



**UNIVERSIDAD CENTRAL
DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**Diagnóstico molecular y serológico de *Theileria*
spp. en distintas locaciones de estados
venezolanos**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Naybeth Jossenrik Guzmán Méndez como requisito parcial para optar al título de Licenciada en Biología.

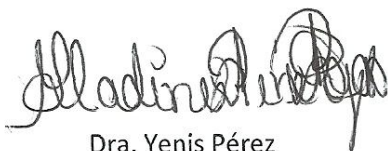
Tutor: Dra. Yenis G. Pérez R.

Asesor Académico: Dr. José Mejía

Caracas, Venezuela
Octubre - 2019

Acta del Examen Público y Solemne del Trabajo Especial de Grado de la Br. Naybeth
Jossenrik Guzmán Méndez

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias y la Ilustre Universidad Central de Venezuela, damos fe que examinamos el Trabajo Especial de Grado de la Br. Naybeth Jossenrik Guzmán Méndez, C.I. 19.606.139, titulado “**Diagnóstico molecular y serológico de *Theileria* spp. en distintas locaciones de estados venezolanos**”, el cual es requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología, mención Biología Celular. Culminada la evaluación, consideramos que dicho trabajo cumple con los requerimientos exigidos en los reglamentos respectivos, por lo cual ha sido **APROBADO**, y calificado con la puntuación de diecinueve (19) **puntos**. Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los 21 días del mes de Octubre del año 2019.



Dra. Yenis Pérez

Tutora



Lic. José Mejía

Asesor Académico



Dra. Guillermina Alonso

Jurado



Dra. Roxana Gajardo

Jurado

RESUMEN

Theileria sp. es un hemoparásito protozoario que causa una infección intraeritrocitaria y usa como vector a la garrapata infectando ciertos animales domésticos (bovinos, pequeños rumiantes, equinos), provocando así una enfermedad conocida como theileriosis, la cual ocasiona grandes pérdidas económicas a nivel mundial. Dichos parásitos se encuentran distribuidos principalmente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, caracterizándose por poseer dos tipos de hospedadores en su ciclo de vida: un invertebrado y un vertebrado. Durante el proceso de infección del parásito intervienen diversas enzimas, de las cuales se destacan las cisteín-peptidasas por su potencial en el diagnóstico y tratamiento de las patologías. Los métodos de diagnóstico para este parásito van desde la observación microscópica hasta las técnicas moleculares. Debido a la deficiencia de ciertas técnicas por si solas, se ha hecho necesario el uso integral de técnicas para el diagnóstico, tratamiento y estudios epidemiológicos. En este trabajo se tuvo como objetivo diagnosticar, usando tanto métodos serológicos como moleculares, a *Theileria equi* en equinos de campo provenientes de diversas locaciones de Venezuela. Para el diagnóstico molecular se obtuvo una sensibilidad de 68,7% y una especificidad de 83,4%. En las pruebas *in silico* de restricción se obtuvo que la enzima DraI genera fragmentos de 84 y 217 pb para *T. equi* y la enzima HaeIII genera fragmentos de 172 y 216 pb para *B. caballi*. En el diagnóstico serológico, se realizó primero un estudio bioinformático para identificar los péptidos sintéticos utilizados en el ELISA indirecto, seleccionándose los péptidos 1 (*B. caballi*) y 3 (*T. equi*), obteniendo así un 42,7% de muestras positivas con el péptido 3 y 53,7% con el péptido 1; sin embargo no hubo coincidencias relevantes al comparar dichos resultados con los obtenidos por Rosales y colaboradores (2013). Los resultados indican que fue posible la detección de *Theileria equi* por ambos métodos; sin embargo es recomendable ampliar los estudios de restricción y los estudios de reactividad cruzada con los péptidos sintéticos.

Palabras claves: *Theileria equi*, *Babesia caballi*, PCR, ELISA, diagnóstico.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	ii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
INTRODUCCIÓN	10
1.1 Características estructurales y descriptivas de <i>Theileria</i> spp.	10
1.2 Distribución geográfica	12
1.3 Ciclo de vida	13
Ciclo en el hospedador invertebrado	13
Ciclo en el hospedador vertebrado	13
1.4 Theileriosis	16
Theileriosis bovina	16
Theileriosis equina	17
1.5 Métodos de diagnóstico	18
Estudios microscópicos	18
Diagnóstico serológico	19
Prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFAT)	19
Ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA)	20
Diagnóstico molecular	21
Hibridación reversa en línea (RLB)	22
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	22
1.6 Genes ribosómicos	22

1.7 Cisteín-peptidasas	23
ANTECEDENTES	25
2.1 Diagnóstico molecular y serológico de la piroplasmosis equina en Vzla	25
2.2 Realización de los péptidos sintéticos y su potencial en diagnóstico	26
OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo General	28
3.2 Objetivos Específicos	28
MATERIALES Y MÉTODOS	29
4.1 Selección de muestras evaluadas	29
4.2 Extracción del ADNg total de las muestras	29
4.3 Evaluación cualitativa y cuantitativa del ADNg extraído	30
4.4 Amplificación por PCR	31
4.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15%	33
4.6 Sensibilidad y especificidad de la PCR	34
4.7 Estudios de restricción <i>in silico</i>	35
4.8 Estudio bioinformático de los péptidos sintéticos de la bovispaína-2	36
4.9 Estandarización del ensayo inmunoenzimático indirecto (iELISA)	38
4.10 iELISA para evaluar la reactividad cruzada de los péptidos sintéticos	40
RESULTADOS	42
5.1 Selección de muestras	42
5.2 Extracción de ADNg de las muestras para diagnóstico molecular	42
5.3 Evaluación cualitativa del ADNg total para diagnóstico molecular	43
5.4 PCR de secuencias específicas de <i>T. equi</i> con cebadores 18S	44
5.5 Estimación de la sensibilidad y especificidad de la PCR	49

5.6 Estudios de restricción <i>in silico</i>	50
5.7 Análisis bioinformático de las cisteín-peptidasas de <i>B. caballi</i> y <i>T. equi</i>	51
5.8 Estandarización del iELISA para evaluar reactividad cruzada	52
5.9 iELISA para la reactividad cruzada de los péptidos sintéticos	54
DISCUSIONES	61
CONCLUSIONES	67
RECOMENDACIONES	68
BIBLIOGRAFÍA	69
Consultas en línea	73
ANEXOS	74
A.1 Marcador de peso molecular	75
A.2 Secuencias consenso utilizadas para los estudios de restricción <i>in silico</i>	76
A.3 Estudios de restricción <i>in silico</i>	77
A.4 Secuencias de las cisteín-peptidasas de <i>B. caballi</i> y <i>T. equi</i>	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Morfología de un protozooario Apicomplexa en estadio de merozoito	11
Figura 1.2. Ciclo de vida de <i>Theileria spp.</i>	15
Figura 1.3. Infecciones de <i>Theileria spp.</i> en células vistas al microscopio	19
Figura 1.4. Tipos de ELISA utilizados para el serodiagnóstico	21
Figura 1.5. Esquema del gen ribosómico	23
Figura 4.1. Secuencia aminoacídica de la bovispaína-2	38
Figura 5.1. Análisis cualitativo del ADN genómico total	43
Figura 5.2. Análisis cualitativo de la temperatura de hibridación	46
Figura 5.3. Análisis cualitativo de PCR para los cebadores PiroA/18SRT	47
Figura 5.4. Análisis cualitativo de PCR para los cebadores PiroAB	48
Figura 5.5. Mapa de restricción de la secuencia consenso de <i>T. equi</i>	50
Figura 5.6. Mapa de restricción de la secuencia consenso de <i>B. caballi</i>	51
Figura 5.7. Gráfica de la estandarización del ELISA para el péptido 1.	53
Figura 5.8. Gráfica de la estandarización del ELISA para el péptido 3	53
Figura 5.9. Gráficos de la evaluación de la reactividad cruzada del péptido 1	56
Figura 5.10. Gráficos de la evaluación de la reactividad cruzada del péptido 3	58
Figura 5.11. Gráfico de controles positivos para <i>T. equi</i> y <i>B. caballi</i>	59
Figura A.1. Marcador de peso molecular Promega® de 1kb.	75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Clasificación Taxonómica de <i>Theileria</i>	11
Tabla II. Distribución geográfica de las especies de <i>Theileria</i> y sus vectores	12
Tabla III. Resumen de las enfermedades causadas por <i>Theileria</i> spp.	18
Tabla IV. Secuencias de los cebadores para la detección de <i>Theileria</i> spp.	31
Tabla V. Tamaño esperado por PCR con cada juego de cebadores para <i>T. equi</i> .	31
Tabla VI. Condiciones del programa del termociclador para la reacción de PCR	32
Tabla VII. Mezcla de reacción de PCR	33
Tabla VIII. Tabla de contingencia 2x2 para la validación de la PCR	34
Tabla IX. Secuencias de <i>B. caballii</i> y <i>T. equi</i> para los estudios de restricción	35
Tabla X. Juegos de cebadores utilizados para <i>B. caballii</i> y <i>T. equi</i>	36
Tabla XI. Secuencias de los péptidos sintéticos	37
Tabla XII. Esquema de trabajo para la estandarización del ELISA indirecto	39
Tabla XIII. Esquema del ELISA indirecto para los péptidos sintéticos	40
Tabla XIV. Número total de muestras en el diagnóstico serológico	42
Tabla XV. Mezclas probadas para la optimización del ensayo de PCR	45
Tabla XVI. Resultados positivos obtenidos mediante PCR	48
Tabla XVII. Tabla de contingencia 2x2 para sensibilidad y especificidad	49
Tabla XVIII. Porcentajes de identidad (% Id) y similitud (% Sim)	52
Tabla XIX. Puntos de corte determinados para los sueros equinos	54
Tabla XX. Total de resultados positivos obtenidos por ELISA	58
Tabla XXI. Comparación de las muestras por ELISA indirecto y por ELISA competitivo	60

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

B. caballi: *Babesia caballi*.

CFSPH: Centro para la Seguridad Alimentaria y Salud Pública. Por sus siglas en inglés: *Center for Food Security & Public Health*.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima. Por sus siglas en inglés: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*.

ETS: Región espaciadora transcrita externo. Por sus siglas en inglés *External Transcribed Spacer*.

iELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima indirecto. Por sus siglas en inglés: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay Indirect*.

IFAT: Prueba de inmunofluorescencia indirecta. Por sus siglas en inglés: *Indirect Fluorescent Antibody Test*.

ITS: Región espaciadora transcrita interno. Por sus siglas en inglés: *Internal Transcribed Spacer*.

OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal. Por sus siglas en inglés: *Office International of Epizooties*.

pb: Pares de bases.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa. Por sus siglas en inglés: *Polymerase Chain-Reaction*.

RLB: Hibridación reversa en línea. Por sus siglas en inglés: *Reverse Line Blot*.

T.equi: *Theileria equi*.

INTRODUCCIÓN

1.1 Características estructurales y descriptivas de *Theileria* spp.

Theileria sp. es un parásito que se encuentra en el filo Apicomplexa. Dentro de este filo se clasifican los grupos de parásitos intracelulares que afectan tanto a vertebrados como invertebrados (Brayton y col., 2007; Lim y McFadden, 2010). Hay una gran cantidad de características morfológicas que estos protozoarios comparten, como, una forma alargada y una región apical especializada. En dicha región apical se encuentran un conjunto de organelos que constituyen el complejo apical. Entre estos organelos se destacan el anillo polar, rhoptrias, micronemas, microporos y conoide. Dichos organelos tienen como función principal secretar las proteínas necesarias para el reconocimiento, adhesión e invasión de los merozoitos y esporozoitos a la célula hospedadora (Morrissette y Sibley, 2002). El filo está dividido en 4 órdenes: Coccidiasina, Gregarinasina, Haemosporida y Piroplasmida. *Theileria* está ubicada dentro del orden Piroplasmida, el cual representa al grupo de protozoarios transmitidos por garrapatas capaces de infectar a las células sanguíneas de una gran variedad de animales vertebrados. Dos de los géneros más importantes que se puede encontrar dentro de los piroplásmidos son *Babesia* y *Theileria*. El género *Theileria* se distingue por la infección de los leucocitos por parte de los esporozoitos, maduración de los esquizontes en merozoitos y la infección de los eritrocitos en forma de piroplasmas (Mans y col., 2015). En la Tabla I se presenta la clasificación taxonómica de *Theileria*:

Tabla I. Clasificación Taxonómica de Theileria.

Reino	Protozoa
Filo	Apicomplexa
Clase	Hematozoa
Subclase	Piroplasmia
Orden	Piroplasmida
Familia	Theileriidae
Género	Theileria

Dentro del género *Theileria* hay 6 especies de relevancia económica: *Theileria parva*, *Theileria mutans*, *Theileria taurotragi*, *Theileria annulata*, *Theileria orientalis* y *Theileria equi* (OIE, 2009). Las especies y subespecies han sido identificadas basadas en las diferencias a nivel bioquímico, inmunológico y molecular, además de las características del hospedador y del vector (Salih, 2013).

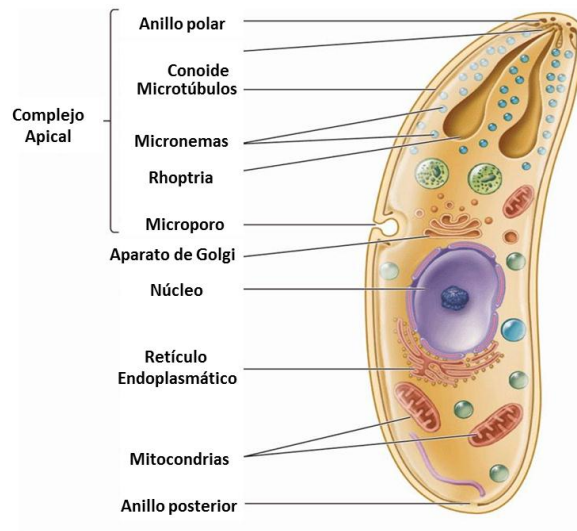


Figura 0.1. Morfología de un protozoario Apicomplexa en estado de merozoito. Tomado y modificado de Woolverton y col., 2008.

1.2 Distribución geográfica

La distribución geográfica de estos parásitos se encuentra directamente asociada a la distribución del vector. Como bien se mencionó anteriormente, el vector capaz de transmitir a estos parásitos es la garrapata, principalmente los pertenecientes a la familia Ixodidae, de los géneros *Rhipicephalus*, *Hyalomma*, *Amblyomma* y *Dermacentor* (Aparna y col., 2013). En la Tabla II se presenta los datos de la distribución geográfica de estos parásitos.

Tabla II. Distribución geográfica de las especies de Theileria, vectores y patogenicidad. Tomado y modificado de Salih, 2013.

Especies de Theileria	Vector	Enfermedad	Área endémica
<i>T. parva</i>	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	Fiebre de la costa este (FCE)	Sur de Sudán ⁽¹⁾ Centro ⁽²⁾ y Sureste de África ⁽³⁾
<i>T. annulata</i>	<i>Hyalomma</i> spp.	Theileriosis tropical	Al Norte de África ⁽⁴⁾ , Sur de Europa ⁽⁵⁾ , Medio Oriente ⁽⁶⁾ , India ⁽⁷⁾ , Rusia ⁽⁸⁾ y China ⁽⁸⁾
<i>T. equi</i>	<i>Amblyomma cajennense</i> <i>Rhipicephalus</i> spp. <i>Dermacentor</i> spp.	Theileriosis equina	Sureste de Europa ^(7,8) , África ⁽⁹⁾ , Asia ^(10, 11, 12) , Norte, Centro y Sur América ^(13, 14, 15, 16) .
<i>T. mutans</i>	<i>Amblyomma</i> spp.	Poco patogénica	África subsahariana, Islas del Caribe ⁽¹⁷⁾
<i>T. taurotragi</i>	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	Poco patogénica	Este, centro y suroeste de África ⁽¹⁸⁾
<i>T. orientalis</i>	<i>Haemaphysalis</i> spp.	No patogénica	Todo el mundo ⁽¹⁹⁾

⁽¹⁾ Marcellino y col., 2016. ⁽²⁾ Gachochi y col., 2012. ⁽³⁾ Chaisi y col., 2011. ⁽⁴⁾ Gharbi y Darghouth, 2015. ⁽⁵⁾ Viseras y col., 1997. ⁽⁶⁾ Ali y Radwan, 2011. ⁽⁷⁾ Datta y col., 1998. ⁽⁸⁾ OIE, 2009. ⁽⁹⁾ Motloang y col., 2008. ⁽¹⁰⁾ Wang y col., 2014. ⁽¹¹⁾ Kamyngkird y col., 2014. ⁽¹²⁾ Munkhjargal y col., 2013. ⁽¹³⁾ Ueti y col., 2012. ⁽¹⁴⁾ Georges y col., 2011. ⁽¹⁵⁾ Rosales y col., 2013. ⁽¹⁶⁾ Quintana-Nizoli y col., 2008. ⁽¹⁷⁾ Binta y col., 1998. ⁽¹⁸⁾ Gueye y col., 1987. ⁽¹⁹⁾ Gubbels y col., 2000.

1.3 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Theileria* es un ciclo indirecto, durante el cual se alternan fases de reproducción sexual y asexual. Este ciclo ocurre en tres fases: esquizogonia, gametogonia y esporogonia. Tanto la gametogonia como la esporogonia, ocurren en el vector, mientras que la esquizogonia ocurre en el hospedador vertebrado (Figura1.2).

Ciclo en el hospedador invertebrado

El ciclo es iniciado cuando las garrapatas se alimentan de la sangre de animales infectados, al entrar, los eritrocitos se lisan y liberan los estadios intraeritrocitarios del parásito, los cuales llegan al lumen del intestino. Una vez allí, ocurre, por un lado, la formación de microgametos, filiformes, uninucleados y pequeños, por otra, se forman los macrogametos, de forma ovoide, este proceso es conocido como gametogonia. Al ocurrir la fertilización de los gametos, se da la formación de un cigoto móvil capaz de invadir a las células epiteliales del intestino. Dentro de estas células, el cigoto pasa por una división meiótica que resulta en la formación de quinetos, los cuales son liberados a la hemolinfa y migran hasta las glándulas salivales. Allí, invaden a las células especializadas ubicadas en los acinos de la glándula y forman los esporontes, estos posteriormente se desarrollan en una malla multinucleada llama esporoblasto. La maduración de los esporoblastos ocurre después de que la garrapata se une al hospedador, dando origen a los esporozoitos que son liberados en la saliva de la garrapata (McKeever, 2009; Marcellino y col., 2016; Jalovecka y col., 2018).

Ciclo en el hospedador vertebrado

Una vez que los esporozoitos son inoculados al hospedador a través de la saliva del vector. El proceso por el cual los esporozoitos penetran los linfocitos consiste en el reconocimiento y adhesión a la membrana de la célula hospedadora, luego se da la formación de uniones celulares entre el parásito y la célula hospedadora, para permitir la entrada total del esporozoito a la célula

mediante un proceso llamado “zippering”, por último la membrana plasmática se cierra y se forma un red de microtúbulos derivadas de la célula hospedadora y que ayudan al desarrollo del parásito (Jalovecka y col., 2018).

Cuando los esporozoitos se encuentran dentro de los linfocitos, comienza el proceso de reproducción asexual denominado esquizogonia, en el cual se produce un grupo de células esquizontes multinucleadas, este grupo de esquizontes residen en el citoplasma y son capaces de transformar a la célula para que entre en un estado de proliferación descontrolada y así cada célula hija se encuentra infectada por el parásito en forma de esquizonte. A medida que la infección progresa, el parásito deja de dividirse y ocurre un proceso de diferenciación celular para producir merozoitos uninucleados, los cuales son liberados al torrente sanguíneo y continúan con la invasión de los eritrocitos (McKeever, 2009; Jalovecka y col., 2018). Inicialmente, el parásito queda en el interior de una vacuola que posteriormente pierde su membrana, permaneciendo el parásito listo para la división asexual y formando lo que se conoce como piroplasmas, estos piroplasmas se multiplican, de forma limitada, formando tétradas, las cuales forman lo que se conoce como “Cruz de Malta” por su forma al ser observadas en el microscopio (Mehlhorn y col., 1998; Tretina y col., 2015).

La fase que ocurre dentro de la células linfocíticas es la responsable de la mayoría de los signos clínicos que se encuentran asociados a la enfermedad que producen dichos parásitos (McKeever, 2009).

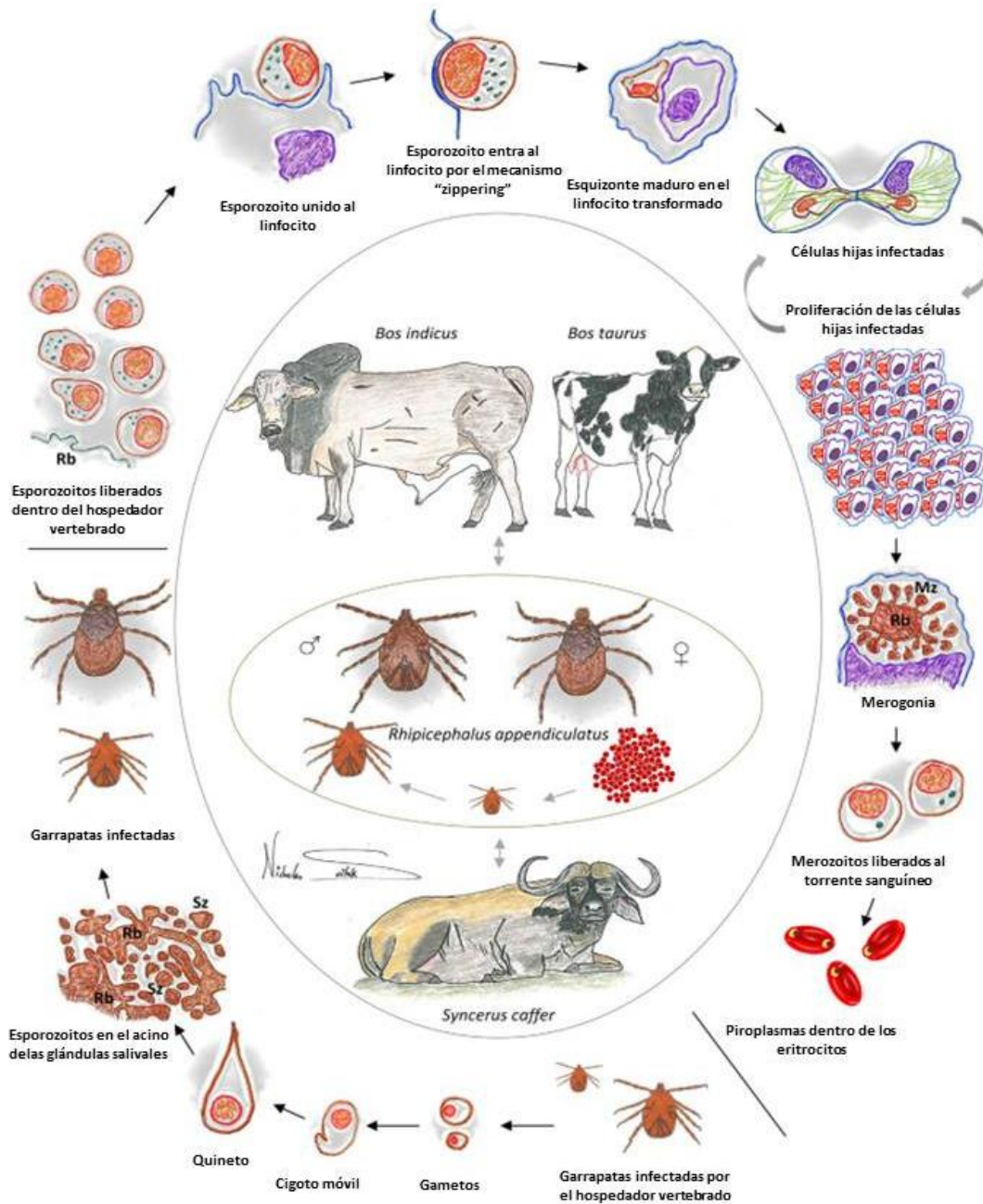


Figura 0.2. Ciclo de vida de *Theileria* spp. usando como ejemplo a *Theileria parva*. El esporozoito entra a los linfocitos, donde se desarrolla la fase esquizonte, transformando así a la célula hospedadora. Este proceso resulta en la expansión de las células infectadas. Durante esta fase se da el proceso de división celular, formando los merozoitos. Los merozoitos son liberados en la sangre e infectan a los eritrocitos. Una vez dentro de los eritrocitos, maduran y forman los piroplasmas. Cuando una garrapata se alimenta de la sangre infectada, ocurre la formación del quineto como producto final del ciclo sexual. El quineto invade las glándulas salivales, donde ocurre la esporogonia. Tomado y modificado de Nene y col. 2015.

1.4 Theileriosis

La theileriosis es una enfermedad que se encuentra englobada en un grupo de enfermedades conocidas como piroplasmosis, la principal característica de dicho grupo son los estados febriles. Dependiendo del hospedador, la theileriosis puede ser clasificada en dos subgrupos, theileriosis bovina y theileriosis equina.

Theileriosis bovina

Las infecciones con *T. parva* y *T. annulata* son las causantes de la Fiebre de la Costa Este y la Theileriosis tropical, respectivamente. Cada una de estas enfermedades presenta diferencias en cuanto a los períodos de incubación y los signos clínicos observados. El cuadro clínico de estas enfermedades puede variar desde la forma aguda a crónica. El cuadro agudo suele aparecer en los animales que no han tenido contacto previo con el parásito, como en el caso de la introducción de animales procedentes de zonas indemnes a zonas endémicas. La forma crónica suele observarse en el ganado sensibilizado o portador que sufre otro proceso capaz de reactivar la enfermedad (García, 2010).

El primer signo clínico que se observa en dichas enfermedades es una linfadenopatía regional cercana a la zona donde ocurrió la picadura de la garrapata, el parásito utiliza las vías linfáticas para invadir otros órganos linfoides causando una depleción linfoide.

Para el caso de la Fiebre de la Costa Este, el animal sufre de signos como anorexia y pérdida de la condición física, afectando la producción de leche. La temperatura corporal del animal puede superar los 40°C. Es posible encontrar petequias y equimosis en las membranas mucosas orales y conjuntivas. Una de las últimas etapas de esta enfermedad es conocida como “turning sickness”, en esta forma, las células infectadas bloquean a los capilares del sistema nervioso central, causando graves daños neurológicos, el animal pierde la coordinación de sus movimientos (Sudan y col., 2013).

Los animales recuperados de la fiebre de la Costa Este frecuentemente se vuelven portadores asintomáticos, pero la productividad de estos animales se vuelve ineficiente y su crecimiento se encuentra atrofiado.

La theileriosis tropical presenta signos clínicos similares a los de la fiebre de la Costa Este, pero en este caso, los parásitos destruyen también los eritrocitos del hospedador causando ictericia, anemia y en algunos casos, hemoglobinuria. El “turning sickness” parece no ser una característica de esta enfermedad, a pesar de presentar signos neurológicos en algunos casos.

Theileriosis equina

Los signos clínicos de esta enfermedad son variables y no específicos. Normalmente se presenta de forma aguda y se observa fiebre mayor a los 40°C, depresión, inapetencia, ictericia, disnea, aumento de la frecuencia cardíaca y respiratoria, congestión de las membranas mucosas.

En los casos subagudos, los signos son menos severos y la infección crónica resulta en variables signos clínicos como: inapetencia, pérdida de peso, fiebre transitoria, intolerancia a la actividad física y anemia. (Zobba y col., 2008).

Es importante destacar que existe una enfermedad parecida a la theileriosis equina, la cual es menos severa, pero presenta signos clínicos similares a esta. Es causada por *Babesia caballi* y juntas han sido nombradas como piroplasmosis equina. La principal diferencia entre ambas enfermedades es que *T. equi* causa linfadenopatía y anemia profusa producida por una parasitemia masiva. El cuadro clínico agudo es variable e inespecífico para cada una; en el caso de *T. equi* produce una forma clínica más grave que *B. caballi*, pero para ambos protozoos está caracterizado, generalmente, por fiebre, edema, debilidad progresiva, pérdida del apetito, además de otros signos clínicos como anemia hemolítica, mucosas pálidas o ictericas, taquicardia, taquipnea y hemoglobinuria (Díaz-Sánchez y col., 2018).

Tabla III. Resumen de las enfermedades causadas por *Theileria* spp. incluyendo las especies de los vectores, hospedadores y reservorios de cada uno (Tomado y modificado de CFSPH, 2009).

	Theileriosis equina	Fiebre de la Costa Este	Theileriosis Tropical
Hospedador	Caballos (<i>Equus ferus caballus</i>)	Vacas (<i>Bos taurus</i> , <i>Bos indicus</i>), Búfalos (<i>Bubalus bubalis</i>)	Vacas (<i>Bos taurus</i> , <i>Bos indicus</i>), Yak (<i>Bos grunniens</i>)
Vector	<i>Dermacentor</i> sp., <i>Rhipicephalus</i> sp., <i>Hyalomma</i> sp.	<i>Rhipicephalus</i> sp., <i>Ambyalomma</i> sp.	<i>Ambyalomma</i> sp.
Reservorio	Cebras (<i>Equus zebra</i>)	Búfalos (<i>Syncerus caffer</i>), Antílope (<i>Kobus ellipsiprymnus</i>)	Búfalos (<i>Bubalus bubalis</i>)

1.5 Métodos de diagnóstico

Actualmente existen diversas técnicas que son implementadas para la detección de hemoparásitos, pueden ser clasificadas de tipo directo o indirecto; las técnicas directas se basan principalmente la observación del parásito, como por ejemplo microscopía de muestras de sangre teñidas. Por su parte, hay técnicas del tipo indirecto que permiten identificar la presencia del hemoparásito a través de la respuesta inmune frente a los mismos. También hay un conjunto de técnicas a nivel molecular que permiten la detección del parásito mediante el análisis de material genético de los organismos.

Estudios microscópicos

Es el método más común utilizado para la detección de los parásitos en la sangre, la tinción de Giemsa en un frotis sanguíneo es la más utilizada. Es posible observar la presencia de *Theileria* spp. tanto en linfocitos como en eritrocitos (Figura 1.3). Al ser observados en eritrocitos, los parásitos se encuentran agrupados en lo que Koch designó como “cruz de Malta” (Mans y col., 2015)

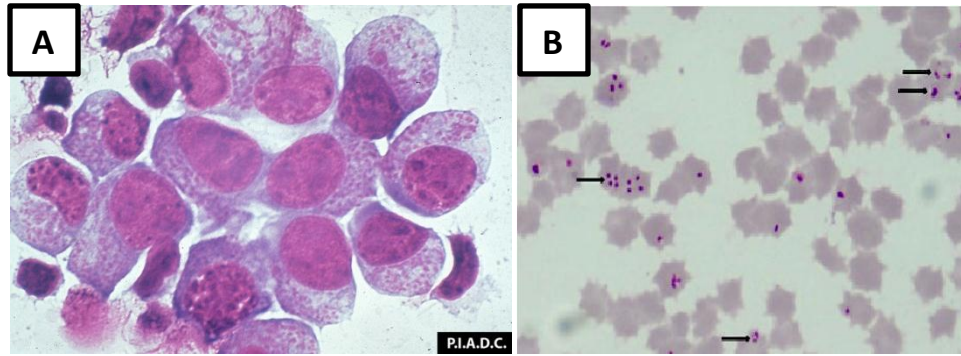


Figura 0.3. Infecciones de *Theileria* spp. en células sanguíneas vistas al microscopio.

- (a) Linfoblastos infectados con *Theileria parva* en el citoplasma. Tomado de: <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/disease-images.php?name=theileriosis&lang=es>
 (b) Micrografía de la cruz de Malta de *Theileria equi*, señaladas con una flecha, en un frotis sanguíneo de equino. Tomado de Sumbria y col., 2016.

A pesar de ser la técnica más común, es una de las técnicas con menor eficiencia y que presentan una gran cantidad de falsos negativos debido a la baja parasitemia. Dado que esta técnica es dependiente de la experiencia del observador resulta ser un método poco confiable (Chauhan y col., 2015), por dichas razones, se recomienda que sea complementada con otro tipo de ensayos.

Diagnóstico serológico

Los métodos serológicos o inmunológicos son pruebas diagnósticas indirectas basadas en la detección de los anticuerpos específicos circulantes. Los anticuerpos pueden aparecer entre los 15-20 días posteriores a la primera infección, dependiendo del agente patógeno y hospedador. Entre las técnicas serológicas más utilizadas se encuentran: prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFAT) y ensayo de inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA).

Prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFAT)

Esta prueba está basada en la interacción antígeno-anticuerpo. En primer lugar, se pueden obtener los parásitos de cultivos celulares o de animales infectados, luego estas células son tratadas con dos anticuerpos, el primero es capaz de reconocer a los antígenos del parásito y posteriormente, se añade un segundo anticuerpo que se encuentra marcado con un fluorocromo y su señal es

observada en un microscopio de fluorescencia. En el caso de *Theileria* sp. es posible utilizar 2 tipos de antígenos: uno constituido por piroplasmas, el cual se obtiene de los animales infectados y el preparado con esquizontes, a partir de los cultivos celulares (Mans y col., 2015).

Esta técnica es una de las más utilizadas y es la recomendada por la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE, 2009), sin embargo, el mayor problema de la técnica es la reactividad cruzada que se observa entre especies altamente relacionadas entre sí.

Ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA)

La técnica ELISA es una de las más utilizadas en el diagnóstico debido a su capacidad de automatización, sirve tanto para el diagnóstico rutinario como en estudios epidemiológicos (García, 2010). Esta técnica consiste en inmovilizar un antígeno en una placa y que este sea detectado mediante un anticuerpo que se encuentra enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable, a través de un cambio en la coloración y medido por espectrofotometría. El principal problema con este método es que se observan un gran número de resultados considerados falsos positivos o negativos y se debe a la desaparición de los anticuerpos y la persistencia del parásito en la sangre (Chauhan y col., 2015). Existen cuatro tipos de ELISA (Figura 1.4) mostrados a continuación:

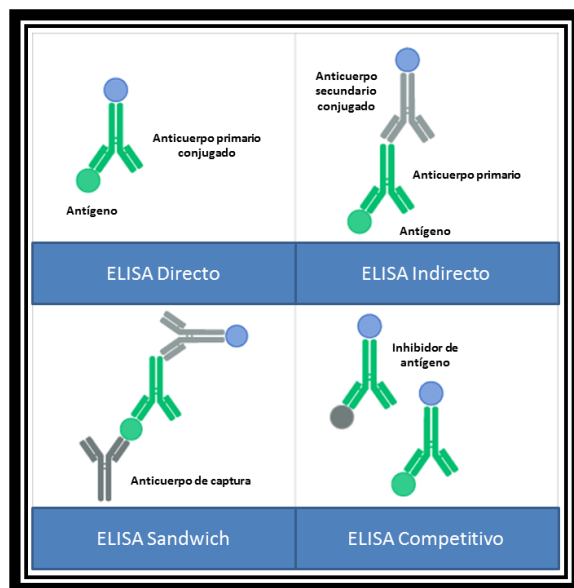


Figura 0.4. Tipos de ELISA utilizados para el serodiagnóstico. **(a)** Directo **(b)** Indirecto **(c)** Sándwich **(d)** Competitivo. Tomado y modificado de: <https://www.abcam.com/kits/types-of-elisa>

Se debe destacar dos tipos de ELISA que son de importancia para el presente trabajo: ELISA indirecto y ELISA competitivo.

ELISA indirecto: Este método consiste en un sistema de detección compuesto de dos anticuerpos. En primera instancia, se utiliza un anticuerpo primario capaz de detectar al antígeno inmovilizado en placa y luego, un anticuerpo secundario que detecta el anticuerpo primario y además está marcado con una enzima, la cual reacciona con un sustrato añadido posteriormente y produce una señal que puede ser medida por espectrofotometría. Es comúnmente utilizado para el diagnóstico de infecciones por parásitos, virus o bacterias.

ELISA competitivo: Una variante más compleja del ELISA y es conocida también como ELISA de inhibición. En dicho ensayo la presencia y cantidad de un antígeno particular en una muestra desconocida es determinado por su capacidad para competir contra un antígeno de referencia, llamado inhibidor, que se encuentra marcado para la unión a un anticuerpo fijo en una placa. Es usado generalmente para la detección y cuantificación de antígenos presentes en bajas cantidades.

Diagnóstico molecular

Las técnicas de diagnóstico molecular están basadas en la detección del material genético de los organismos, por lo que se realiza la búsqueda de una secuencia de nucleótidos que pueda ser lo suficientemente específica para el nivel de identificación deseado en el estudio. Entre las técnicas más destacables se encuentran: hibridación reversa en línea (RLB) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Hibridación reversa en línea (RLB)

La técnica es un trabajo conjunto de la hibridación y la PCR. Se basa en la hibridación de los productos previamente amplificados por PCR, con sondas específicas inmovilizadas en una membrana, con un respectivo orden de identificación, lo cual permite analizar múltiples muestras y detección simultánea de varios agentes patógenos (Ferreira, 2011).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es una técnica molecular que consiste en la transcripción enzimática del ADN y es utilizada principalmente para investigaciones médicas y biológicas para diferentes propósitos (Akbari y col., 2012). Ha sido aplicada para la detección de muchas especies de *Theileria* spp. y *Babesia* spp., reportándose una mayor sensibilidad y especificidad cuando es comparada con los ensayos serológicos. Muchos de los ensayos moleculares usan como blanco genes del ARN ribosómico, especialmente para la identificación a nivel de especies (Bhoora y col., 2010; Lempereur y col., 2017).

1.6 Genes ribosómicos

Los genes ribosómicos son de gran importancia en los estudios moleculares y evolutivos, ya que permiten conocer las relaciones filogenéticas entre especies. Los genes del ADN ribosómico en eucariotas son denominados 18S, 5,8S y 28S (Figura 1.5); presentan también dos espaciadores internos (ITS-1,

ITS-2) y un espaciador externo (ETS). La subunidad pequeña 18S ha sido ampliamente utilizada como herramienta para estudios filogenéticos, permitiendo clasificaciones más precisas de las especies de piroplasmas. Dicho gen está entre las secuencias de baja tasa de sustitución por lo que ha sido útil en el diseño de cebadores universales para los estudios moleculares (Criado-Fornelio y col., 2004).

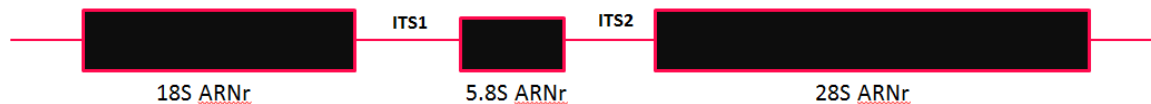


Figura 0.5. Esquema del gen ribosómico. Tomado y modificado de Hillis y Dixon, 1991.

1.7 Cisteín-peptidasas

Dentro de proceso infeccioso del género *Theileria* ocurre la síntesis y liberación de enzimas proteolíticas que forman parte del proceso patogénico como la degradación intracelular de hemoglobina y ruptura del citoesqueleto durante el ingreso al hospedador (Ascensio y col., 2018). Entre estas enzimas proteolíticas se encuentra un grupo que resulta de interés particular para el presente trabajo, las peptidasas.

Las peptidasas son un conjunto de enzimas que catalizan el rompimiento proteolítico de enlaces peptídicos. De este grupo de enzimas, se destaca a las cisteín-peptidasas las cuales en su sitio catalítico presenta un grupo tiol (-SH) proveniente de un residuo de cisteína, este grupo perteneciente a la familia C1A es de interés particular por su carácter inmunogénico y han sido de gran utilidad en el desarrollo de métodos diagnósticos a través de técnicas inmunoenzimáticas (Bremo, 2012).

Los hemoparásitos son capaces de generar un gran impacto en el área de la salud animal, principalmente en la industria ganadera. Entre estos hemoparásitos, se encuentra *Theileria*, el cual puede afectar a una diversidad de animales vertebrados pertenecientes a dicha industria, provocando pérdidas

económicas importantes a nivel global. Con el paso de los años, la expansión de este parásito ha sido cada vez mayor, incluyendo a Latinoamérica. En Venezuela, han sido identificadas previamente algunas especies de *Theileria*, pero no se cuentan con suficientes estudios epidemiológicos sobre la presencia del parásito en el país. Sin embargo, es conocida la presencia de las garrapatas vectores en ciertas zonas ganaderas del país, lo cual aumenta el riesgo de infección de los animales en dichas zonas.

Las pruebas microscópicas son muy limitadas para realizar estudios adecuados sobre la presencia del parásito. Al no contar con las pruebas adecuadas para su detección se hace inevitable la proliferación del parásito en el país, por lo que los investigadores asociados al área han buscado el diseño de nuevas estrategias que permitan su tratamiento y control efectivo. Dicho esto, resulta necesario el desarrollo y validación de una herramienta de diagnóstico molecular que permita la identificación del género *Theileria*, con el fin de obtener datos suficientes para garantizar estudios epidemiológicos.

Además, es importante el desarrollar nuevas técnicas en el serodiagnóstico basado en antígenos que permitan la identificación del parásito y que puedan ayudar a dilucidar los mecanismos de invasión, a fin de encontrar herramientas necesarias para la prevención y tratamiento de la patología.

Por tal motivo, se propone el diagnóstico molecular y serológico de *Theileria* spp. en muestras de campos provenientes de diversos estados venezolanos.

ANTECEDENTES

1.8 Diagnóstico molecular y serológico de la piroplasmosis equina en Venezuela

En un trabajo realizado por Rosales y col. (2013) se realizó la detección de la piroplasmosis equina en los estados Distrito Capital, Miranda, Aragua y Guárico. Para esto, se utilizaron dos metodologías. Por una parte, realizaron un diagnóstico mediante un ELISA competitivo y por otra, una PCR múltiple. Para el ELISA competitivo se evaluaron un total de 694 muestras de suero de caballos, mientras que por su parte, se evaluaron 136 muestras de ADN de caballos por PCR múltiple. Para la prueba de PCR, se utilizaron dos juegos de cebadores que permitían diferenciar las especies de *T. equi* y *B. caballi* o ambas. En primer lugar, se usó el juego de cebadores universales para el gen 18S ARNr de ambas especies y posteriormente otros juegos de cebadores que amplificaban específicamente para *T. equi* (Equi-R) y *B. caballi* (Cab-R).

La seroprevalencia de la piroplasmosis equina fue de un 50,2% de anticuerpos para *B. caballi*, encontrados en 161 caballos (23,2%), de los cuales 97 (14,0%) fueron seropositivos para *T. equi* y 90 (13,0%) fueron positivos para ambos parásitos. Por PCR se obtuvo una prevalencia del 66,2% distribuidos en 84 (61,8% positivos) para *T. equi* y 6 (4,4%) fueron positivos para ambos parásitos. El cELISA fue realizado utilizando un estuche comercial (VMRD Inc.) basado en la detección del antígeno EMA-1 para *T. equi* y RAP-1 para *B. caballi*. En este ensayo se observaron mayores niveles de prevalencia de *B. caballi* y de infecciones mixtas, en comparación a la PCR. Esta discrepancia es explicada por los autores debido a los diferentes parámetros que son evaluados para cada técnica, la técnica de PCR detecta el parásito en sí, mientras que el cELISA detecta los anticuerpos que se producen a partir de la infección por el parásito. Por PCR, la mayor prevalencia fue observada en el estado Apure, donde 92,3% de las muestras fueron positivas para *T. equi*.

En el Laboratorio de Bioquímica e Inmunología de Hemoparásitos de la Universidad Simón Bolívar se realizó un Trabajo Especial de Grado por la bachiller Bendayan, bajo la tutoría de la Dra. Pérez, titulado “Diagnóstico molecular de la Theileriosis bovina y equina en locaciones de los estados Guárico y Apure”, el cual tuvo como objetivo el diagnóstico por la técnica de PCR, basada en el marcador molecular 18S ADNr, de la Theileriosis animal en bovinos y equinos de campo, provenientes de las locaciones del estado Guárico y Apure.

Para esto, se realizó primero el diseño *in silico* de un cebador reverso especie-específico para *Theileria* sp. basado en la región 18S del ADN ribosómico (18SRT). Una vez diseñado y obtenido dicho cebador, se trabajó con un total aproximado de 100 muestras (80 bovinos, 20 equinos), las cuales fueron evaluadas mediante PCR, usando como juego de cebadores PiroA/18SRT. Por este método se obtuvo que la proporción de muestras positivas para bovinos fue de 42/70 (60,0%) y de 13/21 (61,9%) en equinos.

1.9 Realización de los péptidos sintéticos y su potencial en diagnóstico

En el trabajo doctoral realizado por Bremo (2012) se realizó la infección experimental de bovinos, utilizando un aislado venezolano de *Babesia bovis* proveniente del estado Guárico, Venezuela. Partiendo de ello, se llevaron a cabo los ensayos necesarios para la caracterización de las peptidasas presentes en los cultivos *in vitro*. Fueron identificadas siete peptidasas, de las cuales dos presentaban actividad cisteín-peptidasa. Una vez obtenida la cisteín-peptidasa llamada Bovispaína, se procedió a la amplificación por PCR de su región catalítica, con base en regiones consenso de cisteín-peptidasas de otros protozoarios. En una segunda etapa se amplificó y secuenció la Bovispaína-2 (BboCATL) completa. Haciendo uso de programas bioinformáticos se realizó una predicción de epítopes antigénicos en la superficie de dicha proteína.

Posteriormente, se obtuvieron siete posibles epítopes peptídicos de la Bovispaína-2, los cuales fueron sintetizados químicamente. Una vez sintetizados,

los péptidos fueron evaluados inmunogénicamente mediante inoculación en conejos y en el serodiagnóstico de la enfermedad. Cinco de los péptidos de BboCATL resultaron inmunogénicos en conejos y fueron reconocidos por sueros de bovinos infectados experimental o naturalmente en ELISA indirecto. Estos resultados indican que la peptidasa BboCATL representa una herramienta útil para el diagnóstico serológico y molecular.

OBJETIVOS

1.10 Objetivo General

- Diagnosticar por métodos moleculares y serológicos a *Theileria* spp. en muestras de campo provenientes de diversos estados venezolanos.

1.11 Objetivos Específicos

- Extraer el ADN genómico total a partir de muestras de sangre de equinos evaluados clínicamente, provenientes de hatos venezolanos.
- Validar la técnica de PCR para el diagnóstico molecular de *Theileria* sp. en muestras de campo.
- Elaborar mapas de restricción con las secuencias del gen 18S ADN ribosómico de *Theileria* sp.
- Analizar por estudios bioinformáticos la reactividad cruzada de los péptidos derivados de la bovispaína-2 para la detección de *Theileria* sp.
- Evaluar la reactividad cruzada de péptidos derivados de la bovispaína-2 mediante un ensayo de ELISA, utilizando sueros equinos provenientes de infecciones de campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.12 Selección de muestras evaluadas

Se trabajó con un conjunto de muestras de sangre periférica provenientes de equinos, las cuales habían sido recolectadas en salidas de campo realizadas por el grupo de Bioquímica e Inmunología de Hemoparásitos perteneciente a la Universidad Simón Bolívar. A cada uno de los equinos se le realizó un diagnóstico parasitológico a fin de conocer el estado de salud de dichos animales.

La extracción de sangre de dichas muestras realizó por medio de una punción yugular. Una vez realizadas las extracciones, se procedió al análisis por hematocrito (determinación de anemia) y por frotis sanguíneo teñido para determinar la presencia del parásito en sangre. Una vez evaluadas, las muestras fueron llevadas al laboratorio para ser almacenadas y refrigeradas a -20°C .

Las muestras de suero utilizadas también fueron provenientes de equinos previamente evaluadas por el grupo de Bioquímica e Inmunología de Hemoparásitos según lo planteado anteriormente.

1.13 Extracción del ADN total de las muestras

Se realizaron las extracciones de ADN genómico de sangre periférica proveniente de equinos. El protocolo utilizado para la extracción del ADN de sangre periférica fue descrito por los autores Bowen y Keeney en el año 2003.

Para comenzar, se descongelaron las muestras de sangre durante una hora a temperatura ambiente, posterior a esto, en un tubo de microcentrífuga de 1,5mL se añadió un volumen de 700 μL de sangre y 700 μL de una solución tampón de lisis celular (Tris-HCl pH 8 10mM, sacarosa 11%, MgCl_2 5mM, Tritón X-100 1%), que fueron mezcladas en un vórtex por cinco segundos. Una vez hecho esto, se incubaron las muestras durante cinco minutos a temperatura ambiente y

después se realizó una centrifugación a 750g por diez minutos. Concluido esto, se descartó el sobrenadante y al sedimento obtenido se le agregó, nuevamente, 500µL de la solución tampón de lisis celular y se repitió el procedimiento anterior con una centrifugación a 750g por quince minutos. Luego de descartar el sobrenadante, al sedimento se le agregaron 300µL de una solución tampón de lisis nuclear (Tris-HCl pH 8 10mM, EDTA 10mM, Citrato de Sodio 10mM y SDS 1%), resuspendiéndolo y dejándolo a 37°C por treinta minutos, una vez transcurrido este tiempo, se añadieron 100µL de Cloruro de sodio (NaCl 5,3 M) y 500µL de Cloroformo. Se mezcló por inversión hasta observar una emulsión uniforme y se centrifugó nuevamente a 750g por cinco minutos.

La mezcla es separada en 2 fases: una fase acuosa superior, en la cual se encuentra el ADNg disuelto y una fase orgánica inferior que contiene contaminantes y proteínas que no son de interés; de dicha fase acuosa superior se tomaron 300 - 350 µL y se pusieron en un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL y se le añadieron 600 - 700 µL de etanol absoluto frío, este tubo se mezcló, nuevamente, por inversión hasta observar la formación de una malla blanquecina en él, la cual indicó la presencia del ADNg extraído, estos tubos se dejaron incubando a -20°C por tres días. Al concluir este período, se hizo una última centrifugación a 750g por diez minutos y al terminar se retiró el sobrenadante y se dejó secar el sedimento durante una hora a temperatura ambiente. Al cabo de una hora fue resuspendido el sedimento con 50 µL de agua estéril y se incubó durante una hora a 60°C.

1.14 Evaluación cualitativa y cuantitativa del ADNg extraído

La evaluación cualitativa del ADNg se realizó mediante una corrida electroforética en geles de agarosa al 0,8% m/v y 1% m/v, los cuales fueron corridos en una cámara de electroforesis horizontal BIO-RAD® a 100V durante veinticinco minutos. Se cargó en el gel una mezcla compuesta por 2µL de la muestra y 2µL de la solución tampón de carga (Azul de Bromofenol al 0,25%,

Xileno Cianol FF al 0,25% y glicerol al 30%) en una solución tampón de corrida TAE 0,5X (Tris-Acetato 40mM, EDTA 1mM). Posteriormente, se realizó una tinción con una solución de bromuro de etidio (0,5µg/mL), dejando el gel durante una hora en dicha solución. Las bandas fueron visualizadas en un transiluminador de luz UV.

Una vez que se evaluaron todas las muestras, se realizó la evaluación cuantitativa del ADNg. Utilizando una placa de 96 pocillos, se preparó una dilución 1:10, añadiendo 90µL de agua estéril y 10µL de ADNg. Dicha placa fue puesta en un espectrofluoroluminómetro GENios TECAN, el cual realizó las mediciones de densidad óptica (D.O) en dos longitudes de onda (260nm y 280nm).

1.15 Amplificación por PCR

La amplificación por PCR fue realizada utilizando un par de cebadores presentados en la Tabla IV, los cuales habían sido previamente evaluados en una corrida electroforética en gel de agarosa al 2% m/v. El tamaño esperado de los fragmentos se muestra en la Tabla V.

Tabla IV. Secuencias de los cebadores empleados para la detección de *Theileria* spp.

Cebador	Dirección	Secuencia	Referencia
Piro A	Sentido	5'–AATACCCAATCCTGACACAGGG– 3'	Olmeda y col., 1997
18SRT	Antisentido	5'–CTGCTTTGAGCACTCTAATT– 3'	Bendayan, 2018
Piro B	Antisentido	5'–TTAAATACGAATGCCCCAAC–3'	Olmeda y col., 1997

Tabla V. Tamaño esperado por PCR con cada juego de cebadores para *T. equi*.

Juego de cebadores	Tamaño Esperado (pb)
PiroAB	420
PiroA/18SRT	304

Debido a problemas con la amplificación usando el juego de cebadores PiroA/18SRT, se realizó una estandarización de las condiciones de temperatura

de hibridación, evaluando temperaturas en un rango de 50°C a 60°C. Para cada una de estas reacciones, se utilizaron las concentraciones descritas en la Tabla VI para un volumen final de 12,5µL y 100ng de ADN proveniente de una muestra evaluada previamente y considerada como positiva en el trabajo de Rosales y colaboradores (2013) y para completar el volumen hasta 12,5µL se utilizó agua destilada estéril. Como control de reacción, en lugar de agregar el ADN molde, se añadió agua destilada estéril hasta completar el volumen final.

Las condiciones del programa, así como las concentraciones y volúmenes utilizados para las reacciones se presentan en las Tablas VI y VII, respectivamente.

Tabla VI. Condiciones del programa del termociclador para la reacción de PCR.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización	94	4	1X
Desnaturalización	94	1	30X
Hibridación	50 – 60 (PiroA18SRT)	1	
	60 (PiroAB)		
Extensión	72	1	
Extensión	72	10	1X
Finalización	4	10	1X

Todas las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador XP Cycle Bioer, bajo las condiciones presentadas anteriormente.

Tabla VII. Mezcla de reacción de PCR.

Componentes	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (μL)
Buffer (Agilent®)	10X	1X	1,25
dNTPs (Promega®)	10mM	0,2mM	0,25
Piro A	10 μM	0,8 μM	0,25
Piro B	10 μM	0,8 μM	0,25
18SRT	10 μM	0,8 μM	1
Paq5000 (Agilent®)	5U/ μL	1U/12,5 μL	0,125

1.16 Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% m/v

A fin de obtener una buena sensibilidad y resolución en los resultados, se llevaron a cabo geles de poliacrilamida al 15% m/v. Para comenzar con el montaje del gel, primero se preparó un gel de sellado que consistía en: 1mL de solución acrilamida-bisacrilamida al 30%, 50 μL Persulfato de sodio (APS) 10% y 5 μL de tetrametiletilendiamina (TEMED), esta preparación se añadió rápidamente al montaje y se esperó un tiempo aproximado de veinte minutos a la polimerización del gel. Luego, se preparó el gel de resolución de poliacrilamida al 15% utilizando 12,5mL de la solución acrilamida-bisacrilamida al 30%; 12,5mL de la solución tampón TAE 1X, 72 μL de APS al 10% y 24 μL de TEMED. Esta solución se añadió rápidamente en el montaje y se esperó que polimerizara. Una vez polimerizado completamente, se procedió al montaje de una corrida electroforética vertical, donde a cada uno de los pozos se le agregaron 1 μL de la solución tampón de

carga y 6µL de los productos de PCR. La electroforesis se corrió a un voltaje 90V durante cuatro horas.

Una vez finalizada la corrida, se incubó el gel en una solución fijadora (Ácido acético 10% v/v, Etanol 10% v/v) durante un día. Luego se lavó el gel tres veces por 5 minutos cada lavado, con agua destilada. Para la tinción se incubó el gel en una solución de Nitrato de plata 0,15% m/v durante treinta minutos, al finalizar se lavó nuevamente el gel con agua destilada por un tiempo de diez segundos. Por último, se incubó el gel en una solución reveladora (Hidróxido de sodio 1,5%, Formaldehído 0,15% v/v) durante unos minutos hasta lograr la coloración deseada en el gel y se puso en solución fijadora por unos minutos.

1.17 Sensibilidad y especificidad de la PCR

Para la validación de la PCR, en primer lugar se construyó una tabla de contingencia 2x2 (Tabla VIII), con el propósito de comparar los resultados obtenidos con los juegos de cebadores PiroAB y PiroA/18SRT (Akobeng, 2007).

Tabla VIII. Tabla de contingencia 2x2 para la validación de la PCR.

		PiroAB	
		Positivos	Negativos
PiroA/18SRT	Positivos	VP	FP
	Negativos	FN	VN

VP: Verdaderos Positivos
FP: Falsos Positivos
FN: Falsos Negativos
VN: Verdaderos Negativos

Luego de haber construido la tabla se procedió a los cálculos de sensibilidad y especificidad utilizando las siguientes fórmulas (Akobeng, 2007):

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Verdaderos Positivos}}{\text{Verdaderos Positivos} + \text{Falsos Negativos}} \quad 4.1$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Verdaderos Negativos}}{\text{Verdaderos Negativos} + \text{Falsos Positivos}} \quad 4.2$$

Adicionalmente a estos valores, se puede conocer la probabilidad de que el diagnóstico sea realmente positivo o realmente negativo, para ello se calcularon los indicadores conocidos como valores predictivos, según las siguientes fórmulas:

$$\text{Valor Predictivo Positivo} = \frac{\text{Verdaderos Positivos}}{\text{Verdaderos Positivos} + \text{Falsos Positivos}} \quad 4.3$$

$$\text{Valor Predictivo Negativo} = \frac{\text{Verdaderos Negativos}}{\text{Verdaderos Negativos} + \text{Falsos Negativos}} \quad 4.4$$

1.18 Estudios de restricción *in silico*

Para la determinación de las enzimas de restricción se realizó, en primer lugar, un alineamiento múltiple de secuencias del gen 18S de *T. equi* y *B. caballi* (Tabla IX). Dicho alineamiento fue realizado con el programa *Clustal W* versión 1.2.2, a fin de obtener una secuencia consenso para ambas especies. Luego, con la ayuda del programa *BioEdit* versión 7.2.5 se acotaron las secuencias consenso con los cebadores especie-específicos de cada una (Tabla X). Una vez obtenidas estas secuencias, se utilizó el programa *Nebcutter 2.0* (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) y se seleccionaron todas las enzimas disponibles comercialmente y aquellas que tuvieran un punto de corte único para las secuencias.

Tabla IX. Secuencias de *B. caballi* y *T. equi* utilizadas para los estudios de restricción.

Nombre de la secuencia	Código de acceso	País de origen
Secuencia parcial del gen ribosómico 18S <i>Theileria equi</i> .	KF559357.1	China
Secuencia parcial del gen ribosómico 18S de <i>Theileria equi</i> clon 41.	KU240071.1	Brasil
Secuencia parcial del gen ribosómico 18S de <i>Theileria equi</i> aislado A11N.	KX227641.1	Israel
Secuencia completa del gen 18S ribosómico de <i>Babesia caballi</i> cadena EB1.	AY534883.1	España
Secuencia parcial del gen ribosómico 18S <i>Babesia caballi</i> clon Jaboticabal.	KY952238.1	Brasil
Secuencia parcial del gen 18S ribosómico de <i>Babesia caballi</i> genotipo A_CABEQ30.	EU642512.1	Sudáfrica

Tabla X. Juegos de cebadores especie-específicos utilizados para *B. caballi* y *T. equi*.

Cebador	Dirección	Secuencia
Piro A	Sentido	5'-AATACCCAATCCTGACACAGGG-3'
18SRT	Antisentido	5'-CTGCTTTGAGCACTCTAATT-3'
18SF Babesia	Sentido	5'-CTGCGAATGGCTCATTACAA-3'
18SR Babesia	Antisentido	5'-CTGCTTGAAACACTCTAATT-3'

1.19 Estudio bioinformático de los péptidos sintéticos derivados de la bovispaína-2

En el trabajo realizado por Bremo (2012) se obtuvieron 7 péptidos sintéticos derivados de la bovispaína-2 (Figura 4.1), cada uno tiene una longitud de 15 aminoácidos, ubicados sobre la superficie de la proteína. Dichos péptidos fueron sintetizados a partir de la secuencia del gen de una cisteín-peptidasa putativa del genoma de *B. bovis* (MEROPS: XP_0016110695) y se realizó un estudio bioinformático para determinar las posibles regiones de alineamiento entre

las secuencias de los péptidos y las secuencias de las cisteín-peptidasas de *T. equi* y *B. caballii*. En la Tabla XI y Figura 4.1 se presentan estos péptidos y su posición en la cadena polipeptídica:

Tabla XI. Secuencias de los péptidos sintéticos. Tomado de Brems (2012).

Nº	Secuencia aminoacídica	Posición en la cadena polipeptídica	Nº de AA	Peso Molecular (Da)
1	VESLLKRQKTDVRLS	92-106	15	1.771,05
2	ELVSCQLGNQGCNGG	109-123	15	1.477,60
3	PVKDQGMCGSCWAF	73-87	15	1.854,14
4	IHRSEEVPLYAADGK	137-151	15	1.683,84
5	LAADGKCVAHGDKY	146-160	15	1.547,71
6	SGGVFDGECSDLNH	197-212	15	1.564,57
7	DGYFRLERTNTPTDK	243-257	15	1.811,93

El programa *EMBOSSneedle* (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/), hace una lectura de dos secuencias de entrada y escribe su alineación de secuencia global óptima. Entonces, las dos secuencias de los péptidos que presenten una mayor similitud e identidad con las cisteín-peptidasas de *T. equi* y *B. caballii* fueron utilizadas para el ensayo inmunoenzimático.

1	MEIPAAASDL	SNLDDHYVRS	DDEVDRDTTLI	GRSRCCVVK	KTMWIVLLGT	AILTAAITSG
61	IILLVTSLSG	SKAKPSGGVK	HIGKFDGLNR	ADCHVSPETF	AELSSMAHLG	EINVSDPAEI
121	VKYMDFTRMA	KKFDRKYDTV	AERHTAFLNF	RRNHDIKSH	EHNKAATYTK	DLNHFFDKDI
181	KAVAAKLLHK	IDVYNESNIS	VTPTDATTATK	ENQPIYATLK	NYSVSAGYPP	IGSKVNFEDI
241	DWRRADAVT	P VKDQGMCGSC	WAFAAVGS	VE SLLKRQKTDV	RLSEQELVSC	QLGNQGCNGG
		PS3		PS1		PS2
301	YSDYALNYIK	FNG	IHRSEEV	PYLAADGKCV	AHDGTYIYIK	GYHAAKGRSV ANQLLVMGPT
			PS4 y PS5			
361	VVYIAVSEDL	MHY	SGGVFDG	ECSDSELNHV	VLLVGEYDS	ALKKRYWLLK NSWGTSWGED
			PS6			
421	GYFRLERTNT	PTDK	CGVLSY	GYVPY		
		PS7				

Figura 0.1. Secuencia aminoacídica de la bovispaína-2 en fucsia se encuentran resaltadas las secuencias de los péptidos sintéticos. Tomada de Brems (2012).

1.20 Estandarización del ensayo inmunoenzimático indirecto (iELISA)

Para este ensayo se utilizó el protocolo modificado de Ternynck y Avrameas (1989). El ensayo comenzó con la sensibilización de las placas de poliestireno de 96 pocillos por una noche a 4°C con 100µL de los péptidos seleccionados, en cámara húmeda. Para la obtención de las concentraciones óptimas de este ensayo, se realizaron titulaciones de distintas cantidades de los péptidos (50, 25, 10, 5 ng/pozo), los cuales fueron diluidos en una solución tampón Carbonato-Bicarbonato 50mM, pH 9.6.

Al día siguiente, se descartó la solución y se lavaron las placas 3 veces por cinco minutos con una solución tampón de Fosfato de sodio salino 20mM, pH 7.2, Tween 0.1% v/v (PBST). Posteriormente, se bloquearon las placas con 200µL de una solución de albúmina de suero bovino (BSA) 1% m/v en PBST 20mM 0,1%; incubadas en cámara húmeda por 2 horas a 37°C. Nuevamente, se descartaron las soluciones y se lavaron las placas. Seguidamente las placas se incubaron con los sueros primarios de los equinos, inicialmente se utilizaron dos concentraciones (1:100, 1:150) con el fin de encontrar la concentración óptima. Estos sueros fueron preparados en solución de bloqueo e incubados en cámara

húmeda durante una hora a 37°C. Se descartó la solución y se hicieron tres lavados con PBST. Las placas fueron incubadas con 100µL del anticuerpo conjugado marcado con peroxidasa anti-IgG de equino Jackson®, probando dos diluciones (1:1000, 1:1500) en solución de bloqueo por 1 hora a 37°C. Para finalizar, se realizaron tres lavados con PBST y se incubaron las placas en oscuridad con ABTS 2 mM 0,005% en solución tampón de Citrato 50 mM por 45 minutos. La lectura de la absorbancia se realizó a $\lambda=405\text{nm}$, en un espectrofluoroluminómetro marca Tecan®, modelo GENios.

El experimento fue realizado con el suero de equinos que habían sido previamente evaluados por signos clínicos y microscopía, resultando como equinos sanos provenientes del estado Miranda, Venezuela, cada una de las muestras fue probada por duplicado en la placa. También fueron definidos dos controles positivos de muestras evaluadas previamente por frotis sanguíneo y PCR, consideras positivas para *B. caballi* y *T. equi*, respectivamente. El esquema seguido para este ensayo se presenta a continuación en la Tabla XII:

Tabla XII. Esquema de trabajo para la estandarización del ELISA indirecto. **[SP]:** Concentración de suero primario. **[AC]:** Concentración del anticuerpo conjugado. **B:** Blanco (Tampón Carbonato – Bicarbonato). **B+:** Tampón Carbonato – Bicarbonato + Suero primario positivo. **B-:** Tampón Carbonato – Bicarbonato + Suero primario negativo.

[SP]	[AC]		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1:100	1:1500	A	B	5ng/pozo		10ng/pozo		25ng/pozo		50ng/pozo		Sin antígeno		B+
		B	B											B+
1:150	1:2500	C	B											B+
		D	B											B+
1:100	1:1500	E	B	5ng/pozo		10ng/pozo		25ng/pozo		50ng/pozo		Sin antígeno		B-
		F	B											B-
1:150	1:2500	G	B											B-
		H	B											B-

1.21 iELISA para evaluar la reactividad cruzada de los péptidos sintéticos

Una vez que fueron obtenidas las concentraciones óptimas para cada uno de los componentes del ensayo, se realizaron una serie de iELISA usando el protocolo descrito en la sección 4.9 para los sueros primarios de equinos. La distribución de los pozos de las placas se presenta en la Tabla XIII. Para dicho ensayo se utilizaron cuatro controles, el primero, el blanco, donde los pozos se encontraban en presencia únicamente del tampón carbonato-bicarbonato; control negativo que consistía en una muestra de suero de los días pre-infección de un caballo infectado experimentalmente con *Trypanosoma* sp.; por último, los controles positivos, tanto para *B. caballii* como para *T. equi*, fueron muestras determinadas como positivas en el trabajo realizado por Rosales y colaboradores (2013). En la siguiente Tabla se presenta el esquema utilizado para realizar el ensayo:

Tabla XIII. Esquema del ELISA indirecto para la reactividad cruzada de los péptidos sintéticos. **Blanco:** Tampón Carbonato – Bicarbonato. **C-:** Control negativo de un equino sano. **C+:** Control positivo de equinos infectados con *T. equi* y *B. caballii*.

	Con Antígeno						Sin Antígeno					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanco						Blanco					
B	C-			SP1			C-			SP1		
C	C+			SP2			C+			SP2		
D	SP3	SP4		SP5		SP3	SP4		SP5			
E	SP6	SP7		SP8		SP6	SP7		SP8			
F	SP9	SP10		SP11		SP9	SP10		SP11			
G	SP12	SP13		SP14		SP12	SP13		SP14			
H	SP15	SP16		SP17		SP15	SP16		SP17			

Previamente fue desempeñado un ensayo haciendo uso de los sueros de equinos provenientes del Club Ecuestre El Hatillo que fueron considerados como equinos sanos mediante una prueba microscópica y evaluación de signos clínicos, a partir de esto, fue calculado el valor del punto de corte corregido (P.C), utilizando la siguiente ecuación (De Savigny y Voller, 1980):

$$P.C = \bar{X} + 3\sigma$$

4.5

Todos los valores de densidad óptica que sean menores o iguales al punto de corte son considerados como negativos, mientras que todos aquellos por valores de densidad óptica por encima del punto de corte son considerados como positivos.

RESULTADOS

1.22 Selección de muestras

La población estudiada en el diagnóstico molecular, en principio, estuvo comprendida por 60 muestras de campos provenientes de hatos del estado Apure, Venezuela. Las muestras de sangre fueron recolectadas al azar, de animales que presentaban signos clínicos de infección.

Para el caso del diagnóstico serológico se trabajó con un total de 82 muestras de campo de suero de equinos, que fueron colectadas al azar, de animales con signos clínicos de infección. Dichas muestras provienen de hatos pertenecientes a los estados Apure, Cojedes y Portuguesa, Venezuela.

Tabla XIV. Número total de muestras por localidad utilizadas en el diagnóstico serológico.

Localidad	Número de muestras
Apure	60
Cojedes	10
Portuguesa	12

1.23 Extracción de ADNg de las muestras para diagnóstico molecular

Se realizó la extracción de un total de 60 extracciones de ADNg siguiendo el protocolo descrito en la sección 4.2.

1.24 Evaluación cualitativa del ADNg total para diagnóstico molecular

Seguidamente de la extracción del ADNg total de las muestras, se procedió a la evaluación del estado de las mismas en una corrida electroforética horizontal de geles de agarosa al 0,8% m/v y una tinción con bromuro de etidio.

Se encontró que una parte importante de las muestras estaban degradadas. Debido al uso previo de las muestras de sangre, no se pudo realizar nuevamente extracciones, por lo cual se realizó un proceso de selección de las muestras que se encontraban en mejor estado (Figura 5.1).

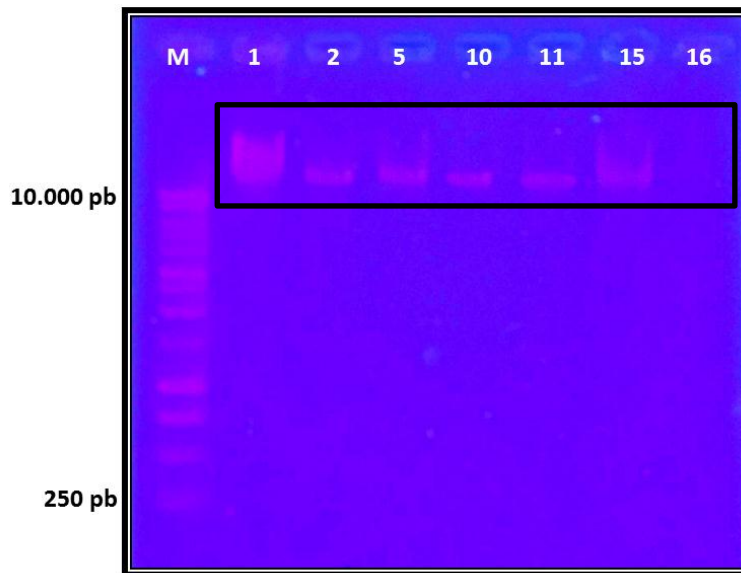


Figura 0.1. Análisis cualitativo del ADN genómico total. Gel de agarosa al 0.8% m/v de muestras del estado Apure, recolectadas en el año 2013.

Al observar una banda nítida, definida y de alto peso molecular (aproximadamente 10.000 pb) se refiere a una muestra de ADN bien conservada. En cambio, los casos donde hay una ausencia de banda o la banda tiene poca definición, encontrándose dispersa por el carril hace referencia a un muestra de ADN de baja calidad y mal conservada, considerándose como razón de esto, el proceso de congelamiento y descongelamiento al que han sido sometidas dichas muestras, promoviendo así la degradación del material genético. Aquellas

muestras en las que se obtuvieron bandas poco definidas o ausencia de ellas, fueron descartadas para el ensayo de PCR.

1.25 PCR de secuencias específicas de *T. equi* con cebadores 18S

Tras la evaluación cualitativa y cuantitativa (datos no mostrados) fueron seleccionadas un total de 28 muestras para realizar la amplificación por PCR.

Al momento de realizar el experimento, se definieron un grupo de controles positivos y negativos. En primer lugar, para todas las reacciones se mantuvo un control de reacción que consistía en no añadir ADN a la mezcla de reacción. Dicho volumen fue completado con agua estéril, a fin de verificar que no existía ningún tipo de contaminación en los reactivos usados. Además de esto, para todas las reacciones también se tuvo como control negativo el ADNg de un equino que había sido evaluado por PCR y previamente fue considerado como un equino sano, proveniente de la finca La Candelaria. Como controles positivos, se utilizaron dos muestras que habían sido previamente evaluadas por el Laboratorio de Fisiología de Parásitos de Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), las cuales provenían de la finca La Candelaria, ubicada en el Estado Guárico, Venezuela.

Al comenzar este experimento se presentaron diversos problemas en el proceso, por lo que fue necesaria la realización de diversas pruebas con los reactivos, a fin de encontrar los más apropiados (Tabla XV).

Tabla XV. Mezclas probadas para la optimización del ensayo de PCR.

1	Taq <i>Pfu</i> Fundaim	Buffer Promega©
2	Taq <i>Pfu</i> Fundaim	Buffer Fundaim
3	Taq Invitrogen©	Buffer Invitrogen© 10X (diluido a 1X)
4	AmpliTaq	Buffer Promega© 5X
5	MasterMix comercial SuperHot BIORON 2X (diluido a 1X)	
6	Taq Fundaim	Buffer Promega© 5X
7	Taq Fundaim	Buffer Promega© 5X
8	MasterMix Casera (FlexiTaq y Buffer Promega©)	
9	MasterMix Promega©	
10	MasterMix Casera (FlexiTaq y Buffer Promega©+ PiroA18SRT)	
11	Taq Promega©	Buffer Promega© 5X
12	MasterMix Casera (TaqFundaim y Buffer Promega©+ PiroA18SRT)	

Una vez realizado esto, al no tener resultados satisfactorios (datos no mostrados), se procedió a realizar un gradiente de la temperatura de hibridación, probando un rango de temperaturas de 50 a 60°C. Los reactivos utilizados fueron dos productos nuevos de la marca Agilent©, además se utilizaron las dos muestras positivas para *T. equi* donadas por el Laboratorio de Fisiología de Parásitos del IVIC, recolectadas en la hacienda La Candelaria y clasificadas como B11 (2011) y 69 (2009). Los resultados se presentan en la Figura 5.2:

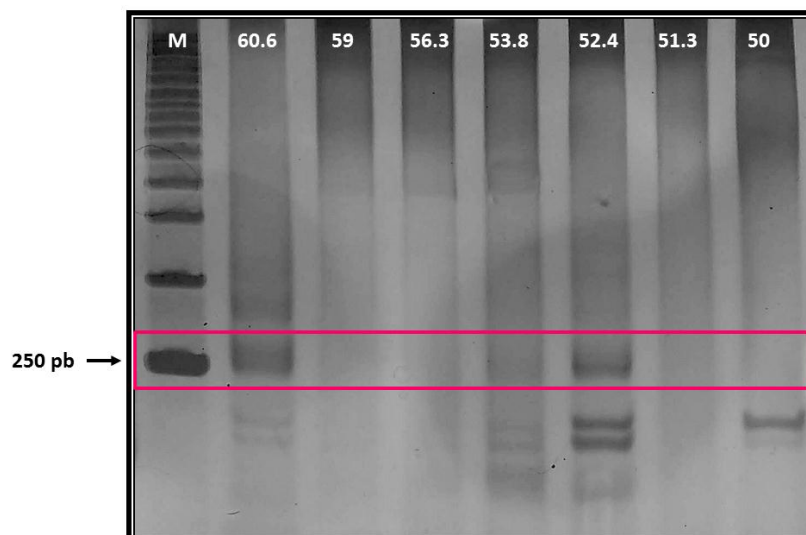


Figura 0.2. Análisis por gel de poliacrilamida al 15% con productos de PCR de la estandarización de la temperatura de hibridación. Carril 1: Marcador de peso molecular de 1kB Promega®. Carril 2 al 7. Productos de PCR del control positivo para *T. equi*. Los números indicados en la parte superior de cada carril son las temperaturas de hibridación (°C) de cada producto de PCR.

En la Figura 5.2, se pueden observar en los carriles de las temperaturas 53,8°C y 52,4°C y 60,6°C una banda de un tamaño aproximado a los 250pb, un poco menor al producto esperado para *T. equi* (aprox. 304 pb). En los carriles de 60,6°C; 59°C; 56,3°C y 53,8°C se aprecian ciertas bandas inespecíficas de mayor peso molecular, mientras que la temperatura de 52,4°C presenta una única banda nítida y bien definida cercana al tamaño esperado, por lo cual se definió esta como la temperatura óptima de hibridación.

Para la validación del ensayo de PCR, fueron tomadas un grupo de muestras de campo que corresponde a las recolectadas en el estado Apure, en el año 2013 y que fueron previamente evaluadas de manera cualitativa y cuantitativa (datos no mostrados). Dichas muestras fueron amplificadas utilizando dos juegos de cebadores, el primero fue PiroAB y el segundo fue PiroA/18SRT. Todos los productos fueron visualizados en geles de poliacrilamida al 15%, teñidos con nitrato de plata (Figuras 5.3 y 5.4).

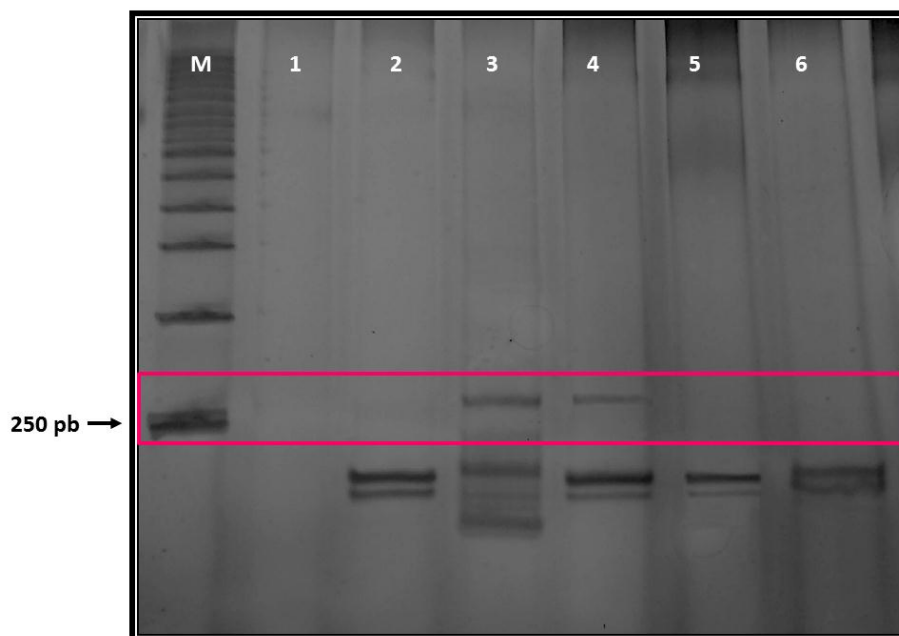


Figura 0.3. Análisis por gel de poliacrilamida de los productos de PCR para los cebadores PiroA/18SRT de las muestras del estado Apure 2013. Carril M: Marcador de peso molecular 1kb Promega®. Carril 1: Control de reacción (sin ADN). Carril 2: Control negativo, equino sano (B39, Guárico 2009). Carril 3: Control positivo de *T. equi* (69, Guárico 2009). Carril 4-6: Muestras problemas amplificadas.

Se puede observar en la Figura anterior la presencia de una banda nítida y bien definida en el carril 4 que concuerda con la banda observada en el control positivo ubicado en el carril 3. Al igual que la Figura 5.2, la banda observada se encuentra por los 250 pb, un tamaño menor al esperado teóricamente.

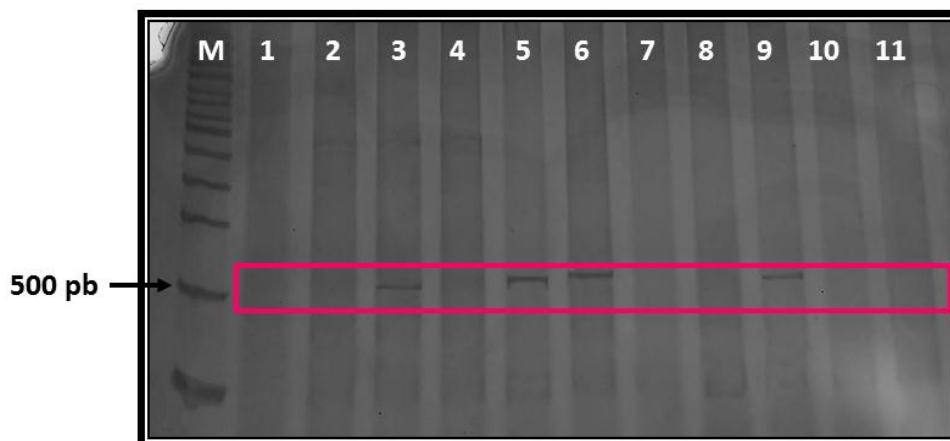


Figura 0.4. Análisis por gel de poliacrilamida de los productos de PCR para los cebadores PiroAB de las muestras del estado Apure 2013. Carril M: Marcador de peso molecular 1kb Promega®. Carril 1: Control de reacción (sin ADN). Carril 2: Control negativo, equino sano (B39, Guárico 2009). Carril 3: Control positivo de *T. equi* (69, Guárico 2009). Carril 4-6: Muestras problemas amplificadas.

En este caso, la Figura 5.4 se observa la presencia de 3 bandas nítidas y bien definidas en los carriles 5, 6 y 9 que corresponden con la banda del control positivo ubicada en el carril 3. Estas bandas se encuentran ubicadas por los 500pb, lo cual mayor al tamaño teórico esperado (aprox. 420 pb).

En la Tabla XVI se presenta el número de muestras que han resultado positivas en el diagnóstico molecular. Fue obtenido un porcentaje del 64,2% de muestras positivas para el juego de cebadores PiroAB, por su parte, con el juego de cebadores PiroA/18SRT se obtuvo un porcentaje de 46,4% de muestras positivas.

Tabla XVI. Resultados positivos obtenidos mediante PCR.

Cebadores	Total de muestras positivas	%
PiroAB	18	64,2
PiroA/18SRT	13	46,4

1.26 Estimación de la sensibilidad y especificidad de la PCR

Luego de culminar la PCR se procedió a realizar los cálculos necesarios para la validación de dicha técnica. Para hacer esto, se utilizó el procedimiento descrito en la sección 4.6, los resultados son presentados en la siguiente Tabla:

Tabla XVII. Tabla de contingencia 2x2 para la estimación de sensibilidad y especificidad de la PCR.

		PiroAB	
		Positivos	Negativos
PiroA/18SRT	Positivos	11	2
	Negativos	5	10

$$\text{Sensibilidad} = \frac{11}{11 + 5} = 0,687 \times 100 = 68,7\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{10}{10 + 2} = 0,834 \times 100 = 83,4\%$$

Para la prueba de PCR género-específica de *Theileria* sp. usando los cebadores PiroA/18SRT se obtuvo una sensibilidad baja (68,7%), pero una alta especificidad (83,4%). A continuación los datos obtenidos para los valores predictivos positivos y negativos:

$$VPP = \frac{11}{11 + 2} = 0,846 \times 100 = 84,6\%$$

$$VPN = \frac{10}{10 + 5} = 0,667 \times 100 = 66,7\%$$

Con respecto a los valores predictivos, se obtuvo que hay una probabilidad del 84,6% de que un individuo infectado se encuentre realmente infectado. Por otra parte, la probabilidad de que un individuo sano esté realmente sano es del 66,7%.

1.27 Estudios de restricción *in silico*

El estudio de restricción se realizó con una secuencia consenso para cada especie, utilizando el programa *Nebcutter 2.0*. Las enzimas se seleccionaron teniendo en cuenta parámetros como la frecuencia de corte (corte único), secuencia diana de mayor especificidad, tamaño de fragmentos generados entre 70 y 250 pb para facilitar la visualización de los productos digeridos en gel y disponibilidad en el laboratorio.

En la Figura 5.5 se presenta el mapa de restricción para la secuencia de *T. equi*, en el cual se señalan todas las enzimas que realizan un corte en dicha secuencia. Para este caso, se seleccionó la enzima *DraI*, la cual genera dos fragmentos de 84 y 217pb.

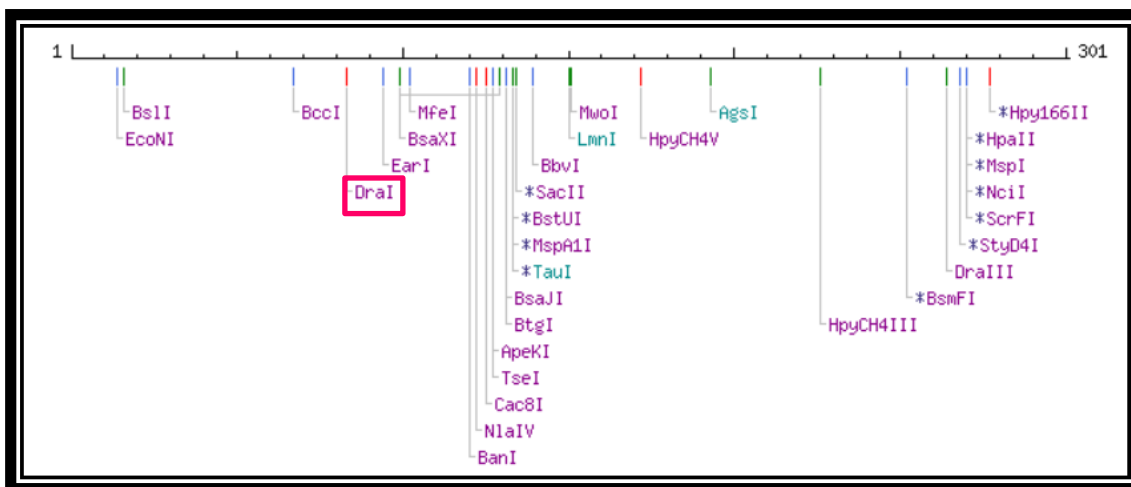


Figura 0.5. Mapa de restricción generado por el programa *Nebcutter 2.0*. Las enzimas de restricción mostradas producen un corte único al fragmento de la secuencia consenso de *T. equi*.

En el caso de la secuencia de *B. caballii* se observa que las enzimas de restricción son distintas a las obtenidas para *T. equi*. Debido a que las enzimas para un punto de corte único de dicha secuencia no se encontraban disponibles en el laboratorio, se realizó un nuevo estudio con las enzimas que generan dos cortes para esta secuencia (Figura 5.6). Se seleccionó la enzima HaeIII, ya que puede generar fragmentos de 172 y 216 pb para futuros estudios de restricción.

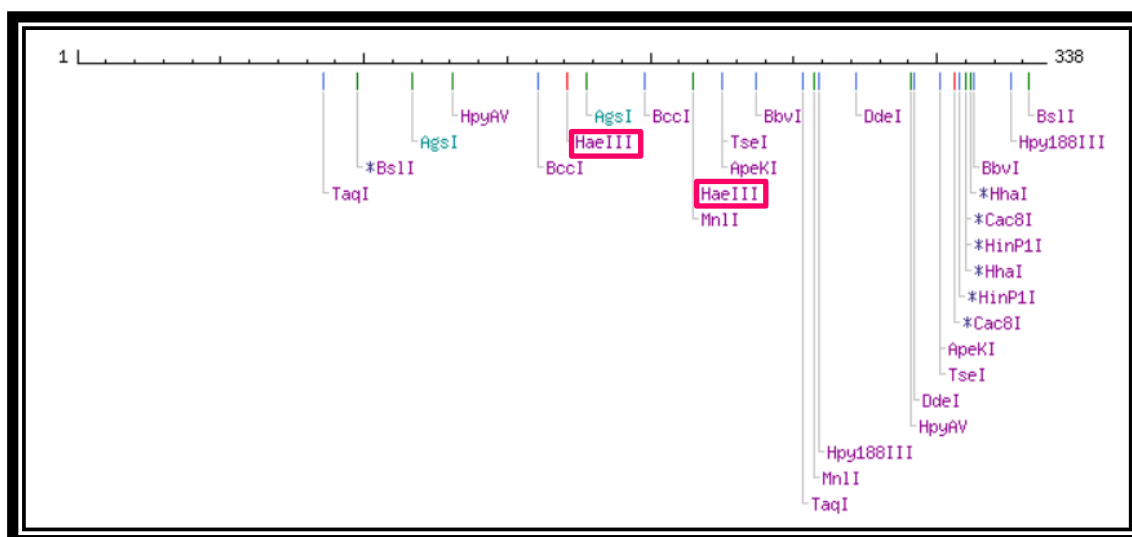


Figura 0.6. Mapa de restricción generado por programa *Nebcutter 2.0*. Las enzimas de restricción mostradas producen dos cortes al fragmento de la secuencia consenso de *B. caballii*.

1.28 Análisis bioinformático de las cisteín-peptidasas de *B. caballii* y *T. equi*

Utilizando el programa *EmbossNeedle* se realizó un alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las cisteín-peptidasas de *B. caballii* y *T. equi* con las de los péptidos sintéticos a fin de compararlas y de esta manera poder elegir los péptidos apropiados para el iELISA.

Tabla XVIII. Porcentajes de identidad (% Id) y similitud (% Sim) de los resultados obtenidos con el programa *EmbossNeedle*. Los datos destacados en color fucsia son los mayores valores obtenidos.

	<i>T. equi</i>		<i>B. caballii</i>	
	% Id	% Sim	% Id	% Sim
Péptido 1	33	53	47	60
Péptido 2	53	80	27	33
Péptido 3	87	87	27	27
Péptido 4	33	53	27	40
Péptido 5	40	53	40	40
Péptido 6	53	80	40	67
Péptido 7	60	73	27	27

Como se observa en la Tabla anterior, el péptido 3 tiene un alto porcentaje de identidad y similitud con la secuencia de *T. equi*, así como bajos porcentajes de identidad y similitud en *B. caballii*, por lo que fue seleccionado como el péptido óptimo para evaluar la reactividad cruzada con la cisteín-peptidasa de *T. equi*. Tal como se observa en la Tabla anterior, todas las secuencias tienen menos del 50% de identidad y similitud con respecto a la cisteín-peptidasa de *B. caballii*; sin embargo fue considerado como óptimo el péptido 1, ya que es el que presentó una menor similitud e identidad para la secuencia de *T. equi*.

1.29 Estandarización del iELISA para evaluar reactividad cruzada

Las condiciones óptimas para este ensayo fueron determinadas mediante una prueba con sueros de equinos sanos, a distintas diluciones del péptido, anticuerpo conjugado y suero. En las Figuras 5.7 y 5.8 se presentan los resultados obtenidos:

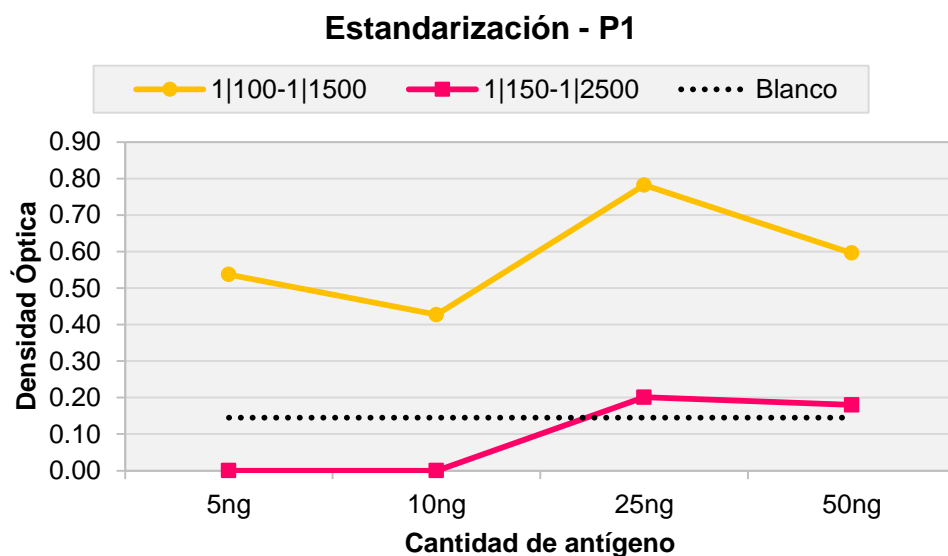


Figura 0.7. Gráfica de la estandarización del ELISA para el péptido 1. En la leyenda se presenta en primer lugar la dilución del antígeno (1|100 y 1|150), luego el anticuerpo conjugado (1|1500 y 1|2500).

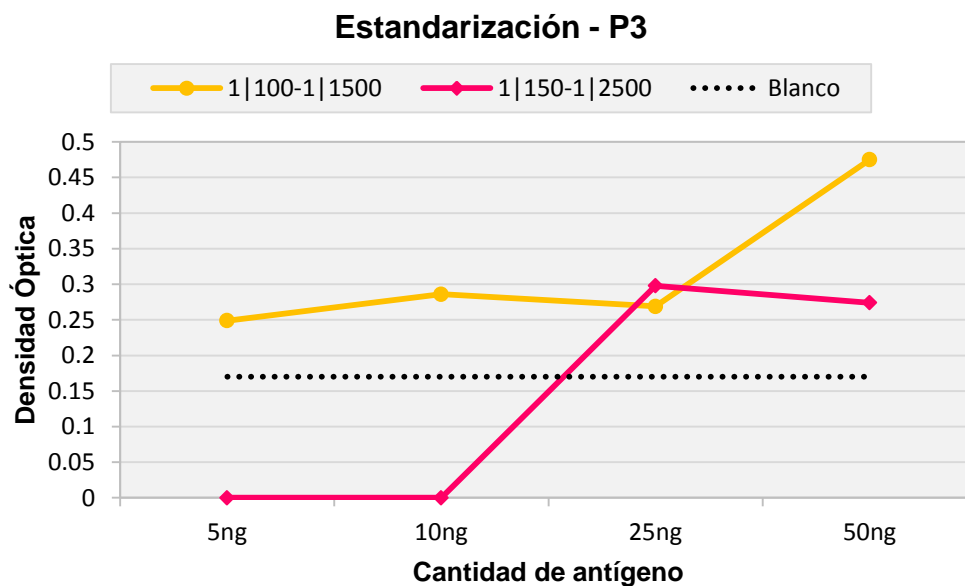


Figura 0.8. Gráfica de la estandarización del ELISA para el péptido 3. En la leyenda se presenta en primer lugar la dilución del antígeno (1|100 y 1|150), luego el anticuerpo conjugado (1|1500 y 1|2500).

En la Figura 5.7 se observa que el péptido 1 en una cantidad de 25ng/pozo presentó sus mayores valores de absorbancia. Para las diluciones del anticuerpo conjugado y suero primario, hay una gran diferencia entre usar una dilución de 1:100 del suero primario y 1:1500 de anticuerpo conjugado, con respecto a las diluciones de 1:150 y 1:2500, los cuales dieron una señal muy baja. En el caso de la Figura 5.8 se presenta que la mayor señal obtenida fue con 50ng/pozo y las diluciones de 1:100 y 1:1500 de suero y anticuerpo conjugado, respectivamente. Al final, se tomó como cantidad óptima de péptido 1 como 25ng/pozo y para el péptido 3 como 50 ng/pozo. En los casos de las diluciones para los sueros primarios y el anticuerpo conjugado se decidió trabajar con las mismas condiciones, tanto para el péptido 1 como para el péptido 3, estas condiciones fueron 1:100 para el suero primario y 1:2000 para el anticuerpo conjugado.

1.30 iELISA para la reactividad cruzada de los péptidos sintéticos

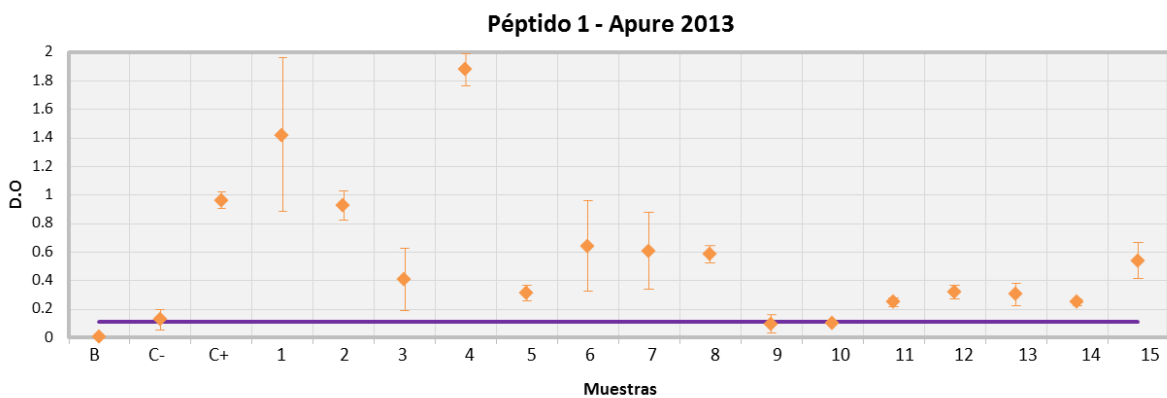
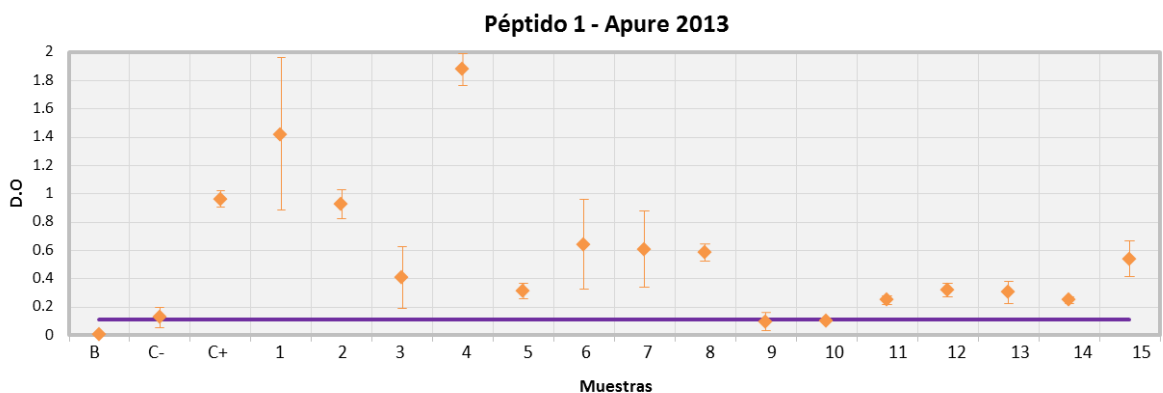
Previamente a la realización de este ensayo, se hizo la determinación del punto de corte para los sueros equinos para ambos péptidos, utilizando un grupo de 15 caballos considerados sanos, pertenecientes al Club Ecuestre El Hatillo. Los puntos de corte determinados permiten diferenciar entre los sueros equinos positivos y negativos de los dos antígenos evaluados (Tabla XIX).

Tabla XIX. Puntos de corte determinados para los sueros equinos.

Antígeno	Punto de Corte
Péptido 1	0,112; 0,103±0,003
Péptido 3	0,093; 0,084±0,003

En la Tabla anterior se puede observar que hay diferencias entre los puntos de corte de ambos péptidos, siendo el del péptido 1 mayor que el del péptido 3. El blanco, el cual consistía en únicamente en el tampón carbonato-bicarbonato, para este experimento, dio valores de 0,145 para el péptido 1 y 0,170 para el péptido 3.

A continuación se presentan los gráficos (Figuras 5.9 y 5.10) para cada grupo de muestras de infecciones de campo con las que se realizó el ELISA indirecto:



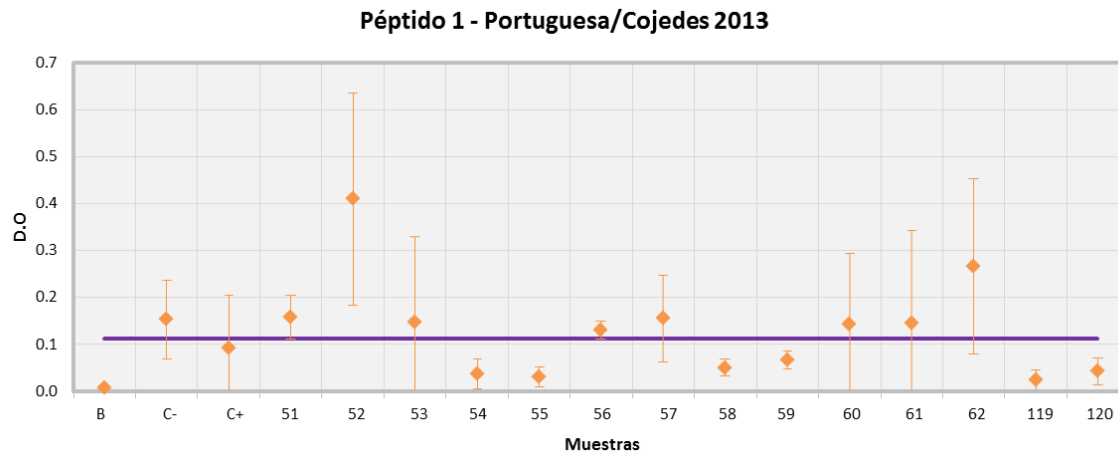
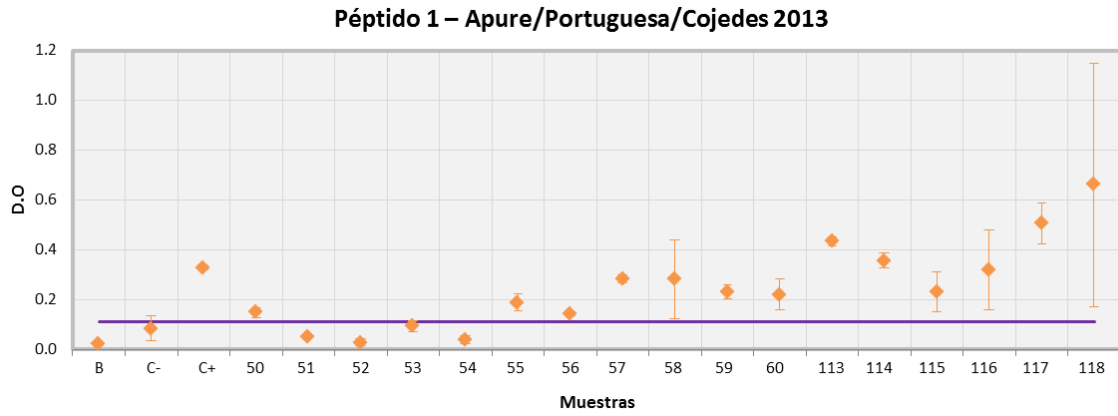
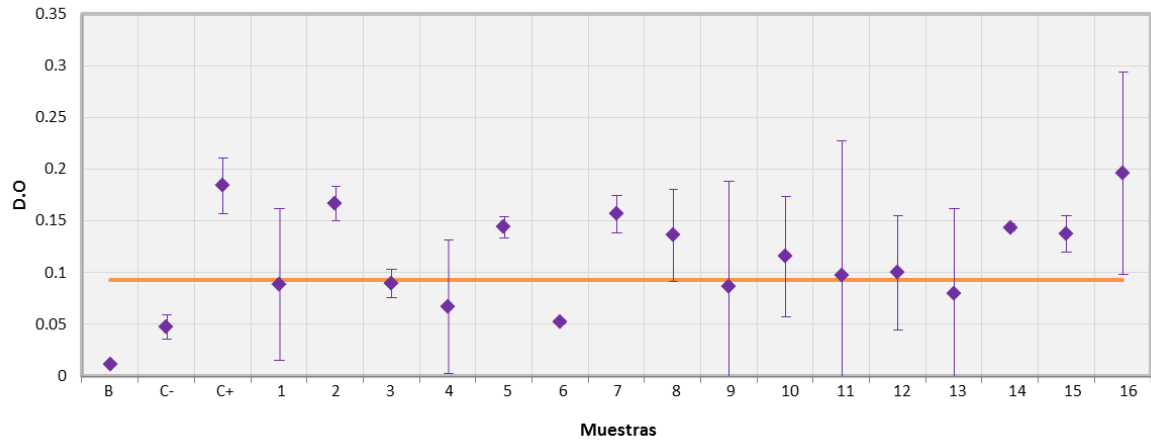
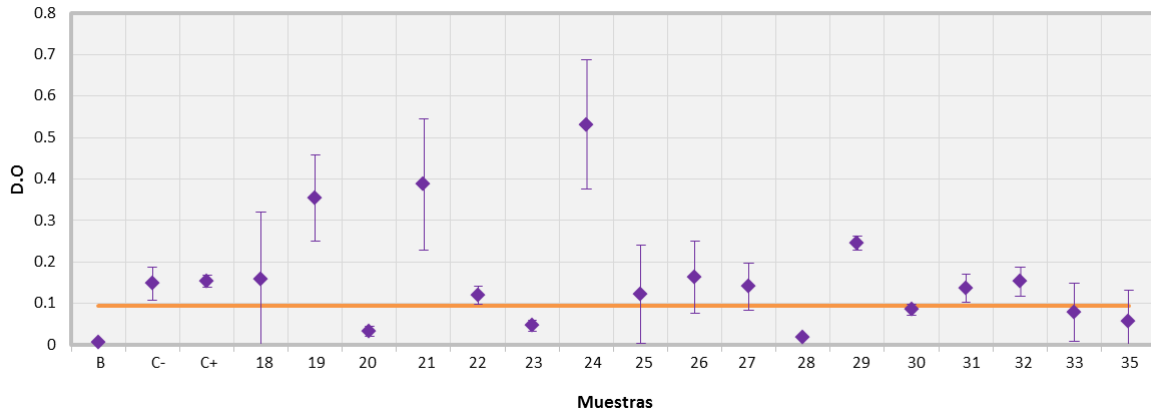


Figura 0.9. Gráficos de la evaluación de la reactividad cruzada del péptido 1 con los sueros equinos.

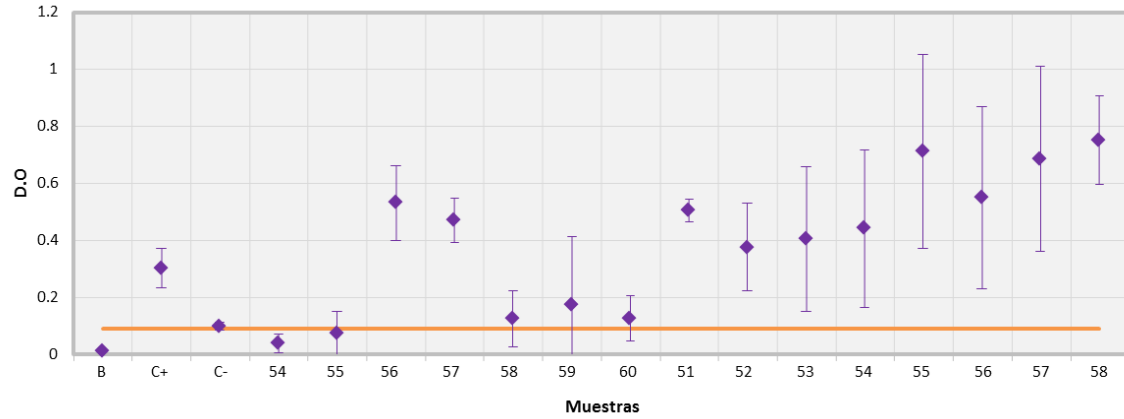
Péptido 3 - Apure 2013



Péptido 3 - Apure 2013



Péptido 3 - Portuguesa/Cojedes/Apure 2013



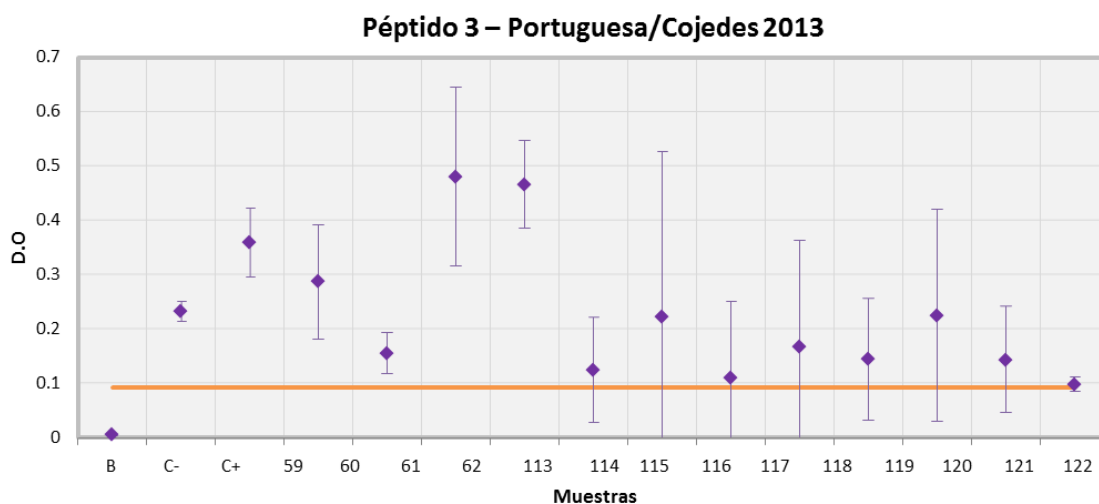


Figura 0.10. Gráficos de la evaluación de la reactividad cruzada del péptido 3 con los sueros equinos.

En la siguiente Tabla se encuentran el número total de muestras positivas para péptido y su porcentaje correspondiente.

Tabla XX. Total de resultados positivos obtenidos por ELISA.

Péptido	Total de muestras positivas	%
1	44	53,7
3	35	42,7

A fin de rectificar estos resultados, se realizaron ensayos con sueros de equinos que habían sido previamente evaluados y considerados positivos, tanto para *T. equi* (8 muestras) como *B. caballii* (7 muestras) y co-infecciones (5 muestras) por un ELISA competitivo (Rosales y col., 2013). Se trabajó con un total de 20 muestras provenientes de hatos ubicados en el estado Lara, Venezuela y fueron proporcionadas por el Laboratorio de Fisiología de Parásitos del IVIC (Figura 5.11).

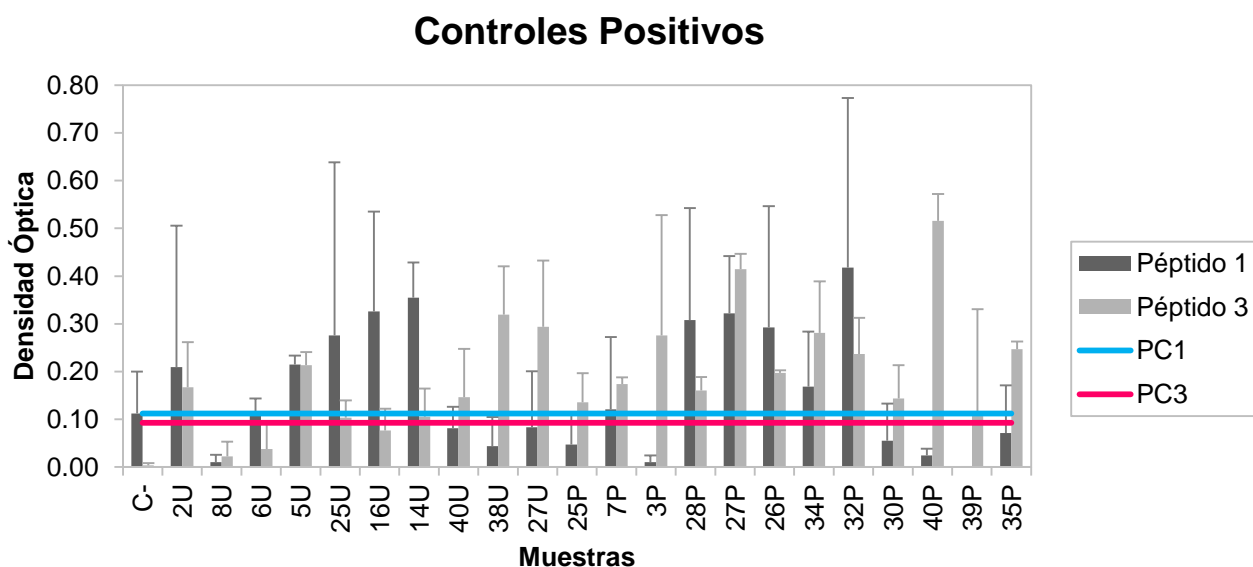


Figura 0.11. Gráfico de barras con los controles positivos para *T. equi* y *B. caballi* evaluados por ELISA indirecto. **PC:** Punto de corte. **U:** Muestras provenientes del Municipio Urdaneta del estado Lara. **P:** Muestras proveniente del Municipio Palavecino del estado Lara.

En la Figura 5.11 se presenta un gráfico, donde la línea azul y fucsia representa el punto de corte obtenido previamente con los péptidos 1 y 3, respectivamente. Aquellas muestras que se encontraban por encima de dichas líneas fueron consideradas como un resultado positivo para dicha infección, teniendo en cuenta la barra de error presente en cada una.

En la Tabla XXI, se presenta una comparación entre los resultados que fueron obtenidos por los dos tipos de ELISA. La coincidencia de muestras positivas entre ambos ensayos fue baja, siendo solamente una muestra positiva para ambos infectada por *B. caballi*, 3 para una co-infección y ninguna para la infección con *T. equi*.

Tabla XXI. Comparación de las muestras que resultaron positivas por ELISA indirecto y por ELISA competitivo.

	Sueros positivos por ELISA competitivo	Sueros positivos por ELISA indirecto
<i>Theileria equi</i>	2U, 8U, 14U, 16U, 27P, 30P, 32P, 39P	27U, 38U, 40U, 3P, 7P, 25P, 35P, 40P
<i>Babesia caballi</i>	5U, 6U, 25U , 27U, 38U, 40U, 25P, 26P	25U , 16U, 14U, 28P
Co-infección	5U , 3P, 7P, 28P , 34P , 35P, 40P	2U, 5U , 28P , 27P, 26P, 34P , 32P

DISCUSIONES

Los hemoparásitos como *Theileria* sp. son capaces de causar enfermedades con un alto impacto en la industria ganadera, generando pérdidas económicas importantes en dicho sector. Actualmente, en Venezuela se desconoce el impacto real de este parásito en el país, hasta los momentos solo hay dos trabajos que han reportado casos de infecciones con este parásito en el país (Rosales y col., 2013; Bendayan, 2018). Debido a la carencia de información respecto a este parásito en el país, fue necesario el desarrollo de técnicas de diagnóstico.

Pese a que los métodos observacionales, como la observación de signos clínicos y microscopía son económicos y sostenibles para la detección de parásitos; sin embargo su baja sensibilidad y especificidad en la detección limitan su aplicación. Por esta razón, las pruebas moleculares como la PCR y pruebas serológicas como el ELISA en conjunto permiten un monitoreo de la prevalencia de dichas infecciones (Criado-Fornelio y col., 2004).

Diagnóstico Molecular

Este trabajo se encuentra compuesto de dos fases. La primera fase consistió en el uso de técnicas moleculares y bioinformáticas que permitieron determinar la presencia del parásito en equinos. Para esto, se realizó primero la extracción del ADN genómico total a partir de las muestras de sangre de equinos previamente evaluados mediante la observación de signos clínicos y microscopía. Posteriormente, fue realizada una PCR convencional, la cual permite la identificación a nivel de género o especie y análisis filogenéticos dependiendo de la especificidad del cebador. En este caso, los juegos de cebadores utilizados pertenecen al gen 18S ARN ribosómico. Dicho gen posee regiones altamente conservadas, así como secuencias variables que permiten estudiar los cambios

evolutivos, por cual, esta región permite diferenciar a los géneros *Babesia* y *Theileria* (George y col., 2015; Criado-Fornelio y col., 2004).

Al comenzar el trabajo, se presentaron fallas en los resultados, obteniéndose bandas con poca definición o ausentes durante el ensayo de PCR. En vista a esto, se realizaron pruebas con grupos de reactivos diferentes, los cuales incluían mezclas comerciales y caseras, a fin de determinar si el problema se encontraba en uno de dichos reactivos. En lo reportado en bibliografía, se indica que esta técnica es propensa a la contaminación y degradación de sus componentes. Normalmente, los problemas con estos ensayos pueden ser fácilmente identificados y explicados, por ejemplo, el exceso de iones Mg^{2+} reduce la especificidad y fidelidad de la Taq polimerasa. Por ejemplo, en un estudio reportado por Schrick y Nitsche (2016) donde los autores tenían resultados satisfactorios en sus reacciones de PCR en tiempo real y luego de realizar un cambio de lote de los reactivos, esta reacción dejó de funcionar. Al probar otro lote de reactivos encontraron que el problema provenía de algún reactivo perteneciente al lote defectuoso. Lo ocurrido en el caso de estos investigadores fue similar a lo ocurrido en este trabajo, ya que al realizar un cambio en los productos utilizados fue posible observar bandas nítidas y definidas.

Para la validación del diagnóstico molecular se realizaron amplificaciones con dos juegos de cebadores. El juego de cebadores PiroAB fue utilizado como referencia para calcular los parámetros de validación de la PCR convencional. Usando este método se obtuvo una sensibilidad de 68,7% y una especificidad de 83,4%. La alta especificidad explica que hay una mayor posibilidad de que un animal considerado por la prueba como infectado se encuentre realmente infectado; sin embargo, hay que tener en cuenta que existe una posibilidad de obtener un mayor número de falsos positivos.

El valor predictivo positivo en este trabajo fue de 84,6%, lo cual indica la probabilidad de que el animal evaluado se encuentre realmente infectado por el

parásito, si el resultado por PCR fue positivo; mientras que el valor predictivo negativo fue de 66,7% y describe la probabilidad del individuo de no estar infectado por el parásito si el resultado de la PCR fue negativo.

Adicionalmente, es importante destacar la diferencia observada entre el tamaño del fragmento que había sido previamente reportado de forma teórica, al observado en los geles de poliacrilamida realizados en el presente trabajo. La diferencia de tamaños ha sido reportada previamente por Bendayan (2018) y por Fernández y colaboradores (2016). Para el caso de Bendayan (2018) se observó una diferencia de aproximadamente 40 pb en la amplificación con el juego de cebadores PiroA/18SRT para la detección de *Theileria* spp. en bovinos y equinos, en ese caso, para descartar la inespecificidad de los cebadores, se realizó una PCR con muestras infectadas por los parásitos *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Anaplasma marginale*, *Tripanosoma evansi*, *Tripanosoma vivax* y *Tripanosoma equiperdum* y no se obtuvo ningún fragmento amplificado para dichos parásitos. En el caso de Fernández y colaboradores (2016) utilizaron el juego de cebadores de PiroAB para la detección de *Theileria orientalis* y se obtuvo una diferencia de 45 pb aproximadamente. Para rectificar esto, los investigadores realizaron una secuenciación de los productos obtenidos y haciendo uso de las herramientas bioinformáticas, confirmaron que la secuencia coincidía con las secuencias de *Theileria orientalis* encontradas en GenBank. Esto sugiere que una manera para constatar los resultados obtenidos en este trabajo se requiere realizar una secuenciación de dichos productos.

Con respecto a los mapas de restricción *in silico* presentados en este trabajo, fueron seleccionadas enzimas capaces de generar fragmentos que puedan ser visualizados como patrones de bandas en geles de poliacrilamida y sirvan para la discriminación entre estas especies. A partir de este estudio, se abre la posibilidad de una línea de investigación que permita la realización de los ensayos pertinentes con el uso de las enzimas propuestas.

Diagnóstico Serológico

De acuerdo a lo reportado por diversos autores, *Theileria equi* y *Babesia caballi* comparten el mismo vector, géneros de garrapatas como *Dermacentor* sp., *Amblyomma* sp. y *Rhipicephalus* sp. sirven como vectores para ambas especies. Por lo cual, es posible encontrar a ambas especies en las mismas regiones y es necesario realizar estudios que permitan la identificación de cada una.

Las cisteín-peptidasas son una familia de enzimas que participan en fases de inmunoevasión de los piroplásmidos, por lo cual pueden ser usados como blancos para su detección mediante técnicas serológicas. Estas enzimas al ser de tal importancia para los parásitos, presentan regiones altamente conservadas entre especies y géneros. Por lo cual, se realizó una evaluación *in silico* de la reactividad cruzada de las cisteín-peptidasas de *T. equi* y *B. caballi* con respecto a unos péptidos sintéticos provenientes de la bovispaína-2. En este caso, se obtuvo que las secuencias de *T. equi* tenían una mayor similitud e identidad, comparadas con las de *B. caballi*. En el estudio filogenético realizado por Ascensio y colaboradores en el año 2018, se logra clasificar las cisteín-peptidasas de los géneros *Babesia*, *Theileria* y *Cytauxzoon* en ocho grandes grupos. Los investigadores encontraron que las cisteín-peptidasas tipo catepsina-L de *T. equi* y *B. bovis* pertenecen al mismo clado, lo cual explica los porcentajes mayores de similitud e identidad entre dichas especies. Las catepsinas son enzimas, las cuales tienen como característica principal que su actividad proteolítica es activada por pH ácido, por lo cual trabajan dentro de los lisosomas (Barret y McDonald, 1986).

El diseño y estandarización de un ELISA indirecto para evaluar la reactividad cruzada usando los péptidos sintéticos de la Bovispaína-2 en las especies de *Theileria equi* y *Babesia caballi* fue una parte innovadora de este proyecto. A partir de la estandarización del ensayo se obtuvieron los puntos de corte para cada uno de los péptidos. El punto de corte para el péptido 1 fue de

0,112 y para el péptido 3 de 0,093, junto a eso los valores del blanco fueron de 0,145 y 0,170, respectivamente. La diferencia entre los datos puede ser atribuida a las condiciones de los péptidos, también hay que destacar que estos valores altos en el ensayo aumentan la posibilidad de falsos negativos. La determinación de un punto de corte es un método de discriminación que permite fijar la probabilidad de un suero de ser positivo o negativo según su cercanía a dicho punto (Reyna-Bello y col., 1998).

En la literatura revisada no fueron encontrados estudios precedentes sobre reactividad cruzada entre *Theileria* sp. y *Babesia* sp., sin embargo, en un estudio realizado por Vexenat y colaboradores (1996), evalúan la reactividad cruzada de los protozoarios *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* y *Leishmania (Viannia) braziliensis*, causantes de las enfermedades de Chagas, Kala-azar y leishmaniasis mucocutánea, respectivamente. Mediante un ELISA los investigadores demostraron que los sueros de pacientes enfermos de Chagas eran positivos al ser evaluados con antígenos de *Leishmania chagasi* y *Leishmania braziliensis*, lo mismo ocurrió con el resto de las enfermedades. Extrapolando dichos resultados a este trabajo, es comprensible que exista reactividad cruzada entre *Babesia* sp. y *Theileria* sp., ya que son parásitos causantes de enfermedades similares en animales y además presentan similitudes en sus mecanismos de invasión al hospedador.

A pesar que en el país fue desempeñado un estudio serológico por parte de Rosales y colaboradores en el año 2013 para las mismas especies. Dicho estudio fue realizado mediante un ELISA competitivo usando un estuche comercial (VMRD Inc.); sin embargo, actualmente no es posible acceder a estos estuches comerciales en el país, por lo que es importante el generar alternativas para la serodetección mediante kits caseros como el realizado en el presente trabajo. Adicionalmente, el desarrollo de los péptidos sintéticos permite mimetizar epítopes de antígenos. Esto hace que su uso como biosensores sea útil en la formación de nuevos sistemas de diagnóstico, disminuyendo de esta manera la dificultad de

reproducibilidad y alta variabilidad es presentada, en ocasiones, por los ensayos serológicos (Gomara y Haro, 2007). En dicho sentido es importante el continuar con el estudio de los péptidos sintéticos para el diagnóstico serológico de hemoparásitos.

CONCLUSIONES

- Se realizó el diagnóstico molecular y serológico de *Theileria equi* de las muestras de campo de los equinos provenientes de los estados Apure, Portuguesa y Cojedes, a través de la implementación de una PCR con un juego de cebadores específicos y un ELISA indirecto utilizando un par de péptidos sintéticos derivados de la bovispaína-2.
- Se seleccionaron las enzimas Dral y HaeIII para identificación de *T. equi* y *B. caballi*, respectivamente, a partir de los mapas de restricción *in silico*. Dichas enzimas son ideales para realizar este ensayo, ya que generan patrones de bandas visibles en los geles de poliacrilamida.
- Se validó la técnica de PCR al obtener los valores de sensibilidad y especificidad para el diagnóstico molecular de *Theileria equi* en muestras problemáticas.
- Se logró el estudio de la reactividad cruzada de los péptidos sintéticos derivados en la bovispaína-2 con la cisteín-peptidasa presente en *Theileria equi* y en *Babesia caballi* mediante el uso del programa *EmbossNeedle* y esto permitió la selección de los péptidos 1 y 3 para realizar el ensayo de ELISA indirecto.
- Se evaluó la reactividad cruzada de los péptidos sintéticos de la Bovispaína-2, mediante la estandarización del ensayo de ELISA indirecto usando los péptidos como antígenos, destacando su importancia inmunogénica; sin embargo, al comparar dichos resultados con los obtenidos por cELISA con un kit comercial (Rosales y col., 2013), no hubo coincidencias.

RECOMENDACIONES

- Evitar someter las muestras de sangre a cambios constantes en la temperatura para conservar la calidad del material.
- Realizar los estudios de restricción con las enzimas propuestas en este trabajo para continuar con dicha línea de investigación.
- Secuenciar los controles positivos usados para la PCR para confirmar dichas secuencias con las encontradas en GenBank.
- Realizar nuevamente los ensayos de ELISA indirecto, utilizando los péptidos sintéticos en infecciones experimentales.

BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón, B., Colmenares, C., Noya, O. 2001. Comunidad Antigénica y Reactividad Cruzada: Su repercusión en el Diagnóstico y Tratamiento de Enfermedades Parasitarias. Especial referencia a Esquistosomiasis. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*. **20**: 163-171.
- Ali, A. E. F., Radwan, M. 2011. Molecular detection of *Theileria annulata* in egyptian buffaloes and biochemical changes associated with particular oxidative changes. *Advances in Life Sciences*. **1**: 6-10.
- Akbari, J., Javanbakht, J., Tavassouli, M., Tabatabai, M., Shafieis, R. 2012. Molecular Survey of *Theileria annulata* in Cattle by PCR - RFLP Method in Iran. *J Bacteriol Parasitol*. **3**: 135.
- Akobeng, A. K. 2007. Understanding diagnostic tests 1: sensitivity, specificity and predictive values. *Acta Paediatr*. **96**: 338–341.
- Aparna, M., Vimalkumar, M., Varghese, S., Senthilvel, K., Ajithkumar, K., Raji, K., y col. 2013. Phylogenetic analysis of bovine *Theileria* spp. isolated in south India. *Trop Biomed*. **30**: 281–290.
- Ascensio, M., Florin-Christensen, M., Mamoun, C.B, Weir, W., Shiels, B., Schnittger, L. 2018. Cysteine Proteinase C1A Paralog Profiles Correspond with Phylogenetic Lineages of Pathogenic Piroplasmids. *Vet. Sci*. **5**: 41.
- Barrett, A., McDonald, J. 1986. Mammalian Proteases: A Glossary and Bibliography. Vol. 2, Exopeptidases. Academic Press.
- Bendayan, A. 2018. Diagnóstico molecular de theileriosis bovina y equina en locaciones de los estados Guárico y Apure. Tesis de Licenciatura. Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela.
- Bhoora, R., Quan, M., Matjila, P., Zwegarth, E., Guthrie, A., & Collins, N. 2010. Sequence heterogeneity in the equi merozoite antigen gene (ema-1) of *Theileria equi* and development of an ema-1-specific TaqMan MGB assay for the detection of *T. equi*. *Vet Parasitol*. **172**: 33-45.
- Binta, M., Losho, T., Allsopp, B. A., Mushi, E. 1998. Isolation of *Theileria taurotragi* and *Theileria mutans* from cattle in Botswana. *Vet Parasitol* **77**: 83-91.
- Bowen, D., Keeney, S. 2003. Unleashing the long-distance PCR for detection of the intron 22 inversion of the factor VIII gene in severe haemophilia a. *Thromb haemostasis*. **1**: 201-202.
- Brayton, K.A., Lau, A., Herndon, D. R., Hannick, L., Kappmeyer, L., Berens, S. J., Bidwell, S. 2007. Genome Sequence of *Babesia bovis* and Comparative Analysis of Apicomplexan Hemoprotezoa. *PLoS Pathog*. **3**:1401-13.

- Bremono, A. 2012. Identificación y caracterización bioquímica y molecular de peptidasas de *Babesia bovis* con potencial diagnóstico. Tesis doctoral. Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela.
- Chaisi, M., Sibeko, K., Collins, N., Potgieter, F., Oosthuizen, M. 2011. Identification of *Theileria parva* and *Theileria sp.* (buffalo) 18S rRNA gene sequence variants in the African Buffalo (*Syncerus caffer*) in southern Africa. *Vet Parasitol* **182**: 150-162.
- Chauhan H., Patel B., Bhagat A., Patel M., Patel S., Raval S., Panchasara H. y col. 2015. Comparison of molecular and microscopic technique for detection of *Theileria annulata* from the field cases of cattle. *Vet World* **8**: 1370-1374.
- Criado-Fornelio, A., Gonzalez-del-Rio, M.A., Buling-Saraña, A., Barba-Carretero, J.C. 2004. The “expanding universe” of piroplasms. *Vet Parasitol* **119**: 337–345.
- De Savigny, D., Voller, A. 1980. The communication of ELISA data from laboratory to clinician. *J Immunoassay* **1**: 105-28.
- Datta, C., Srivastava, P., Sinha, S. 1998. Prevalence and epidemiology of a virulent strain of *Theileria annulata* in cattle, in and around Patna (Bihar, India). *Indian J Anim Res* **27**: 151-157.
- Díaz-Sánchez, A., Fonseca-Rodríguez, O., Del Castillo-Domínguez, S., Alfonso-Dorta, Y., Lobo-Rivero, E., Corona-González, B., Vega-Cañizares, E. 2018. Alteraciones hematológicas encontradas en caballos (*Equus caballus*) infectados con *Babesia caballi* y *Theileria equi*. *Salud Anim* **40**: 1-10.
- Ferreira, M. A. 2011. Desenvolvimento de métodos moleculares para detecção de *Theileria annulata*. Tesis doctoral. Universidad de Nova de Lisboa. Lisboa, Portugal.
- Gachochi, J., Skilton, R., Hansen, F., Ngumi, P., Kitala, P. 2012. Epidemiology of east coast fever (*Theileria parva* infection) in Kenya: past, present and the future. *Parasites Vectors* **5**: 1-13.
- García, M. 2010. Identificación molecular de las especies de piroplasmas en poblaciones de Ixódidos de la Comunidad Autónoma del País Vasco. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza. Vitoria-Gasteiz, España.
- George, N., Bhandari, V., Peddi Reddy, D., Sharma, P. 2015. Molecular and Phylogenetic analysis revealed new genotypes of *Theileria annulata* parasites from India. *Parasites Vectors* **8**: 468.
- Georges, K., Ezeokoli, C., Sparagano, O., Pargass, I., Campbell, M., D'Abadie, R., Yabsley, M. 2011. A case of transplacental transmission of *Theileria equi* in a foal in Trinidad. *Vet Parasitol* **175**: 363-366.
- Gharbi, M., Darghouth, M. 2015. Control of tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection in cattle) in North Africa. *Asian Pac J Trop Med* **5**: 505-510.

- Gómara, M., Haro, I. 2007. Synthetic Peptides for Immunodiagnosis of Human Diseases. *Curr Med Chem.* **14**: 531-546.
- Gubbels, M., Hong, Y., Van Der Weide, M., Qi, B., Nijmanc, I., Guangyuan, L., Jongejan, F. 2000. Molecular characterization of the *Theileria buffeli/orientalis* group. *Int J Parasitol* **30**: 943-952.
- Gueye, A., Mbengue, M., Diouf, A. 1987. Presence of *Theileria velifera* in Senegal. *Rev Ele Med Vet Pay* **40**: 117-118.
- Hillis, D., Dixon, M. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quart Rev Biol* **66**: 411-453.
- Jalovecka, M., Hajdusek, O., Sojka, D., Petr, K., Malandrin, L. 2018. The Complexity of Piroplasms Life Cycle. *Front Cell Infect Mi* **8**: 248.
- Kamyngkird, K., Yangtara, S., Desquesnes, M., Cao, S., Adjou, P., Jittapalapong, S., Nimsupan, B. y colaboradores. 2014. Seroprevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in horses and mules from Northern Thailand. *J Protozool Res*; **24**: 11-17.
- Lempereur, L., Beck, R., Fonseca, I., Marques, C., Duarte, A., Santos, M., Zúquete S. y colaboradores. 2017. Guidelines for the Detection of *Babesia* and *Theileria* parasites. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **17**:51-65
- Lim, L., McFadden, G. 2010. The evolution, metabolism and functions of the apicoplast. *Philos Trans R Soc.* **365**: 749-763.
- Marcellino, W., Salih, D., Njahira, M., Ndiwa, N., Araba, A., El Hussein, A., Skilton, R. A. 2016. The Emergence of *Theileria parva* in Jonglei State, South Sudan: Confirmation Using Molecular and Serological Diagnostic Tools. *Transbound Emerg Dis* **64**: 1229-1235.
- Mans, B., Pienaar, R., Latif, A. 2015. A review of *Theileria* diagnostics and epidemiology. *Int J Parasitol Parasites and Wildl.* **4**: 104-118.
- McKeever, D. 2009. Bovine immunity—a driver for diversity in *Theileria* parasites? *Trends Parasitol.* **25**: 269-276.
- Mehlhorn H., Schein E. 1998. Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi*. *Parasitol Res.* **84**: 467-475.
- Morrissette, N., Sibley, L. 2002. Cytoskeleton Of Apicomplexan Parasites. *Microbiol Mol Biol Rev.* **66**: 21-38.
- Motloang, M., Thekiso, O., Alhassan, A., Bakheit, M., Motheo, M., Masangane, F.E., Thibedi, M. y colaboradores. 2008. Prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in horses belonging to resource-poor farmers in the north-eastern Free State Province, South Africa. *Onderstepoort J Vet* **75**: 141-146.

- Munkhjargal, T., Sivakumar, T., Battsetseg, B., Nyamjargal, T., Aboulaila, M., Purevtseren, B., Bayarsaikhan, D. y colaboradores. 2013. Prevalence and genetic diversity of equine piroplasms in Tov province, Mongolia. *Infect Genet Evol* **16C**: 178-185.
- Nene, V., Kiara, H., Lacasta, A., Pelle, R., Svitek, N., Steinaa, L. 2015. The biology of *Theileria parva* and control of East Coast Fever. *Ticks Tick-Borne Dis* **7**: 549-564.
- Olmeda, A., Armstrong, P., Rosenthal, B., Valladares, B., Del Castillo, A., De Armas, F., y otros. 1997. A subtropical case of human babesiosis. *Acta Trop.* **67**: 229-234.
- Posada-Guzmán, M., Dolz, G., Romero-Zuñiga, J., Jiménez-Rocha, A. 2015. Detection of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in Blood from Equines from Four Indigenous Communities in Costa Rica. *Vet Med.* **2015**.
- Quintana-Nizoli, L., Mendes-Gotze, M., Rodrigues-Félix, S., Silva-Da Silva, S., Wayne-Noguera, C. 2008. Frequency of seropositive equines for *Theileria equi* in the Southern Rio Grande do Sul State, Brazil". *Parasitología latinoamericana* **63**: 46-50.
- Reyna-Bello, A., García, F., Rivera, M., Sansó, B., Aso, P. 1998. Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) for detection of anti-*Trypanosoma evansi* equine antibodies. *Vet Parasitol.* **80**: 149-157.
- Rosales, R., Rangel-Vivas, A., Escalona, A., Jordán, L., Gonzatti, M., Aso, P., y col. 2013. Detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in Venezuelan horses using Competitive-Inhibition ELISA and PCR. *Vet Parasitol.* **196**: 37-43.
- Salih, D. A., Hassan, S. M., El Hussein, A. M. 2013. Comparisons among two serological tests and microscopic examination for the detection of *Theileria annulata* in cattle in northern Sudan. *Prev Vet Med* **81**: 323–326.
- Schrick, L y Nitsche, A. 2016. Pitfalls in PCR troubleshooting: Expected the unexpected. *Biomol Detect Quantif* **6**: 1–3.
- Sudan, V., Sharma, R., Yadav, R., Borah, M. 2013. Review of equine piroplasmiasis. *J Vet Int Med* **27**: 1334–1346.
- Sumbria, D., Das Singla, L., Sharma, A. 2016. *Theileria equi* and *Babesia caballi* infection of equids in Punjab, India: a serological and molecular survey. *Trop Anim Health Prod.* **48**: 45-52.
- Ternynck, T., Avrameas, S. 1989. Técnicas Inmunoenzimáticas. Grupo Editorial Iberoamérica, Primera Edición. México D.F., México.
- Tretina, K., Gotia, H., Mann, D., Silva, J. 2015. *Theileria*-transformed bovine leukocytes have cancer hallmarks. *Trends Parasitol.* **31**: 306-314.

- Ueti, M., Mealey, R., Kappmeyer, L., White, S., Kumpula-McWhirter, N., Pelzel, A., Grause, J., Bunn, T. y colaboradores. 2012. Re-emergence of the apicomplexan *Theileria equi* in the United States: elimination of persistent infection and transmission risk. *Plos One* **9**: 1-6.
- Vexenat, A., Santana, J., Teixeira, A. 1996. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. **38**: 177–185.
- Viseras, J., García Fernández, P., Adroher, F.J. 1997. Field trial of immunization with an experimental vaccine against Mediterranean theileriosis in Spain. *Vet Res* **28**: 397- 403.
- Wang, M., Guo, W., Igarishi, I., Xuan, X., Wang, X., Xiang, W., JIA, H. 2014. Epidemiological investigation of equine piroplasmosis in China by enzyme-linked immunosorbent assays. *J Vet Med Sci* **76**: 549-552.
- Woolverton, C., Willey, J., Sherwood, L. 2008. Prescott, Harley & Klein: Microbiology. McGraw-Hill. E.U.A.
- Zobba R., Ardu M., Niccolini, S., Chessa B., Manna L., Cocco R., Parpaglia M. 2008. Clinical and Laboratory Findings in Equine Piroplasmosis. *J Equine Vet Sci* **28**: 301-308.

Consultas en línea

- Center for Food Security & Public Health (CFSPH). *Theileria parva* & *Theileria annulata* [En línea]. 2009. Disponible en: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/theileriosis_theileria_parva_and_theileria_annulata.pdf
- Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE). Theileriosis [En línea]. 2009. Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/THEILERIOSIS.pdf
- Productos y reactivos para la investigación y diagnóstico ABCAM® [En línea] Disponible en: <https://www.abcam.com/kits/types-of-elisa>

ANEXOS

A.1 Marcador de peso molecular

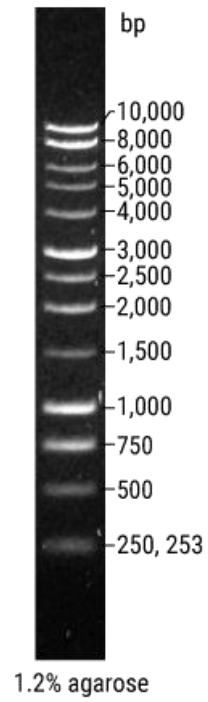


Figura A.1. Marcador de peso molecular Promega® de 1kb.

A.2 Secuencias consenso utilizadas para los estudios de restricción *in silico* acotadas por sus respectivos cebadores

- *Babesia caballi*

CTGCGAATGGCTCATTACAACAGTTATAGTTTCTTTGGTATTCGTTTTCTATGGATAACCG
TGCTAATTGTAGGGCTAATACAAGTTCGATGCCTTTTGGCGGCGTTTATTAGTTTTGAAGC
CTTCTTTTTGGTGATTTCATAATAAACTTGCGAATCGCTTTTGAGCGATGGCCATTCAAGT
TTCTGACCCATCAGCTTGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGAGGCAGCAACGGGTAACGGGG
AATTAGGGTTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAG
CAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGG

- *Theileria equi*

ATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACGGGGCTTTAAGTCT
TGTAATTGGAATGATGGGAATTTAAACCTCTTCCAGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGG
TGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAACTTGTTGCAGTTAAAAA
GCTCGTAGTTGAATTTCTGCTGTATCGTTATCTTCTGCTTGACAGTTTGGTATCGTTTGTG
TATGGCTTGTTGGGTCACCTTTGTGTCCCGGCGTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGCT

A.3 Estudios de restricción *in silico*

Tabla A.3.I. Enzimas de restricción para un corte único de la secuencia consenso de *T. equi*.

Enzima	Especificidad	Punto de corte
AgsI	TT↓SAA	194/193
ApeKI	G↓CWGAC	128/131
BanI	G↓GYRCAC	121/125
BbvI	GCAGC(N) ₈ ↓NNNNAC	140/144
BccI	CCATCNNNN↓NAC	68/69
BsaJI	C↓CNNGAC	132/136
BsaXI	ACNNN↓(N) ₉ AC(N) ₅ CTCC(N) ₇ ACNNN↓	100/97+130/127
BsII	CCNNACNNN↓NNGG	17/14
BsmFI	GGGAC(N) ₁₀ ↓NNNNAC	*253/257
BstUI	CG↓CG	*134
BtgI	C↓CRYGAC	132/136
Cac8I	GCN↓NGC	126
DraI	TTT↓AAA	84
DraIII	CACACNNN↓GTG	265/262
EarI	CTCTTCN↓NNNAC	95/98
EcoNI	CCTNN↓NACNNAGG	15/16
HpaII	C↓CGAC	*271/273
Hpy166II	GTN↓NAC	*278

HpyCH4III	AC.N [▼] GT	227/226
HpyCH4V	TG [▼] CA	173
Lmnl	GCTC.ACN [▼]	151/149
Mfel	C [▼] AATT.G	103/107
MspA1I	CMG [▼] CKG	*134
MspI	C [▼] CG.G	*271/273
Mwol	GCNN.NNN [▼] NNGC	152/149
Ncil	CC [▼] S.GG	*271/272
NlaIV	GGN.ANCC	123
SacII	CC.GC [▼] GG	*135/133
ScrFI	CC [▼] N.GG	*271/272
StyD4I	[▼] CCNGG.A	*269/274
TauI	G.CSG [▼] C	*134/131
TseI	G [▼] CWG.C	128/131

Tabla A.3.II. Enzimas de restricción para dos cortes de la secuencia consenso de *B. caballi*.

Enzima	Especificidad	Puntos de corte
AgsI	TT _↓ S _↑ AA	118/117, 179/178
ApeKI	G _↓ CWG _↑ C	226/229, 302/305
BbvI	GCAGC(N) ₈ _↓ NNNN _↑	238/242, 314/318
Bccl	CCATCNNNN _↓ N _↑	162/163, 199/200
BsII	CCNN _↓ NNN _↓ NNGG	*99/96, 333/330
Cac8I	GCN _↓ NGC	*307, *311
DdeI	C _↓ TNA _↑ G	273/276, 293/296
HaeIII	GG _↓ CC	172, 216
HhaI	G _↓ CG _↓ C	*311/309, *313/311
HinP1I	G _↓ CG _↓ C	*309/311, *311/313
Hpy188III	TC _↓ NN _↓ GA	260/262, 327/329
HpyAV	CCTTC(N) ₅ _↓ N _↓	132/131, 292/291
MnII	CCTC(N) ₆ _↓ N _↓	216/215, 258/257
TaqI	T _↓ CG _↓ A	87/89, 254/256
TseI	G _↓ CWG _↓ C	226/229, 302/305

A.4 Secuencias de aminoácidos de las cisteín-peptidasas de *B. caballi* y *T. equi* obtenidas por alineamiento múltiple

- *Babesia caballi*

CWAVAAASLVDAYRSIKTGLLVAHSSQQLLDCTSRRYNCIAGGDHKKVALEYAAEHGLCTAD
TYSYVVGKAMACQRQSCGQKFKVDNIVKLTGEDLEKHIKTHGPAIVTLRISRAFMHYSNGIY
DGPCDSSIHHSALVVGYGENVKLGVKY

- *Theileria equi*

RCWAFAAVGSVESLYLIHKGETLDLSEQELVNCETHSHGCDGGFSDSALRYIKVHGLSSSS
DVPYFAKNEVCYSVSRSKTYIDAVSIMKGDEILNKSLVLSPTVVFIAASEELTTYKSGIYN
GSCSDQLNHAVLLVGEHDEVTGKRYWIIKNSWGPNWGENGFLRLERTFEGTDKCGVLEAG
MNPILN