corte. Por encima del punto de corte los sueros son considerados positivos y por debajo de la línea se consideran negativos.

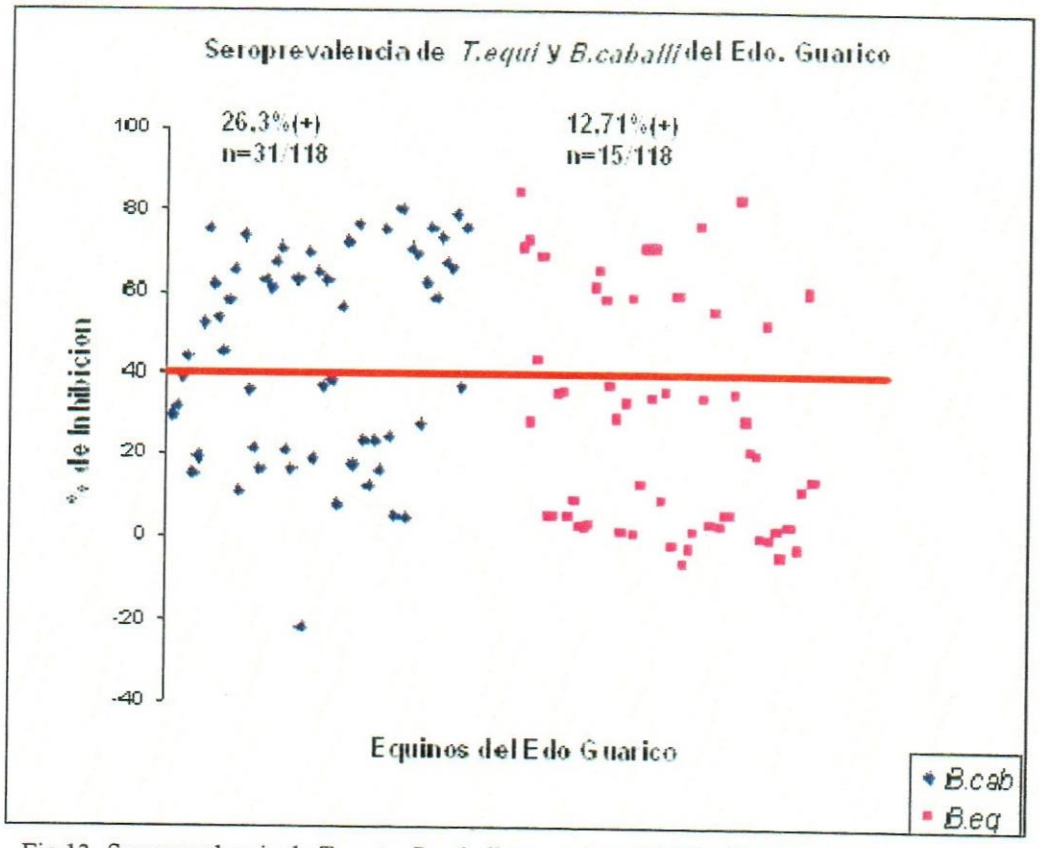

Fig.13- Seroprevalencia de *T.equi* y *B.caballi* en equinos del Edo Guarico. Los puntos en la gráfica representan los sueros de equinos sometidos a la técnica de cELISA para *T.equi* (puntos rosa) y para B.caballi (azul). La Línea roja representa el punto de corte. Por encima del punto de corte los sueros son considerados positivos y por debajo de la línea se consideran negativos.

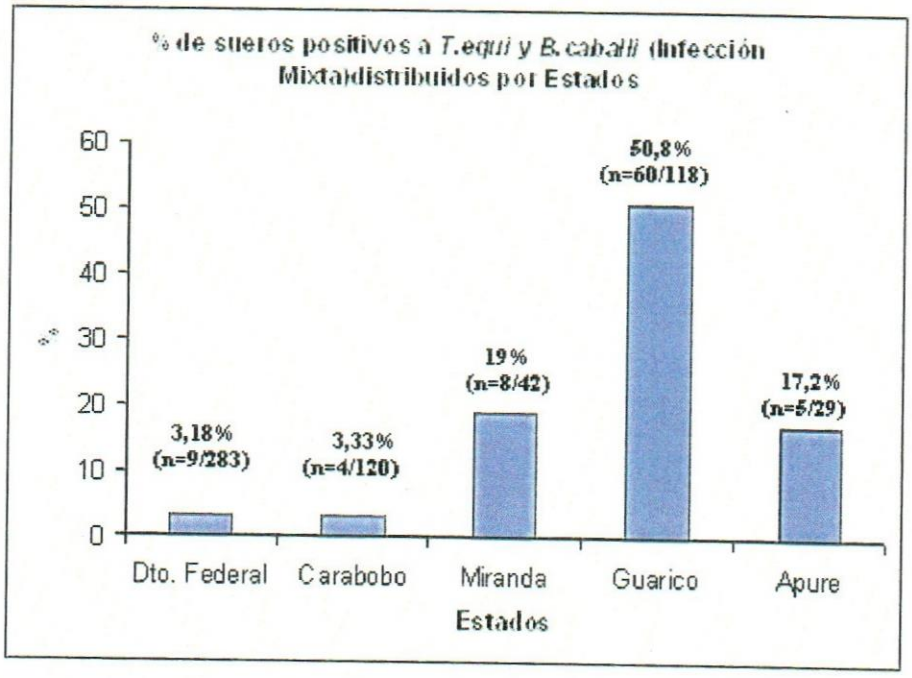

Fig-14. % de Sueros positivos a *T.equi* y *B.caballi* (infección mixta) Distribuido por Estado. Las barras de color azul representan el porcentaje de sueros positivos para ambas infecciones.

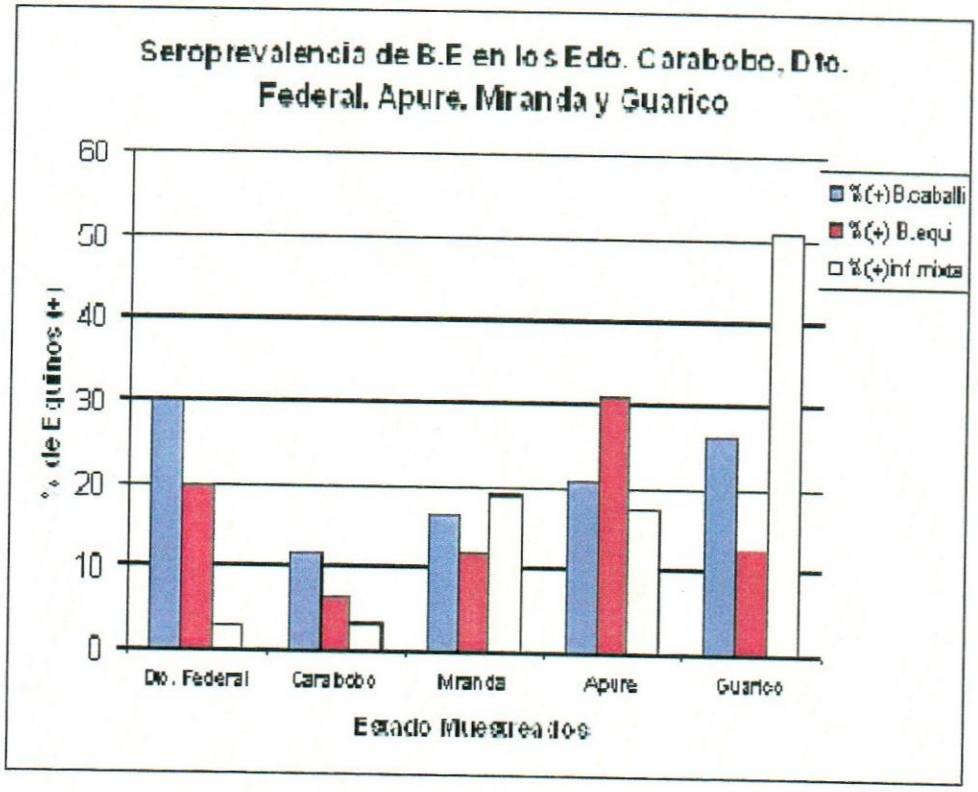

Fig.15- Seroprevalencia de P.E en los Estados muestreados y analizados en este estudio. Las Barras de color azul representa *B.caballi*, la barra de color vinotinto representa *T.equi* y la Barra de color amarillo la infección mixta en cada uno de los Estados

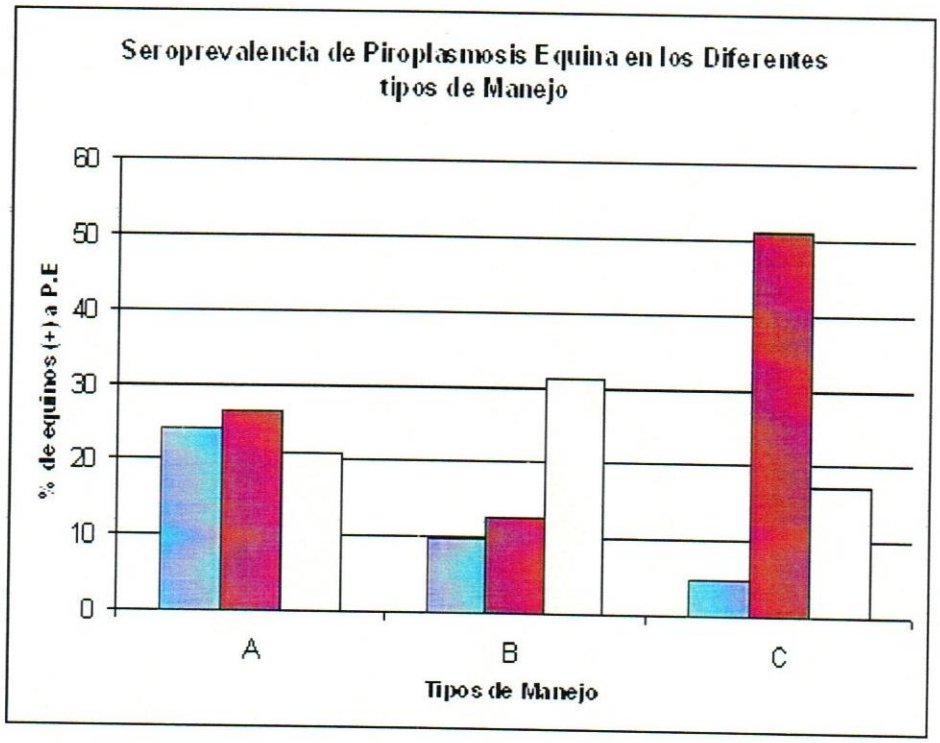

Fig. 16- Seroprevalencia de Piroplasmosis Equina en los diferentes tipos de manejo. Las Barras de color azul representa *B.caballi*, la barra de color vinotinto representa *T.equi* y la Barra de color amarillo la infección mixta., en los tres tipos de Manejo

DISCUSIÓN

Comparación de cELISA e IFI

Una vez analizados por ambas técnicas, tabulados en positivos y negativos y graficados, se observó el porcentaje de equinos considerados como positivos para *T.equi* y *B.caballi* por ambos métodos, lo resultados mostraron la cual nos indica una presencia de la infección por ambos parásitos y por ambas técnicas.

En Venezuela, estudios realizados por Oliveira (2001) y por Simoes (2001), en los que utilizaron pruebas de serodiagnóstico como las de frotis sanguíneo e IFI. La Seroprevalencia de *Babesia* y *Theileria* en caballos es un buen indicador de las distribución de la garrapata (Boldbaatar y col, 2005).

En regiones tropicales de América los estudios efectuados evidencian una situación de alta endenmicidad para Piroplasmosis Equina (P.E) como en Colombia, en el Departamento de Cordova, con valores de seroprevalencia de 95% para *T.equi* y 82% para *B.caballi* y en Brasil de 84% para *Babesia spp.* (Oliveira, 2001). Asimismo lo muestran estudios realizados en Trinidad utilizando la técnica IFI como método de diagnóstico, el porcentaje de seropositividad obtenido en el total de las muestras fue de 82,8%; 33,3% para *T.equi*, 68,8% para B.caballi y un 19,4 % con infección mixta.(Asgarali y col;2006).

En las muestras analizadas para *T.equi* y *B.caballi* por el método cELISA se muestran un porcentaje de 25% de seropositividad, sin embargo por el método IFI se muestra una discrepancia ya que los porcentajes de seropositividad fue de 4,6% y 35% respectivamente lo que nos indica que IFI tiene mayor probabilidad de diagnosticar más animales enfermos, según la tabla de concordancia calculada.

El cálculo de especificad y sensibilidad por cELISA para ambos parásitos nos indica que aunque existan diferencias entre ambos métodos se puede considerar a cELISA como una alternativa para el diagnóstico de P.E.

Para garantizar esta alternativa se realizó el análisis por medio del método de Cohen-Kappa.

Método Cohen-Kappa

Los resultados obtenidos por este método para *T.equi* fue una concordancia de, 0,485±0,133, lo cual coloca a la técnica según la escala de Cohen-Kappa como regular, por tanto las técnicas concuerdan, es decir, ambas detectan anticuerpos contra *T..equi* por ambos métodos, la obtenida por *B.caballi* fue de 0,670±0,128; por lo que la técnica es considerada buena según la misma escala y por tanto este método detecta anticuerpos en contra de la infección.

La diferencia entre ambos resultados *T.equi* y *B.caballi* en los análisis estadísticos y por la escala de Cohen-Kappa, puede deberse a que las proteínas recombinante utilizadas RAP-1 para *B.caballi* y EMA-1 para *B.equi* provienen de zonas diferentes de los parásitos. La proteína recombinante EMA-1 proviene de la superficie del merozoito a diferencia de RAP-1 que es una proteína asociada a roptrias, sin mencionar que la especificidad de la prueba depende del anticuerpo monoclonal utilizado, sin embargo la literatura reseñada indica que las proteínas permanecen constantes durante los diferentes estadios de crecimiento de los parásitos (Yokoyama y col, 2006).

Estudios realizados con cELISA y Fijación de Complemento (CF) para ambos parásitos ha mostrado una correlación de 94% en la detección de anticuerpos para *T.equi.* Asimismo el cELISA para *B.caballi* ha mostrado una correlación de 73% de concordancia con la FC. (www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00084.htm).

Otros estudios realizados por Huang y col (2006) comparando el ELISA con proteínas recombinates (GTS- Bc48 para *B.caballi* y GST-EMA-2t para *B.equi)* con el método IFI, utilizando 380 sueros, muestran una concordancia de 92,4%(351/380) y 98,2%(373/380) entre ELISA e IFI para *B.caballi* y *T.equi*

respectivamente los resultados obtenidos sugieren al ELISA como método alternativo para el serodiagnóstico de P.E para *B.equi*, aunque sugieren realizar algunas mejoras para *B.caballi*

Los resultados obtenidos en este estudio indican que el cELISA para ambos parásitos poseen una alta capacidad para detectar anticuerpos de *T.equi* y *B.caballi*, debido a ello ha sido aprobada por la OIE, sin embargo los resultados obtenidos en este estudio en relación con IFI muestran discrepancia en la proporción de seropositividad y en la concordancia de ambas pruebas, lo cual indica que la IFI es la técnica más favorable para continuar determinando la seroprevalencia de P.E. si se utiliza como Gold Estándar

Sin embargo, aunque la IFI sea la más favorable, existen características desde el punto de vista de metodológico que ofrece el cELISA y que sugieren su uso en lugar de la IFI.

La técnica cELISA utiliza como antígenos proteínas recombinantes específicas para cada parásito RAP-1 para *B.caballi* y EMA-1 para *T.equi*, al igual que los anticuerpos monoclonales. Asimismo los resultados obtenidos, positivos y negativos pueden ser cuantificados por medio del cálculo del % de inhibición y estos se pueden observar por medio de una gráfica en donde se exprese el punto de corte, además la prueba se puede realizar en un tiempo aproximado de 3 horas, y por último no se necesita de un personal altamente capacitado para interpretar los resultados obtenidos. Además que ambos protocolos ya están estandarizados por lo que su uso es mucho más fácil.

A diferencia de la IFI, el antígeno utilizado es obtenido de un equino previamente esplenectomizado con una parasitemia de 2 a 5%, la preparación de las láminas con el antígeno tiene un tiempo de 1 año de preparación, ya que el protocolo con el antígeno no se encuentra estandarizado y se debe tener controles de equinos positivos y negativos de de animales realmente enfermos y verdaderamente sanos, además de poseer un personal altamente capacitado para la interpretación ya que diferenciar un débil positivo de un negativo requiere de

una considerable experiencia; ya que el antígeno corresponde a los parásitos obtenidos en picos de parasitemia a partir de animales esplenectomizados.

Otro punto importante a destacar fue los resultados obtenidos en cuanto a la seropositividad obtenida entre *T.equi* y *B.caballi* por el método IFI. Esto puede deberse a las diferencias que presentan ambos parásitos en el ciclo de vida, como se mencionó anteriormente en el marco teórico. *B.caballi* cumple con el ciclo de *Babesia spp*, más no así *T.equi* el cual infecta primero a los linfocitos antes de invadir a los eritrocitos y estas son comunes con *Theileria spp.* (Knowles, 1996) además de presentar diferencias a nivel sintomatológico, por lo general las infecciones causadas por *B.caballi* son controladas por el equino (ya que más del 1% de los glóbulos rojos son infectados, la infección puede ser inaparente, pero puede persistir por 1 a 4 años (Página web: //.mexico.spah.com/mexico) es decir, que presentan una mejor tendencia a la curación espontánea (Ribotta, 2005). Más aún se ha reportado que los equinos infectados se convierten en portadores asintomáticos (Ribotta, 2005) y de por vida además de volver a manifestar la enfermedad debido a inmuno supresión por enfermedad o estrés (Página web: //.mexico.spah.com/mexico/). Sin embargo, los animales tratados con medicamentos para la Piroplasmosis y que les han sido eliminados el parásito pueden tener títulos de seropositivos que pueden estar presentes por más de ocho meses. Por lo que no se descarta que los animales analizados en esta investigación estén bajo esta condición, ya que en el momento de realizar el estudio no se tomó en cuenta este parámetro lo cual justifica los valores obtenidos para *B.caballi*.

Seroprevalencia por el método cELISA

La seroprevalencia obtenida para Piroplasmosis en los sueros obtenido en distintas zonas geográficas, dependió principalmente del cuidado veterinario del animal, la presencia del vector en la zona, ya que se considera el trópico

como una zona endémica del parásito, por tanto Venezuela entra dentro de este estatus, asi lo demuestran los estudios realizados por Oliveira y Simoes(2001).

La sintomatología clínica que presentaron los equinos en el momento de la recolección de los sueros, no indica la presencia de la enfermedad, ya que lo diversos aspectos de la sintomatología y el estado de stress en el cual se encuentre pueden desencadenar infecciones o enfermedades que se encuentren latentes incluyendo la Babesiosis.

Para el momento en que se desarrollaron los análisis no se tomaron en cuenta si los equinos se encontraban en tratamiento para la Piroplasmosis, la edad de los animales, el sexo o si los animales habían actuado como reservorio del parásito o si se encontraban en la fase crónica de la enfermedad.

La seropositividad encontrada en la población de los equinos por Estado indica que el vector y por ende la infección se encuentra muy distribuida en el territorio nacional, en especial *B.caballi*, más aun en el Dto. Federal se puede considerar predominante a diferencia de los demás Estados, lo cual manifiesta que este parásito infecta con mayor facilidad a los animales lo cual puede deberse a su ciclo de vida, es importante destacar que los equinos del Dto. Federal se encuentran dentro de tipo de manejo A por lo tanto, estos animales se encuentran bajo un régimen de alimentación y cuidados permanentes, siendo revisados continuamente por un veterinario, debido a los continuos viajes que realizan por las competiciones en otros países. Sin embargo, aunque los cuidados y el relativo control del vector en estos establecimientos son de alto nivel, no impide que el animal sea contagiado con la enfermedad, lo que indica que son expuestos continuamente a la P.E, por lo tanto estos establecimientos podrían actuar como promotores y reservorios de la infección, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Simoes (2001) en sus estudios en el Hipódromo de Santa Rita en el Estado Zulia.

Asimismo la seroprevalencia obtenida en los diferentes sistemas de manejo manifiesta que los animales del sistema tipo B muestra un alto porcentaje de infección con *B.caballi* seguidos por el tipo de manejo A, sin

embargo cabe mencionar que los equinos que se encuentran en el tipo de manejo tipo C presentan un alto porcentaje de infección por *T.equi* a diferencia de los otros tipos de manejo, hay que considerar que en este tipo de manejo los equinos no son cuidados de ninguna forma, a diferencia del tipo A y el tipo B, no obstante las infecciones por *B.caballi* son mas persistentes en los tres tipos de manejo que las de *T.equi*.

Ahora bien la infección mixta entre los tres sistemas de manejo la mayor proporción es la de el sistema de manejo tipo B, aunque en los otros sistema hay una proporción no muy alta, pero como se ha mencionado antes estos animales pueden actuar como reservorios de ambos parásitos y emisores de la infección dentro del sistema donde se encuentren.

CONCLUSIONES

Una vez analizados los resultados se llegaron a las siguientes conclusiones:

Al determinar la seroprevalencia a B.E por ambos métodos se encontró una alta seropositividad, por ende la presencia del vector en Venezuela, esto es corroborado por los estudios realizados por Oliveira (2001) y por Simoes (2001)

Ambas técnicas la IFI y el cELISA fueron comparadas estadísticamente, y se muestra que el método cELISA puede ser utilizada como método de diagnóstico en sustitución del método IFI, lo cual se comprobó por medio del calculo de E, S, VP+ y VP- para ambos parásitos. La especificidad y la sensibilidad obtenida para P.E por medio del cELISA y utilizando como referencia la IFI fueron las siguientes:

Para *T.equi*, se muestra que tiene una alta capacidad para considerar anticuerpos contra la infección, mas no tiene una alta capacidad de considerar animales sanos, por lo que hay mayor probabilidad de haber obtenido falsos seropositivos en las muestras estudiadas lo cual fue corroborado por VP+, VP-

Para *B.caballi* se muestra una alta capacidad de considerar animales enfermos y verdaderamente sanos, lo cual fue corroborado por VP+, VP-

Las diferencias obtenidas puede deberse a las diferencias en su ciclo de vida, además de que las proteínas recombinantes no provienen de la misma zona del parásito.

Al comparar ambas técnicas por medio del método de Cohen- Kappa, se observó que la técnica mas favorable para continuar con el diagnostico de P.E es la IFI, sin embargo por el tiempo de estandarización, el personal altamente capacitado para la interpretación y el no poder representar cuantitativamente los resultados hacen del cELISA la técnica mas favorable para el diagnóstico de B.E.

La alta seroprevalencia obtenida en los distintos estados analizados muestra la amplia distribución de los parásitos *B.caballi* y *T.equi*, en el territorio

nacional, además de estar presente en los diversos tipos de manejo analizados en este estudio.

Pese a los cuidados veterinarios que se imparten en los distintos tipos de manejo, estos no han logrado disminuir la infección a P.E, lo cual indica que la garrapata en un vector muy eficaz en la transmisión de los parásitos, asimismo los controles establecidos para este en los distintos sitios de permanencia no han logrado minorizar su presencia, convirtiéndose en reservorios adecuados para la proliferación de la infección.

En base a lo anteriormente expuesto se sugiere realizar estudios aplicando técnicas tales como PCR para determinar la presencia del antigeno en el animal problema, asimismo realizar estudios para observar la disminución o aumento de la parasitemia a través del tiempo, así como el efecto de los medicamentos que se administran para controlar la infección

También se sugiere realizar estudios en base al control del vector en los diferentes tipos de crianza.

Referencias Bibliográficas

1. Asgarali, Z; Coomb K, D; Mohanmed, F; Campbell D.M y Caesar, E. (2006). A serological study of *Babesia Caballi* and *Theileria equi* in Thoroughbreds in Trinidad. Veterinary Parasitology. Vol.144(1-2):167-71.[Disponible online en: www.sciencedirect.com]

2. Azzimonti R, J(2005). Acta Bioquímica Latinoamericana. ISSN0325-2957.La Concordancia entre dos test Clínicos para casos Binarios: Problemas y solución

3. Barnes, R.(1996). Zoología De Los Invertebrados. Mexico, D.F. Editorial Mc Graw-Hill Inter-americana, Cap,2. pp 10-51.

4. Bose, R y Peymann,B (1994). Diagnosis of Babesia caballi Infections in Horses By Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Western Blot. International journal Of Parasitology. Vol 24. Nro 3. pp341-346

5. Botteon de Tarso.L y P, Massard, C.L,C.M CASSIA De, R, Loss, Z.G y Linhares, G.F.C (2002). Seroprevalencia de Babesia equi en tres diferentes sistemas de crianza de equinos Río de Janeiro-Brazil. Parasitologia Latinoamericana. Vol. 57.Nro 3-4. pp141-145.

6. Boldbaatar, D; Xuan, X; Battsetseg, B; Igarashi, I; Battur, B; Bstzukh, Zayat; Bayambaa, B y Fujisaki, K.(2005). Epidemiological study of equine piroplasmosis in Mongolia. Veterinary.127, 29-32. [Disponible online en : http://www.sciencedirect.com.]

7. Edward Z, Russell, Moore, Holly Le Roy, K y Latimer (2005). Equine Babesiosis - A Review. Class of 2005 (Edwards) and Department of Pathology (Moore, LeRoy, Latimer) College of Veterinary Medicine,

University of Georgia, Athens, GA 30602-7388. Disponible en: http://www.vet.uga.edu/vpp/clerk/edwards/. [Consulta: 2005, Mayo 11]

8. Fernandez S.P y Diaz S.P (2003). Pruebas diagnósticas.[Disponible en: www.fisterra.com/material/investiga/pruebas_diagnostica/pruebas_diagnósticas.htm]
9. Guimaraes M.A; Lima D.J; y Ribeiro B F.M(2003).Pesq. Vet. Bras. 23(3):101-104
10. Habela A.M; Corchero. E; Peña. J y Sevilla R.G.(2002).Epidemiología de la Theileriosis y Babesiosis Bovinas. Publicado en Bovis.
11. Homer. J.M; Aguilar D.J; Telford III S.R; Krause P.J y Persing H. David (2000). Babesiosis. Clinical Microbiology Reviews. Vol.13. Nro. 3, p. 451-469.
12. Knowles,D.P.Jr, Kappermayer,L.S y Perryman.L (1994). Specific Immune Response Are Required To Control Parasitemia in *Babesia equi* Infection. Infection and Immunity. Vol 62 Nro 5. pp 1909-1913
13. Knowles, D.P.Jr (1996). Control of *Babesia equi* parasitemia. Parasitology today. Vol12 Nro 5,[131] pp195-198.
14. Madruga, C.R; Ribeiro de Araujo, F y Oliveira Soario,(2001) C. Imunodiagnóstico em medicina Veterinaria. EMBRAPA. Ministerio de Agricultura Pecuaria e Abastecimiento,pag 229-230,245-252.
15. Mehlhorn. H y Schein. E (1998). Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi*. Pasitol. Res 84: 467-475.

16. Molinero M.L. Valorización de pruebas diagnósticas. Asociación de la Sociedad Española de Hipertensión Liga Española para la lucha contra la hipertensión Arterial [Consulta: www.seh-lelha.org/pdiagnos.htm]

17. Nicolaiewsky,T.B, Richter. M.F, Lunge V.R, Cunha,C.W, Delagostin.O, Ikuta.N, Fonseca, A.S, da Silva,S.S, Ozaki,L.S (2001). Detection of *Babesia equi* (Laveran,1901) by nested polymerase chain reaction. Veterrinary Parasitology 101(2001) 9-21.

18. Oliveira, M (2001). Seroprevalencia de Babesiosis Equina en Caballos Pura Sangre de Carrera de los Estados Aragua y Carabobo. Rev.Fac.Cs.Vets. Parasitología. UCV.42(1-2):3-13.

19. Organización Mundial de Sanidad Animal..Código Sanitario para Animales terrestres. Capitulo 2.5.6. Equine Piroplasmosis.(s.f).[Pagina Web en línea]. Disponible: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00084.htm.

20. Página web: http: // www.vet.uga.edu/.../ticks/exo_dis/e_babe01a.htm [Consulta: 2005, mayo 11]

21. Página web: http://goldenvetlab.co.za/photo-gallery.htm [Consulta: 2005, mayo 11]

22. Parásitos Domésticos de los Animales deVenezuela. Vol 1. Carlos Diaz-Ugría. Universidad del Zulia .Consejo Del Desarrollo Científico y Humanístico. Maracaibo- Venezuela (1970)

23. Perrone, T y Reyna, A (2005). III Curso Nuevas Estrategias para el Estudio y Diagnóstico de las Hemoparasitosis de Interés Veterinario. Instituto Venezolano de Investigaciones Cientifica (IVIC), Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCT), Universidad Nacional Experimental

Simón Rodríguez (UNESR), FONACIT. 28 de noviembre-02 de diciembre de 2005. Practica N° 3, pp 27-29.

24. Ribotta, F. (2003).Piroplasmosis Equina..Made in Peru. The Peruvian Paso Horse magazine.[Revista en línea].Edición 19. Disponible en: http://www.madeinperumagazine.net/PiroplasmosisEquina1.html. [Consulta:2005, Diciembre 10].
25. Simoes C.D (2001) Seroprevalencia de Babesiosis equina en el Hipódromo de Santa Rita del Estado Zulia. Tesis de Grado. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias Veterinarias.
26. Sharing-Plough Veterinaria. Página web: http://mexico.spah.com/mexico/ [Consulta: Diciembre 10]

27. Uilenberg. G (2006). Babesia-A historical Reviuw. Veterinary Parasitology. Vol.144. 138:3-10.[Disponible en: www.sciencedirect.com]

28. Xuan,X , Chahab, Bayin, Huang X, Yokoyama, N, Makala H.L, Igarashi, I, Fuijisaki, K, Sakai, T y Mikami, T(2002). Diagnosis of equine piroplamosis in Xinjiang province of China by the enzyme-linkend immnunosorbent assays usin recombinant antigens. Veterinary Parasitology. Vol 108.pp179-182.

29. Xuang, X; Xuenan. X; Yokoyama, N; Katayama Y; Anzai, T e Igarashi, I.(2006). Evaluation on entume-linked inmnuosorbent assays with recombinant antigens for the seiodiagnosis of equine Babesia infections. Veterinary Parasitology.140:158-161

30. Wiser F. M. Tulane University (1999). Cell and Molecular Biology of Plasmodium Lecture Notes (última modificación Febrero 17,2005).

Página web: www.tulane.edu/~wiser/malaria/cmb.pdf .[Consulta: 2005, Diciembre 10]

31. Yokoyama, N; Okamura, M y Igarashi, I.(2006). Erythrocyte invasión by *Babesia* parasite: Current advances in the elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligand and host receptor in the invasión stage. Veterinary Parasitology. 138, 22-32