

PIROPLASMOSIS EQUINA

RESUMEN

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

La introducción de animales portadores en áreas con prevalencia de garrapatas vector puede conducir a una propagación epizootica de la enfermedad.

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

Una característica diagnóstica de la infección por B. caballi es la presencia de parejas de merozoítos unidos por sus extremos posteriores. Los parásitos que se encuentran dentro de eritrocitos miden $2 \times 5 \mu\text{m}$. Los merozoítos de T. equi presentan una longitud inferior a $2-3 \mu\text{m}$, y son piriformes, redondos u ovoides. Una característica de T. equi es la disposición de cuatro merozoítos piriformes formando una tétrada denominada "Cruz de Malta".

Se han desarrollado técnicas moleculares, cuyo uso sigue aumentando, para la detección de T. equi y B. caballi basadas en pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específicas de especie, dirigidas al gen de la subunidad 18S del ARNr, así como a los genes BC48 (B. caballi) y EMA-1 (T. equi). Se ha comprobado que estas pruebas son muy sensibles y específicas, y resultan prometedoras para el diagnóstico de esta infección. Es importante destacar que la especificidad de la PCR puede definirse más allá de la evaluación de la masa molecular de los amplicones. También es posible la hibridación con sondas específicas, el análisis mediante endonucleasas de restricción y la secuenciación de los amplicones.

Pruebas serológicas: *La mejor manera de demostrar la infección en los animales portadores es analizar sus sueros para comprobar si presentan anticuerpos específicos.*

En la actualidad, la inmunofluorescencia indirecta (IFA) y el enzoinmunoanálisis de competición (C-ELISA) son las pruebas más utilizadas para calificar caballos de importación. La prueba de fijación del complemento (CF), utilizada durante muchos años como la prueba fundamental, ha sido reemplazada por las pruebas IFA y C-ELISA. Se ha demostrado que estas pruebas son más efectivas para la detección de los animales con una infección crónica y los animales tratados con medicamentos antiparasitarios. Dichos animales pueden ser negativos a la fijación del complemento y, aun así, estar infectados. Se ha demostrado que las pruebas IFA y C-ELISA son muy específicas para cada una de las dos especies de agentes causantes de la piroplasmosis. Una dificultad de la IFA es la necesidad de diluir los sueros para reducir la unión inespecífica y el subsiguiente fondo, que puede impedir la identificación de parásitos intra-eritrocitarios. Las diluciones de sueros para la mejora de la especificidad comportan una disminución de la sensibilidad de la IFA. Las técnicas ELISA indirectas en las que se utilizan proteínas recombinantes de merozoíto de T. equi y B. caballi para el diagnóstico parecen ser muy prometedoras para determinar con exactitud la infección por piroplasmosis equina.

Requisitos para las vacunas: *No se dispone de vacunas.*

A. INTRODUCCIÓN

La piroplasmosis equina es una enfermedad de los caballos, las mulas, los asnos y las cebras producida por protozoos y transmitida por garrapatas. Recientemente, esta infección se ha observado también en camellos (Sloboda *et al.*, 2011). Los agentes etiológicos de la piroplasmosis equina son *Theileria equi* y *Babesia caballi*. Se han identificado alrededor de 14 especies de garrapatas de la familia Ixodidae, géneros *Dermacentor*, *Rhipicephalus* y *Hyalomma*, como vectores transestadiales de *B. caballi* y *T. equi*, aunque ocho de estas especies fueron también capaces de transmitir las infecciones por *B. caballi* por vía transovárica (De Waal, 1992). Los animales infectados pueden permanecer como portadores de estos parásitos sanguíneos durante por largos períodos de tiempo y actuar como fuentes de la infección para las garrapatas que actúan como vectores.

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

Durante el ciclo de vida de *Babesia*, al principio los esporozoítos invaden los eritrocitos y se transforman allí en trofozoítos. En este lugar, los trofozoítos crecen y se dividen en dos merozoítos redondos, ovoides o piriformes. Los merozoítos maduros son entonces capaces de infectar a nuevos eritrocitos y luego se repite el proceso de división.

Babesia caballi: en los eritrocitos los merozoítos son piriformes, de 2–5 µm de longitud y 1,3–3,0 µm de diámetro (Levine, 1985). Los pares de merozoítos unidos por sus extremos terminales son una característica diagnóstica propia de la infección por *B. caballi*.

Theileria equi: los merozoítos de este microorganismo son relativamente pequeños, con una longitud inferior a 2–3 µm (Levine, 1985), y son piriformes, de redondos u ovoides. Una característica de *T. equi* es que se suelen encontrar juntos cuatro parásitos de unos 2 µm de longitud dispuestos en forma de una tétrada conocida como “Cruz de Malta” (Holbrook *et al.*, 1968).

En la infección por *T. equi*, se ha demostrado que los esporozoítos inoculados en caballos a través de la picadura de garrapata invaden los linfocitos (Schein *et al.*, 1981). Los esporozoítos se desarrollan en el citoplasma de estos linfocitos y terminan formando esquizontes semejantes a *Theileria*. Los merozoítos liberados de estos esquizontes penetran en los eritrocitos. También se ha documentado la transmisión vertical de *T. equi* de la yegua al potro (Allsopp *et al.*, 2007). En la infección experimental, se ha detectado *T. equi* no solo en la sangre sino también en otros tejidos, como el hígado, el bazo, el pulmón y la médula ósea (Alhassan *et al.*, 2007).

La clasificación taxonómica de *T. equi* ha sido polémica y tan solo recientemente se ha vuelto describir y se ha admitido como una *Theileria* (Mehlhorn & Schein, 1998). Otros datos que respaldan una estrecha relación con especies de *Theileria* son la homología encontrada entre las proteínas de superficie de 30 y 34 kDa de *T. equi* y las proteínas de tamaño similar de otras especies de *Theileria* (Knowles *et al.*, 1997). Sin embargo, la posición de *T. equi* en los árboles filogenéticos en base a los genes del ARN de la subunidad pequeña ribosómica es variable y casi siempre aparece como clado de las teilerias (Criado-Fornelio *et al.*, 2003), lo que induce a algunos a creer que *T. equi* es un ancestro de las teilerias (Criado-Fornelio *et al.*, 2003) o un grupo totalmente distinto (Allsopp *et al.*, 1994). Los datos de la totalidad del genoma de *T. equi* constituyen una garantía más de que esta especie debe situarse filogenéticamente como taxón hermano de *Theileria* spp. (Kappmeyer *et al.*, 2012). Tanto la secuencia de *B. caballi* como de *T. equi* presentan heterogeneidad, lo cual podría llegar a repercutir en la interpretación de las pruebas de diagnóstico molecular.

Los signos clínicos de la piroplasmosis equina suelen ser inespecíficos, y la enfermedad puede confundirse fácilmente con otros trastornos. La piroplasmosis se puede presentar en las formas hiperaguda, aguda o crónica. Los casos agudos son los más comunes, y se caracterizan por fiebre, que suele superar los 40°C, disminución del apetito y malestar, aumento de las frecuencias cardíaca y respiratoria, congestión de las mucosas, y deposiciones fecales más pequeñas y secas de lo normal.

En los casos subagudos, los signos clínicos son semejantes. Además, los animales afectados muestran pérdida de peso, y la fiebre es a veces intermitente. Las mucosas varían de color rosa pálido a rosa, o de amarillo pálido a amarillo fuerte. En las mucosas también se pueden apreciar petequias y/o equimosis. Los movimientos normales del intestino pueden disminuir ligeramente y los animales pueden mostrar los signos de un cólico leve. A veces se presenta una ligera hinchazón edematosa en el extremo distal de las extremidades.

Los casos crónicos suelen presentar signos clínicos inespecíficos como ligera falta de apetito, bajo rendimiento y un descenso de la masa corporal. Mediante el examen rectal, se suele hallar una esplenomegalia.

Se ha descrito una forma hiperaguda muy infrecuente en la que los caballos aparecen muertos o moribundos.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la piroplasmosis equina y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Identificación del agente¹						
Examen al microscopio	–	+	–	++	+	n/a
PCR	+++	+++	+++	+++	+++	n/a
Detección de la respuesta inmunitaria						
IFA	++	++	++	+++	++	n/a
C-ELISA	+++	+++	+++	+++	+++	n/a
CF	+	+	+	+	+	n/a

Clave: +++ = método recomendado; ++ = método idóneo; + = puede utilizarse en algunas situaciones, pero el coste, la fiabilidad y otros factores limitan mucho su aplicación; – = no adecuado para este propósito; n/a = no aplicable.

Aunque no todas las pruebas clasificadas como +++ o ++ han sido validadas formalmente, su uso sistemático y hecho de que se hayan utilizado ampliamente sin resultados dudosos las hace aceptables.

PCR = reacción en cadena de la polimerasa; IFA = inmunofluorescencia indirecta;

C-ELISA = enzimoimmunoanálisis de competición; CF = fijación del complemento.

1. Identificación del agente

Los caballos infectados pueden identificarse observando los parásitos en frotis teñidos de sangre o de órganos, obteniéndose la primera preferiblemente de capilares cutáneos durante la fase aguda de la enfermedad. Los métodos de tinción de tipo Romanovsky, como el de Giemsa, normalmente proporcionan los mejores resultados. Sin embargo, incluso en los casos clínicos agudos de infección por *B. caballi*, la parasitemia es muy baja y difícil de detectar. Los analistas con experiencia pueden a veces detectar una parasitemia muy baja utilizando una técnica de gota gruesa. La gota gruesa se prepara colocando una pequeña gota de sangre (aproximadamente 50 µl) sobre un porta de vidrio limpio. Esta gota se seca al aire, se fija a 80°C durante 5 minutos, y se tiñe con Giemsa al 5% durante 20–30 minutos.

A veces es deseable una identificación exacta de la especie, ya que con frecuencia se presentan infecciones mixtas de *T. equi* y de *B. caballi*.

La identificación de la piroplasmosis equina en animales portadores mediante el examen de frotis sanguíneos no solo es muy difícil sino también inexacta, por lo que son preferibles los métodos serológicos (véase más adelante). Sin embargo, las pruebas serológicas pueden dar tanto falsos positivos como negativos (Tenter & Freidhoff, 1986). En tales casos, se han sugerido como procedimientos de diagnóstico complementarios el pase de sangre total a un caballo nunca antes expuesto al parásito, o el dejar que una garrapata se alimente en un animal sospechoso. No obstante, estas técnicas son difíciles de realizar, lentas y caras. Además, y es importante destacarlo, debe tenerse en cuenta si la necesidad de la información diagnóstica justifica los problemas que estas pruebas acarrearán en cuanto a bienestar animal.

Lograr establecer cultivos *in vitro* de *T. equi* y *T. caballi* puede ser una alternativa a los métodos complementarios que se han descrito arriba para identificar portadores de los parásitos. Se han logrado cultivar parásitos de *Babesia caballi* de la sangre de dos caballos que dieron negativo a la prueba de fijación de complemento (CF) (Holman *et al.*, 1993). De modo análogo, se ha podido cultivar *T. equi* a partir de caballos que no presentaban parasitemia patente en el momento de empezar los cultivos (Zweygarth *et al.*, 1997).

¹ Se recomienda una combinación de métodos de identificación del agente en la misma muestra clínica.

Se han descrito técnicas moleculares para la detección de *T. equi* y *B. caballi*. Estas técnicas son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específica de especie, dirigida sobre todo al gen de la subunidad 18S de rARN (Criado-Fornelio *et al.*, 2003). Versiones más refinadas de esa técnica son la PCR anidada (Rampersad *et al.*, 2003), la amplificación isotérmica mediada por bucles (LAMP) (Alhassan *et al.*, 2007), a la que se atribuye una mayor sensibilidad; la muy sensible prueba de transferencia lineal inversa (RLB) y la PCR múltiple para la detección e identificación simultáneas de las especies *Theileria* y *Babesia* en los caballos (Alhassan *et al.*, 2005). El hecho de conocer la totalidad del genoma de *T. equi* proporciona otra oportunidad de mejorar y ampliar las modalidades diagnósticas para este parásito (Kappmeyer *et al.*, 2012).

2. Pruebas serológicas

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

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

En el diagnóstico de la piroplasmosis se han utilizado varias técnicas serológicas, como la prueba de la CF, la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFA), y el ensayo de inmunoenzimático (ELISA). Además, recientemente se ha descrito una prueba sencilla y rápida de inmunocromatografía para *T. equi*, que podría resultar muy útil para el cribado masivo de muestras de suero (Huang *et al.*, 2004).

2.1. Prueba de inmunofluorescencia indirecta

La IFA se ha aplicado con éxito al diagnóstico diferencial de infecciones por *T. equi* y *B. caballi* (Madden & Holbrook, 1968). El reconocimiento de una reacción fuertemente positiva es relativamente sencillo, pero, para diferenciar entre una reacción positiva débil y una negativa débil, se requiere una experiencia considerable de cara a su interpretación. Se ha ofrecido una descripción detallada del protocolo de la IFA (Madden & Holbrook, 1968). Un problema de la IFA es la necesidad de diluir sueros para reducir la unión inespecífica y el consecuente fondo, que podría impedir identificar los parásitos intra-eritrocitarios. Las diluciones de sueros para mejorar la especificidad pueden comportar una disminución de la sensibilidad de la IFA. Más adelante se ofrece un ejemplo de protocolo para esa prueba.

2.1.1. Producción de antígeno

La sangre para producir antígeno se debe extraer de caballos con parasitemia creciente; lo ideal es del 2–5%. Los animales portadores que ya han producido anticuerpos no son adecuados para la producción de antígeno. Como alternativa, pueden utilizarse parásitos cultivados *in vitro* para preparar antígenos en porta, ya que así se evita que los eritrocitos infectados resulten infectados por anticuerpos, y pueden suministrarse sin interrupción los eritrocitos infectados, sobre todo por *B. caballi*. Se obtiene sangre (unos 15 ml) y se transfiere a un recipiente con 235 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,2. Los eritrocitos se lavan tres veces con PBS frío (1.000 **g** durante 10 minutos a 4°C). El sobrenadante y la capa leucocitaria se eliminan después de cada lavado. Después del último lavado, los eritrocitos concentrados se reconstituyen hasta el volumen normal inicial con una solución al 4% de la fracción V de seroalbúmina bovina preparada en PBS, es decir, el volumen original de células concentradas se considera de un 30%, por lo que un tercio son eritrocitos. Si el volumen original era 15 ml, entonces 5 ml de eritrocitos concentrados + 10 ml de seroalbúmina bovina al 4% en PBS constituyen el antígeno. Después de mezclar bien, se coloca el antígeno en pocillos preparados sobre un porta de vidrio mediante un sacabocados o una jeringa. Alternativamente, se pueden extender cuidadosamente las células sobre portas para microscopio, cubriendo por completo el porta con una capa uniforme y moderadamente gruesa. Estos portas se dejan secar, se envuelven en papel suave y se sellan en bolsas de plástico o se envuelven en papel de aluminio, y se guardan a –20°C durante un máximo de 1 año.

2.1.2. Procedimiento analítico

- i) Se analiza cada muestra de suero frente a antígeno de *B. caballi* y de *T. equi*.
- ii) Antes de su uso, se retiran los portas congelados de su lugar de mantenimiento a –20°C y se incuban a 37°C durante 10 minutos.

- iii) Los frotis de antígeno se sacan luego de su cubierta protectora y se fijan en acetona con hielo seco (–20°C) durante 1 minuto. Existen portas comerciales que están prefijados.
- iv) Si se trata de frotis sobre la superficie completa del porta, se forman cuadrículas sobre el frotis de antígeno con esmalte para uñas o un medio de montaje de secado rápido (como Cytoseal) (se dibujan 14–21 cuadrículas en total, es decir 2–3 filas de 7 en cada una).
- v) Se diluyen a 1/80 – 1/1280 con PBS los sueros problema y los sueros control positivo y negativo. Se incluyen sueros control negativo y positivo en cada prueba.
- vi) Se aplican los sueros (10 µl de cada uno) a las diluciones apropiadas en los diferentes pocillos o cuadrículas sobre el frotis de antígeno, se incuban 30 minutos a 37°C, y se lava varias veces con PBS y una vez con agua.
- vii) Se diluye en PBS una solución de anticuerpos anti inmunoglobulina de caballo, generados en conejos y conjugados con isotiocianato de fluoresceína (este conjugado está disponible comercialmente), y se aplica al frotis, que se incuba y luego se lava como antes.
- viii) Después del lavado final, se colocan en cada frotis dos gotas de una solución que contenga glicerina y PBS a partes iguales, y se monta con un cubre para la observación microscópica.
- ix) Luego se examinan los frotis al microscopio para comprobar si hay parásitos fluorescentes. Por lo general, los sueros diluidos a 1/80 o más y que den fluorescencia fuerte, se consideran positivos, aunque hay que tener también en cuenta el tipo de fluorescencia que presentan los controles positivos y negativos.

2.2. Enzimoimmunoanálisis de competición

Se ha descrito la producción de varios antígenos recombinantes para su uso en técnicas de ELISA. Se han producido proteínas recombinantes de *T. equi* (EMA-1; EMA-2) y *B. caballi* (RAP-1; Bc48) en *Escherichia coli* (Huang *et al.*, 2003; Kappmeyer *et al.*, 1999; Knowles *et al.*, 1992) o en células de insectos mediante baculovirus (Xuan *et al.*, 2001). Los antígenos recombinantes producidos en *E. coli* o por baculovirus presentan la ventaja obvia de evitar la necesidad de infectar caballos para la producción de antígenos y de eliminar las reacciones cruzadas que se han experimentado con los antígenos crudos de la prueba ELISA. También suponen una fuente invariable de antígeno para su distribución y estandarización a nivel internacional.

Los ELISA indirectos en los que se utiliza EMA-2 y BC48 han mostrado una gran especificidad y sensibilidad en la detección de anticuerpos en caballos infectados (Huang *et al.*, 2003; Ikadai *et al.*, 1999). Los resultados iniciales de estas pruebas son prometedores y está en curso una validación adicional de las mismas.

La proteína EMA-1 y un anticuerpo monoclonal (MAb) específico, que define el epítipo de esta proteína superficial del merozoíto, se han utilizado en C-ELISA para *T. equi* (Knowles *et al.*, 1992). Con este método se evita el problema de la pureza del antígeno, ya que la especificidad de esta prueba depende solo de la especificidad definida por el epítipo de *T. equi* para el MAb. En la detección de anticuerpos frente a *T. equi*, se observó una correlación del 94% entre el C-ELISA y la CF. En los sueros que dieron resultados discrepantes se comprobó su capacidad para inmunoprecipitar los productos de la traducción *in vitro* del ARN mensajero del merozoíto de *T. equi* marcados radiactivamente con ³⁵S-metionina. Sin embargo, los resultados de la inmunoprecipitación con las muestras de suero que dieron negativo en el C-ELISA y positivo en la CF no fueron concluyentes (Knowles *et al.*, 1991). Este C-ELISA para *T. equi* también se ha validado recientemente en Marruecos y en Israel, y se ha hallado una concordancia del 91% y del 95,7%, respectivamente, con la IFA (Rhalem *et al.*, 2001; Shkap *et al.*, 1998). Se ha elaborado un método C-ELISA similar utilizando la proteína1 recombinante (RAP-1) de *B. caballi*, que es un componente asociado al roprorio, y un MAb que reacciona con un péptido del epítipo del antígeno de 60 kDa de *B. caballi* (Kappmeyer *et al.*, 1999). Los resultados de 302 muestras de suero analizadas por C-ELISA y CF mostraron un 73% de concordancia. De las 72 muestras que fueron negativas en la CF y positivas en el C-ELISA, 48 (el 67%) fueron positivas en la IFA, mientras que cuatro de las cinco muestras que fueron positivas en la CF y negativas en el C-ELISA fueron positivas en la IFA (Kappmeyer *et al.*, 1999).

Se ha descrito un protocolo analítico para C-ELISA de diagnóstico de la piroplasmosis equina y se ha utilizado en estudios adicionales de validación (Departamento de Agricultura de EE.UU. [USDA], 2005). La aparente especificidad de los C-ELISA para *T. equi* y *B. caballi* cae dentro del 92,2%–99,5% cuando se utilizan sueros de 1.000 caballos que se suponen libres de piroplasmosis. Se analizaron mediante ambas pruebas más de 1.000 caballos de origen extranjero y de estado desconocido respecto a la infección, y se obtuvo una aparente mayor sensibilidad con el C-ELISA. Los resultados

fueron de un 1,1% (*T. equi*) y un 1,3% (*B. caballii*) más de animales seropositivos detectados mediante C-ELISA que mediante CF; los resultados positivos adicionales se confirmaron mediante IFA. En un estudio similar con 645 caballos de origen extranjero que se analizaron con fines de importación y preimportación, se usaron sueros tratados con calor (58°C durante 30 minutos) y se obtuvo como resultado un 3,6% (*T. equi*) y un 2,1% (*B. caballii*) más de animales seropositivos detectados mediante el C-ELISA que mediante la CF; ambos C-ELISA fueron muy reproducibles pocillo a pocillo, placa a placa y día a día, con variaciones globales de $\pm 1,2\%$ y $\pm 1,6\%$, para las pruebas de *T. equi* y *B. caballii*, respectivamente.

A continuación se expone el protocolo de C-ELISA.

Los *National Veterinary Services Laboratories* del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) (2005) han ofrecido una descripción detallada de la producción de antígeno y el protocolo analítico. Existe un kit comercial que se basa en los mismos antígenos y anticuerpos monoclonales.

2.2.1 Soluciones

i) Tampón de revestimiento de antígeno

Se prepara el volumen necesario de tampón de revestimiento de antígeno usando las siguientes cantidades de reactivos para cada litro: 2,93 g de bicarbonato sódico; 1,59 g de carbonato sódico; suficiente agua ultra pura para disolver lo anterior, y se lleva a un volumen de 1 litro con agua ultra pura. Se ajusta el pH a 9,6.

ii) Solución de lavado para C-ELISA (diluyente de alta salinidad)

Se prepara el volumen necesario de solución de lavado para C-ELISA usando las siguientes cantidades de reactivos para cada litro: 29,5 g de cloruro sódico; 0,22 g de fosfato sódico monobásico; 1,19 g de fosfato sódico dibásico; 2 ml de Tween 20; suficiente agua bidestilada para disolver lo anterior, y se lleva a un volumen de 1 litro con agua bidestilada. Se mezcla bien. Se ajusta el pH a 7,4. Se esteriliza en autoclave a 121°C.

2.2.2. Producción de antígeno

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

Las células se resuspenden al 10% del volumen original en el tampón Tris-HCl, al que se añade 1 mg/ml de lisozima, y se mantienen en hielo 20 minutos. Luego se añade el detergente Nonidet P-40 (NP-40) a una concentración final del 1% (v/v), se agita con un vórtex, y se deja la muestra en hielo 10 minutos. El material se sonica a continuación con cuatro ciclos de 30 segundos cada uno a 100 vatios, en hielo, con intervalos de 2 minutos entre cada ciclo de sonicación para evitar el calentamiento de la muestra. El sonicado se centrifuga a 10,000 **g** durante 20 minutos. El sobrenadante resultante se distribuye en tubos de microcentrífuga en alícuotas de 0,5 ml y puede conservarse durante años a -70°C. La presencia de antígenos bacterianos heterólogos en el hospedador no interfiere en la unión con los anticuerpos específicos equinos anti-piroplasma ni en la unión de los pares de MAb a los epítomos de los antígenos recombinantes expresados, y se confirma mediante los procedimientos siguientes. Se controla la calidad de los sobrenadantes que contienen el antígeno titulándolos con sus anticuerpos emparejados y con antisueros equinos monoespecíficos de referencia para verificar un nivel de expresión adecuado y una especificidad completa para la especie homóloga del agente de la piroplasmosis. Los controles normales de suero (suero negativo) no deben interferir con la unión de los MAb ni de los sueros equinos de referencia positivos a la preparación de antígeno expresado.

2.2.3. Procedimiento analítico

i) Se preparan las placas de microtitulación revistiendo los pocillos con 50 µl de antígeno de *T. equi* o de *B. caballii* diluido en tampón de revestimiento de antígeno. Se determina la dilución usada por técnicas estándar de titulación serológica. La placa se sella con su

tapadera, se guarda durante la noche a 4°C y se congela a –70°C. Las placas se pueden guardar a –70°C hasta 6 meses.

- ii) Los MAb primarios anti- *T. equi* o anti-*B. caballi* y el conjugado de peroxidasa y anticuerpos secundarios se diluyen, según las instrucciones del fabricante, en el momento en que vayan a utilizarse en un C-ELISA, con el tampón de dilución de los anticuerpos (proporcionados con el kit de la prueba).
- iii) las placas se descongelan a temperatura ambiente, la solución de revestimiento se decanta, y las placas se lavan dos veces con solución de lavado de C-ELISA.
- iv) Los sueros control y las muestras del suero problema se diluyen a 1/2 con tampón para dilución de suero antes de añadir 50 µl de sueros a los pocillos. Se analiza cada muestra de suero desconocida en pocillos individuales o duplicados. Los sueros control positivos y los pocillos blanco se analizan por duplicado, mientras que los sueros control negativos se analizan por triplicado o en diferentes partes de la placa. Las placas se cubren e incuban a temperatura ambiente (21–25°C) durante 30 minutos en una cámara húmeda y luego se lavan tres veces con solución de lavado para C-ELISA
- v) Se añade a cada pocillo 50 µl de MAb primario anti *T. equi* o anti-*B. caballi*. (el MAb se produce en un biorreactor de cultivo celular y puede conseguirse en el NVSL P.O. Box 844, Ames, Iowa 50010, EE.UU.). Las placas se cubren e incuban 30 minutos a temperatura ambiente (21–25°C) en una cámara húmeda y luego se lavan tres veces con solución de lavado para C-ELISA.
- vi) Se añade a cada pocillo una dilución de anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa (50 µl/pocillo). Las placas se cubren e incuban 30 minutos a temperatura ambiente (21–25°C) en una cámara húmeda y luego se lavan tres veces con solución de lavado para C-ELISA.
- vii) A todos los pocillos se añade un substrato cromógeno para el enzima (50µl/pocillo). Las placas se incuban cubiertas durante 15 minutos a temperatura ambiente (21–25°C) durante el revelado del color.
- viii) El revelado del color se detiene añadiendo a todos los pocillos 50 µl de solución de parada y se leen las placas de forma inmediata en un lector de placas.
- ix) Las placas se leen a 620, 630 o 650 nm de longitud de onda (OD). Se calcula la OD media del par de pocillos para cada uno de los sueros control y los pocillos blanco. Para que una prueba sea válida, la media de los controles debe producir una OD > 0,300 y < 2.000. La media de los sueros control positivos debe producir una inhibición ≥40%.
- x) El porcentaje de inhibición [%I] se calcula del modo siguiente: %I = 100 – [(OD de la muestra × 100) ÷ (OD de la media del control negativo)].
- xi) Si la muestra problema produce una inhibición ≥40%, se considera positiva; si produce una inhibición <40%, se considera negativa.

2.3. Fijación del complemento

La CF se ha utilizado en el pasado en algunos países para certificar caballos de importación, y en algunas regiones se sigue utilizando mucho para este fin. Se dispone de una descripción detallada de la producción del antígeno y del procedimiento de la prueba (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos [USDA], 1997). La CF es una prueba exacta solo para la detección de infecciones tempranas (agudas), en la que ofrece una buena sensibilidad y especificidad, pero es posible que no identifique a todos los animales infectados, especialmente si han sido tratados farmacológicamente o si generan reacciones anti-complementarias, o bien por la incapacidad de la IgG (T) (el principal isotipo de las inmunoglobulinas de los équidos) de fijar complemento de cobaya. El antígeno para la CF se prepara mediante la infección experimental de caballos, lo cual suscita preocupaciones relativas al bienestar animal. Por lo tanto, es probable que la CF se deje de utilizar en el futuro; la IFA y el C-ELISA la han sustituido como pruebas más idóneas para certificar animales individuales antes de su traslado, incluso para el comercio internacional.

A continuación se ofrece un ejemplo de protocolo de la CF.

2.3.1. Soluciones

- i) Solución de Alsever

Se prepara 1 litro de solución de Alsever disolviendo 20,5 g de glucosa; 8,0 g de citrato sódico; y 4,2 g de cloruro sódico en suficiente cantidad de agua. Se ajusta el pH a 6,1

utilizando ácido cítrico y se lleva hasta 1 litro con agua destilada. Se esteriliza por filtración.

ii) Reserva de tampón veronal (5 x)

Se disuelven los siguientes componentes en 1 litro de agua destilada: 85,0 g de glucosa; 3,75 g de 5,5 dietil barbiturato sódico; 1,68 g de cloruro magnésico ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$); y 0,28 g de cloruro cálcico. Se disuelven 5,75 g de 5,5 dietil barbiturato sódico en 0,5 litros de agua destilada caliente (casi hirviendo). Se enfría esta solución de ácido y se añade a la anterior solución de sales. Se lleva el volumen a 2 litros con agua destilada y se guarda a 4°C. Para preparar una solución de trabajo, se añade una parte de solución reserva a cuatro partes de agua destilada. El pH final debe estar entre 7,4 y 7,6.

2.3.2. Producción de antígeno

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

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

2.3.3. Procedimiento analítico

- i) Deben comprobarse la especificidad y la potencia de cada lote de antígeno frente a los antiseros estándar de especificidad y potencia conocidas. Se determinan también las diluciones óptimas del antígeno en una titulación preliminar por el sistema de tablero de ajedrez o tabla de doble entrada.
- ii) Los sueros problema se inactivan durante 30 minutos a 56°C (los sueros de asnos y mulas se inactivan a 62,5°C durante 35 minutos) y se analizan a diluciones de 1/5 a 1/5120. Para todas las diluciones se utiliza tampón veronal.
- iii) El complemento se prepara y se titula espectrofotométricamente para determinar la dosis que causa hemólisis al 50% de las células ($C'H_{50}$) (Stiller *et al.*, 1980) y se utiliza en la prueba a valores de 5 veces la $C'H_{50}$. El sistema hemolítico consta de partes iguales de una suspensión al 2% de eritrocitos de oveja y de tampón veronal con 5 dosis hemolíticas mínimas (MDH) de hemolisina (amboceptor) (USDA, 1997). Algunos laboratorios utilizan dos veces la dosis que causa hemólisis al 100% de las células, que da una sensibilidad equivalente.
- iv) La prueba se ha adaptado a las placas de microtitulación (Herr *et al.*, 1985). El volumen total de la prueba es de 0,125 ml, formado por fracciones iguales (0,025 ml) de antígeno, complemento (cinco veces la $C'H_{50}$) y suero diluido. La incubación se realiza a 37°C durante 1 hora.
- v) Se añade una fracción doble (0,05 ml) del sistema hemolítico y se incuban las placas durante otros 45 minutos a 37°C con agitación después de 20 minutos.
- vi) Las placas se centrifugan a 200 **g** durante 1 minuto antes de proceder a la lectura sobre un espejo.
- vii) Se considera como resultado positivo una lisis del 50%, y el título es la dilución mayor de suero que produce una lisis del 50%. Un título de 1/5 se considera como suero positivo. En cada prueba se debe incluir un juego completo de controles (sueros positivos y negativos) así como un antígeno control preparado a partir de eritrocitos de un caballo normal (no infectado).

Las muestras que no dan la reacción del complemento se analizan mediante IFA. Los sueros de asno son frecuentemente negativos en la reacción del complemento.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

En la actualidad no existen vacunas.

BIBLIOGRAFÍA

ALHASSAN A., GOVIND Y., TAM N., THEKISOE O., YOKOYAMA N., INOUE N. & IGARASHI I. (2007). Comparative evaluation of the sensitivity of LAMP, PCR and *in vitro* culture methods for the diagnosis of equine piroplasmosis. *Parasitol. Res.*, **100**, 1165–1168.

ALHASSAN A., PUMIDONMING W., OKAMURA M., HIRATA H., BATTSETSEG B., FUJISAKI K., YOKOYAMA N. & IGARASHI I. (2005). Development of a single-round and multiplex PCR method for the simultaneous detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in horse blood. *Vet. Parasitol.*, **129**, 43–49.

ALLSOPP M.T., CAVALIER-SMITH T., DE WAAL D.T. & ALLSOPP B.A. (1994). Phylogeny and evolution of the piroplasms. *Parasitol.*, **108**, 147–152.

ALLSOPP M.T., LEWIS B.D. & PENZHORN B.L. (2007). Molecular evidence for transplacental transmission of *Theileria equi* from carrier mares to their apparently healthy foals. *Vet Parasitol.*, **148**, 130–136.

CRIADO-FORNELIO A., MARTINEZ-MARCOS A., BULING-SARANA A. & BARBA-CARRETERO J.C. (2003). Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe: Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history. *Vet. Parasitol.*, **114**, 173–194.

DE WAAL D.T. (1992). Equine piroplasmosis: a review. *Br. Vet. J.*, **148**, 6–14.

HERR S., HUCHZERMEYER H.F.K.A., TE BRUGGE L.A., WILLIAMSON C.C., ROOS J.A. & SCHIELE G.J. (1985). The use of a single complement fixation test technique in bovine brucellosis, Johne's disease, dourine, equine piroplasmosis and Q fever serology. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **52**, 279–282.

HOLBROOK A.A., JOHNSON A.J. & MADDEN B.S. (1968). Equine piroplasmosis: Intraerythrocytic development of *Babesia caballi* (Nuttall) and *Babesia equi* (Laveran). *Am. J. Vet. Res.*, **29**, 297–303.

HOLMAN P.J., FRERICHS W.M., CHIEVES L. & WAGNER G.G. (1993). Culture confirmation of the carrier status of *Babesia caballi*-infected horses. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 698–701.

HUANG X., XUAN X., XU L., ZHANG S., YOKOYAMA N., SUZUKI N. & IGARASHI I. (2004). Development of an immunochromatographic test with recombinant EMA-2 for the rapid detection of antibodies against *Babesia equi* in horses. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 359–361.

HUANG X., XUAN X., YOKOYAMA N., XU L., SUZUKI H., SUGIMOTO C., NAGASAWA H., FUJISAKI K. & IGARASHI I. (2003). High-level expression and purification of a truncated merozoite antigen-2 of *Babesia equi* in *Escherichia coli* and its potential for immunodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 1147–1151.

IKADAI H., XUAN X., IGARASHI I., TANAKA S., KANEMARU T., NAGASAWA H., FUJISAKI K., SUZUKI N. & MIKAMI T. (1999). Cloning and expression of a 48-kilodalton *Babesia caballi* merozoite rhoptry protein and potential use of the recombinant antigen in an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 3475–3480.

KAPPMAYER L.S., PERRYMAN L.E., HINES S.A., BASZLER T.V., KATZ J.B., HENNAGER S.G. & KNOWLES D.P. (1999). Detection of equine antibodies to *Babesia caballi* recombinant *B. caballi* rhoptry-associated protein 1 in a competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 2285–2290.

KAPPMAYER L.S., THIAGARAJAN M., HERNDON D.R., RAMSAY J.D., CALER E., DJIKENG A., GILLESPIE J.J., LAU A.O., ROALSON E.H., SILVA J.C., SILVA M.G., SUAREZ C.E., UETI M.W., NENE V.M., MEALEY R.H., KNOWLES D.P. & BRAYTON K.A. (2012). Comparative genomic analysis and phylogenetic position of *Theileria equi*. *BMC Genomics*, **13**, 603.

KNOWLES D.P., KAPPMAYER, L.S. & PERRYMAN L.E. (1997). Genetic and biochemical analysis of erythrocyte-stage surface antigens belonging to a family of highly conserved proteins of *Babesia equi* and *Theileria* species. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **90**, 69–79.

KNOWLES D.P., KAPPMAYER, L.S., STILLER D., HENNAGER S.G. & PERRYMAN L.E. (1992). Antibody to a recombinant merozoite protein epitope identifies horses infected with *Babesia equi*. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 3122–3126.

KNOWLES D.P., PERRYMAN L.E. & KAPPEMEYER L.S. (1991). Detection of equine antibody to *Babesia equi* merozoite proteins by a monoclonal antibody-based competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 2056–2058.

LEVINE N.D. (1985). Veterinary protozoology. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.

MADDEN P.A. & HOLBROOK A.A. (1968). Equine piroplasmosis: Indirect fluorescent antibody test for *Babesia caballi*. *Am. J. Vet. Res.*, **29**, 117–123.

MELHORN H. & SCHEIN E. (1998). Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi*. *Parasitol Res.*, **84**, 467–475.

RAMPERSAD J., CESAR E., CAMPBELL M.D., SAMLAL M. & AMMONS D. (2003). A field evaluation of PCR for the routine detection of *Babesia equi* in horses. *Vet. Parasitol.*, **114**, 81–87.

RHALEM A., SAHIBI H., LASRI S., JOHNSON W.C., KAPPEMEYER L.S., HAMIDOUCH A., KNOWLES D.P. & GOFF W.L. (2001). Validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosing *Babesia equi* infections of Moroccan origin and its use in determining the seroprevalence of *B. equi* in Morocco. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **13**, 249–251.

SCHEIN E., REHBEIN G., VOIGT W.P. & ZWEYGARTH E. (1981). *Babesia equi* (Leveran, 1901). Development in horses and in lymphocyte culture. *Tropenmed Parasitol.*, **32**, 223–227.

SHKAP V., COHEN I., LEIBOVITZ B., SAVITSKY, PIPANO E., AVNI G., SHOFER S., GIGER U., KAPPEMEYER L. & KNOWLES D. (1998). Seroprevalence of *Babesia equi* among horses in Israel using competitive inhibition ELISA and IFA assays. *Vet. Parasitol.*, **76**, 251–259.

SLOBODA M., JIRKŮ M., LUKEŠOVÁ D., QABLAN M., BATSUKH Z., FIALA I., HOŘIN P., MODRÝ D. & LUKEŠ J. (2011). A survey for piroplasmids in horses and Bactrian camels in North-Eastern Mongolia. *Vet. Parasitol.*, **179**, 246–249.

STILLER D., FRERICHS W.M., LEATCH G. & KUTTLER K.L. (1980). Transmission of equine babesiosis and bovine anaplasmosis by *Dermacentor albipictus* (Packard) (Acari: Ixodidae). *J. N. Y. Ent. Soc.*, **88**, 75–76.

TENTER A.M. & FREIDHOFF K.T. (1986). Serodiagnosis of experimental and natural *Babesia equi* and *B. caballi* infections. *Vet. Parasitol.*, **20**, 49–61.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) (1997). Complement fixation test for the detection of antibodies to *Babesia caballi* and *Babesia equi* – microtitration test. USDA, Animal and Plant Health Inspection Service, Veterinary Services, National Veterinary Services Laboratories, Ames, Iowa, USA.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) (2005). Competitive ELISA for Serodiagnosis of Equine Piroplasmosis (*Babesia equi* and *Babesia caballi*), USDA, Animal and Plant Health Inspection Service, Veterinary Services, National Veterinary Services Laboratories, Ames, Iowa, USA.

XUAN X., LARSEN A., IDADAI H., TNANKA T., IGARASHI I., NAGASAWA H., FUJISAKI K., TOYODA Y., SUZUKI N. & MIKAMI T. (2001). Expression of *Babesia equi* merozoite antigen 1 in insect cells by recombinant baculovirus and evaluation of its diagnostic potential in an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 705–709.

ZWEYGARTH E., JUST M.C. & DE WAAL D.T. (1997). *In vitro* cultivation of *Babesia equi*: detection of carrier animals and isolation of parasites. *Onderstepoort J. Vet Res.*, **64**, 51–56.

*

* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la Piroplasmosis equina (puede consultarse la lista más actualizada en la Tabla de la Parte 4 de este *Manual Terrestre* o en la página web de la OIE: <http://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/laboratorios-de-referencia/lista-des-laboratorios/>).

Por favor, contacte con los Laboratorios de Referencia de la OIE para más información sobre las pruebas de diagnóstico y los reactivos para la piroplasmosis equina.

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1989; ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2014.