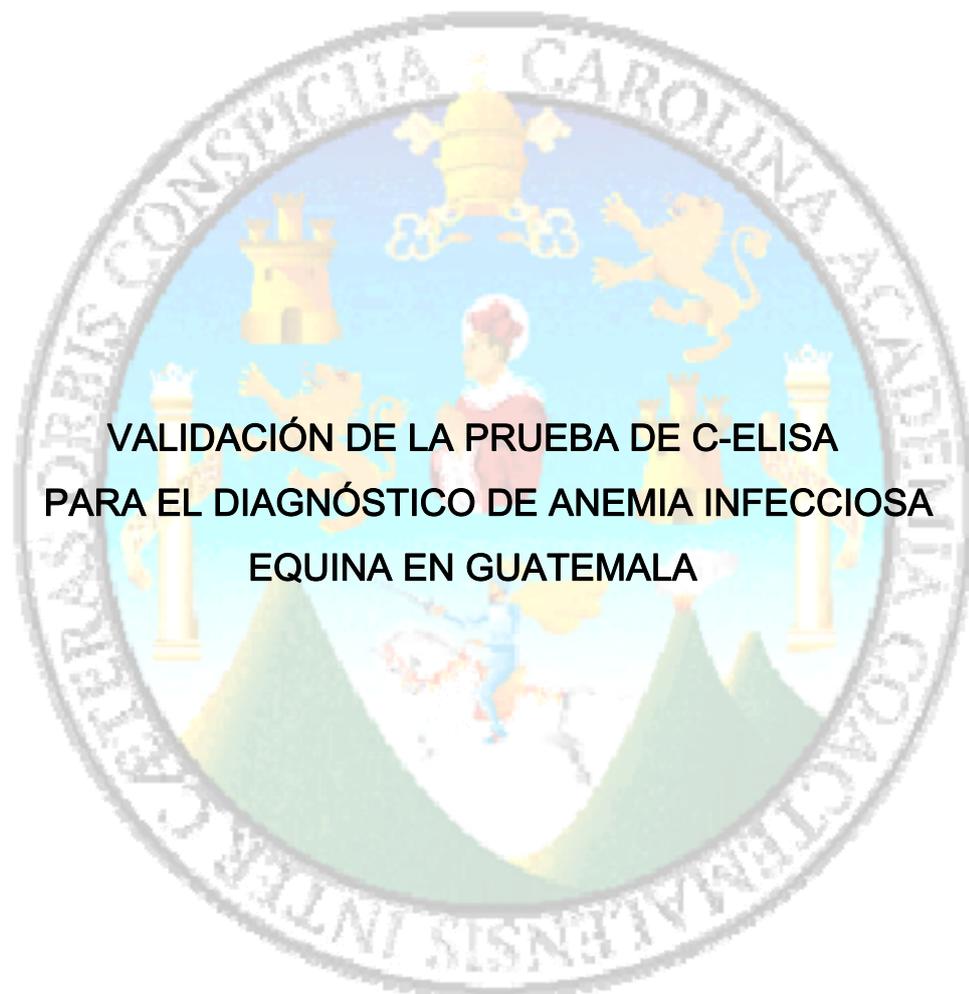


**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**



**VALIDACIÓN DE LA PRUEBA DE C-ELISA  
PARA EL DIAGNÓSTICO DE ANEMIA INFECCIOSA  
EQUINA EN GUATEMALA**

**MARÍA ANDREA MUÑOZ LORENZANA**

**GUATEMALA, NOVIEMBRE 2007**

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

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure, likely a saint or historical figure, surrounded by various symbols including a crown, a cross, and a shield. The text "UNIVERSITAS CAROLINA GUATEMALENSIS" is inscribed around the perimeter of the seal.

**VALIDACIÓN DE LA PRUEBA DE C-ELISA  
PARA EL DIAGNÓSTICO DE ANEMIA INFECCIOSA  
EQUINA EN GUATEMALA  
TESIS**

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

**POR**

**MARÍA ANDREA MUÑOZ LORENZANA**

Al conferírsele el grado académico de

**Médica Veterinaria**

Guatemala, noviembre del 2007

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

<b>Decano:</b>	Lic. Zoot. Marco Vinicio De La Rosa M.
<b>Secretario:</b>	Med. Vet. Marco Vinicio García Urbina
<b>Vocal I:</b>	Med. Vet. Yeri Véliz Porras
<b>Vocal II:</b>	Mag. Sc. M.V. Fredy Rolando González Guerrero
<b>Vocal III:</b>	Med. Vet. Edgar Bailey Vargas
<b>Vocal IV:</b>	Br. José Abraham Ramírez Chang
<b>Vocal V:</b>	Br. José Antonio Motta Fuentes

**Asesores:**

Mag. Sc. M. V. Juan José Prem González  
Med. Vet. Carlos Enrique Camey Rodas  
Med. Vet. Virginia Bolaños de Corzo  
Med. Vet. Jacqueline Escobar Muñoz

**Honorable Tribunal Examinador**

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

**VALIDACIÓN DE LA PRUEBA DE C-ELISA  
PARA EL DIAGNÓSTICO DE ANEMIA INFECCIOSA  
EQUINA EN GUATEMALA**

**Que Fuera aprobado por la Junta Directiva de la Facultad de Medicina  
Veterinaria y Zootecnia**

**Como requisito previo a optar el título profesional de**

**Médica Veterinaria**

## TESIS QUE DEDICO

**A Dios**

**A mis Padres**

**A mi Patria Guatemala**

**A la Universidad de San Carlos de Guatemala**, por abrirme sus puertas y permitirme ser parte de esta honorable unidad académica.

**A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**, por brindarme el conocimiento que forjará mi futuro.

**A mis Asesores** por su amistad.

## ACTO QUE DEDICO

- A DIOS: Por darme la vida y por poner en mi camino a todas las personas que me quieren y me apoyan.
- A mi Madre: María Eugenia Lorenzana González por ser un ser excepcional que dedicó su tiempo, vida y amor para ser de mí la persona que soy.
- A mi Padre: Luis Alberto Muñoz González por quererme, apoyarme, enseñarme y darme todo lo que necesité en los momentos más importantes de mi vida.
- A mis abuelitos: Sin ellos no sería lo que soy.
- A mi novio: Roberto Mérida por cuidarme, quererme y estar junto a mí durante toda la carrera; este fue el comienzo, es el presente y será el futuro de nuestras vidas, para que juntos podamos crear un camino fuerte aplicando los conocimientos, sentimientos y el amor a los animales que a lo largo de la carrera hicieron de nosotros las personas que ahora somos.
- A mis tíos y primos: En especial a mi tío Carlos Alberto y Enrique Lorenzana.
- A mis catedráticos: En especial a los catedráticos de clínicas, por su enseñanza, tiempo, dedicación y amistad que me brindaron durante todo un año. En especial Al Dr. M.V. José Víctor Roma Batres: por haber dedicado parte de su vida en compartir conmigo su experiencia y enseñanza de la Clínica de especies menores, por haber tenido el honor de conocerlo y haber compartido momentos inolvidables.
- A mis asesores: Dr. Juan Prem, Dr. Carlos Camey, Dra. Virginia de Corzo, Dra. Jacqueline Escobar y Dra. Blanca Romillo, por su tiempo, amistad y paciencia
- A mis amigos: Vivi Saézn y su esposo Erick Fuentes, por permitirme ser parte de muchos momentos importantes de su vida, y sobre todo por brindarme su apoyo y amistad incondicional.

## AGRADECIMIENTOS

A los Doctores Viau, Bosque y Calderón. Al personal técnico del Centro Médico Veterinario Superpet, por permitirme ser parte de esa gran familia.

A la Empresa Avícola Villalobos, por abrir sus puertas y permitirme realizar las prácticas de EPS.

A todo el personal profesional y técnico de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, en especial a los Licenciados Rita Pérez y Carlos Chinchilla y al Sr. Cristian Orellana del departamento de Bioquímica por permitirme ser parte de ese gran equipo.

Al personal técnico y administrativo del departamento de Microbiología.

A mis asesores: Infinitas gracias por todo el apoyo brindado para poder realizar este trabajo de tesis.

A todos los Animales que donaron su vida para brindarme el conocimiento adquirido.

## ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. HIPÓTESIS	2
III. OBJETIVOS	3
3.1 General	3
3.2 Específicos	3
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	4
4.1 Definición	4
4.2 Sinónimos	4
4.3 Historia de la enfermedad	4
4.4 Etiología	5
4.5 Reservorios del virus.	8
4.6 Formas de transmisión de la enfermedad.	9
4.6.1 Transmisión directa.	9
4.6.2 Transmisión indirecta	10
4.6.2.1 Vectores y su ciclo de vida	11
4.6.2.1.1 Tábanos	11
4.6.2.1.2 <i>Stomoxys calcitrans</i> .	12
4.6.3 Transmisión vertical.	12
4.7 Presentación de la enfermedad	13
4.8 Patogenia.	14
4.8.1 Respuesta antigénica del huésped ante el virus	16
4.9 Signos clínicos	17
4.10 Patología clínica	18
4.11 Hallazgos a la necropsia	19
4.12 Diagnóstico	20
4.12.1 Diagnóstico serológico	22
4.12.1.1 Obtención de muestras y preparación para el análisis.	23
4.12.1.2 Prueba de inmunodifusión o difusión en gel.	24
4.12.1.3 Técnica de enzimoimmunoensayo.	26

4.12.1.3.1	Distintos tipos de elisa.	28
4.12.1.3.1.1	Elisa Indirecto.	28
4.12.1.3.1.2	Elisa de antígeno marcado.	29
4.12.1.3.1.3	Sistema competitivo DIA ELISA (AIE CELISA).	29
4.13	Técnicas espectroscópicas	31
4.13.1	Teoría de la absorción molecular	32
4.14	Validación de pruebas serológicas	33
4.15	Tratamiento	33
4.15	Control.	34
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	39
5.1	Materiales.	39
5.1.1	Recursos humanos.	39
5.1.2	Recursos biológicos	39
5.1.3	Recursos de laboratorio.	39
5.1.3.1	Reactivos de la prueba de análisis de Anemia Infecciosa Equina (AIE-AGID)	40
5.1.3.2	Materiales de la prueba de análisis de Anemia Infecciosa Equina (AIE-AGID).	40
5.1.3.2.1	Reactivos de la prueba C-Elisa para el diagnóstico de Anemia Infecciosa Equina	40
5.1.3.2.2	Materiales de la prueba C-Elisa para el diagnóstico de Anemia Infecciosa Equina	40
5.1.4	Centros de referencia	40
5.2	Metodología a seguir	41
5.2.1	Diseño del estudio	41
5.2.1.1	Método estadístico	42
	Análisis de resultados	42
5.2.1.2	Método de laboratorio	43
5.2.3.1	Procedimiento de análisis de AGID	43
5.2.3.2	Procedimiento de análisis C-ELISA	44
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
VII.	CONCLUSIONES	52

VIII. RECOMENDACIONES	54
IX. RESUMEN	55
X. BIBLIOGRAFÍA	56
XI. ANEXOS	60
Anexo No. 1 Figuras	61
Anexo No. 2 Fotografías	69
Anexo No. 3 Boletas	75
Anexo No. 4 Cuadros y tablas	78
Anexo No. 5 Gráficas	92

## I. INTRODUCCIÓN

La Anemia Infecciosa Equina (AIE) es una enfermedad viral, infectocontagiosa, inmunosupresora, de distribución mundial que afecta a los équidos de todas edades y razas causando desde formas inaparentes hasta casos fatales (6).

La importancia del diagnóstico confirmativo temprano por medio de pruebas de laboratorio a animales sospechosos de padecer dicha enfermedad radica en que el equino es el único reservorio del virus. Dicho virus tiene la capacidad de mutar genéticamente, integrarse a las células hospedadoras y de formar nuevas variedades de cepas virales, las que circulan libremente por el torrente sanguíneo, creando cuadros clínicos poco específicos de la enfermedad, constituyéndose así, en fuentes de contagio vivo para los caballos circundantes sin olvidar el papel primordial que juegan los insectos hematófagos voladores en la transmisión de la enfermedad. Ya que no existe un tratamiento efectivo para combatir al virus de la Anemia Infecciosa Equina, la medida de control más efectiva es el sacrificio de animales que resulten positivos a la prueba de referencia internacional Inmunodifusión en Agar de Gel (AGID) conocida también como prueba de Coggins. Existen otras pruebas de laboratorio reconocidas para el diagnóstico de Anemia Infecciosa Equina, como es el caso del Enzimoimmunoensayo en fase sólida (ELISA), la cual es una técnica sencilla, reproducible, de interpretación objetiva que permite procesar una gran cantidad de muestras en poco tiempo, lo que facilita su implementación en laboratorios; obteniéndose resultados precisos y en forma más rápida que la prueba oficial antes mencionada.

El objetivo de este trabajo es validar la prueba de C-ELISA para el diagnóstico de la enfermedad Anemia Infecciosa Equina y correlacionar los resultados frente a los obtenidos con la prueba de Coggins.

## II. HIPÓTESIS

No existe diferencia significativa entre la prueba de C-Elisa y la de Coggins para el diagnóstico de Anemia Infecciosa Equina.

### III. OBJETIVOS

#### 3.1 General:

- Contribuir a la disponibilidad y confiabilidad de nuevas pruebas serológicas para el diagnóstico de Anemia Infecciosa Equina en Guatemala.

#### 3.2 Específicos:

- Validar el método serológico de C-Elisa para el diagnóstico de Anemia Infecciosa Equina en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Comparar los resultados obtenidos de las pruebas de C-Elisa y de Coggins.

## IV. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1 DEFINICIÓN:

La Anemia Infecciosa Equina (AIE) es un padecimiento contagioso de los equinos ocasionado por un virus, que se caracteriza por presentar un curso crónico después de un ataque agudo inicial. La replicación periódica del virus en los macrófagos origina una anemia aguda mediada inmunológicamente (3,6,7,9,14,15,20,21).

### 4.2 SINÓNIMOS:

La Anemia Infecciosa Equina también es conocida como “Fiebre de los pantanos”, “Sida de los equinos”, “Anemia perniciosa de los equinos” o “Zurra americana”; entre otros (3,6,7,21).

### 4.3 HISTORIA DE LA ENFERMEDAD:

La Anemia Infecciosa Equina fue identificada en Francia en el año de 1843, y en los Estados Unidos de América en forma experimental en 1888. Esta enfermedad es históricamente importante debido a que fue la primera enfermedad equina causada por un virus filtrable, el cual pudo sobrevivir y mantenerse infeccioso aún pasándolo a través de un procedimiento de filtro especial de laboratorio. Es la primera enfermedad causada por un *retrovirus* que se ha comprobado ser transmitida por insectos; y la primera enfermedad viral para la cual se ha aprobado una prueba diagnóstica (8,12). En 1904 se determinó

la etiología viral de la enfermedad (10). Desde que Coggins y Leroy descubrieron la prueba diagnóstica en el año de 1970 y que el Gobierno de los Estados Unidos de América, en Noviembre de 1972 la reconoció como la prueba oficial para la detección de animales portadores del virus de la enfermedad, se ha reducido la cantidad de brotes clínicos y fue de importancia económica, ya que también redujo el costo del diagnóstico y el tiempo en procesar la muestra (15).

#### 4.4 ETIOLOGÍA:

El virus causante de la Anemia Infecciosa Equina es clasificado como un retrovirus, incluyéndose dentro de los llamados **slow viruses**, es denominado *Lentivirus*, el cual pertenece a la familia *Retroviridae*. (6,8,10,11,13,14,20,21,22). Se ha clasificado de esta manera en base a su secuencia de ácido nucleico, la actividad de la transcriptasa reversa y reactividad serológica cruzada (9). El ácido nucleico que contiene es Ácido Ribonucleico (RNA), material genético con el cual produce el Ácido Desoxirribonucleico (DNA), que se incorpora en las células infectadas de los caballos (8,14).

Recientemente, el virus de la Anemia Infecciosa Equina ha sido reconocido como un tipo de lentivirus que causa enfermedades progresivas y mortales (12).

Este virus no es infeccioso para los animales de laboratorio (15), y ha sido el primer virus que in vitro, muestra relación con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) causante del Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida –SIDA–, a través de reacciones cruzadas en pruebas de suero sanguíneo. Estos dos lentivirus comparten muchas fracciones estructurales y bioquímicas; el virus de la Anemia Infecciosa Equina ha sido de importancia como modelo a tomar para muchos aspectos de la investigación de la enfermedad de VIH, especialmente en el descubrimiento de los mecanismos comunes del control inmunológico. También

se relaciona con otros virus inmunodeficientes como el de los gatos y ganado, y con el virus de la artritis encefalitis caprina y el virus Maedi Visna de la ovejas (9,11).

Se han determinado varios serotipos antigénicamente diferentes y serológicamente identificables mediante la prueba de Neutralización Viral, existe tal grado de variación antigénica en este virus que probablemente haya serotipos no identificados. El virus puede cultivarse en leucocitos, células fibroblásticas de equinos y solamente se multiplica en macrófagos de equinos (6,10,12).

Algunas de las características físicas que este virus presenta son las siguientes: posee un tamaño de 80 a 130 nm, la simetría de la cápside es icosaédrica, presentando envoltura y el genoma es linear diploide de sentido +, RNA de 10 kb, el lugar de replicación del genoma es el núcleo y el lugar del ensamblaje viral es el citoplasma (12). El RNA viral es protegido y rodeado por varias proteínas como la nucleoproteína, nucleocápside, matriz y cubierta, con un número bajo de copias de la transcriptasa reversa en el centro de cada partícula (12).

La partícula viral está constituida por una proteína asociada con el genoma RNA. Alrededor de la célula hospedadora se derivan envolturas lipídicas las cuales están integradas con moléculas de glicoproteína virales específicas. El genoma del *retrovirus* está compuesto de dos hileras de codones RNA y varios genes accesorios (10). (Ver figura No. 1 y 2 del anexo No.1)

Este virus es relativamente resistente a la mayor parte de las influencias ambientales, así como a la ebullición durante 15 minutos y desinfectantes, pero es destruido por la luz solar. Persiste durante varios meses a la temperatura ambiente en orina, heces, sangre desecada y suero (6,15,23). También se ha encontrado en semen, saliva y leche (15,22,23). El virus está presente en todos los tejidos, secreciones y excreciones, y puede persistir en el organismo animal

hasta 18 años; lo que proporciona una fuente de infección para el resto de animales susceptibles. Sin embargo, el virus pierde efectividad fuera del organismo animal (15).

Con respecto a la resistencia de la acción física y química se determina lo siguiente: los lentivirus son inactivados a 50°C por 3 horas y a 60°C por 15 minutos, sobrevive en un pH entre 6.0 y 12.0 y en el ambiente sobrevive a 37°C durante 37 días (23).

Dentro de los productos químicos a los cuales los lentivirus son susceptibles se puede mencionar el éter y Beta propiolactona a una concentración de 0.4%; así como también son funcionales la formalina al 0.1%, fenol y los productos iodóforos (23).

Se pueden mencionar dos características importantes de los lentivirus con respecto a la composición genética; los lentivirus pueden infectar a las células que no se dividen y el genoma de los lentivirus codifican proteínas reguladoras, las cuales se encargan de la transcripción viral y el transporte del RNA viral (13).

Dentro de las propiedades patogénicas que presentan estos virus se puede mencionar lo siguiente:

- Los lentivirus persisten durante toda la vida del animal, esta característica depende de la habilidad de los virus para integrarse en los cromosomas del huésped, así como la de evadir la inmunidad del huésped, esto lo logran gracias al alto grado de mutación, llegando a infectar las células del sistema inmune (12,13,14).
- Los lentivirus tienen un alto grado de mutación, y son seleccionados por la respuesta inmunitaria del huésped (13).
- Debido a la inmunodeficiencia que induce el virus la enfermedad puede presentar variaciones en los signos clínicos de los distintos estadios (13).

La estructura y la función de las partículas virales del virus de la Anemia Infecciosa Equina son similares a la de otros lentivirus, la organización y la replicación del material genético es menos complejo. El RNA viral sirve como una plataforma para que la enzima viral transcriptasa reversa catalice la formación de una copia de ADN (ADN proviral), el que se integra con el material genético de las células del hospedador para permanecer de por vida (12).

Bajo condiciones óptimas, el ADN proviral codifica una variedad de proteínas virales, algunas de estas interactúan con el ADN proviral y son facilitadoras de la multiplicación del virus en las células hospedadoras. La síntesis viral completa requiere del proceso de transcripción de varias clases de RNA viral, algunas de ellas son proteínas reguladoras o proteínas estructurales y algunas pueden ser empacadas con las proteínas estructurales nuevas dentro de los viriones, los cuales vienen de las membranas celulares infectadas (12).

#### **4.5 RESERVORIOS DEL VIRUS:**

El virus está muy adaptado a los équidos y tiene su reservorio exclusivamente en las poblaciones hospedadoras infectadas, las que se constituyen por todos los solípedos, independientemente de cual sea la edad, raza o sexo (2,5,6,8,10,15,16,21,22,23).

Independientemente de la excreción del virus, todo portador del mismo se convierte en una fuente potencial de contagio para toda su vida, a pesar de generarse anticuerpos. Los caballos que muestran signos clínicos agudos de la enfermedad se constituyen como una potente fuente de transmisión del virus; sin embargo el virus se puede encontrar en la sangre de cualquier animal infectado sin importar los síntomas clínicos (15). La enfermedad clínica y la latente, no deja ninguna inmunidad protectora, por lo que los animales infectados pueden enfermar gravemente y morir al cabo de meses o años, inclusive tras largos

períodos apiréticos (5). Son más susceptibles los animales desnutridos, débiles y parasitados (6).

#### 4.6 FORMAS DE TRANSMISIÓN DE LA ENFERMEDAD:

##### 4.6.1 TRANSMISIÓN DIRECTA:

La transmisión directa del virus responsable de la Anemia Infecciosa Equina no se constituye como la principal forma de contagio, pero se menciona que la asociación continuada y estrecha de animales susceptibles con animales infectados sintomáticos y asintomáticos termina casi siempre en infección (6,8,10,19,22).

Debido a que el virus se elimina por las excreciones y secreciones de los animales infectados, se considera una posible fuente de contagio el agua y el pienso contaminado; aunque sería relevante, sí el animal presentara microlesiones en el tracto digestivo, constituyéndose así la puerta de entrada de dosis infectantes suficientes (5,13).

El virus puede invadir también el organismo por medio de la mucosa nasal o bucal, heridas, e incluso, por el tegumento indemne, pero estas puertas de entrada tienen poca importancia en los brotes de campo. Aunque se menciona que, sí hay penetración del *Retrovirus* al torrente sanguíneo por medio de abrasiones en la piel y de mucosas intestinales, éstas tienen que estar lesionadas para que el virus tenga contacto con el endotelio y se disemine hacia el torrente sanguíneo (11).

La transmisión del proceso infeccioso de un caballo a otro ocurre a través de instrumentos utilizados para recoger saliva para las pruebas de doping (6). La saliva, el semen y la orina son consideradas como vía de transmisión aunque

todavía no se ha probado su importancia en la transmisión directa del virus (1,9). Deberá considerarse también la posibilidad de contagio por medio del coito puesto que se consigue la transmisión experimental del virus mediante la inyección subcutánea de esperma proveniente de un semental infectado (8).

#### 4.6.2 TRANSMISIÓN INDIRECTA:

Este tipo de transmisión es el más importante en la propagación de la enfermedad. Al hablar de una transmisión indirecta se destaca dentro de los factores más importantes los vectores mecánicos del virus y la transmisión por medio de utensilios quirúrgicos no estériles, o el uso de agujas contaminadas con la sangre de otros caballos, en las distintas vías de inoculación. Dentro de los vectores mecánicos más importantes se encuentran los artrópodos hematófagos como las moscas tabánicas (*Tabanus*), moscas de los establos (*Stomoxys calcitrans*), los mosquitos (*Anopheles*), aunque estos últimos no son considerados tan importantes en la cadena epidemiológica de la transmisión de la enfermedad (18); así mismo, en caballos con heridas abiertas actúan también como vectores las moscas de aparato bucal lamedor (fam. *Muscidae*); por su parte los ácaros y garrapatas no tienen importancia como agentes transmisores de la enfermedad (3,6,8,10,13,19,15,16,21,22).

El piquete de los tábanos estimula un movimiento defensivo del caballo, el que usualmente resulta en la interrupción de la succión de sangre. Por lo que la mosca es motivada a completar el proceso de alimentación lo antes posible, y es cuando se da el ataque al mismo, o a otro hospedero, hasta quedar repleta. De esta manera cualquier material infectivo que provenga de la sangre del primer hospedero puede ser transmitido mecánicamente hacia el segundo (10,12). (Ver figura No.3 del anexo No. 1)

La transmisión del virus de la Anemia Infecciosa Equina por medio de insectos es dependiente del número y hábitos de los insectos, la densidad de la población equina, el número de veces que el insecto pica al mismo u otro caballo, la cantidad de sangre transferida entre caballos y el nivel del virus sanguíneo del caballo infectado (12,14).

En condiciones naturales, cuando un caballo se detecta que es positivo a la enfermedad por medio de las pruebas de laboratorio, convive con el resto de la población y en el entorno se localizan moscas tabánicas (las cuales pueden picar más de 1,000 veces por hora) es de esperar que se lleve a cabo la transmisión entre caballos (12).

#### **4.6.2.1 VECTORES Y SU CICLO DE VIDA:**

##### **4.6.2.1.1 TÁBANOS:**

Los tábanos (*Tabanus*) pertenecen a la familia *Tabanidae*, suborden *Brachycera*, estos insectos son grandes y robustos, con poderosas alas, ojos grandes. Dentro de los géneros más importantes de esta familia tenemos a los *Tabanus*, *Haemopota*, *Chrysops* y *Pangonia*. Los huevos son depositados en las proximidades del agua, normalmente sobre las hojas de las plantas. Las especies mayores ponen de 500 a 600 huevos y las menores 300. Las larvas eclosionan de cuatro a siete días y entran en el agua o en el fango desapareciendo en su interior durante dos o tres meses y a continuación pupan, este estado dura aproximadamente de 10 a 14 días. El ciclo biológico completo tiene lugar entre 4 y 5 meses en condiciones favorables, pero las bajas temperaturas prolongan el desarrollo. Los adultos se observan en verano y especialmente cuando el día presenta bastante luz solar. Son sumamente activos en los días calurosos. Las hembras son las hematófagas, y los machos se alimentan de la liga dulce de las plantas y de jugos florales, como también las hembras, si no disponen de un hospedador adecuado como los équidos y bóvidos. Los insectos se alimentan

sobre la cara interior del abdomen, ombligo o sobre las patas, cuello y cruces de los hospedadores. Pican unas cuantas veces en varios lugares antes de saciarse. Las pequeñas cantidades de sangre que normalmente salen de las heridas producidas por la picadura son succionadas por múscidos no picadores. Las moscas se alimentan cada tres días. Las picaduras de los tábanos son muy dolorosas e irritantes, pudiendo afectar al bienestar de los animales de piel fina (26).

#### **4.6.2.1.2 *Stomoxys calcitrans*:**

Pertenecen a la familia *Muscidae*, llamada también mosca de los establos, esta mosca pone de 20 a 25 huevos sobre materia vegetal húmeda en una sola vez, pudiendo alcanzar hasta un total de 800. Las larvas crecen y maduran en 14 a 24 días. La pupación dura de 6 a 10 días. La ovoposición se inicia aproximadamente a los 9 días de la emergencia de la mosca adulta, después de unas pocas tomas de sangre. El desarrollo completo del ciclo tiene lugar en aproximadamente 30 días. Tanto las hembras como los machos son hematófagos, necesitan de 3 a 4 minutos para realizar una toma, a menudo cambian de posición o vuelan hacia otro animal para seguir alimentándose (26).

#### **4.6.3 TRANSMISIÓN VERTICAL:**

Se ha comprobado la transmisión del virus desde la yegua infectada al potro (10,13,14,15), aunque no está todavía claro en qué momento ocurre dicha infección, si se da durante la gestación, o postparto durante la lactancia, pero es necesaria la ingestión de cantidades relativamente grandes de virus, ya que el aparato gastrointestinal no es una puerta de entrada apropiada (3,5, 6).

Los potros de madres infectadas son menos susceptibles a la infección natural que los adultos, esto debido a la persistencia de los anticuerpos colostrales en un período de 2 a 6 meses después del nacimiento (15). También

puede ocurrir el caso contrario en donde el potro pasivamente inmunizado desarrollará una enfermedad aguda mortal (6).

#### 4.6 PRESENTACIÓN DE LA ENFERMEDAD:

Los **portadores**, clínicamente normales son el medio por el cual se introduce casi siempre la enfermedad en zonas libres de ella, y la incapacidad para arraigar de forma permanente las áreas tras su introducción constituye una característica de la problemática de la Anemia Infecciosa Equina (5,6).

La Anemia Infecciosa Equina está difundida a escala mundial. Las diferencias en prevalencia e incidencia dependen de la densidad de población de équidos y de los resultados de las medidas de control. En los brotes naturales se observa la propagación lenta de la enfermedad a caballos susceptibles después de la incorporación de un animal infectado (6,10).

En Alemania no se han registrado casos seropositivos desde hace varios años. Se presenta en zonas húmedas de Australia, China, Japón e Italia. En Sudamérica y Centroamérica se describe en zonas tropicales o subtropicales donde abundan los zancudos. En Europa es más frecuente en las regiones septentrional y central. Se ha registrado también en América del Norte , pero las zonas enzoóticas más importantes se encuentran en la región de la costa del golfo y en las zonas boscosas del norte de Canadá. La incidencia es muy baja. La morbilidad varía mucho, y puede ser cercana al 100 por 100 en pequeñas zonas donde las poblaciones de caballos portadores e insectos vectores son particularmente densas. La tasa de mortalidad es, por lo general, cercana al 50 por 100, aunque nunca ocurre una verdadera recuperación en el sentido de que el animal ya no porte el virus, así los caballos una vez infectados lo estarán durante toda su vida (3,5,6,14,15).

Es notorio el aumento de la incidencia estacional de la enfermedad, observándose el mayor número de casos en verano, y guarda siempre la relación con las zonas de monte bajo y matorrales debido a que hay mayor número de insectos vectores en tales áreas (3,6).

En zonas enzoóticas se han producidos brotes por empleo de preparados biológicos, no tratados, de origen equino. En tales circunstancias todos los preparados biológicos producidos a partir de equinos deben esterilizarse por adición a fenol al 0.5 por 100 y almacenarse durante 3 meses antes de su uso (6).

#### **4.8 PATOGENIA:**

La respuesta inmunitaria que se produce en el organismo animal es la base del proceso de la enfermedad (3,21).

El primer paso en la invasión viral de una célula ocurre cuando el virus se une a los receptores de superficie celular, proceso denominado adsorción; una vez que éste se enlaza se introduce a la célula por endocitosis. Ya dentro, la cápside viral se rompe para liberar el ácido nucleico en el citoplasma celular, proceso que se conoce como descubrimiento. Una vez que se descubre el genoma viral, inicia el proceso de replicación, en el caso de los retrovirus el RNA se transcribe primero inversamente hacia DNA, proceso que se logra gracias a la enzima transcriptasa reversa. Como resultado se forma nuevo DNA viral el que entra en el núcleo celular y luego se integra en el genoma de la célula huésped como un provirus. Este provirus puede traducirse después en RNA, además de ser capaz de replicarse. Las proteínas y el RNA pueden colocarse en paquetes y formar un nuevo virión (29). (Ver Figura No. 4 del anexo No.1)

En la inoculación experimental el virus se encuentra en la sangre del equino infectado de 2 a 5 días después, y se observa la reacción febril hasta el décimo o vigésimo noveno días. El virus se localiza especialmente en bazo, hígado, riñón y ganglios linfáticos. El virus desaparece de los tejidos durante los períodos entre ataques clínicos graves. La viremia es persistentemente baja durante toda la vida del caballo, a excepción de los períodos de actividad clínica, que es cuando el animal es más infeccioso (3,6).

La infección por el virus produce daño a la capa íntima capilar, con afectación del sistema reticuloendotelial, produciéndose gran destrucción de eritrocitos. A las lesiones del endotelio le siguen cambios inflamatorios en los órganos parenquimatosos, sobre todo el hígado. Se producen cambios similares en el tejido nervioso desencadenándose ataxia, leptomeningitis espinal y encefalomiелitis, signos característicos en la presentación clínica de la enfermedad (6).

La enfermedad aguda se asocia con la duplicación masiva del virus y con la destrucción de macrófagos, aunque la causa de la muerte se desconoce (6).

La hemólisis se caracteriza por la breve duración de los eritrocitos, así como la fragilidad vascular y eritrocitaria forman parte de una reacción inmunitaria. El virus puede atravesar la barrera placentaria e infectar el potro fetal (6).

Todos los signos clínicos corresponden a la aparición de anticuerpos circulantes, los cuales son fijadores de complemento pero no neutralizantes del virus. El tercer componente del complemento aparece sobre las membranas de los eritrocitos y esto responde por el reconocimiento de los macrófagos y es cuando se produce la eritrofagocitosis. Los anticuerpos IgG e IgM no se encuentran fijados a los eritrocitos, pero se cree que reaccionan específicamente con el virus adsorbido en los eritrocitos. Hay un acortamiento del lapso de vida de

los eritrocitos hasta un 20 a 65% del período normal. La hemólisis es intracelular, aunque en la enfermedad aguda hay fragmentación de los eritrocitos debido al daño microvascular y a los niveles de haptoglobina disminuidos. La médula ósea se muestra al principio con una respuesta muy elevada, presentando una desviación hacia arriba en el volumen celular medio y anisocitosis marcada. Luego la médula se vuelve hipoproliferativa ( 21).

#### **4.8.1 RESPUESTA ANTIGÉNICA DEL HUÉSPED ANTE EL VIRUS:**

Un aspecto importante a tomar en cuenta de la patogenia de la Anemia Infecciosa Equina es la evasión que realiza el virus ante la respuesta inmunitaria del huésped, ya que los caballos recuperados del primer ataque de la enfermedad clínica, pueden permanecer normales durante semanas o meses. Generalmente ocurren 3 o 4 recaídas antes de que el equino desarrolle una enfermedad emaciante o crónica, o de que se vuelva clínicamente normal. Las recaídas cíclicas pueden estar separadas entre dos y ocho semanas. Cada acceso de la enfermedad tiende a ser menos grave que el anterior (fiebres más bajas y anemia menos intensa). El virus de la Anemia Infecciosa Equina (VAIE) sufre un alto índice de mutación aleatoria y en él se producen nuevas variantes genéticamente diferentes. La supervivencia de estas variantes está determinada por la presencia de anticuerpos neutralizantes en el suero del caballo. Conforme se producen cepas variantes del virus, los caballos infectados producen anticuerpos neutralizantes contra esa variante y, en consecuencia ese período de viremia termina. Las variantes del virus aparecen con rapidez y al azar, y la aparición de una nueva variante no neutralizable causa una nueva recaída de la enfermedad. Después de que el virus ha sufrido varias de estas mutaciones y cuando el caballo ha respondido a todas, el espectro de anticuerpos neutralizantes del suero del caballo se vuelve muy amplio y la viremia disminuye hasta alcanzar un nivel muy bajo. Es entonces cuando se examina una gran cantidad de tejidos para aislar el virus (29).

#### 4.9 SIGNOS CLÍNICOS:

El período de incubación es de 14 días, generalmente está comprendido entre 2 a 4 semanas en brotes naturales. La enfermedad se clasifica debido a su presentación clínica en la forma aguda, subaguda, crónica e inaparente; estadíos difícilmente de identificar entre sí (3,10).

Los signos que se presentan en las fases aguda y subaguda son de grado variable, generalmente es raro observarlas en situaciones naturales y son las formas de la enfermedad que más daño causan debido a que los signos aparecen rápidamente (11); Como regla general se observa depresión inicial, debilidad intensa y deterioro del estado general. La ataxia es un signo importante en muchos de los casos y en algunos es la única anormalidad clínica observada. Existe fiebre intermitente hasta 41°C, que puede elevarse y caer rápidamente, en algunos casos dura menos de 24 horas (8,10), con fluctuaciones hasta de 1°C en una hora. También puede observarse ictericia, edema de la porción ventral del abdomen, en el prepucio y extremidades, así como hemorragias petequiales de las mucosas vulvar, conjuntival y especialmente sublinguales, signo considerado como patognomónico de la enfermedad (5,22). En las etapas tempranas de la enfermedad las mucosas se observan congestivas y edematosas. Hay un aumento característico en la frecuencia e intensidad de los ruidos cardíacos, que se exacerba durante el ejercicio moderado. La disnea se observa en las etapas terminales, pero se puede presentar secreción nasal sanguinolenta (3,6,8,10,12,21).

La esplenomegalia es tan intensa que frecuentemente se palpa por exploración rectal. En las yeguas gestantes se puede presentar aborto. Muchos animales se recuperan de esta etapa aguda después de un curso de 3 días a 3 semanas. Otros se debilitan progresivamente, caen en decúbito dorsal y mueren después de 10 a 14 días de iniciados los signos clínicos de la enfermedad (6).

Los pacientes que se recuperan temporalmente pueden permanecer normales durante 2 o 3 semanas y luego recaen con signos análogos, generalmente menos graves. Las recaídas ocurren frecuentemente coincidiendo con períodos de stress, y se caracterizan por períodos febriles y recidivantes, adelgazamiento progresivo, debilidad e insuficiencia cardíaca; un signo tardío es la aparición de palidez de las mucosas (3,6,10).

La viremia se presenta durante todo el curso de la enfermedad e incluso durante toda la vida del caballo. Si el animal no muere en un período de 2 a 3 semanas la dolencia puede tornarse crónica y los animales virémicos recuperados se observan en buenas condiciones, algunos presentan episodios recurrentes y otros desarrollan la enfermedad crónica (3,8,10,12).

En la etapa crónica puede observarse alotrofagia. Algunos animales afectados parecen estar curados por completo, aunque pueden permanecer infectados y sufrir recaídas (6).

#### **4.10 PATOLOGÍA CLÍNICA:**

La anemia es severa y suficiente para causar la muerte con recuentos eritrocitarios muy bajos, de hasta  $1 \times 10^{12}$  por litro, hemoglobina de 25 a 50 g/litro y hematocrito de 0,08 a 0.15 litro/litro. Hay una trombocitopenia constante durante los períodos febriles, lo que constituye la base de las petequias. En las etapas tempranas de la enfermedad hay anisocitosis, con poquilocitosis moderada, característicamente ningún policromático. Los eritrocitos nucleados no están presentes en la sangre periférica. En la etapa temprana de un ataque agudo hay macrocitosis, a veces hasta un volumen celular medio de 60fl. Más tarde la enfermedad se vuelve normocromática, normocítica y no hay respuesta. Hay leucopenia y neutropenia, desviación mínima a la izquierda, linfopenia y una monocitosis relativa. Los monocitos con frecuencia contienen glóbulos rojos

ingeridos (sideroleucocitos). Los niveles de 4 por 10,000 sideroleucocitos constituyen un diagnóstico positivo de la enfermedad. Los sideroleucocitos están presentes en la sangre a los 2 o 3 días de un episodio febril y disminuyen con la temperatura. Los neutrófilos tienen cambios tóxicos moderados, con vacuolización y granulación azurófila. Las células mononucleares son grandes y basofílicas y es difícil distinguir los linfocitos de los de los monocitos jóvenes. Las plaquetas son pequeñas, uniformemente basofílicas, con un nivel bajo normal de granulación y las células inmaduras se encuentran con poca frecuencia (18).

La ictericia siempre está presente en los caballos anémicos y febriles y la bilirrubina está entre 170 y 250 mmol/litro; la mayor parte no está conjugada. Se observa lipemia ocasionalmente en la enfermedad aguda (18).

Con la cronicidad de la enfermedad hay una caída en la albúmina de aproximadamente 10 g/litro y se produce un aumento en la gammaglobulina de tal manera la proteína total permanece relativamente sin cambio y la relación albúmina/globulina está disminuida. El hierro sérico aumenta en la enfermedad aguda y cae con la cronicidad (18).

#### **4.11 HALLAZGOS A LA NECROPSIA:**

Los caballos que mueren durante el episodio febril muestran nódulos linfáticos agrandados, hepatomegalia, esplenomegalia, hemorragias mucosas y viscerales, edema subcutáneo ventral y trombosis (10).

Microscópicamente se observan linfocitos y macrófagos acumulados en las áreas periportales del hígado, de los nódulos linfáticos, bazo, glándulas adrenales y pulmones. Las células de Kupffer, médula ósea, células del bazo y nódulos linfáticos ocasionalmente presentan hemosiderina (10).

En la mayoría de caballos eutanasiados o que mueren naturalmente seropositivos a la enfermedad se observa microscópicamente glomerulonefritis con incremento celular y adelgazamiento de los glomérulos (10).

Los caballos con este tipo de anemia pueden presentar una meningoencefalitis. Las lesiones parecen iniciarse junto a los ventrículos y por debajo de la piamadre. En este proceso hay infiltraciones perivasculares constituidos principalmente por linfocitos. También, a veces, se pueden encontrar granulomas con células epiteloides y aún células gigantes en las proximidad de los vasos y hay proliferación de células de la microglía, así como degeneración de neuronas, con la consiguiente neuronofagia. El epéndimo puede presentar alteraciones importantes, que consisten en un edema a su alrededor, infiltración linfocitaria y formación de los granulomas. El epitelio ependimario puede desaparecer formándose elevaciones proliferas proyectadas hacia el exterior (1).

#### 4.12 DIAGNÓSTICO:

El cuadro clínico de la enfermedad es muy variable. Para emitir un diagnóstico resulta imprescindible la práctica de pruebas laboratoriales (6,8).

Antes del año 1970 el diagnóstico de la enfermedad era complicado y costoso, hasta que Leroy y Coggins describieron una prueba efectiva de anticuerpos específicos del virus de la A.I.E. La prueba de **Coggins** o de **Inmunodifusión en Agar de Gel –AGID–**, demostró una correlación con los resultados de las pruebas de inoculación a caballos para el virus de A.I.E, y por lo tanto la prueba resultó útil para el diagnóstico de animales portadores del virus (6,8,15,16).

La Organización Internacional de Epizootías (O.I.E.) recomienda como método de diagnóstico de elección la Inmunodifusión en Agar de Gel, o de

Coggins (Standard de O.I.E. de 1984), ya que es la única prueba que descubre con máxima seguridad a los portadores del virus sin manifestaciones clínicas. Si el resultado de la prueba de Coggins es claramente positivo en los équidos adultos el diagnóstico se considera confirmado independientemente de cuál sea el cuadro clínico (5,27).

Se dispone de otras pruebas diagnósticas, entre las que se pueden mencionar la de **ELISA** (Análisis de Inmunoabsorción Ligada a Enzimas, o **Ensayo complejo enzimático inmunoabsorbente**), la que actualmente se encuentra en el mercado es la prueba **C-ELISA** (ELISA de competición) y la prueba **SA-ELISA** (antígeno sintético) (11,13). Ambas pruebas detectan anticuerpos neutralizantes cerca de un mes después del primer período febril, los que persisten de forma indefinida (2,4,6).

Las pruebas de diagnóstico más sensibles son menos específicas, por lo que un alto porcentaje de reacciones positivas se espera que sean falsos positivos. La prueba de C-ELISA da los resultados el mismo día en que se procesan las muestras, por el contrario de la prueba de Coggins en la cual se puede saber los resultados 24 horas después de procesadas las muestras. Una de las desventajas que presenta la prueba de ELISA, es que debido a su alta sensibilidad puede arrojar resultados falsos positivos (12,14). En Chile la tendencia actual es reemplazar la prueba de Coggins por la prueba de ELISA (3).

Los resultados de falsos positivos o falsos negativos pueden ocurrir por varias razones, mencionándose entre ellas, el error humano en la colecta y mantenimiento de las muestras, o en la interpretación y reporte de los resultados (12).

La prueba de Western Inmunoblot es una técnica utilizada para detectar un espectro de anticuerpos de la superficie glicoprotéica gp90 y gp45, así como también la proteína coriónica p26; producidos por los antígenos del virus de la

Anemia Infecciosa Equina, y además, tiene el poder de distinguir anticuerpos de las distintas variedades de la proteínas del virus de la Anemia Infecciosa Equina debido a la separación física de la membrana (9,12,14).

Otra prueba menos utilizada es la de Inmunofluorescencia Indirecta que detecta la presencia del virus en los tejidos. En la prueba de Fijación de Complemento se puede medir un título incluso después de 2 o 3 meses después del ataque (2,4,6).

#### **4.12.1 DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO:**

La utilización de la epidemiología serológica y del diagnóstico serológico en estudios de investigación es de gran importancia, ya que se valoran variables presentes en el suero sanguíneo de poblaciones animales que pueden estar expuestas a una enfermedad y al agente etiológico de la misma. El principal componente del suero que se analiza es la actividad de las globulinas como anticuerpos específicos. Los anticuerpos sanguíneos son una evidencia de la exposición actual o anterior a los agentes infecciosos (27).

Los animales con títulos detectables de anticuerpos son seropositivos; aquellos otros que no tienen anticuerpos detectables son seronegativos y los animales que eran previamente seronegativos y que en la actualidad son seropositivos se dice que muestran una seroconversión (27).

Los caballos expuestos al virus de Anemia Infecciosa Equina generalmente desarrollan una respuesta inmune detectable al antígeno 45 días postinfección. Los antígenos principales reconocidos por el caballo son dos proteínas de envoltura, la gp90 y gp45, y la principal proteína es p26 (12).

Aunque los genes mutantes se desarrollan en distintas proporciones, éstos conservan la secuencia genética que se encuentra en todas las cepas del virus

causante de la enfermedad. Debido a esto, los laboratorios han utilizado las proteínas de envoltura del virus para detectar los anticuerpos generados por los caballos en respuesta a la infección con todas las cepas de campo (12).

Los anticuerpos precipitantes aparecen precozmente, al mismo tiempo que el anticuerpo de fijación de complemento, pero duran más tiempo, el mismo tiempo que persiste el anticuerpo neutralizante. El período entre la inoculación y la aparición de la positividad de las reacciones puede ser hasta de 45 días. Los potros que quedan pasivamente inmunizados reaccionan positivamente cuando absorben anticuerpos del calostro de la madre y los títulos se hacen negativos entre los 65 a 182 días de edad (6).

#### **4.12.1.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN PARA EL ANÁLISIS:**

Para realizar un diagnóstico serológico en animales sospechosos de padecer la enfermedad de Anemia Infecciosa Equina se debe utilizar únicamente suero de equinos. En el campo se debe realizar la colecta de sangre asépticamente por medio de venopunción y colocarla en tubos limpios sin anticoagulante. La sangre debe dejarse coagular durante 1-2 horas a temperatura ambiente, mantenerse en posición horizontal durante toda la noche a 4°C y, tras esto, debe separarse el suero mediante centrifugación a 2,000-3,000 rpm durante 15 minutos (19,27).

La reactividad de los anticuerpos a las técnicas serológicas puede verse afectada por un almacenamiento deficiente de las muestras, a consecuencia de la alteración de las moléculas de las inmunoglobulinas. Por eso se cuentan con dos técnicas de conservación: la ultracongelación y la liofilización. En el caso de la primera, existen cuatro opciones:

1. Fase líquida de nitrógeno líquido: -196°C,
2. Fase de vapor de nitrógeno líquido: -110°C,

3. Ultracongelación: de  $-70^{\circ}\text{C}$  a  $-90^{\circ}\text{C}$ , y
4. Ultracongelación estándar: de  $-20^{\circ}\text{C}$  a  $-40^{\circ}\text{C}$  (18,25).

La conservación prolongada de anticuerpos puede conducir a la formación de fragmentos Fab monovalentes, lo que da lugar a la pérdida de anticuerpos específicos; la congelación y descongelación repetidas tienen efectos deletéreos y la utilización de crioprotectores y enzimas reduce o elimina el deterioro de las muestras. Así se ha demostrado que la conservación ininterrumpida a  $20^{\circ}\text{C}$  es un procedimiento satisfactorio, existiendo una disminución muy escasa de la actividad específica durante, al menos 2 años (27). Las muestras antes de analizarse deben ser almacenadas a temperatura de refrigeración entre  $2^{\circ}\text{C}$  a  $8^{\circ}\text{C}$  hasta por 5 días y si se almacena por más tiempo la temperatura deberá estar a  $-20^{\circ}\text{C}$  (19,27).

Los sueros congelados deben ser descongelados antes de su uso y utilizarse inmediatamente, ya que todo retraso conduce a un aumento de la tasa de proteólisis. Se deberá de mezclar las muestras varias veces antes de usarlas. Si la muestra presenta turbidez, hemólisis o indicios visibles de crecimiento bacteriano no hay que utilizarla ya que puede interferir con el rendimiento y exactitud del análisis serológico (18,25).

#### **4.12.1.2 PRUEBA DE INMUNODIFUSIÓN O DIFUSIÓN EN GEL:**

Es una prueba de unión secundaria en la cual la reacción entre antígeno y anticuerpo va seguida de una segunda reacción, en este caso la precipitación de los complejos antígeno y anticuerpo (29).

La prueba de Coggins o de Inmunodifusión en Agar de Gel (AGID), es un método confiable de difusión en gel que se usa para detectar anticuerpos

específicos formados entre 10 y 30 días después de la infección con el virus de la Anemia Infecciosa Equina (19,27,29).

Desde 1970, este método de diagnóstico detecta la presencia de anticuerpos contra la proteína p26 (12) y determina la existencia de precipitinas presentes en el suero de caballos infectados, se utiliza como antígeno cultivos tisulares del virus (6). En el antígeno purificado del virus se detecta anticuerpos contra el virus de la Anemia Infecciosa Equina analizando suero de caballos infectados. El uso de estos antígenos altamente purificados elimina las líneas de precipitina no específicas de la prueba (19).

El desplazamiento de los anticuerpos hacia sus respectivos antígenos en un agar de gel da lugar a la formación de líneas de precipitina. En sueros fuertemente positivos, puede visualizarse líneas de precipitina de identidad como una continuación de la línea entre el suero del control y el pocillo de antígeno central. En los sueros débilmente positivos la línea del suero de control forma una curva, orientada hacia el pocillo de antígeno. Si el suero es negativo, no se forma ninguna línea de precipitina de identidad (19). (Ver figuras No. 5 y 6 del anexo No.1)

Los resultados que emite esta prueba de diagnóstico son los siguientes:

- Sí el suero es negativo, las líneas de precipitina del control se dirigen en línea recta al pocillo de la muestra negativa o se curvan ligeramente de vuelta hacia los pocillos de control,
- Sí el suero es débilmente positivo, las líneas de precipitina de control se topan con el pocillo de muestra pero se curvan en sentido opuesto de los pocillos de control, las unas con las otras, Y
- Sí el suero es fuertemente positivo, las líneas de precipitina de control se curvan en dirección de las unas a las otras antes de llegar

- a los pocillos del suero de prueba. Es posible que estén conectadas por una línea de precipitina ancha y difusa próxima al pocillo del antígeno. Puede detectarse una línea más nítida si el suero se diluye dos veces en secuencia y se vuelve a analizar (19).

Para realizar dicha prueba se cortan dos pozos de unos 5 mm de diámetro en una capa de agar, con una separación aproximada de 1 cm. Un pozo se llena con antígeno soluble y el otro con antisuero; los reactivos se difundirán en forma radial. Cuando estos reactivos se encuentren en proporciones óptimas, aparecerá una línea blanca opaca de precipitado (29).

#### **4.12.1.3 TÉCNICA DE ENZIMOINMUNOENSAYO:**

La técnica de Elisa está clasificada dentro de las pruebas de unión primaria, ya que en ella se lleva a cabo un combinado de antígeno y anticuerpo, y luego se mide la cantidad de complejos inmunitarios formados (29).

Esta prueba se basa en la cuantificación de una reacción enzimática asociada a la formación de complejos inmunes, la cual combina la especificidad de los anticuerpos con la sensibilidad de un simple ensayo enzimático, mediante el uso de anticuerpos o de antígenos unidos a una enzima fácilmente detectable (2,17). Como anteriormente se mencionó, la detección es posible gracias a la conversión enzimática de un sustrato en un producto coloreado. La técnica de ELISA fue desarrollada por primera vez en 1971, usa un conjugado enzima-anticuerpo y hace posible la detección y cuantificación específica de antígenos o anticuerpos en la solución. La técnica tiene como base una reacción colorimétrica en la que se relaciona la absorbancia del compuesto coloreado formado, con la concentración de la muestra (2).

La prueba de ELISA ofrece una serie de ventajas:

- No usa compuestos radioactivos,

- Menor equipamiento,
- La sensibilidad que posee la prueba de ELISA se compara con la que se obtiene al utilizar métodos complejos como RIA (Radioinmunoensayo), y
- Puede ser fácilmente desarrollado y validado para una nueva sustancia (2,4).

La prueba de ELISA se puede utilizar para cuantificar cualquier antígeno, basándose en el siguiente concepto: detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción, cuyo producto, puede ser medido espectrofotométricamente (4).

Al utilizar cantidades conocidas de antígeno estándar sin marcar, se genera una curva estándar que relaciona la absorbancia (del producto coloreado formado) con la cantidad de antígeno. De esta curva se puede determinar por medio de cálculos sencillos la cantidad de antígeno que hay en la muestra problema (2,8).

Los dispositivos utilizados en la técnica de ELISA son los siguientes: microplacas de 96 pocillos de plástico tratado para aumentar la capacidad de absorción de moléculas con fondos de pocillo ópticamente claros para poder realizar las medidas de densidad óptica en los lectores ELISA, estos lectores son espectrofotómetros capaces de realizar lecturas seriadas de cada uno de los pocillos de la placa ELISA. A diferencia de un espectrofotómetro convencional, con capacidad de leer todas las longitudes de onda ultravioleta, los lectores ELISA disponen de sistemas de filtros que sólo permiten la lectura de una o pocas longitudes de onda, las cuales son las necesarias para determinar la densidad óptica de los cromógenos comúnmente utilizados (4).

El ensayo ELISA consta de 4 fases:

1. Conjugación del anticuerpo o del antígeno con una enzima,
2. Luego se da la unión del antígeno o anticuerpo a los pocillos, lo cual se realiza fácilmente debido a que la superficie de plástico tratado tienen gran afinidad por proteínas, unión del antígeno (o anticuerpo) a la placa, en donde se da la formación de inmunocomplejos,
3. Revelado de la reacción enzimática, la cual se da después de realizar un lavado de moléculas marcadas no fijadas en forma de inmunocomplejos y se añade el sustrato enzimático en solución, y
4. Se deja reaccionar y se lee la densidad óptica mediante espectrofotometría (4,9). (Ver figura No.7 del anexo No. 1)

#### **4.12.1.3.1 DISTINTOS TIPOS DE ELISA:**

##### **4.12.3.1.1 ELISA INDIRECTO:**

Para realizar dicha prueba se cubren con una capa de solución de antígeno pequeños pozos preformados en placas de poliestireno. Los antígenos proteínicos se unen con firmeza a este material, de modo que el antígeno no unido pueda después extraerse aplicándole un lavado enérgico. Esto permite que los pozos de la placa permanezcan revestidos del antígeno. Las placas así cubiertas pueden guardarse hasta el momento en que se necesiten. El suero que se habrá de probar se coloca dentro de los tubos, de manera que los anticuerpos específicos del suero puedan unirse al antígeno que se encuentra fijo a las paredes de los tubos. Después de la incubación y del lavado para extraer al anticuerpo no unido, la presencia de los anticuerpos que se unieron se puede detectar agregando antiglobulina (inmunoabsorbente) ligada químicamente a una enzima. Este complejo se une a los anticuerpos y, después de la incubación y del lavado, se detecta y mide con sólo agregar el sustrato para la enzima correspondiente. La enzima y el sustrato se seleccionan de una manera que en cada tubo se

produzca un producto que tenga un cierto color. La intensidad del color será proporcional a la cantidad de antiglobulina ligada a la enzima que se haya captado, la cual a su vez, será proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en el suero que se está analizando. La intensidad del color se estima a simple vista o, aún mejor, mediante espectrofotometría (29).

#### **4.12.1.3.1.2 ELISA DE ANTIGENO MARCADO:**

Esta variante es la que se encuentra en los estuches de diagnóstico comerciales. El antígeno se une a la placa antes de la prueba. Se agrega el anticuerpo que va a ser probado, lo cual va seguido de varios lavados con antígeno marcado. El anticuerpo se une a la placa del antígeno marcado (29).

Existen estuches comerciales que utilizan placas de poliestireno con micropozos, o con filtro de membrana. El filtro se puede cubrir con anticuerpos y también puede utilizarse para detectar antígenos. Una ventaja del uso del filtro de membrana es que el anticuerpo se puede unir a una parte del filtro, mientras que los testigos positivos y negativo pueden colocarse en otros puntos del mismo filtro. El resultado puede leerse como un punto de color, el cual se compara con los testigos positivo y negativo adyacentes (29).

#### **4.12.1.3.1.3 SISTEMA COMPETITIVO DIA™ ELISA (AIE C-ELISA):**

Esta prueba fue aprobada por el gobierno de Estados Unidos de Norte América en 1986, como la segunda prueba de laboratorio en importancia para la detección de anticuerpos contra el virus de la Anemia Infecciosa Equina (15).

Este sistema es rápido y específico para la detección de anticuerpos séricos de Anemia Infecciosa Equina en caballos. El antígeno purificado de AIE y los anticuerpos monoclonales p26 son utilizados para reducir reacciones no

específicas comúnmente encontradas en las pruebas de ELISA. La correlación entre los sistemas Dia AIE C-ELISA y el AIE AGID es mayor al 99 por ciento (19).

El sistema DIA™ AIE C-ELISA contiene celdas plásticas cubiertas con anticuerpo monoclonal específico p26, el cual es el principal antígeno específico del virus de la Anemia Infecciosa Equina. El antígeno p26 ha sido conjugado con una enzima. El suero equino es incubado simultáneamente con el antígeno conjugado p26. Los anticuerpos séricos específicos p26 compiten con los anticuerpos monoclonales anti- p26 del antígeno de la enzima ligada purificada p26 (19).

Cuando los anticuerpos del virus de la Anemia Infecciosa Equina (VAIE) están presentes en una muestra de suero equino, estos previenen la unión del antígeno de la enzima ligada a la cubierta de anticuerpos monoclonales de los pozos plásticos, por lo tanto una muestra positiva dará como resultado poco o nada de coloración. Si un caballo es negativo a los anticuerpos del virus de la Anemia Infecciosa Equina, el antígeno de la enzima ligada se unirá a los anticuerpos monoclonales de los pozos plásticos. El color de la solución del sustrato cambia a azul oscuro, lo cual es indicativo que no hay presencia de anticuerpos específicos del virus de la Anemia Infecciosa Equina en el suero del caballo (19).

Para obtener una interpretación final del ensayo, el color de las muestras de los pozos se comparan con el color de los controles positivos (19). (ver figuras No.8 y 9 del anexo No. 1)

#### 4.13 TECNICAS ESPECTROSCOPICAS:

Desde hace muchos años se ha usado el color como ayuda para reconocer las sustancias químicas; al reemplazar el ojo humano por otros detectores de radiación se puede estudiar la absorción de sustancias (7).

Las técnicas espectroscópicas de análisis se basan en la observación de las interacciones entre la materia y la radiación electromagnética. De esta manera se determina la absorción de dicha radiación para detectar y cuantificar la presencia de ciertos analitos en una muestra. Las radiaciones electromagnéticas más utilizadas con finalidad analítica son las comprendidas en la región infrarroja, visible y ultravioleta. La especificidad de la detección del analito se basa en la selección de longitud de onda de la radiación emitida o absorbida (24).

La espectrofotometría se refiere a la medición de la cantidad de energía radiante que absorbe un sistema químico en función de la longitud de onda de la radiación, y a las radiaciones de una determinada longitud de onda. Esta es una de las técnicas más utilizadas para la detección de moléculas. Se caracteriza por su sensibilidad y aplicabilidad a distintas moléculas (23).

El espectro de absorción se refiere a la luz absorbida de una molécula en función de la longitud de onda y constituye la identidad de la molécula a analizar (23). Los espectros de absorción de las moléculas se miden mediante un aparato denominado espectrofotómetro (24).

Los instrumentos que miden la absorción de la luz visible se denominan colorímetros, mientras que los espectrofotómetros son los aparatos que miden la absorción de la luz ultravioleta y visible (24). El espectrofotómetro es un dispositivo que posee una fuente de radiación que se puede dirigir hacia una muestra que se espera absorba parte de esa radiación, la cual se puede detectar mediante un circuito que produzca una señal reproducible (análisis químico). Este consta de una fuente de luz blanca caracterizada por un espectro de emisión continuo en un intervalo amplio de longitudes de onda y de un monocromador que

actúa como un filtro óptico transmitiendo un haz de luz de longitud de onda fija e intensidad. Este haz de luz penetra en la cubeta de análisis donde se encuentra la muestra. Un detector sensible mide a la luz la intensidad del haz a la salida y un sistema electrónico se encarga de calcular la relación entre la intensidad de la radiación emitida por la fuente y la intensidad de la radiación recibida por el detector (7,23,24).

La utilización de la absorbancia al realizar los espectros tiene la ventaja de ser directamente proporcional a la concentración de moléculas en la muestra (24).

## TEORIA DE LA ABSORCION MOLECULAR

Todas las moléculas poseen un nivel de energía. A temperatura ambiente, la mayoría de las sustancias se encuentran en su nivel energético mas bajo denominado estado fundamental. Cuando una onda electromagnética interacciona con una molécula, la energía de dicha onda puede resultar absorbida si coincide exactamente con la energía necesaria para llevar la sustancia química desde el estado fundamental hasta algunos de los niveles energéticos superiores (24).

Lambert y Beer dedujeron la relación entre la medida de absorción, el espesor de la sustancia absorbente y la cantidad de sustancia que absorbe. Se evidencia un crecimiento exponencial de la absorción de la radiación en función tanto del espesor de la región absorbente como de la cantidad de esa especie. La espectrofotometría utiliza estas relaciones para cuantificar la presencia de una especie absorbente (23).

#### **4.14 VALIDACION DE PRUEBAS SEROLOGICAS:**

Para validar una prueba serológica a nivel de laboratorio se tiene que tomar en cuenta una serie de procesos relacionados entre sí; como los que a continuación se mencionan. Debe ser un proceso experimental, ya que en esta etapa se optimizan los reactivos y protocolos para detectar la sustancia analizable con exactitud y precisión. Debe ser un proceso relativo, ya que la sensibilidad y especificidad de diagnóstico del ensayo se calculan con respecto a los resultados del ensayo sobre poblaciones de animales de referencia cuyos antecedentes y eventual infección o exposición se conocen. Debe ser un proceso condicionado, ya que la clasificación de los animales de la población diana está condicionada en la medida en que la población animal de referencia usada para validar el ensayo sea representativa de la población a la que se le aplicará la prueba. Debe ser un proceso acumulativo, ya que la validez de un ensayo se incrementa con el tiempo, a medida que el uso de la prueba demuestra la exactitud y la precisión de sus

resultados. Y por último debe ser un proceso continuo, ya que el ensayo es válido únicamente mientras siga proporcionando resultados exactos y precisos, lo que se verificará por técnicas estadísticas (19).

#### **4.15 TRATAMIENTO:**

No existe tratamiento específico alguno. La terapéutica de sostén, que incluye transfusiones sanguíneas y administración de fármacos hematógenos puede facilitar la recuperación clínica; por razones legales este tratamiento no está recomendado (6,14). El estudio del efecto inmunoestimulante que tiene el Levamisol sobre caballos infectados con el virus de Anemia Infecciosa Equina durante 30 días y 2 aplicaciones diarias a una dosis de 2 mg/kg demostró un efecto inmunoestimulante por encima de los valores fisiológicos (16). A pesar de que se ha tenido una amplia investigación sobre el desarrollo de una vacuna segura y efectiva para proteger a los équidos de la infección de este virus, no se

ha tenido el éxito esperado, debido a que las vacunas utilizadas en experimentos no estimulan completamente la respuesta inmunológica; se ha demostrado que las vacunas vivas modificadas tienen mejor respuesta cuando la cepa utilizada es la misma del virus de la Anemia Infecciosa Equina, sin embargo, la aparición de signos clínicos sigue siendo un problema con algunas subunidades utilizadas en vacunas recombinantes. Otra desventaja del uso de vacunas sería la interferencia con los controles serológicos que muchos países han adoptado para mantener controlada la enfermedad, aunque en China se está trabajando en una vacuna que viene equipada con un marcador que diferencia las cepas de campo y de las vacunales a la hora de realizar muestreos serológicos (13).

#### **4.16 CONTROL:**

Debido a que en el curso de la infección natural los anticuerpos formados no garantizan ninguna protección inmunitaria, hasta el presente no se ha podido disponer de una inmunoprofilaxis eficaz, ni de una terapia efectiva. Por lo que todas las medidas de lucha se concentran, en descubrir y eliminar los reservorios del virus, así como de evitar la difusión de éste y erradicarlo paulatinamente (5,6,9,11).

El desarrollo en 1970 de la técnica de difusión en gel para la detección de anticuerpos frente a la Anemia Infecciosa Equina dio lugar a la regulación del movimiento controlado de caballos seropositivos en Estados Unidos de Norte América (15).

La prueba de Coggins ha arrojado resultados exactos y es tomada como base para un programa de erradicación. Con excepción de los potros se acepta que ésta prueba es sinónimo de infección y de infecciosidad. La única limitación identificable de la prueba es su incapacidad para señalar casos que se

encuentran aún en el período de incubación, en el que los animales todavía no muestran signos clínicos y que tal vez mueran durante este período (6).

Pueden presentarse resultados débilmente positivos en la prueba de Coggins:

1. En potros sanos que vehiculen todavía anticuerpos maternos persistentes; (un segundo análisis realizado 2 meses después del destete, en el quinto mes de vida, arrojará resultados claramente negativos),
2. En équidos infectados y en período de incubación (el segundo análisis efectuado entre 15 y 20 días después arrojará resultado claramente positivo), y
3. En animales con la infección latente (el segundo análisis da por lo regular el mismo resultado débilmente positivo) (5).

Las medidas protectoras de territorios libres de la enfermedad son las siguientes:

1. Se prohibirán las importaciones y tránsito de équidos procedentes de territorios con la enfermedad enzoótica (5).
2. En cada importación de solípedos exigirá el país importador del exportador, un certificado oficial internacional en el que se haga constar que no más de 5 días antes de efectuar el transporte:
  - Los animales se encontraban libres de signos clínicos de la enfermedad,
  - Los animales permanecieron como mínimo durante los 3 meses últimos en su establecimiento de origen, el cual, lo mismo que un entorno de 30 km, están libres de Anemia Infecciosa Equina desde 12 meses antes,
  - Los animales arrojarán resultado negativo a la prueba de Coggins de 30 a 45 días antes de su exportación,

-

- Los animales que permanezcan corto tiempo en el país por motivo de exposiciones y concursos hípicas cumplirán con los requisitos anteriores, y
- Los caballos que vayan a quedarse en el país se someterán como mínimo a una cuarentena de 28 días, en cuyo transcurso serán investigados serológicamente (5,7).

La validez máxima de la prueba de Coggins negativo debe fijarse de manera unitaria en 120 días. Al efectuarse vacunaciones y extracciones de muestras de sangre, en todas las poblaciones equinas es imprescindible utilizar en cada animal aguja y jeringa estériles de un solo uso (5,7).

#### Medidas a adoptar en los brotes de Anemia Infecciosa Equina:

Está contraindicado todo tipo de tratamiento de la enfermedad, ya que el animal, una vez infectado, se convierte en vehiculador del virus de por vida y con ello en una fuente de contagio. Todos los animales enfermos y todos los que den resultado positivo a la prueba de Coggins deben separarse inmediatamente del resto de animales y sacrificarse. Cuantos animales contactaron con ellos se deberán aislar de los demás caballos y se deben someter a control clínico y serológico. También se debe tener control sobre los insectos vehiculadores del virus (5,7).

#### Medidas en territorios con la enfermedad:

En áreas territoriales débilmente infectadas se eliminarán en seguida de la población todos los équidos con manifestaciones clínicas y serológicamente positivos; los animales que contactaron con ellos serán aislados. Se debe de minimizar el contacto de los caballos sanos con las excreciones y secreciones provenientes de los caballos infecciosos (11). Todos los traslados se controlarán mediante análisis serológicos, autorizándose únicamente si estos son negativos. En todos los casos los animales se someterán a una cuarentena de por lo menos

4 semanas en el establecimiento receptor. Los animales que den resultado positivo en el análisis serológico se eliminarán de inmediato. (5,7).

Mediante la eliminación progresiva de los animales seropositivos de la población remanente, junto con el aislamiento y posterior control de los animales en contacto, se irá reduciendo paulatinamente el número de équidos infectados presentes en el territorio, y por tanto los reservorios del virus (5,7).

Cuando se presente algún caso positivo en un área territorial, se deberán muestrear y realizar pruebas serológicas a todos los caballos restantes y los que den resultados negativos deberán volverse a muestrear en un período entre 30 a 60 días hasta que dejen de presentarse nuevos casos comprobados (11).

Como medida paliativa se recomienda drenar las zonas pantanosas y mantener el control de insectos. Es posible mantener cierto grado de protección mediante el uso de repelente de insectos y la colocación de telas metálicas en las ventanas de los establos. Debido a que el virus exhibe una marcada resistencia frente a las influencias físico-químicas, se hace necesaria una desinfección y limpieza escrupulosa con desinfectantes en concentraciones suficientemente altas para la destrucción del virus (5).

Para evitar la transmisión de la enfermedad por medio de instrumentos quirúrgicos, éstos deben esterilizarse siempre por ebullición durante 15 minutos o por medio de autoclave a 6.6 kg de presión durante el mismo tiempo. Las agujas hipodérmicas deben ser de uso único por animal a tratar y deben ser desechables. Para la desinfección de instrumentos y equipo de tatuaje es necesario sumergirlos durante 10 minutos en un recipiente con desinfectantes fenólicos poco corrosivos. Es necesario primero limpiar toda la sustancia orgánica de todos los materiales que se vayan a desinfectar. Para la desinfección personal son seguros el hipoclorito de sodio, el etanol o compuestos yodados, y para los

materiales las sustancias que han demostrado un buen resultado son la clorhexidina o los compuestos fenólicos combinados con un detergente (6).

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 MATERIALES

#### 5.1.1 Recursos Humanos

- Investigadora, responsable del proyecto.
- 4 asesores profesionales especializados.
- Personal técnico y profesional del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

#### 5.1.2 Recursos Biológicos:

- Suero sanguíneo de equinos adultos, provenientes de distintos departamentos de Guatemala. Los sueros se encuentran congelados en tubos de ensayo con tapón.

#### 5.1.3 Recursos de Laboratorio:

- Congelador.
- Refrigerador.
- Equipo para análisis de Anemia Infecciosa Equina (EIA-AGID)
- Equipo de C-Elisa para el diagnóstico de Anemia Infecciosa Equina.
- Micropipetas.
- Toallas de papel.
- Marcadores.
- Botellas con agua destilada.
- Perforadora.
- Incubadora.
- Lámpara de luz.
- Computadora y lector.

#### 5.1.3.1 Reactivos de la prueba de análisis de Anemia Infecciosa Equina (AIE-AGID)

- 1 ampolla de 3.9 ml. de antígeno de la Anemia Infecciosa Equina (AIE), conservado con azida de sodio (tapa negra).
- 1 ampolla 11.7 ml. de suero de control positivo para la Anemia Infecciosa Equina (AIE), conservado con azida de sodio (tapa roja).

#### 5.1.3.1.2 Materiales para la prueba de análisis de Anemia Infecciosa Equina (AIE-AGID)

- 1 litro de solución tampón.
- 1 litro de agua destilada.
- Solución de agar Noble al 1.0%.
- Cajas de petri de 100mm.

#### 5.1.3.2.1 Reactivos de la prueba C-Elisa para el diagnóstico de Anemia Infecciosa Equina:

- 1 frasco de 6 ml de Control Negativo (banda roja)
- 1 frasco de 6 ml de Control Positivo (banda azul)
- 1 frasco de 6 ml de Antígeno Conjugado VAIE (banda morada)
- 1 frasco de 12 ml. de Solución de Substrato (banda negra).

#### 5.1.3.2.2 Materiales de la prueba C-Elisa para el diagnóstico de Anemia Infecciosa Equina:

- 1 placa de 96 pozos cubiertos de anticuerpo monoclonal específico para p26 (VAIE)
- Toallas de papel.
- Micropipetas.

#### 5.1.4 CENTROS DE REFERENCIA:

- Biblioteca de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Internet.

## 5.2 METODOLOGÍA A SEGUIR:

### 5.2.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

El estudio “Validación de la prueba de C-Elisa para el diagnóstico de Anemia Infecciosa Equina en Guatemala” se llevó a cabo en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Los sueros a estudiar se encontraban en el laboratorio de dicho departamento bajo condiciones de congelación para su buen almacenamiento y conservación en un medio propicio para realizar estudios posteriores con pruebas serológicas. Dichos sueros se almacenaron durante el período comprendido de enero a noviembre del año 2005, provenientes de equinos adultos de distintas razas, originarios de los departamentos de: Chimaltenango, Guatemala, Escuintla, Sacatepéquez, Jutiapa, Izabal, Jalapa, Santa Rosa, Quetzaltenango, El Progreso, Suchitepéquez, Chiquimula, Alta Verapaz, San Marcos, Totonicapán, Petén, Retalhuleu, Zacapa, Quiché, Sololá y Huehuetenango; además, existen en el registro del Departamento de Microbiología muestras sin definir su procedencia. El sexo de los animales no es relevante para dicho estudio, sin embargo la edad sí, ya que se tomó en cuenta únicamente a los animales adultos.

El total de las muestras recibidas en el laboratorio durante el período de enero a noviembre del año 2005 fue de 1101. Presentando el departamento de Chimaltenango 9, Guatemala 105, Escuintla 116, Sacatepéquez 26, Jutiapa 75, Santa Rosa 302, Izabal 19, Jalapa 3, Quetzaltenango 10, el Progreso 4, Suchitepéquez 124, Chiquimula 12, Alta Verapaz 1, San Marcos 16, Totonicapán 1, Petén 63, Retalhuleu 183, Huehuetenango 3, Quiché 3, Sololá 1, origen no registrado 5. Estos datos se recopilaron de los protocolos de registro de muestras para análisis que existe en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. (Ver cuadro No. 1 y gráfica No. 1)

### 5.2.1.1 MÉTODO ESTADÍSTICO:

5.2.1.1.1 Se realizó un estudio doblemente a ciegas.

5.2.1.1.2 Análisis de resultados:

- a. Se creó una hoja de resultados en la cual iba descrito el número de la muestra según el protocolo de referencia del Departamento de Microbiología y los resultados de cada muestra de suero sometido a las pruebas de Coggins y C- Elisa,
- b. Los resultados que se obtuvieron por medio de la prueba de C-ELISA fueron variables cualitativas que se observaron por medio de colorimetría siendo éstas positivo y negativo, así como también se obtuvieron variables numéricas siendo éstas las concentraciones de absorbancia de las distintas muestras sometidas a espectrofotometría con un filtro de 650 nm,
- c. Los resultados que se obtuvieron utilizando la prueba de Coggins fueron variables cualitativas que se observaron por medio de líneas de precipitina en las placas de agar; siendo éstas positivo, negativo y positivo débil, y
- d. Se determinó si existe diferencia entre los resultados de las variables positivas de ambas pruebas utilizando las fórmulas estadísticas de DIFERENCIA DE PORCENTAJE y  $\chi^2$ .

### 5.2.1.2 MÉTODO DE LABORATORIO:

- Una vez establecido el número de muestras a estudiar, se adquirió la prueba de C-ELISA para diagnóstico de Anemia Infecciosa Equina.
- Se realizó el estudio doblemente a ciegas, se escogieron los sueros a estudiar en una forma aleatoria, sin tomar en cuenta el origen o el sexo de los animales,
- Una vez teniendo los sueros descongelados y numerados de 1 a 92, se procedió a realizar la prueba de C-ELISA; la cual se trabajó y se obtuvieron los resultados en un lapso de 2 horas, y
- De la misma manera se sometieron los sueros a la prueba de Coggins; la cual demostró los resultados en un lapso de 48 horas.

### 5.2.3.1 Procedimiento de análisis de AGID:

1. Se preparó un litro de solución tampón con 2 g de hidróxido de sodio (NaOH) y 9 g de ácido bórico ( $H_3BO_3$ ) se agregó 1 litro de agua destilada y se ajustó el pH a 8.6  $\pm$  0.1,
2. Se preparó una solución de Agar Noble al 1.0% de la siguiente manera: se puso a hervir la suspensión para disolver el agar y luego se esterilizó el líquido por autoclave durante siete minutos. También se puede colocar la solución de agar en un horno de microondas donde se calentará en intervalos de 30 segundos por un máximo de 3 minutos, hasta que se disuelva el agar,
3. Se agregó 15 ml de agar líquido a una caja de petri de 100 mm de diámetro,

4. Las placas de agar se enfriaron durante una hora a temperatura ambiente y luego se almacenaron entre 2°C y 8°C,
5. Se perforaron 7 fositos, con el fosito central rodeado de 6 fositos. Los fositos tienen un diámetro de 5.3 mm y una separación de 2.4 mm,
6. Colocación del suero y el antígeno en los fositos:
  - Se colocó 30 microlitros de los sueros problema en los tres fositos exteriores,
  - Se llenó el fosito central con 30 microlitros de antígeno purificado de la misma forma,
  - Se llenaron los tres fositos exteriores restantes con suero control positivo, y
  - Se incubaron las placas de petri con agar durante 48 horas a 30 °C. en una cámara húmeda.

#### **5.2.3.2 Procedimiento de análisis C-ELISA:**

- 1.- Se requiere el número de fositos a utilizar, se rotuló y se colocó la placa en un lugar seguro. Se utilizó un fosito por muestra de suero y dos fositos para las muestras control,
- 2.- Se utilizaron fositos y puntas de pipetas individuales para cada muestra de suero. Se debe colocar 10 microlitros de cada muestra de suero dentro de los fositos rotulados, 10 microlitros del control negativo (banda roja) y 10 microlitros del control positivo (banda azul) dentro de los respectivos fositos,
- 3.- Se colocaron 50 microlitros de antígeno conjugado VAIE (banda lavanda) dentro de todos los fositos,

- 4.- Se homogenizó el contenido de los fositos de la placa dando pequeños golpes 10 veces,
- 5.- Se incubó la placa por 30 minutos a una temperatura de 37° C,
- 6.- Se removió el reactivo de los fositos y se colocó la placa seca en una toalla de papel limpia. Se debe inclinar la placa hacia la persona que está realizando la prueba a un ángulo de 45°. Empezando desde la fila inferior y con un movimiento de lado a lado, luego se inundan los fositos con agua desionizada.

Se aseguró de que cada fosito estuviera completamente lleno y que no quedaran burbujas de aire atrapadas. Se quitó el agua y se repitió 5 veces este último paso. Se Colocó la placa con los fositos secos en una toalla de papel después del enjuague final,

- 7.- Se colocaron dos gotas de la Solución Substrato (banda negra) dentro de los fositos,
- 8.- Se homogenizó nuevamente la placa dando pequeños golpes 10 veces,
- 9.- Se incubó la placa durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se observó el cambio de color, y
- 10.- La interpretación los resultados se realizó por medio de los cambios de color observados en los fositos, y también utilizando un espectrofotómetro con un filtro de 650 nm.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvo un total de 92 sueros, los cuales se tomaron al azar, para analizarlos con las pruebas de C-Elisa y Coggins y determinar la presencia de anticuerpos séricos contra el virus de la Anemia Infecciosa Equina.

Al someter las 92 muestras de suero equino al Sistema Competitivo DIA ELISA (AIE C-Elisa) y al cabo de 2 horas, se obtuvo que, 41% (38) de muestras dieron resultado negativo presentando una coloración azul; y que un 59% (54) de muestras dieron resultado positivo a la formación de complejos inmunes siendo éstas las que a simple vista no presentaron coloración en los fositos. El fundamento técnico de los resultados que esta prueba nos da, se basa en la competición que los anticuerpos séricos presentes en los caballos positivos, realizan en contra del anticuerpo monoclonal específico para la proteína denominada p26 que forma parte de la cubierta coriónica del virus de Anemia Infecciosa Equina, y es una proteína que a diferencia del resto, no muestra variación antigénica entre las cepas del virus (9,10). Las paredes de los fositos de la placa están revestidas con este anticuerpo monoclonal. En las muestras de suero que dieron resultado negativo a la presencia de anticuerpos contra el virus de Anemia Infecciosa Equina, el antígeno conjugado a la enzima (VAIE) se une a los anticuerpos monoclonales de la placa para poder alcanzar la formación del complejo inmune. En los sueros de los caballos que presentan anticuerpos circulantes contra el virus de Anemia Infecciosa Equina, la formación del complejo inmune se lleva a cabo con la unión del anticuerpo sérico y el antígeno conjugado a la enzima (VAIE) de la prueba de análisis (18,26). (Ver cuadro No. 2, tabla No. 1 y gráfica No. 2 de los anexos 4 y 5)

La coloración azul que presentan las muestras negativas de suero de equino analizadas, se debe a la conversión enzimática cuando se lleva a cabo la unión del anticuerpo monoclonal y del antígeno conjugado a la enzima (VAIE).

Por el contrario en las muestras que dieron un resultado positivo, no se observó un cambio en la coloración de las paredes de los fritos, debido a que no se llevó a cabo la unión del antígeno con los anticuerpos monoclonales de la placa, ya que los anticuerpos séricos se unieron con el antígeno inhibiendo de esta manera la conversión enzimática encargada de colorear las muestras.

La prueba de C-Elisa proporciona dos resultados por cada muestra analizada, siendo la primera cualitativa donde se determina a simple vista por el cambio de color en las celdas de la placa la presencia de anticuerpos contra el virus de Anemia Infecciosa Equina; y el otro resultado que se obtiene es la concentración de moléculas de anticuerpos contra el virus de Anemia Infecciosa Equina en cada muestra analizada. Esta concentración de anticuerpos se obtiene al ser sometida la placa a un espectrofotómetro que tiene un filtro con un espectro de luz visible de 650 nm. La longitud de onda es específica para el color azul que se observa en la placa de la prueba. Este aparato lo que hace es emitir luz visible a cada una de las celdas donde se encuentran las muestras y estas absorben cierta cantidad de energía y el aparato determina el haz de luz después de haber atravesado la muestra. Las muestras negativas se observan de color azul oscuro por lo tanto estas van a demostrar un comportamiento de interacción con la región visible del espectro electromagnético, de tal manera que absorben la radiación electromagnética a medida que esta la atraviesa. Por el contrario las muestras que dieron positivo no cambiaron de color y se mantuvieron las celdas transparentes, por lo tanto estas muestras no absorben la radiación de la región visible del espectro electromagnético (7,24). Las muestras coloreadas absorbieron mayor cantidad de luz que las muestras transparentes. La importancia de este análisis es que la absorbancia de una muestra es directamente proporcional a la concentración de moléculas de la misma, según la teoría de Beer-Lambert (7,23,24).

Las 54 muestras que salieron positivas al Sistema Competitivo DIA ELISA (AIE C-Elisa) denotaron un intervalo de porcentaje de absorción de 0.044 a 0.116 nm, y un rango de 0.072, presentando un promedio de 0.056 nm. al ser sometidas a un espectrofotómetro con un filtro de 650 nm. Y, las 38 muestras que salieron negativas denotaron un intervalo de porcentaje de absorción que va desde 0.586 hasta 1.446 nm., con un rango de 0.86 nm. y un promedio de 0.92 nm. Los controles positivos denotaron 0.335 y 0.372 nm, y los controles negativos 0.84 y 0.866 nm. de absorción. El filtro que se utilizó fue de 650 nm. (Ver cuadro No. 3 y gráfica No. 3 de los anexos No. 4 y 5). Las muestras negativas presentan mayor absorbancia y lo demuestran presentando una mayor concentración de complemento antígeno anticuerpo monoclonal. Y las muestras positivas demuestran menor absorbancia y menor concentración de anticuerpos contra el virus de Anemia Infecciosa Equina.

Al someter las 92 muestras de suero equino a la prueba de Coggins o de Inmunodifusión en Agar de Gel (AGID) y al cabo de 48 horas, se obtuvo que, un 48% (44) de las muestras dieron un resultado positivo, 40% (37) de las muestras dieron negativo y 12% (11) dieron un resultado positivo débil. Esta prueba está clasificada dentro de las pruebas de unión secundaria, ya que en las muestras de suero de los caballos que presentan anticuerpos circulantes contra el virus de la Anemia Infecciosa Equina, primero se lleva a cabo la unión del antígeno con el anticuerpo y durante el desplazamiento del anticuerpo hacia el fosito donde se encuentra el antígeno se lleva a cabo la formación de las líneas de precipitina, las cuales son el indicativo del resultado de la prueba (18,26), en este caso, también se utiliza el antígeno viral que contiene la proteína de cubierta p26. En las muestras que dieron un resultado negativo no se observó ninguna línea de precipitina, ya que estas no contenían anticuerpos circulantes. En el caso, de las muestras que dieron positivo débil, la formación de la línea de precipitina en el agar de gel se topó con el fosito de la muestra y se curvó con el fosito control. (ver

figuras 5 y 6 del anexo No. 1) En este estudio se utilizaron únicamente muestras de caballos adultos, por lo que se elimina la posibilidad de que el resultado de positivo débil, sea a causa de anticuerpos maternos persistentes, por lo tanto estos caballos deben ser nuevamente muestreados al cabo de 30 días (18,24, 26). La poca precisión de la línea de precipitina en el agar de gel se debe a que posiblemente el caballo se encontraba en período de incubación del virus de Anemia Infecciosa Equina; o, sí este no presentaba síntomas puede que sea portador del virus, en ambos casos la cantidad de anticuerpos séricos circulantes es menor a la cantidad que esta prueba requiere para determinar la muestra como positiva (5,18). (ver cuadro No 2, tabla No. 2 y gráfica No. 4 de los anexos 4 y 5)

De las 92 muestras de suero equino analizados con ambas pruebas se obtuvieron, 54 muestras positivas utilizando la prueba de C-Elisa y con la de Coggins se obtuvieron 44 muestras positivas. En cuanto, a los resultados negativos con la prueba de C-Elisa se obtuvieron 38 y con la de Coggins 37. Tras obtener los resultados de los 11 sueros de equinos que dieron positivo débil con la prueba de Coggins y, al someterlos a la prueba de C-Elisa, esta dio 10 casos positivos y 1 suero negativo. Por lo que se confirmó que las 10 muestras positivo débil presentaban anticuerpos circulantes contra el virus de la Anemia Infecciosa Equina, y que solamente 1 muestra no presentaba anticuerpos circulantes. (ver cuadro No. 4, tabla No 3 y 4, y gráficas No. 5 y 6 de los anexos 4 y 5)

Las ventajas de la prueba de C-Elisa que se constataron durante este estudio fue la menor cantidad de tiempo utilizado para obtener resultados y la alta sensibilidad que tiene la prueba, ya que este tipo de análisis puede detectar 0.0005 microgramos/ml de proteínas de anticuerpos presente en una muestra de suero en un lapso de 2 horas (25), en cambio la prueba de Coggins o de Inmunodifusión en Agar de Gel puede detectar cantidades mayores o iguales a 30 microgramos/ml de proteínas de anticuerpos en un período de tiempo de 48 horas

(25). Y poder cuantificar la concentración de anticuerpos circulantes por medio de la absorbancia.

Gracias a la alta sensibilidad que presenta la prueba de C-Elisa, se puede determinar los animales verdaderamente positivos, sin importar en el período patogénico en que se encuentren, es decir, esta prueba detecta a los animales que se encuentran en período de incubación del virus. Por el contrario de la prueba de Coggins, en donde los animales que se encuentran en dicho estado presentan resultados positivos débiles, teniendo que volver a realizar la prueba para confirmar el resultado pasados 45 días de la primera toma de muestra de sangre (18,24,26). Con respecto a la especificidad que ambas pruebas presentaron en este estudio, se observó que las dos determinaron un porcentaje muy parecido de animales verdaderamente negativos, ya que con la prueba de C-Elisa se obtuvo un 41% y con la prueba de Coggins se obtuvo un 40% de animales negativos. Estos no presentaban anticuerpos circulantes contra el virus de Anemia Infecciosa Equina; Sin embargo, se obtuvo el resultado de una muestra que dio positivo débil con la prueba de Coggins, y al someterla a la de C-Elisa dio negativo. Dentro de la metodología de este estudio no está estipulado la recomendación de volver a correr la prueba de Coggins pasados 20 días de la primera muestra (5), para determinar el estado inmunológico de este animal. (Ver gráfica No.6 del anexo No. 5 )

Según Cordes, T., Issel, C, (1996) y Berrios, P. (2006) la ventaja que tiene la prueba de C-Elisa en comparación con la de Coggins es la rapidez para determinar los resultados de los sueros a analizar, sin embargo; mencionan que la alta sensibilidad que esta presenta puede dar resultados falsos positivos. En el presente estudio se determinó que la utilización de esta prueba en animales adultos no dio resultados falsos positivos, por el contrario, definió a 10 de los animales que salieron positivos débiles a la prueba de Coggins como positivos con un promedio de absorbancia de 0.066 nm, lo cual es proporcional a la concentración de anticuerpos circulantes contra el virus de Anemia Infecciosa

Equina. Según estudios realizados por científicos de laboratorios IDEXX (2005), ambas pruebas tienen 99% de correlación. Y Berrios, P. cita que en el país de Chile la tendencia actual es la de reemplazar la prueba de Coggins por la prueba de C-Elisa.

El análisis estadístico que se utilizó en este estudio para relacionar los resultados de ambas pruebas incluyó a la Prueba de Diferencia de Porcentajes y a la Prueba de Independencia de  $\chi^2$ , ambas determinaron que no existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos con la prueba de Coggins y con la prueba de C-Elisa; utilizando grado de libertad 2 y significancia al 0.1 6.25, y 0.5 7.81. (Ver tabla No 4 del anexo No. 4)

## VII. CONCLUSIONES

1. El 59% de las muestras de sueros de equinos analizadas con la prueba de C-Elisa resultaron positivas a la presencia de anticuerpos contra el virus de Anemia Infecciosa Equina.
2. El 48% de las muestras de sueros de equinos analizadas con la prueba de Coggins resultaron positivas a la presencia de anticuerpos contra el virus de Anemia Infecciosa Equina.
3. El 12% de las muestras de sueros de equinos analizadas con la prueba de Coggins dieron como resultado positivo débil, y al someterlas a la prueba de C-Elisa, únicamente 1 muestra dio negativo ante la presencia de anticuerpos circulantes contra el virus de la Anemia Infecciosa Equina.
4. El promedio de porcentaje de absorción utilizando un espectrofotómetro de lectura de 650 nm. para las muestras que salieron positivas ante la prueba de C-Elisa es de 0.056 nm, para las negativas es de 0.92 nm y para las positivas débiles es de 0.066.
5. Las ventajas que presentó la prueba de C-Elisa sobre la prueba de Coggins en este estudio fue la rapidez para obtener resultados, la sensibilidad para definir a los animales que salen positivos débiles en la prueba de Coggins como positivos o negativos y la posibilidad de cuantificar la concentración de anticuerpos circulantes por medio de la absorbancia de las muestras al ser analizadas con un espectrofotómetro.

6. La sensibilidad de la prueba de C-Elisa es mayor a la prueba de Coggins, debido a que la primera puede detectar 0.0005 microgramos/ml de proteínas de anticuerpos, y la segunda puede detectar concentraciones mayores o iguales a 30 microgramos/ml.
7. Ambas pruebas dieron una especificidad parecida, ya que la prueba de C-Elisa determino 41 animales negativos y la de Coggins 40.
8. Las pruebas de C-Elisa y la de Coggins o de Inmunodifusión en Agar de Gel son equivalentes para validar el diagnóstico de la enfermedad Anemia Infecciosa Equina en Guatemala.

## VIII. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar estudios espectrofotométricos posteriores para determinar el porcentaje de absorbancia que presenta la concentración de anticuerpos circulantes en las muestras que dan resultados positivo y positivo débil en la prueba de Coggins.
2. En base a los resultados obtenidos con este estudio y a la forma de transmisión de la enfermedad, se recomienda implementar la prueba de C-Elisa en los laboratorios veterinarios como una prueba de diagnóstico confiable y rápida para la Anemia Infecciosa Equina.

## IX. RESUMEN

La Anemia Infecciosa Equina es una enfermedad viral de distribución mundial que afecta a todos los equinos. Debido a la forma de transmisión de la enfermedad es importante el diagnóstico rápido de animales sanos y enfermos para determinar la presencia de anticuerpos circulantes contra el virus de Anemia Infecciosa Equina. Este virus causa numerosas pérdidas económicas. El diagnóstico de laboratorio se basa en la serología. La técnica serológica de referencia internacional es la de Inmunodifusión en Agar de Gel o prueba de Coggins. El objetivo de este trabajo fue validar los resultados obtenidos al someter 92 muestras de sueros de equino adulto a la prueba de Coggins y enfrentarlos con los resultados obtenidos con la prueba de C-Elisa.

Se utilizaron 92 sueros de equinos de un total de 1,108 sueros provenientes de todos los departamentos de Guatemala, los que se guardaron durante el período de enero a noviembre de 2,005 en el laboratorio del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Los sueros fueron sometidos a las pruebas de Inmunodifusión en Agar de Gel y a la prueba de C-Elisa, obteniendo los resultados de la primera prueba en un lapso de 48 horas y los de la segunda prueba en un lapso de 2 horas.

Con la prueba de Inmunodifusión en Agar de Gel se obtuvieron 44 muestras positivas, 37 negativas y 11 positivas débiles. Y para la prueba de C-Elisa se obtuvieron 54 muestras positivas y 38 muestras negativas. El promedio de porcentaje de absorción de las muestras positivas fue 0.056 nm, y de las muestras negativas fue 0.92 nm. Al someter las 11 muestras positivas débiles a la prueba de C-Elisa resultaron 10 positivas y 1 negativa, el promedio de porcentaje de absorción de las positivas fue de 0.066 nm y de la negativa 0.76 nm.

Al cotejar los resultados de ambas pruebas utilizando los métodos estadísticos diferencia de porcentaje y Chi<sup>2</sup>, se concluyó que ambas pruebas son equivalentes para validar el diagnóstico de Anemia Infecciosa Equina en Guatemala.

## X. BIBLIOGRAFÍA

1. Andrade dos Santos, J. 1982. Patología especial de los animales domésticos. Trad. G López de Fontoura. 2ed. México, D.F., Interamericana. p. 251-252.
2. Avances en Acuicultura y Calidad Ambiental. IV curso, Ideas generales acerca de la Técnica ELISA. 2003. (en línea) Consultado 26 set. 2006. Disponible en [http://cva.iim.CSIC.es/curscongr/PuertoReal%20cadiz/curso-practico\\_2003.pdf](http://cva.iim.CSIC.es/curscongr/PuertoReal%20cadiz/curso-practico_2003.pdf)
3. Berrios, P. s.f. Actualización Sobre enfermedades virales de los equinos (en línea) Consultado 24 set.. 2006. Disponible en [www.patologiaveterinaria.cl/monografias/mepavet1-2005/pdf/mepavet09.pdf](http://www.patologiaveterinaria.cl/monografias/mepavet1-2005/pdf/mepavet09.pdf).
4. Bioforos, P. s.f. (en línea) Consultado 24 set. 2006. Disponible en <http://www.ub.es/biocel/wbc/técnicas/elisa.htm>
5. Blaha, T. 1995. Epidemiología Especial. Trad. J E Escobar. Zaragoza, ES., Acribia. p. 253-256.
6. Blood, D; Radostits, O. 1990. Medicina Veterinaria; Libro de texto de las enfermedades del ganado vacuno, ovino, porcino, caprino y equino. Trad. I Begara Morilas. 7 ed. México, D.F., Mc Graw Hill Interamericana. Vol. 2, p. 864-868.
7. Brunetti, C; Martn, A. 2005. Introducción a la Espectroscopia de absorción molecular, ultravioleta, visible e infrarrojo cercano (en línea) Consultado 28 set. 2007. Disponible en [www.fi.ubaar/materias/6305/download/Espectrofotometria.pdf](http://www.fi.ubaar/materias/6305/download/Espectrofotometria.pdf)

8. Castillo, J. 1997. Anemia infecciosa Equina. (en línea) Consultado 9 mayo. 2006. Disponible en [www.monografias.com/trabajos](http://www.monografias.com/trabajos)
9. ClinPro International Co. LLC ELISA. s.f. (en línea) Consultado 3 jun. 2006. disponible en [www.clinprointl.com/technical.htm](http://www.clinprointl.com/technical.htm)
10. Colahan, P. 1999. Equine Medicine And Surgery. 5 ed. St. Louis Missouri, US, Mosby. Vol 5, p. 2013-2019.
11. Conclusiones y Desgrabación de la XV Jornada de Actualización Técnico Científica. (en línea) Consultado 24 set. 2006. Disponible en [www.eia.com](http://www.eia.com)
12. Cordes, T.; Issel, C. 1996. EIA—A STATUS REPORT ON ITS CONTROL (en línea) Consultado 1 jun. 2006. Disponible en [www.aphis.usda.gov/vs/hahps///equine/eia/eia/-1996.pdf](http://www.aphis.usda.gov/vs/hahps///equine/eia/eia/-1996.pdf)
13. Dewhurst, S. Patogénesis, Lentivirus/HIV s.f. (en línea) Consultado 9 abr. 2006. Disponible en <http://patlent/HIV.htm>
14. Equine Infectious Anemia; The Facts and The Controversy. s.f. (en línea) Consultado 5 set. 2006. Disponible en <http://pages.tca.net/LOSTHR/topics.htm>
15. Equine Infectious anemia. 1996. (en línea) Consultado 29 set. 2006. Disponible en <http://www.ncagr.com/vet/equine.htm>
16. Fenner, F. 1992. Virología Veterinaria. Trad. C Díaz de Villegas Salans. Zaragoza, ES., Acribia. p. 598-599.
17. Fernández, Y; Martínez, R. 2005. Efecto Estimulante del Levamisol en equinos afectados con anemia infecciosa. (en línea) Consultado 24 set. 2006. Disponible en <http://www.levamisol.htm>

18. González, R; Tarazona, R. 17 Métodos Basados en la unión AG-AC. s.f. (en línea) Consultado 24 set. 2006. Disponible <http://www.uco.es/grupos/inmologiamolecular/inmunologia/tema17/etexto17.htm#6%20ELISA>
19. IDEXX Lab. DiaSystems™EIA CELISA. s.f. (en línea) Consultado 2 set. 2005. Disponible en [www.idexx.com](http://www.idexx.com)
20. Jacobson, R. 1998. Validación de pruebas serológicas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. (en línea) Rev. Sci. Tech. Off.int. Epiz, 17 (2): 469-486. Consultado 2 jun. 2006. Disponible en <http://www.oie.int/>
21. Jubb, KvF ; Kennedy, PC ; Palmer, N. 1991. Patología de los animales domésticos. Trad. G. Fernández. 3 ed. Monte Video, UY., Hemisferio Sur S.R.L. p. 155-157.
22. Merck y Co. 1993. El Manual Merck de Veterinaria, Un manual de diagnóstico, tratamiento, prevención y control de las enfermedades para el veterinario. 3 ed. Barcelona, Es., Centrum. p. 32.
23. OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal). 2005. Enfermedades animales, Anemia Infecciosa Equina. (en línea) Consultado 9 mayo. 2006. Disponible en <http://www.oie.int/>
24. Salgado, J. Introducción a la Espectrofotometría. s.f. (en línea) Consultado 28 set. 2007. Disponible en [www.uv.es/salgado/medicina/.files/Practica2.pdf](http://www.uv.es/salgado/medicina/.files/Practica2.pdf)
25. Sogorb, M; Vilanova, E. 2004. Técnicas Analíticas de Contaminantes Químicos. España, Díaz de Santos.

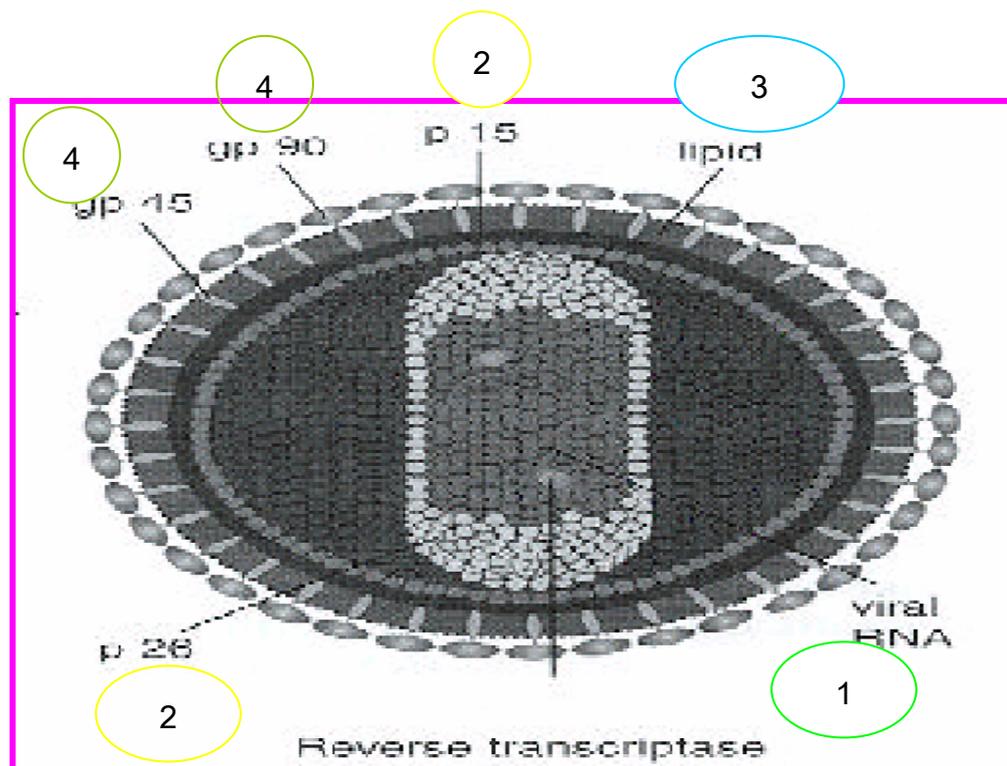
26. Soulsby, E. 1987. Parasitología y enfermedades parasitarias, en los animales domésticos. Trad. A R Martínez. 7 ed. México, D.F., Interamericana. 823 p.
27. Test de Coggins. s.f. (en línea) Consultado 24 set. 2006. Disponible en <http://www.viarural.com.ar/viarural.com.ar/ganaderia/equinos/test%20de%20coggins.htm>
28. Thrusfield, M. 1990. Epidemiología Veterinaria. Trad. J Castillo Hernández. Zaragoza, ES., Acribia. p. 219-232.
29. Tizard, R. 1998. Inmunología Veterinaria. Trad. M E Araiza. 5 ed. México, D.F., Mc Graw – Hill Interamericana. 566 p.

# XI. ANEXOS

# ANEXO No.1

# FIGURAS

**Figura No. 1** Componentes estructurales de la partícula viral de Anemia Infecciosa Equina.



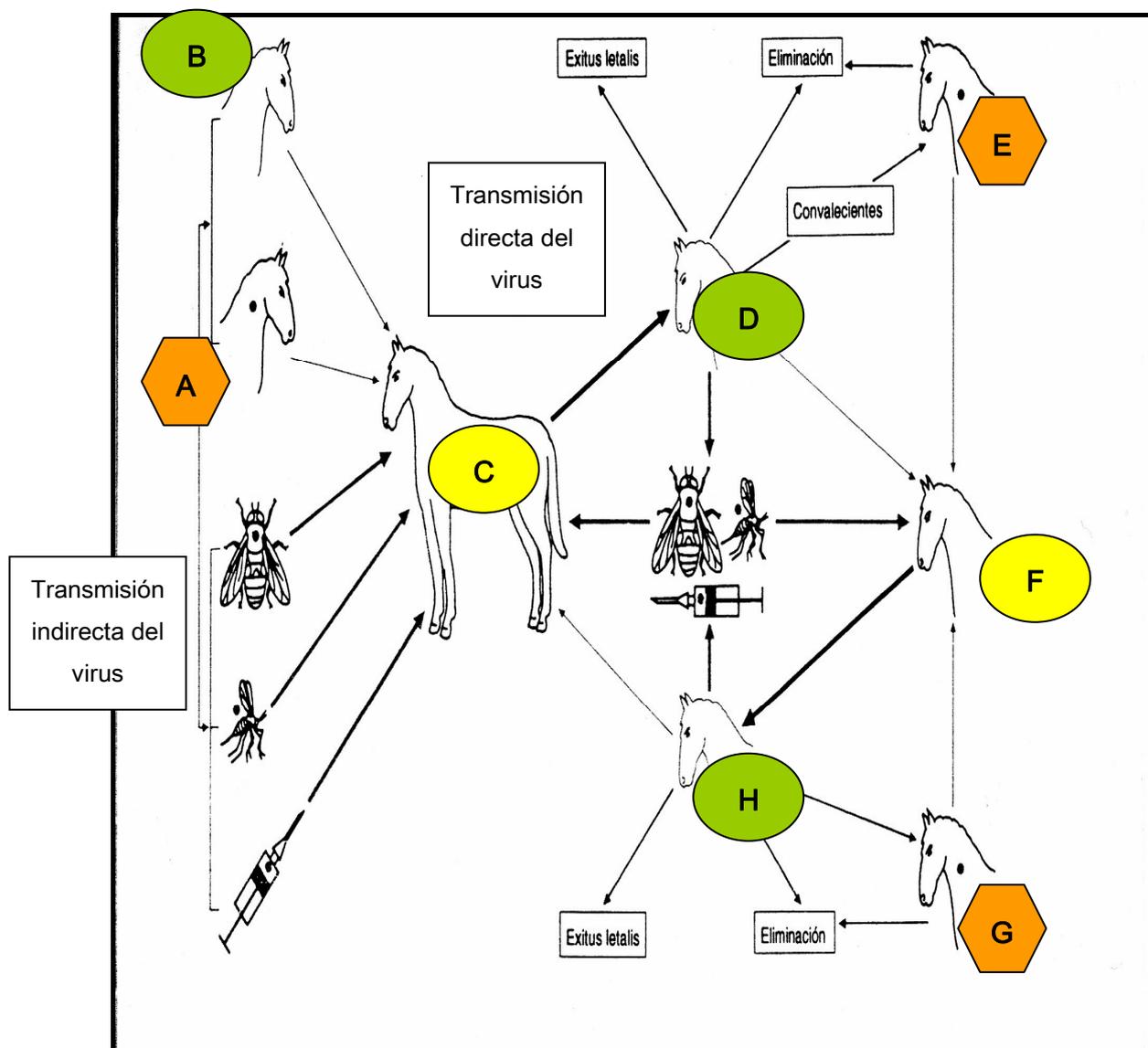
1 = Genoma Viral RNA y enzima transcriptasa reversa. 2 = Cápside formado por las proteínas P 26 y P15. 3 = Membrana lipídica. 4 = Proteínas de superficie gp 45 y gp 90 (11).

**Figura No. 3** Vista real de la partícula del virus de Anemia Infecciosa Equina.



Las proyecciones de la superficie son análogas a un juguete de perro (11).

Figura No. 3 Transmisión del virus de Anemia Infecciosa Equina. (5)



El caballo **A** y **B** se infectan del virus por medio de insectos y jeringas con aguja que tienen el virus de Anemia Infecciosa Equina, juntos transmiten el virus al caballo **C** ( éste también se contagia por medio de insectos hematófagos y jeringas con aguja contaminada con sangre del caballo **H**). El caballo **C** le transmite el virus al caballo **D**, el cual se vuelve portador y es eliminador del virus, este al ser picado por insectos y tener contacto con instrumentos quirúrgicos transmite el virus al caballo **F**, el caballo **E** es positivo al igual que el caballo **G**, estos dos transmiten el virus al caballo **F**, y el **F** transmite el virus al caballo **H**, el que termina el ciclo de transmisión al caballo **C**.

**Figura No. 4** Proceso de replicación viral dentro de la célula del hospedero infectado con el virus de Anemia Infecciosa Equina. (11)

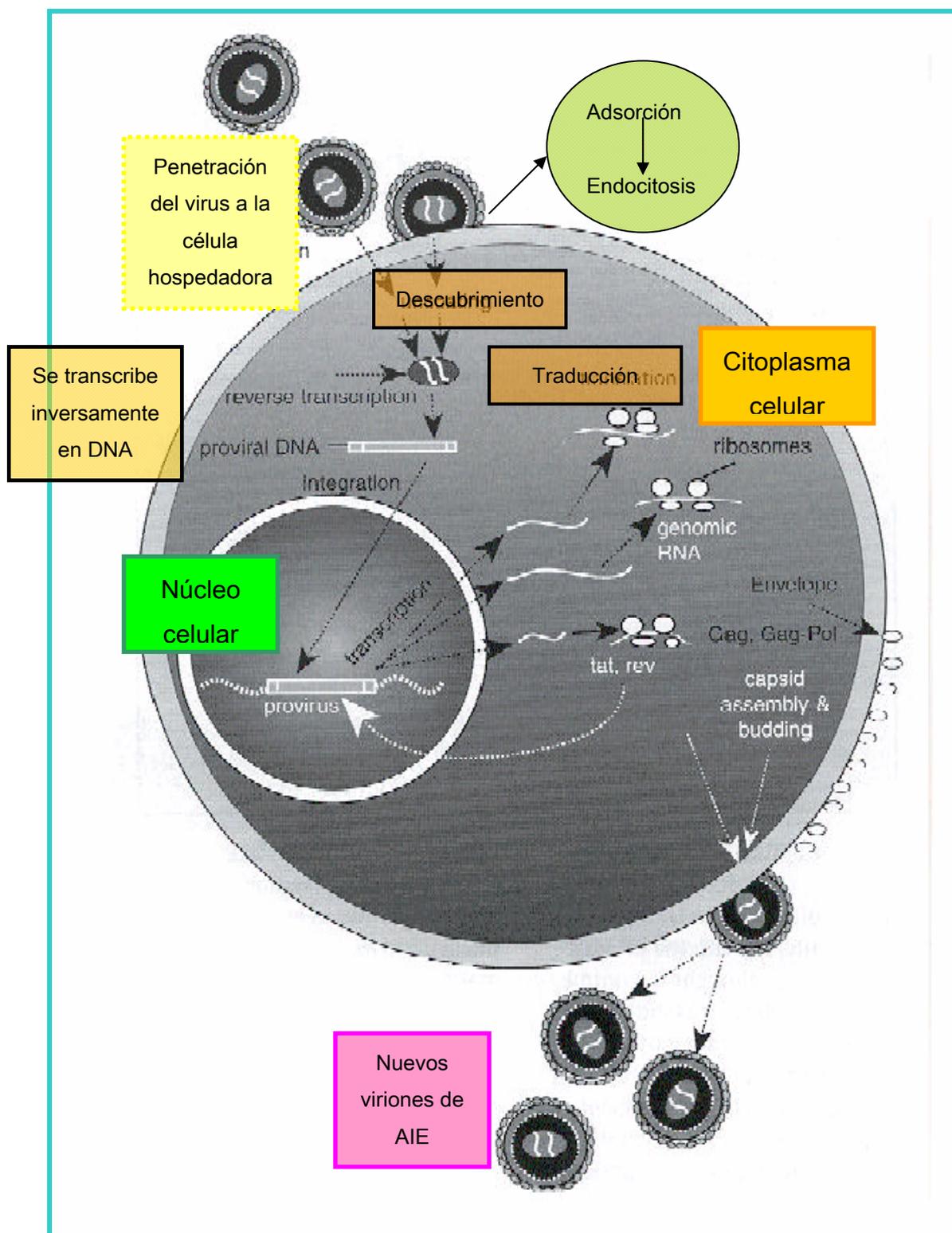


Figura No. 5 y 6 Ubicación de reactivos, de muestras de suero equino y resultados obtenidos con la prueba de Inmunodifusión en Agar de Gel o Coggins. (18,24)

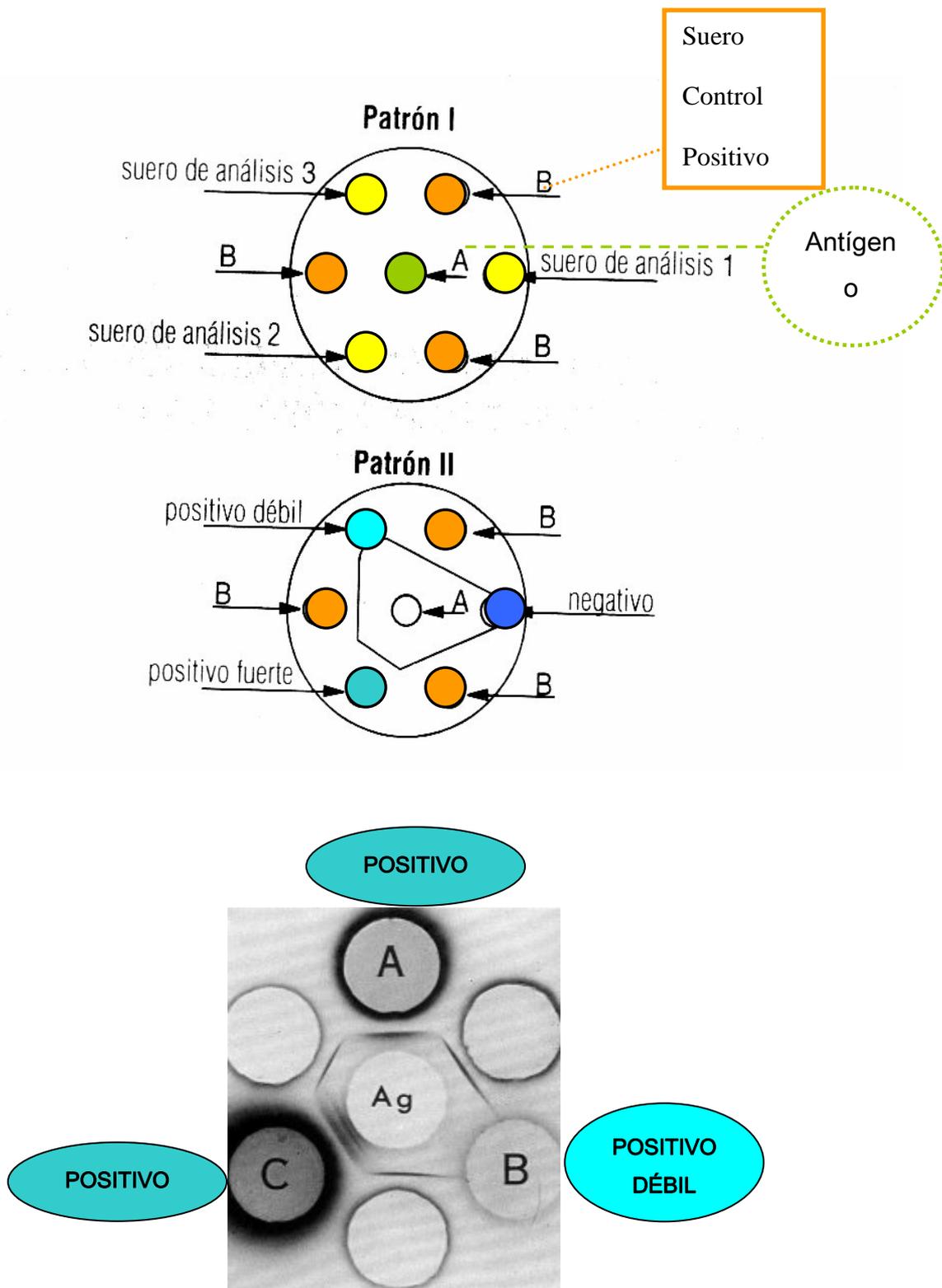
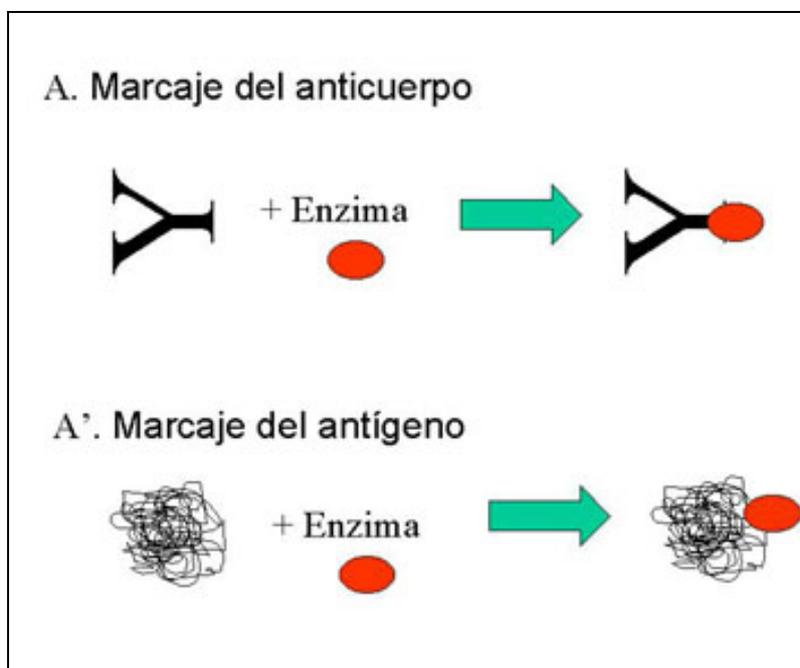
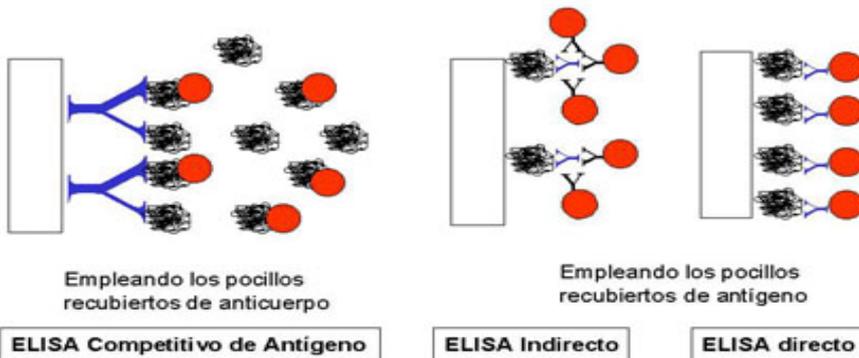


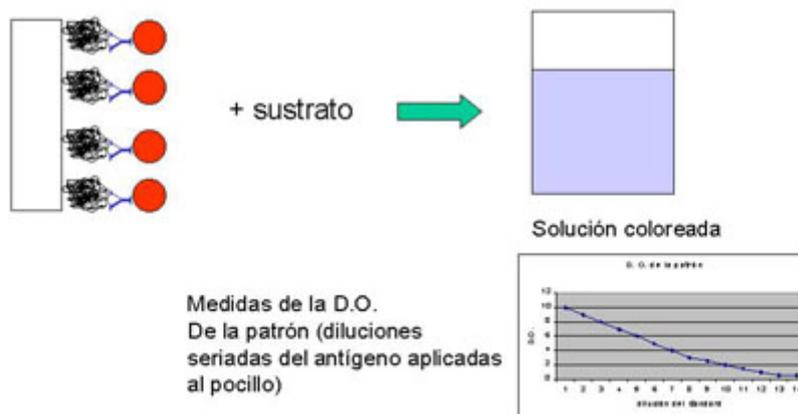
Figura No. 7 Fases de un ensayo Elisa. (4)

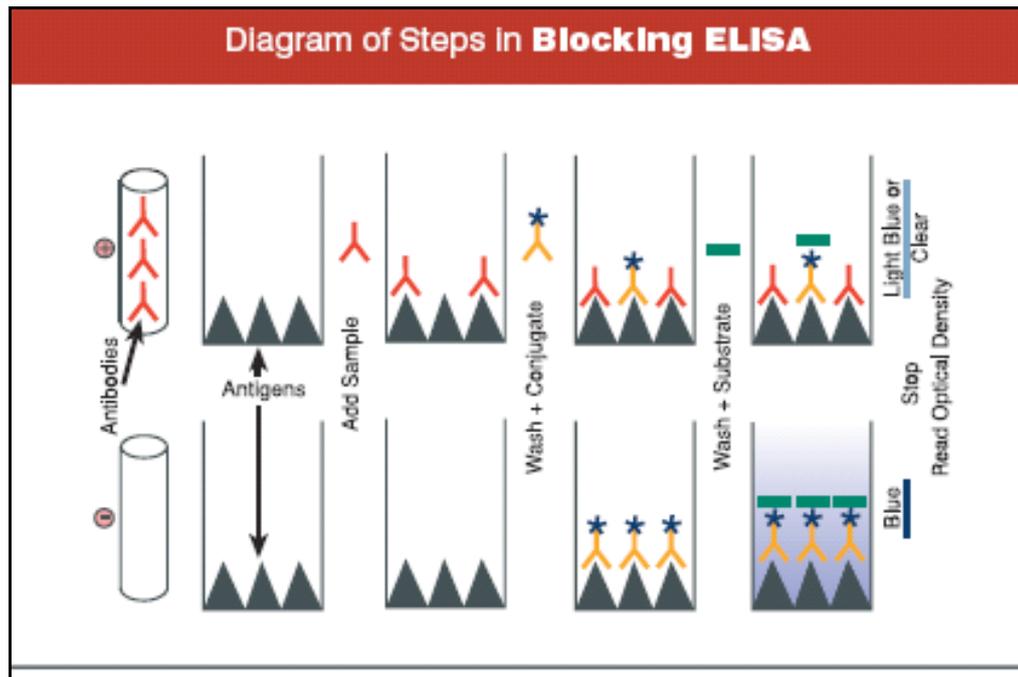


C. Se forman una o más capas de complejos inmunes sobre la fase sólida



D. Reacción entre el enzima fijado y el sustrato forma un producto coloreado que se mide por espectrofotometría





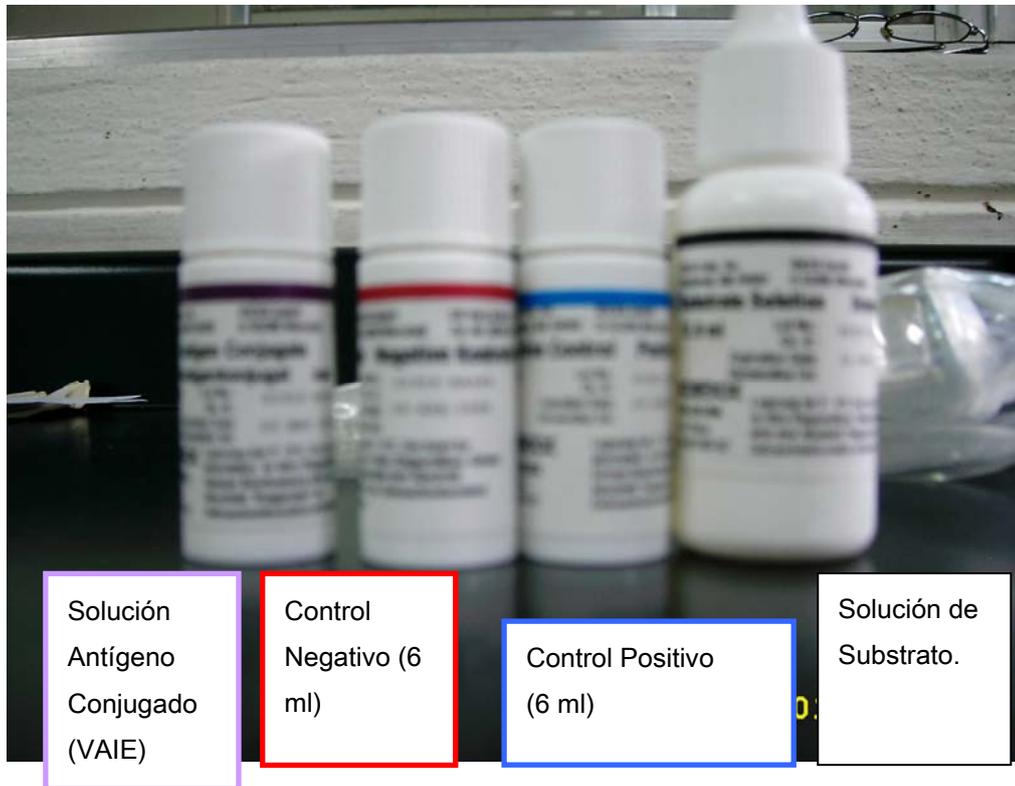
# ANEXO No. 2

# FOTOGRAFÍAS

Fotografía No. 1 y 2 Materiales necesarios para realizar la prueba de C-Elisa.



Fotografía No. 3 Reactivos necesarios para realizar la prueba de C-Elisa.



Fotografías 3 y 4 Recurso Biológico. 92 muestras de suero sanguíneo de equinos adultos, provenientes de distintos departamentos de Guatemala.



**Fotografía 5** Procedimiento para realizar las pruebas de C-Elisa y Coggins para el diagnóstico de Anemia Infecciosa Equina.



**Fotografía 6** Procedimiento de la prueba de C-Elisa para el diagnóstico de Anemia Infecciosa Equina.



Fotografía No. 7 Lectura de resultados de la prueba de Coggins.



Placa de Petri con Agar de Gel, para el diagnóstico de Anemia Infecciosa Equina, en la prueba de Coggins.

# **ANEXO No. 3**

## **BOLETAS**

**BOLETA No. 1 REGISTRO DE MUESTRAS EN EL LABORATORIO**

**GENERALIDADES:**

No. DE MUESTRA \_\_\_\_\_ FECHA: \_\_\_\_\_

**PROCEDENCIA:**

DEPARTAMENTO \_\_\_\_\_ MUNICIPIO \_\_\_\_\_

ALDEA \_\_\_\_\_ CASERIO \_\_\_\_\_

FINCA \_\_\_\_\_

NOMBRE DEL PROPIETARIO \_\_\_\_\_

TELÉFONO \_\_\_\_\_

DIRECCIÓN: \_\_\_\_\_

**CARACTERÍSTICAS DEL ANIMAL:**

ESPECIE \_\_\_\_\_

SEXO \_\_\_\_\_ EDAD \_\_\_\_\_

RAZA \_\_\_\_\_ COLOR \_\_\_\_\_

FECHA DEL ÚLTIMO CELO \_\_\_\_\_

FECHA DE MONTA \_\_\_\_\_

ESTADO DE PREÑEZ SI ( ) NO ( )

TIEMPO DE GESTACIÓN \_\_\_\_\_

**CARACTERÍSTICAS DEL AMBIENTE:**

PRESENCIA DE MOSQUITOS, TÁBANOS, ETC. SI ( ) NO ( )

PRESENCIA DE AGUA ESTANCADA O PANTANOS SI ( ) NO ( )



# ANEXO No. 4

# CUADROS Y TABLAS

**Cuadro No. 1** Cantidad de sueros de equinos por mes y lugar de origen recibidos durante el período de enero a noviembre del año 2005 en el laboratorio del departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

MES	CHIMALTENANGO	GUATEMALA	ESCUJINTLA	SACATEPÉQUEZ	JUTIAPA	SANTA ROSA	IZABAL	JALAPA	QUETZALTENANGO
ENERO	0	4	14	5	11	63	2	1	4
FEBRERO	0	15	1	0	0	1	11	0	1
MARZO	6	22	0	8	0	0	0	0	0
ABRIL	0	8	0	7	0	7	0	0	0
MAYO	0	23	10	0	0	3	0	2	0
JUNIO	1	3	1	1	1	22	2	0	1
JULIO	1	7	0	5	42	5	0	0	0
AGOSTO	1	10	1	0	18	4	3	0	0
SEPTIEMBRE	0	7	0	0	3	0	0	0	0
OCTUBRE	0	4	0	0	0	168	1	0	4
NOVIEMBRE	0	2	89	0	0	29	2	0	0
<b>TOTAL</b>	9	105	116	26	75	302	21	3	10

MES	EI PROGRESO	SUCHITEPÉ-QUEZ	CHIQUMULA	ALTA VERAPAZ	SAN MARCOS	TOTONICAPÁN	PETÉN	RETALHULEU	ORIGEN DESC.	ZACAPA	HUEHUETENANGO	QUICHÉ	SOLOLÁ	TOTAL
ENERO	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	105
FEBRERO	2	8	1	1	3	0	0	0	4	0	0	0	0	48
MARZO	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	40
ABRIL	0	0	0	0	0	1	3	0	0	3	0	0	0	29
MAYO	0	71	0	0	3	0	43	0	0	0	1	0	0	156
JUNIO	0	13	0	0	0	0	0	12	0	1	0	0	0	58
JULIO	0	3	2	0	3	0	0	5	0	0	1	0	0	74
AGOSTO	1	17	8	0	0	0	7	54	0	5	0	3	1	133
SEPTIEMBRE	1	4	1	0	5	0	0	0	0	7	1	0	0	29
OCTUBRE	0	1	0	0	0	0	0	81	0	2	0	0	0	261
NOVIEMBRE	0	5	0	0	0	0	10	31	0	0	0	0	0	168
TOTAL	4	124	12	1	16	1	63	183	5	18	3	3	1	1101

**Cuadro No. 2** Resultados obtenidos del análisis colorimétrico y por lectura de espectrofotómetro (filtro 650 nm.) de muestras de sueros de equinos, sometidos a la prueba de C-ELISA y prueba de Coggins o Inmunodifusión en Agar de Gel (IGAD), para determinar la presencia de anticuerpos contra el virus de Anemia Infecciosa Equina.

P = Positivo N = Negativo PD = Positivo Débil

No DE MUESTRA	RESULTADO C-Elisa	RESULTADO Coggins	Porcentaje de absorbancia
1	P	P	0.047
2	P	P	0.056
3	P	P	0.05
4	P	P	0.049
5	P	P	0.06
6	P	P	0.05
7	P	P	0.094
8	N	N	0.807
9	N	N	1.045
10	N	N	0.842
11	P	P	0.053
12	P	P	0.052
13	P	P	0.055
14	P	P	0.052
15	P	P	0.066
16	P	P	0.048
17	P	P	0.044
18	P	P	0
19	N	N	1.162
20	N	N	0.944
21	N	N	0.872
22	N	N	0.973
23	N	N	0.97

24	N	N	0.913
<b>No DE MUESTRA</b>	<b>RESULTADO C-Elisa</b>	<b>RESULTADO Coggins</b>	<b>Porcentaje de absorbancia</b>
25	P	P	0.05
26	P	P	0.054
27	P	P	0.055
28	P	PD	0.074
29	P	P	0.051
30	P	PD	0.057
31	N	N	0.753
32	N	N	0.93
33	N	N	0.934
34	N	N	1.045
35	N	N	1.167
36	N	N	1.315
37	P	P	0.062
38	P	P	0.054
39	P	P	0.061
40	N	N	0.871
41	P	P	0.051
42	P	P	0.055
43	P	P	0.116
44	N	N	1.009
45	N	N	0.951
46	N	N	1.115
47	N	N	0.719
48	N	N	0.731
49	P	P	0.055
50	P	P	0.056
51	P	P	0.068
52	P	P	0.053
53	P	P	0.051

No DE MUESTRA	RESULTADO C-Elisa	RESULTADO Coggins	Porcentaje de absorbancia
54	P	P	0.058
55	P	P	0.742
56	N	N	0.78
57	N	N	0.79
58	N	N	0.862
59	N	N	1.446
60	N	N	0.757
61	P	P	0.056
62	P	P	0.049
63	P	P	0.053
64	P	P	0.052
65	P	P	0.048
66	P	P	0.055
67	P	P	0.057
68	N	N	0.932
69	N	N	0.839
70	N	N	0.698
71	P	<b>PD</b>	0.07
72	N	N	0.698
73	N	N	0.793
74	P	P	0.062
75	N	N	0.965
76	P	<b>PD</b>	0.07
77	<b>N</b>	<b>PD</b>	0.761
78	P	P	0.069
79	N	N	0.895
80	P	<b>PD</b>	0.071
81	P	<b>PD</b>	0.066
82	N	N	0.586

83	P	PD	0.058
<b>No. de muestra</b>	<b>Resultado C- Elisa</b>	<b>Resultado Coggins</b>	<b>% de absorbancia</b>
84	N	N	0.761
85	N	N	0.836
86	P	PD	0.064
87	P	PD	0.076
88	P	PD	0.057
89	P	P	0.06
90	P	P	0.055
91	P	P	0.069
92	N	N	0.877

**Cuadro No. 3** Porcentaje de absorbancia en orden ascendente presentado en las muestras de suero equino sometidas a la prueba competitiva C-Elisa, leídas con espectrofotómetro de filtro 650 nm.

P = Positivo N = Negativo PD = Positivo Débil

No DE MUESTRA	RESULTADO	Porcentaje de absorbancia
17	P	0.044
1	P	0.047
16	P	0.048
65	P	0.048
4	P	0.049
62	P	0.049
3	P	0.05
6	P	0.05
25	P	0.05
29	P	0.051
41	P	0.051
53	P	0.051
12	P	0.052
14	P	0.052
64	P	0.052
11	P	0.053
52	P	0.053
63	P	0.053
26	P	0.054
38	P	0.054
13	P	0.055
27	P	0.055
42	P	0.055
49	P	0.055
66	P	0.055

90	P	0.055
<b>No DE MUESTRA</b>	<b>RESULTADO</b>	<b>Porcentaje de absorbancia</b>
2	P	0.056
50	P	0.056
61	P	0.056
30	P	0.057
67	P	0.057
88	P	0.057
54	P	0.058
83	P	0.058
5	P	0.06
89	P	0.06
39	P	0.061
37	P	0.062
74	P	0.062
86	P	0.064
15	P	0.066
81	P	0.066
51	P	0.068
78	P	0.069
91	P	0.069
71	P	0.07
76	P	0.07
80	P	0.071
28	P	0.074
87	P	0.076
7	P	0.094
43	P	0.116
82	N	0.586
70	N	0.698
72	N	0.698

47	N	0.719
<b>No DE MUESTRA</b>	<b>RESULTADO</b>	<b>Porcentaje de absorbancia</b>
48	N	0.731
55	P	0.742
31	N	0.753
60	N	0.757
77	N	0.761
84	N	0.761
56	N	0.78
57	N	0.79
73	N	0.793
8	N	0.807
85	N	0.836
69	N	0.839
10	N	0.842
58	N	0.862
40	N	0.871
21	N	0.872
92	N	0.877
79	N	0.895
24	N	0.913
32	N	0.93
68	N	0.932
33	N	0.934
20	N	0.944
45	N	0.951
75	N	0.965
23	N	0.97
22	N	0.973
44	N	1.009
9	N	1.045

34	N	1.045
<b>No DE MUESTRA</b>	<b>RESULTADO</b>	<b>Porcentaje de absorbancia</b>
46	N	1.115
19	N	1.162
35	N	1.167
36	N	1.315
59	N	1.446
18	P	0

**Cuadro No. 4** Comparación de los resultados obtenidos de la prueba de Coggins y la prueba de C-Elisa ante las muestras de suero equino que dieron resultado Positivo Débil en la primera prueba.

**P = Positivo N = Negativo PD = Positivo Débil**

<b>NO. DE MUESTRA</b>	<b>COGGINS</b>	<b>C-ELISA</b>	<b>% DE ABSORBANCIA</b>
28	PD	P	0.074
30	PD	P	0.057
71	PD	P	0.07
76	PD	P	0.07
77	PD	<b>N</b>	<b>0.76</b>
80	PD	P	0.071
81	PD	P	0.066
83	PD	P	0.058
86	PD	P	0.064
87	PD	P	0.076
88	PD	P	0.057

**Tabla No.1** Resultados obtenidos del análisis de sueros de equinos sometidos a la prueba de C-Elisa, en el laboratorio del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de La Universidad de San Carlos de Guatemala. (Enero a noviembre de 2005)

	POSITIVO	NEGATIVO
TOTAL	54	38

**Tabla No. 2** Resultados obtenidos del análisis de sueros de equinos sometidos a la prueba de Coggins o Inmunodifusión en Agar de Gel (IGAD), en el laboratorio del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de La Universidad de San Carlos de Guatemala. (Enero a noviembre de 2005)

	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO DÉBIL
TOTAL	37	44	11

**Tabla No. 3** Comparación de los resultados obtenidos con la prueba de Coggins y la prueba de C-Elisa ante el análisis de las muestras de suero equino que dieron resultado **Positivo Débil** en la primera prueba. En el laboratorio del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de La Universidad de San Carlos de Guatemala. (Enero a noviembre de 2005)

	Coggins	C-Elisa	Promedio de % de absorvancia.
<b>Positivo débil</b>	11	0	0
<b>Positivo</b>	0	10	0.066
<b>Negativo</b>	0	1	0.76
<b>Total</b>	11	11	-----

**Tabla No. 4** Resultados obtenidos del análisis de 92 muestras de suero de equinos de distintos departamentos de la República de Guatemala para determinar la presencia de anticuerpos circulantes contra el virus de Anemia Infecciosa Equina, utilizando para su análisis dos pruebas diagnósticas en el laboratorio de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. (Enero a noviembre 2005)

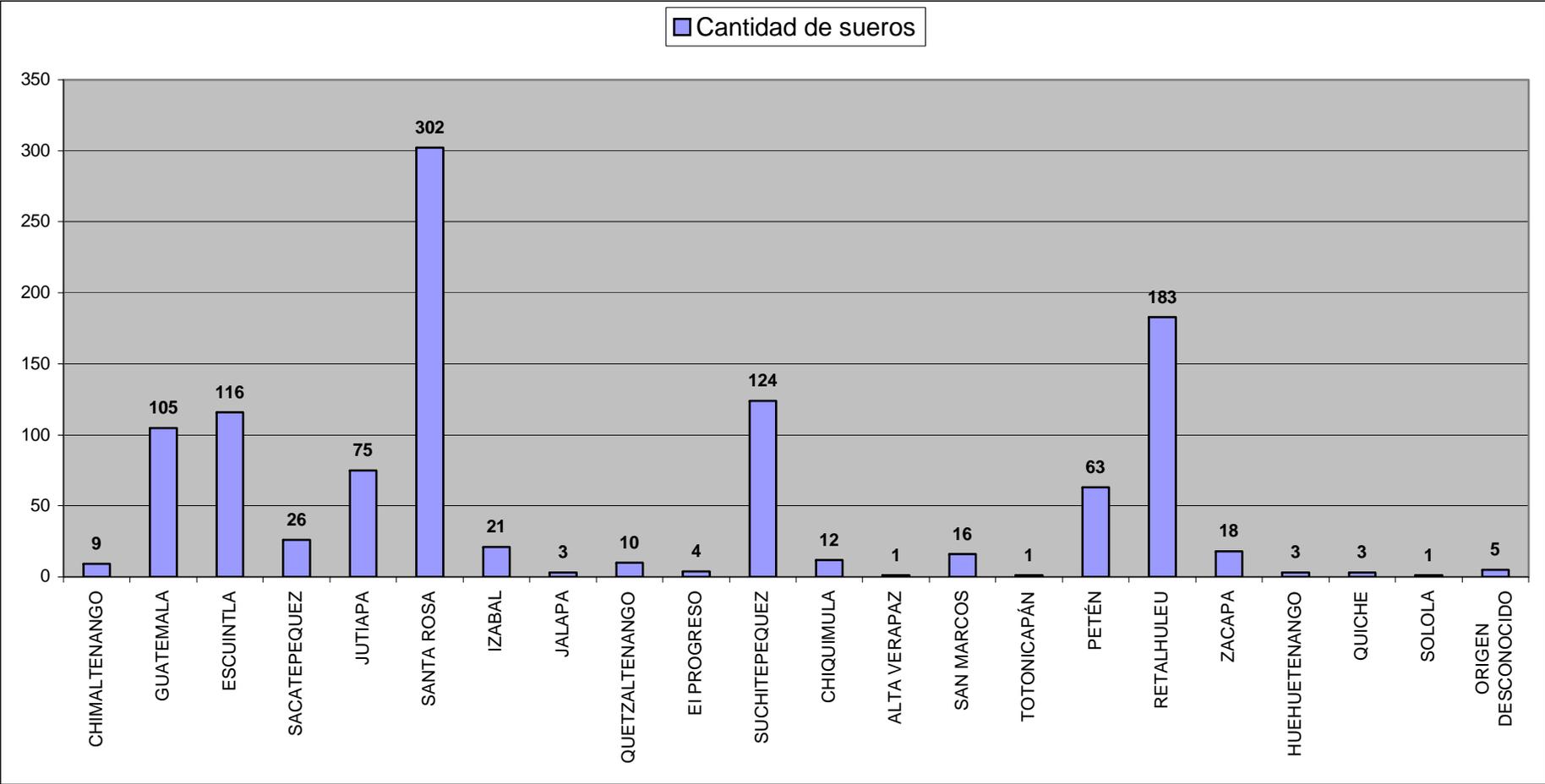
	Positivo	Negativo	Positivo Débil	Total
<b>Prueba de Coggins</b>	37	44	11	92
<b>Prueba de C-Elisa</b>	54	38	0	92
<b>Total</b>	91	82	11	<b>184</b>

# ANEXO No. 5

# GRAFICAS

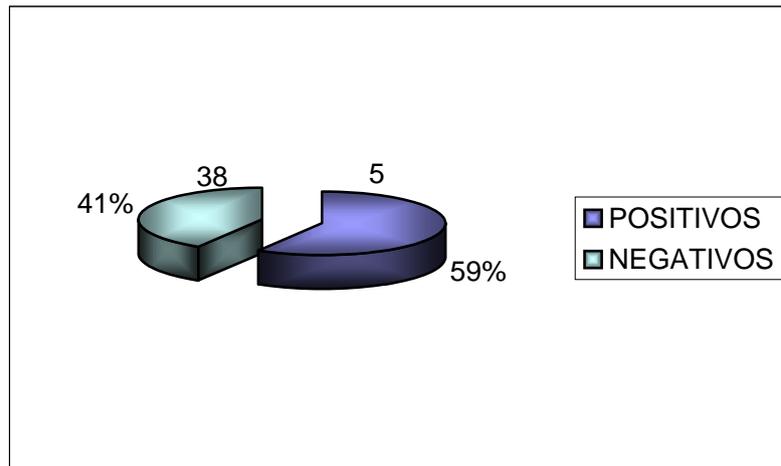


**Gráfica No. 1** Cantidad de sueros de equino recibidos en el laboratorio del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, durante los meses comprendidos de enero a noviembre de 2005.

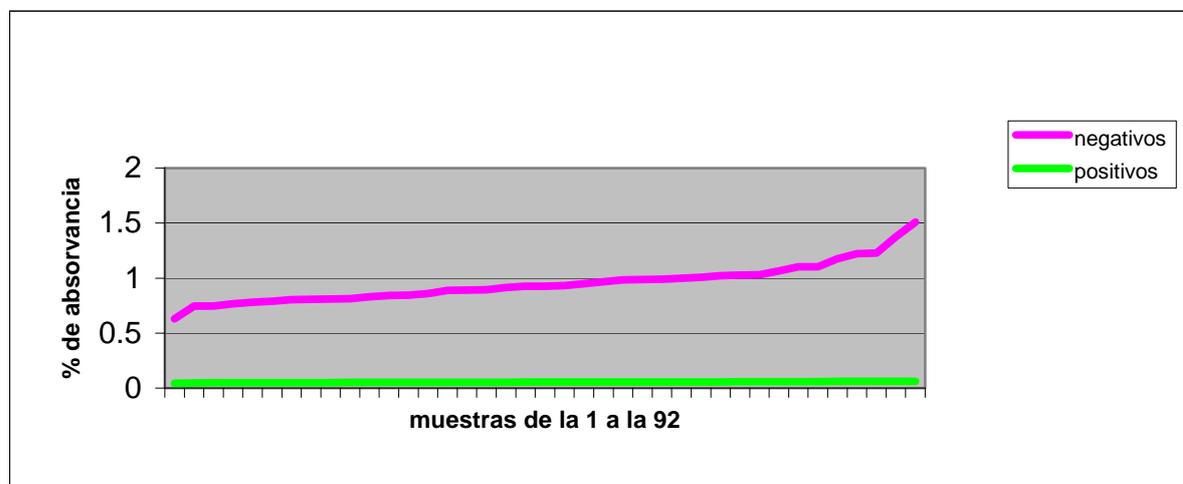




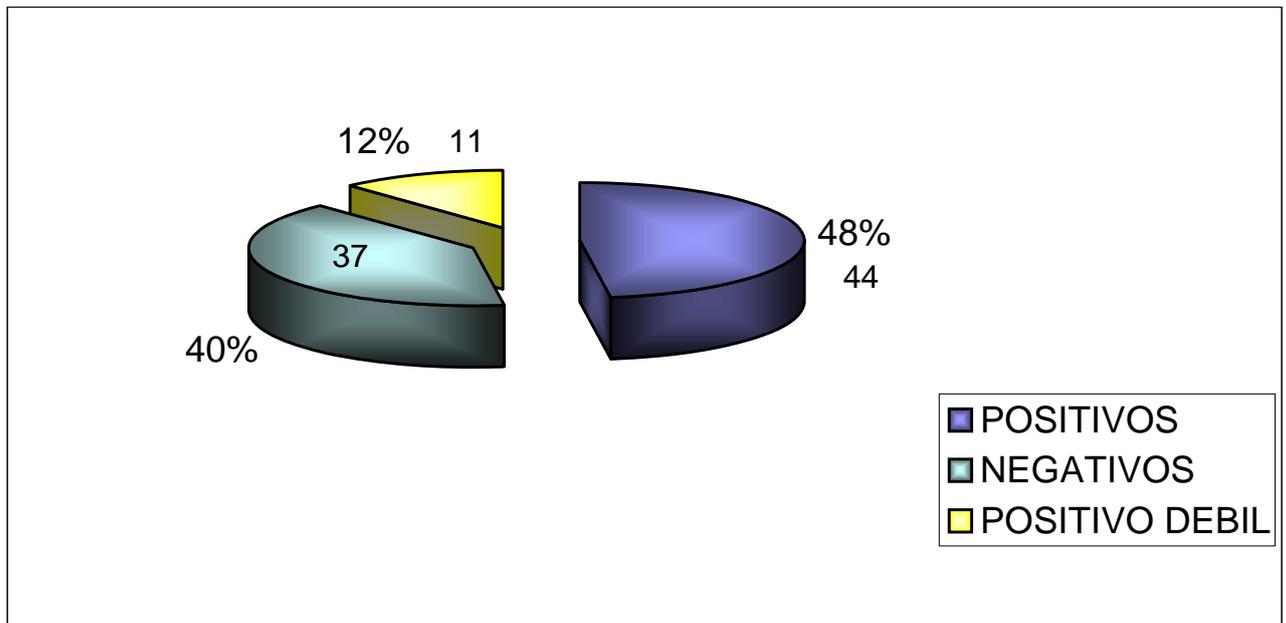
**Gráfica No. 2** Resultados obtenidos del análisis de sueros de equinos sometidos a la prueba de C-Elisa, en el laboratorio del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de La Universidad de San Carlos de Guatemala. (Enero a noviembre de 2005)



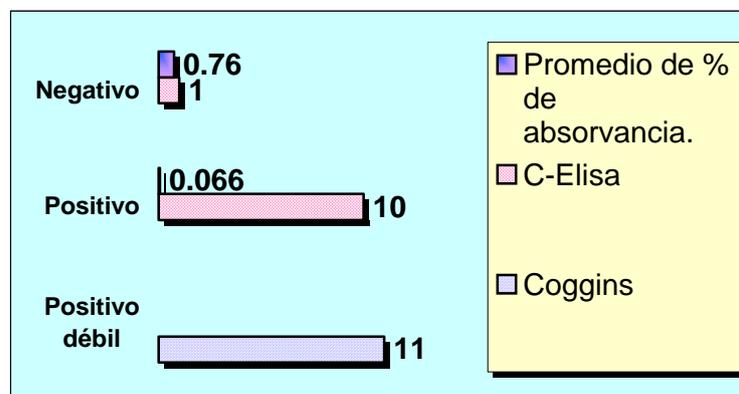
**Gráfica No. 3** Porcentaje de absorbancia que presentaron los sueros de equinos, luego de ser sometidos a la prueba de C-Elisa y al ser analizados con un espectrofotómetro (filtro 650 nm.), en el laboratorio del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de La Universidad de San Carlos de Guatemala.



**Gráfica No. 4** Resultados obtenidos del análisis de sueros de equinos sometidos a la prueba de Coggins o Inmunodifusión en Agar de Gel (AGID), en el laboratorio del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de La Universidad de San Carlos de Guatemala.



**Gráfica No. 5** Comparación de los resultados obtenidos con la prueba de Coggins y la prueba de C-Elisa ante el análisis de las muestras de suero equino que dieron resultado **Positivo Débil** en la primera prueba. En el laboratorio del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de La Universidad de San Carlos de Guatemala.



**Gráfica No. 6** Resultados obtenidos del análisis de 92 muestras de suero de equinos de distintos departamentos de la República de Guatemala para determinar la presencia de anticuerpos circulantes contra el virus de Anemia Infecciosa Equina, utilizando para su análisis dos pruebas diagnósticas. En el laboratorio del Departamento de Microbiología, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. (Enero a noviembre 2005)

