



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

CENTRO UNIVERSITARIO UAEM AMECAMECA

LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“COMPARACIÓN DE LA PRUEBA DE ELISA MEDIANTE EL USO DE LAS
PROTEINAS r12D3 Y rRAP – 1 COMO ANTÍGENO CONTRA *Babesia bigemina*”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

JUAN MANUEL PALACIOS MENDOZA

ASESOR.

DR. JUAN JOSÉ OJEDA CARRASCO

COASESOR.

DR. JULIO VICENTE FIGUEROA MILLÁN

AMECAMECA, ESTADO DE MÉXICO

MAYO, 2019

Índice.

I. Introducción.	1
II. Planteamiento del problema.	4
III. Justificación	6
IV. Marco teórico.....	7
4.1 Aspectos relevantes de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> como principal vector para la transmisión de la babesiosis bovina.	7
4.2 Taxonomía.	8
4.3 Ciclo biológico de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	9
4.4 Métodos para el control de garrapatas.....	10
4.4.1 Control químico.....	10
4.4.2 Control biológico.	12
4.4.3 Control genético.....	12
4.4.4 Aplicación de vacunas.	12
4.4.5 Rotación de potreros.	13
4.5 Distribución de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> en México.	14
4.6 Definición de Babesiosis bovina.....	15
4.7 Antecedentes de babesiosis bovina.	16
4.8 Agente etiológico.....	17
4.9 Ciclo Biológico.....	20
4.10 Interacción del parásito con su hospedero y su respectiva invasión de eritrocitos.	21
4.11 Patogenia de la babesiosis bovina.	27
4.12 Signos clínicos.	30
4.13 Inmunidad contra <i>Babesia</i> spp.....	31
4.14 Diagnóstico.	33

4.14.1 Examen microscópico directo.....	34
4.14.2 Inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	35
4.14.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	36
4.15 Tratamiento de la babesiosis bovina.....	38
V. Hipótesis.....	42
VI. Objetivos.....	43
6.1 General.....	43
6.2 Específicos.....	43
VII. Materiales y Métodos.....	44
7.1 Localización.....	44
7.2 Muestras.....	44
7.3 Diseño experimental.....	44
7.4 Prueba de iELISA.....	45
7.4.1 Materiales.....	45
7.4.2. iELISA.....	45
7.5 Inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	46
7.5.1 Materiales.....	46
7.5.2 Prueba de IFI.....	47
7.6 Análisis estadístico.....	47
7.6.1 Determinación de la sensibilidad y especificidad.....	47
7.6.2 Determinación de los valores predictivos.....	48
7.6.3 Determinación del índice de concordancia.....	49
VIII. Resultados.....	50
8.1 Prueba de iELISA.....	50
8.2 Prueba IFI.....	51

8.3 Análisis estadístico.....	52
8.3.1 Sensibilidad y especificidad.....	52
8.3.2 Valores Predictivos.....	54
8.3.3 Determinación del índice de concordancia Kappa.....	55
IX. Discusión.....	57
X. Conclusión.....	62
XI. Referencias bibliográficas.	63
XII. Anexos.	77
12.1 Anexo 1. Preparación de soluciones.....	77
12.2 Anexo 2. Procedimiento de la técnica de iELISA.	77
12.3 Anexo 3. Procedimiento de la técnica IFI.	79
12.4. Anexo 4. Punto de corte para iELISA con RAP-1.	80
12.5. Anexo 5. Punto de corte para iELISA con 12D3.	81
12.6 Anexo 6. Densidades ópticas de los 96 sueros probados a 650 nm en la prueba de iELISA con RAP-1.....	81
12.7 Anexo 7. Densidades ópticas de los 96 sueros probados a 650 nm en la prueba de iELISA con 12D3.....	82
12.8. Anexo 8. Resultados de las 96 muestras de suero probados en la prueba de IFI.	82

Índice de figuras.

Figura 1. Ciclo biológico de la garrapata <i>R. microplus</i>	10
Figura 2. Distribución de la garrapata <i>Boophilus</i> spp en México.	15
Figura 3. <i>Babesia bigemina</i> y <i>Babesia bovis</i> en el interior de un eritrocito. 17	
Figura 4. Diagrama de un trofozoito de <i>Babesia</i>	19
Figura 5. Ciclo biológico de <i>Babesia</i>	22

Índice de cuadros.

Cuadro 1. Taxonomía de <i>Rhipicephalus Boophilus microplus</i>	8
Cuadro 2. Clasificación taxonómica de <i>Babesia</i>	18
Cuadro 3. Principales proteínas involucradas en la invasión.....	23
Cuadro 4. Cuadrado de contingencia 2x2 para la determinación de la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de las pruebas iELISA e IFI.	48
Cuadro 5. Cuadrado de contingencia 2x2 para la determinación del índice de concordancia entre las pruebas iELISA e IFI.	49
Cuadro 6. Determinación de sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de <i>Babesia bigemina</i> en iELISA utilizando como antígeno la proteína recombinante RAP-1.....	53
Cuadro 7. Determinación de sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de <i>Babesia bigemina</i> en iELISA utilizando como antígeno la proteína recombinante 12D3.....	53
Cuadro 8. Determinación de sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de <i>Babesia bigemina</i> en IFI utilizando el antígeno crudo.	54
Cuadro 9. Tabla de contingencia para la determinación del índice de concordancia kappa (κ) entre las pruebas de IFI utilizando el antígeno crudo de <i>Babesia bigemina</i> y iELISA utilizando como antígeno la proteína recombinante RAP-1.	55
Cuadro 10. Tabla de contingencia para la determinación del índice de concordancia kappa (κ) entre las pruebas de IFI utilizando el antígeno crudo de <i>Babesia bigemina</i> y iELISA utilizando como antígeno la proteína recombinante 12D3.....	56

Índice de gráficas.

Gráfica 1. Muestras positivas y negativas de acuerdo al punto de corte establecido para la proteína recombinante RAP-1 de <i>Babesia bigemina</i>	50
Gráfica 2. Muestras positivas y negativas de acuerdo al punto de corte establecido para la proteína recombinante 12D3 de <i>Babesia bigemina</i>	51
Gráfica 3. Muestras positivas y negativas utilizando la prueba IFI.	52

I. Introducción.

La babesiosis es una enfermedad de problemática global de gran importancia tanto en animales domésticos, así como también en algunos animales salvajes, la cual se delimita con la distribución de las garrapatas que actúan como principales vectores, esta enfermedad está presente especialmente en regiones tropicales y subtropicales del mundo (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2014). La presencia de esta enfermedad en una región está íntimamente asociada a tres factores; el agente, el hospedero y ambiente lo que se conoce como triada epidemiológica (Meléndez, 1990). Cuando se mantiene un equilibrio ecológico entre los tres factores citados se denomina condición de estabilidad enzoótica, la cual influye directamente y de manera natural en la presentación de babesiosis bovina ya que dicha estabilidad se logra cuando existe una elevada tasa de transmisión entre el vector y el hospedero (FAO, 2003). Por ejemplo, se ha demostrado que cuando la tasa de inoculación de *Babesia* por garrapatas infectadas es alta, de modo que los animales de un hato que sean infectados durante una etapa joven (generalmente de 8 a 9 meses de edad que es el período cuando aún están protegidos por la inmunidad pasiva e innata) poseen una resistencia natural, la cual les permite tener una reacción de menor severidad si posteriormente se enfrentan a esta enfermedad, así entonces, la presentación de los signos clínicos de babesiosis en estos animales será mínima la cual se va denominar una condición de estabilidad enzoótica (Bock, 2004). Por otro lado, si la tasa de inoculación es baja y no todos los animales de un hato se enfrentan a la enfermedad en una etapa joven cuando estos son expuestos en edad adulta sufren una severa reacción clínica e incluso mueren. Por esto, dado que la tasa de inoculación no es estable en las áreas enzoóticas, sino que varía con los cambios en las condiciones climáticas, o en las condiciones de manejo de los animales, existe el fenómeno denominado inestabilidad enzoótica que puede aparecer dentro de una zona endémica y provocar brotes severos de babesiosis bovina (Bock, 2004).

Algunas de las manifestaciones clínicas generales de la enfermedad incluyen: fiebre, anorexia, depresión, debilidad, ataxia, hemoglobinuria y anemia,

algunas veces también presentan signos nerviosos como resultado del secuestro de eritrocitos infectados en capilares cerebrales y finalmente la muerte (Figuroa y Álvarez, 2003).

La babesiosis bovina es una enfermedad causada por parásitos intraeritrocíticos obligatorios del género *Babesia* cuyas especies más prevalentes en el mundo son *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* (OIE, 2010). Esta enfermedad se delimita por la presencia de los principales vectores artrópodos del género *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Bravo, 2012). Se estima que más de 1.2 billones de bovinos alrededor del mundo están expuestos a la babesiosis (Bock *et al.*, 2006), siendo la enfermedad hemoparasitaria transmitida por artrópodos de mayor importancia en el ganado bovino a nivel mundial (CFSPH, 2008).

Debido a su gran capacidad de adaptación y propagación, las garrapatas del género *R. microplus* se extienden en diversas áreas geográficas de todo el mundo (Estrada y Venzal, 2006). Presentando una amplia distribución en gran parte de América, África, Asia y Australia (Rodríguez *et al.*, 2004; Madrid *et al.*, 2012; OIE 2014).

La presencia de garrapatas en unidades de producción bovina, además de transmitir los parásitos causantes de la babesiosis, se le atribuye también que provocan la disminución en la producción de carne y leche, deterioran las pieles por efecto de las picaduras, afectan la capacidad reproductiva bajando los índices de fertilidad en los machos, retrasan el desarrollo de animales jóvenes y provocan trastornos metabólicos (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2011). Por otro lado, se ha observado que animales infestados muestran pérdidas en las ganancias de peso debido a la reducción en el consumo de alimento. (Bock *et al.*, 2008). Todo esto implica grandes pérdidas económicas debido a los costos elevados para el control del vector, así como el diagnóstico de la enfermedad y su tratamiento (Chulmin *et al.*, 2007). Estas pérdidas económicas se han estimado en varios miles de millones de dólares, lo que genera un gran impacto para la economía pecuaria mundial (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2005; Jonsson, 2006).

A pesar de los esfuerzos por intentar controlar la babesiosis bovina y los daños que causa aún sigue siendo una preocupación en cuanto a salud y producción animal se refiera y para poder establecer nuevas medidas que incluyan la prevención y el control es importante realizar un diagnóstico certero, rápido y específico. Por lo cual, existe una gran necesidad de acceder a un grupo de pruebas altamente sensibles y en conjunto estudiar la biología de los agentes causales. Es así que la importancia en la realización del presente trabajo se basa en la comparación de dos proteínas como antígenos utilizando la prueba de iELISA para el diagnóstico serológico de *Babesia bigemina*, lo que permitirá contar con un sistema de detección de anticuerpos más específico que pueda ser utilizado en estudios epidemiológicos y que pueda contribuir para establecer medidas de control y/o prevención de la babesiosis bovina.

II. Planteamiento del problema.

El Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) estimó un total de 33 millones 779 mil 290 cabezas de ganado bovino en México, durante el año 2017. De los cuales, más del 60 % de este total se encuentra en regiones tropicales y subtropicales y por lo tanto expuestos al riesgo de ser infestados por garrapatas del género *R. microplus* que, en este caso, cumple como vector de los protozoarios causantes de la babesiosis bovina (Jonsson *et al.*, 2000). La presencia del vector, así como la aparición de brotes severos de esta enfermedad en unidades de producción bovina, genera importantes pérdidas económicas para la ganadería en cuanto a la producción de carne, leche o en los sistemas de doble propósito, esto se debe principalmente a los altos costos en medidas que conllevan a la prevención, control, diagnóstico y tratamiento, además de obstaculizar el mejoramiento de razas en zonas endémicas (Rodríguez *et al.*, 2017).

El diagnóstico de la babesiosis bovina es una importante herramienta para el control, la prevención y el tratamiento de esta enfermedad, para ello, en la actualidad se dispone de distintos métodos tales como; técnicas microscópicas, cuya finalidad principal es identificar directamente a los parásitos en muestras sanguíneas, las técnicas serológicas que son ampliamente utilizadas para evaluar la respuesta inmune humoral específica a través de la detección de anticuerpos contenidos en el suero del hospedero, y por último las técnicas moleculares que detectan la presencia del material genético de los parásitos (OIE, 2013).

La observación microscópica de los parásitos en frotis sanguíneos teñidos, a pesar de ser una técnica con alta sensibilidad analítica y bajo costo, requiere de mucha experiencia para poder realizar la identificación del agente causal, además de que sólo es posible observarlo durante la fase aguda de la enfermedad (Bock *et al.*, 2008; OIE, 2013).

Los métodos moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), resultan ser altamente sensibles y específicos, a partir del cual se lleva a cabo la amplificación del material genético (ADN) de los parásitos. Esta técnica y sus variantes colaboran en el diagnóstico de la babesiosis cuando los signos de la

infección no son evidentes o cuando las pruebas serológicas resultan en falsos negativos; sin embargo, no suelen ser recomendables para realizar pruebas a gran escala debido a los problemas asociados a la contaminación, por otro lado, el elevado costo de los materiales y reactivos necesarios, así como los intensos y laboriosos métodos de detección son algunas de las condiciones que limitan el amplio uso de esta técnica (Figueroa y Buening, 1995).

Las técnicas serológicas son utilizadas para diversos estudios epidemiológicos y tienen la capacidad de identificar anticuerpos específicos circulantes en el suero de los bovinos, la más utilizada y en la actualidad considerada como prueba de oro para el diagnóstico de la babesiosis es la inmunofluorescencia indirecta (IFI) (Bautista *et al.*, 2012). Dicha técnica resulta ser altamente sensible y específica; sin embargo, cuando se procesa una gran cantidad de muestras de suero, la prueba IFI presenta ciertas desventajas, esto debido a que cada muestra debe ser analizada individualmente, además de que se necesita de un operador experimentado para realizar la interpretación, por lo que se considera que es una prueba altamente subjetiva. (OIE, 2013).

Por lo tanto, es necesaria la implementación y el uso de nuevas técnicas que permitan realizar el diagnóstico de la enfermedad de una manera más específica, además de que faciliten la interpretación de los resultados cuando la cantidad de muestras es muy elevada.

III. Justificación

El empleo de la serología además de ser útil para el análisis epidemiológico de la babesiosis bovina, también permite establecer criterios en áreas consideradas como endémicas o libres de esta enfermedad, contribuyendo a determinar la ausencia o presencia de reactividad en un rango de edad y tiempo determinado.

Para ello, es necesaria la implementación de nuevos y mejores métodos para el diagnóstico serológico contribuyendo al control y/o la prevención de la babesiosis bovina. En la actualidad, se han realizado diversos estudios de investigación sobre las características biológicas que presenta *Babesia bigemina*, así como también la identificación de antígenos que participan en la invasión de los eritrocitos y que son plenamente reconocidos por el sistema inmunológico del hospedero. El uso y el propósito de mejorar estas técnicas altamente sensibles y específicas, radica en que son comunes las infecciones subclínicas, los portadores crónicos y las bajas parasitemias en áreas donde la enfermedad es endémica.

Resultando importante abordar nuevos temas de investigación que permitan conocer, aplicar y en conjunto mejorar las técnicas utilizadas para el diagnóstico serológico de dicha enfermedad de una manera certera, segura y eficaz. Así también dichas investigaciones se consideran que en un futuro encaminen a la implementación de nuevos antígenos con alta especificidad para el desarrollo de técnicas de diagnóstico rápido. Todo esto con la finalidad de tener un adecuado control y prevención en materia de salud de las unidades de producción bovina y de esta forma preservar la estabilidad sanitaria en cuanto a la producción ganadera de México.

IV. Marco teórico.

4.1 Aspectos relevantes de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* como principal vector para la transmisión de la babesiosis bovina.

Las garrapatas han sido señaladas a través del tiempo como agentes parasíticos que afectan a diferentes especies domésticas, tanto a los animales de compañía como a los de interés económico. Los bovinos padecen enfermedades causadas por protozoarios, como *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, agentes etiológicos de la babesiosis bovina, cuyo vector o transmisor es la garrapata *R. microplus* (Moissant de Roman, 2004; De la Fuente *et al.*, 2007).

En las regiones tropicales y subtropicales del mundo las garrapatas son uno de los principales ectoparásitos que causan pérdidas económicas en la ganadería bovina. Específicamente *R. microplus* causa daños directos debido a la acción de las picaduras, tales como: extracción de sangre, inoculación de toxinas y daños a las pieles (Buczek y Bartozic, 2006); también producen daños indirectos ocasionados por la inoculación y transmisión de agentes patógenos, en éste caso de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* (Jonsson *et al.*, 2008).

Dichos ectoparásitos requieren para su desarrollo de fluidos y sangre de sus hospedadores, lo cual les genera diversos estados anémicos en los animales. De acuerdo con Quiroz (2008) una hembra *R. microplus* puede consumir hasta 1.2 ml de sangre al día.

Atendiendo las condiciones climáticas que favorecen su sobrevivencia, *R. microplus* muestra que su hábitat más apropiado se ubica en zonas ecológicas donde la temperatura ambiental oscile entre 20 - 25 °C (Estrada, 2001).

4.2 Taxonomía.

Dentro de las consideraciones taxonómicas de las garrapatas en general, éstas se dividen por sus características morfológicas en tres familias: *Ixodidae* conocidas como garrapatas duras (cuadro 1), *Argasidae* o garrapatas blandas y *Nuttalliellidae*, representada por el género monoespecífico *Nuttalliella*, que posee características intermedias de las dos familias principales (Keirans y Durden, 2001; Horak *et al.*, 2002; Barker y Murrell, 2004); pero la especie que en este caso interesa es *R. microplus* la cual se encuentra clasificada dentro de la familia *Ixodidae* (garrapatas duras).

Cuadro 1. Taxonomía de *Rhipicephalus Boophilus microplus*

Reino	Animal
Subreino	<i>Metazoa</i>
Phyllum	<i>Arthropoda</i>
Subphyllum	<i>Chelicerata</i>
Clase:	<i>Arachnida</i>
Orden	<i>Parasitiformes</i>
Sub Orden	<i>Ixodida</i>
Familia	<i>Ixodidae</i>
Género	<i>Boophilus</i>
Especie	<i>Rhipicephalus</i> <i>(Boophilus) microplus</i>

Fuente: Adaptado a partir de Hoskins, 1991.

4.3 Ciclo biológico de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Las garrapatas de esta especie presentan cuatro estadios para su ciclo biológico: Huevo, larva, ninfa, y adulto. Estas garrapatas son solo de un hospedero (bovino) y consta de dos etapas bien definidas: La parasitaria y la no parasitaria. (Figura 1) (SAGARPA, 2006; Quiroz, 2008).

1.- La fase no parasitaria se lleva a cabo en el ambiente. Se inicia con el desprendimiento de la teleogina, (hembra adulta ingurgitada). En esta fase se cumplen los siguientes períodos: El primero, es el período de preoviposición donde la teleogina busca un lugar adecuado para colocar los huevos (Álvarez *et al.*, 2007). Posteriormente viene el período de ovoposición es ahí donde la garrapata deposita alrededor de 2,500-3,500 huevos en el ambiente, generalmente lugares húmedos y sombríos, y finalizado este proceso la hembra muere para dar paso al período de incubación donde los huevos incuban en 27 - 30 días a temperatura de 27 a 29°C y 80% de humedad relativa. Finalmente, de la eclosión de los huevos emergen larvas hexápodas muy activas, que suben a los pastos y esperan al nuevo hospedero (Campos *et al.*, 2006).

2. - Fase parasitaria: Se inicia con la subida de las larvas al hospedero en el cual se fijan a zonas de piel delgada, se alimentan por cuatro días, entran en reposo y mudan durante dos días para convertirse en ninfas, estas se alimentan durante seis días, entran en reposo nuevamente y mudan durante dos días para transformarse en adultos (machos y hembras), estos se alimentan, se realiza la cópula; las hembras se alimentan más intensamente durante ocho días, luego se desprenden y durante un periodo de 21 – 23 días caen al suelo para ovopositar en el ambiente (Quiroz, 2008).

Durante este proceso de alimentación, estas garrapatas además de la acción expoliatriz que generan también ejercen acciones tóxicas y antigénicas. Las secreciones salivales inyectadas en la herida, ayudan a penetrar en la piel del hospedero y contribuyen a prevenir la coagulación de la sangre, facilitando la ingestión de ésta. Esas secreciones son muy irritantes y provocan dolor en el sitio de la picadura así como síntomas de toxicosis en su hospedero (Quiroz, 2008).

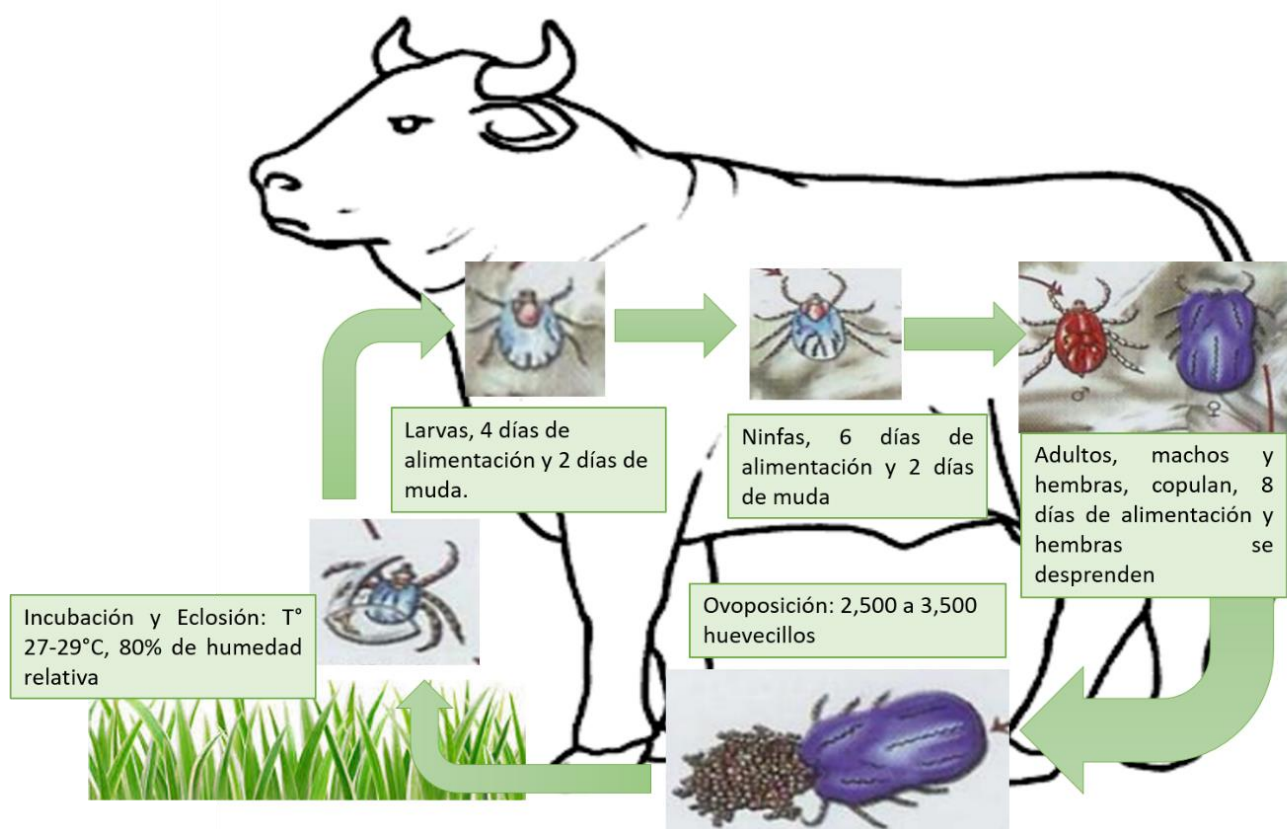


Figura 1. Ciclo biológico de la garrapata *R. microplus*.

Fuente: Adaptado de SAGARPA 2006

4.4 Métodos para el control de garrapatas.

Con la finalidad de minimizar los efectos negativos que ejercen las garrapatas sobre la ganadería, se han implementado una serie de métodos para controlar las poblaciones de estos ectoparásitos y las infestaciones al ganado. Entre los métodos más empleados se mencionan los siguientes:

4.4.1 Control químico.

Es el más conocido y el más usado, consiste en aplicar al hospedero un producto químico con efecto acaricida; se administra en diferentes formas:

- Aspersión en una manga de manejo.
- Inmersión en tanque con la solución química.

- Con aretes impregnados con el producto y fijados al cuerpo del hospedero.
- Inyección del producto.
- Tratamiento que consiste en colocar el producto acaricida sobre la línea media en el dorso del hospedero (Davey *et al.*, 2001; Casas *et al.*, 2009; López *et al.*, 2009).

Este control químico se basa en el conocimiento del ciclo biológico de la garrapata para evitar que las formas parasitarias lleguen a alcanzar el estado de teleoginas o comúnmente llamadas garrapatas repletas, y estas a su vez se desprendan caigan al suelo para reinfestar los pastos en las praderas (Casas *et al.*, 2009).

El ciclo biológico de *R. microplus* en los bovinos dura en promedio 21 a 23 días. Aplicando un químico cada 21 días “se evita” la presencia de estas garrapatas en el ambiente y los bovinos permanecen libres o disminuyen las poblaciones (López *et al.*, 2009).

Los principios activos de los productos químicos empleados hasta ahora han sido; organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides sintéticos, arsenicales, amidinas y endectocidas. Los compuestos clorados, estimulan el sistema nervioso central de la garrapata y producen manifestaciones neuromusculares. Los organofosforados, carbamatos y amidinas inhiben la actividad de la enzima colinesterasa, produciendo exceso de estímulo colinérgico, los piretroides bloquean la actividad motriz y provocan incoordinación motora, parálisis y letargo. Todos ellos se absorben por la piel del hospedero y se acumulan en el tejido adiposo (Davey *et al.*, 2001).

Sin embargo, las aplicaciones de tales métodos de control químico hacia estas poblaciones de garrapatas han sido ineficaces en algunas regiones debido a la aparición de garrapatas resistentes, el desarrollo de resistencia a estos productos no es un fenómeno fuera de lo común ya que se han encontrado cepas resistentes a los acaricidas también en muchos lugares del mundo y es un grave problema para el control de la garrapata (Alonso *et al.*, 2006).

4.4.2 Control biológico.

Se refiere al de un microorganismo vivo introducido en el ambiente del parásito para lograr su control por reducción de su crecimiento poblacional (Chae *et al.*, 2008).

En este caso, las garrapatas de la familia *Ixodidae* (garrapatas duras), son parasitadas por avispa de la familia *Encyrtidae*, pertenecientes al género *Ixodiphagus*, esta avispa consume el contenido completo de los tejidos internos de la garrapata repleta (ninfas y adultos); así como también se ha observado la acción letal que ofrecen hongos de los géneros *Beauveria* y *Metarhizium* sobre estas garrapatas (Heath y Cane, 2010).

4.4.3 Control genético.

Consiste en utilizar razas de bovinos resistentes a la infestación de garrapatas; está documentado desde 1912, la reducción del número de garrapatas *R. microplus* que finalizan su fase parasítica en las razas *Bos indicus* (Cebú) y sus cruza (CFSPH, 2008). Esta resistencia se demuestra porque se desprenden o mueren las garrapatas inmaduras, también hay reducción del número de garrapatas repletas y disminución en la oviposición por las teleoginas (Willadsen, 2006). La resistencia de la raza Cebú puro es dominante, demostrándose 85% de rechazo de las larvas de garrapata durante las primeras 24 horas de contacto. Por su parte, Jonsson (2006) menciona que en ganado *Bos indicus* presenta del 10 al 20 % menos garrapatas que el ganado *Bos taurus*. Es un carácter heredable y la hembra es más resistente que el macho (Hernández, 2005; Willadsen, 2006).

4.4.4 Aplicación de vacunas.

El desarrollo de vacunas, contra *R. microplus* fue realizado por primera vez en Australia, donde la proteína Bm86, aislada del intestino de la garrapata, fue recombinada en la bacteria *Escherichia coli* y luego dicha vacuna se ofreció a escala mundial (Odongo *et al.*, 2009). Posteriormente en Cuba, fue desarrollada la vacuna GAVAC con la misma tecnología recombinante, pero ahora utilizando la levadura

Pichia pastoris (Vargas *et al.*, 2010); esta vacuna fue distribuida en varios países de América Latina que es ofrecida en países de América Latina. El antígeno Bm86 se expresa de forma natural en células del sistema digestivo de las garrapatas adultas hembras y se sabe que juega un papel importante durante el período de alimentación y digestión de la sangre en garrapatas hembras repletas alimentadas de bovinos infectados con *Babesia* (Bastos *et al.*, 2010). Los anticuerpos anti-Bm86 aparentemente se unen a la superficie de las células epiteliales del intestino de la garrapata e interrumpen la endocitosis causando la lisis de las células y reduciendo la capacidad reproductiva de las hembras repletas.

Los efectos de la vacuna sobre estas garrapatas son reducciones de la capacidad reproductiva (50-90 %), del número de garrapatas repletas (20-30 %), del peso de las garrapatas (30 %) y del peso de los huevos (60-80 %); sin embargo, no produce mortalidad (Jonsson *et al.* 2000; De la Fuente *et al.*, 2008).

Actualmente, se está utilizando una versión mexicana de la vacuna Bm86 que ha sido empleada con resultados prometedores cuando se utiliza en combinación con acaricidas (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2006); el tratamiento aplicado permite mantener infestaciones menores a 10 garrapatas por animal lo cual se considera que representa una ventaja de este control y cumple así la necesidad de mantener la estabilidad enzoótica del hato. Este uso de estrategias de combinar acaricidas con vacunas, además de reducir el abuso del empleo de los químicos, retardan la aparición de resistencia y disminuyen el daño ambiental producido por la contaminación del suelo y subsuelo, así como también reducen la contaminación de productos como carne y leche para consumo humano (Jongejan y Uilenberg, 2004).

4.4.5 Rotación de potreros.

La estrategia consiste en incrementar el tiempo de retorno del hato al potrero, con el objetivo de eliminar parte de la población de larvas de garrapata presentes en el ambiente por ausencia del hospedero donde alimentarse, con esto se pretende atacar a los parásitos en la fase no parasítica de su ciclo evolutivo (Quiroz, 2008).

4.5 Distribución de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en México.

En México, desde hace varios años se está tratando de controlar las infestaciones de garrapatas en ganado bovino por la Campaña Nacional contra la garrapata *Boophilus* misma que contempla estrategias y acciones básicas que se ejercen de manera coordinada con diversas dependencias oficiales y privadas las cuales incluyen: Capacitación, monitoreo, vigilancia epidemiológica, supervisión de baños garrapaticidas, estaciones cuarentenarias y coordinación con el Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA) como institución oficial de referencia en parasitología, todos estos esfuerzos han logrado mantener zonas libres y limitar hasta cierto punto la reproducción de la garrapata en las zonas bajo control (SAGARPA-SENASICA, 2016).

En la Figura 2, se muestra la superficie “libre de garrapatas” que comprende 599,367.84 km² representando el 30.6% del territorio nacional. La superficie en erradicación abarca 67,472.76 km² lo que corresponde a el 3.4% del total del territorio mexicano. Por otro lado, la superficie mexicana considerada en control de esta especie de garrapata comprende 1, 292, 407.02 km² representando así 65.9% del territorio nacional.

Para todo esto, se ha reconocido a los Estados de Sonora, Tlaxcala, Aguascalientes, Baja California, Chihuahua y el Norte de Baja California Sur como libres del ectoparásito.

En fase de erradicación se encuentran los municipios de Los Cabos junto con la parte sur de La Paz en Baja California Sur, así como el norte del estado de Sinaloa y parte del desierto del estado de Coahuila. El resto del país comparte regiones en control y zonas libres naturales de garrapata (SENASICA, 2018).



Figura 2. Distribución de la garrapata *Boophilus* spp en México.

Fuente: SENASICA 2018. Situación actual del control de la garrapata *Boophilus* spp.

4.6 Definición de Babesiosis bovina.

La Babesiosis bovina es una enfermedad que es transmitida por garrapatas y causada por parásitos del género *Babesia*, esta enfermedad generalmente se caracteriza porque ocasiona lisis de eritrocitos que conduce a anemia y muerte de los bovinos; causando pérdidas económicas significativas para las producciones ganaderas en riesgo de las infestaciones de garrapatas (Figuroa y Álvarez, 2003). Es la enfermedad protozoaria transmitida por un vector artrópodo de mayor importancia en regiones tropicales del mundo (Bravo, 2012).

La presentación de la babesiosis en hatos bovinos, depende mucho de la edad; la mayoría de los casos de babesiosis se observan en adultos, y los animales menores de 9 meses a pesar de ser portadores de la infección generalmente no

presentan signos clínicos. Así como también la susceptibilidad de la enfermedad varía según la raza y sus cruzas; *Bos indicus* y su cruzas con *Bos taurus* son más resistentes que sólo *Bos taurus* (CFSPH, 2008). También influye el ambiente y la variación estacional de la población de garrapatas en una región. En México, la babesiosis bovina afecta la economía pecuaria en diferentes niveles, limita la importación de ganado genéticamente superior al nativo en regiones tropicales y hay una disminución notable en la producción de carne y leche (Navarrete *et al.*, 2002).

4.7 Antecedentes de babesiosis bovina.

Como antecedentes de la babesiosis bovina se sabe que el primer reporte de la enfermedad se realizó en la ciudad de Rumania por Viktor Babes en el año de 1888 quien observó al microscopio parásitos intraeritrocíticos en sangre de ovinos y bovinos con signos de anemia hemolítica y hemoglobinuria (Navarrete *et al.*, 2002); posteriormente Theobald Smith y Frederick Kilborne en el año de 1893 le asignaron el nombre de *Pyrosoma bigeminum* y también demostraron que la garrapata del género *R. microplus* es la responsable de transmitir la enfermedad en los bovinos. Este parece haber sido el primer informe de la transmisión de un parásito protozario por un artrópodo hematófago (Cordero, 2002). En el mismo año, Starcovici asignó a estos parásitos el nombre de: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Babesia ovis*. Algunos otros nombres fueron propuestos, pero el más conocido fue Piroplasma. Originalmente el nombre “piroplasma” inicia del hecho que el parásito después de la multiplicación tiene a menudo forma tipo pera, asignándole “piroplasmosis” (Cordero, 2002).

4.8 Agente etiológico.

En México, las especies más comunes causantes de babesiosis bovina son *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* (Solís et al., 2000).

Babesia bigemina es un parásito piriforme redondeado oval que mide aproximadamente 2.5 a 5 μm , en cambio *Babesia bovis* es más pequeño, su longitud se encuentra entre 1 a 2.5 μm (García, 2015). *B. bigemina* característicamente se observa y se identifica como un par de corpúsculos en forma de pera unidos por un ángulo agudo dentro de un eritrocito maduro (figura 3); y presenta una distribución más amplia (Friedhoff, 2005). Mientras que *B. bovis* en general es más patógena que *B. bigemina* (OIE, 2010); y ésta se observa y se identifica como pequeños corpúsculos en pares también en forma de pera, pero unidos en un ángulo obtuso dentro de un eritrocito maduro. (Solorio y Rodríguez-Vivas 2005).

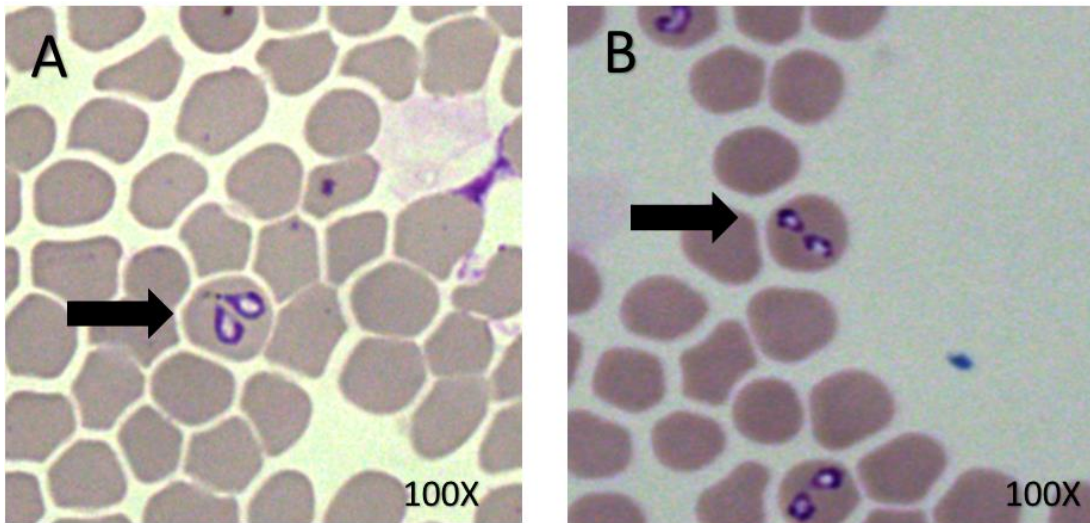


Figura 3. Panel A: *Babesia bigemina* en el interior de un eritrocito bovino. Panel B: *Babesia bovis* en el interior de un eritrocito bovino

Fuente: Frotis obtenido a partir de *cultivo in vitro* de la unidad de babesiosis, CENID-SAI, INIFAP.

Dentro de las características estructurales y taxonómicas, los protozoarios del género *Babesia* son organismos eucariotas que pertenecen al *Phylum Apicomplexa* (cuadro 2), caracterizándose por la presencia de un complejo apical y un citoesqueleto único distinto de otros organismos eucariotas (Gordon y Sibley, 2005). No poseen cilios, ni pseudópodos, ni flagelos y son de reproducción alterna (sexual y asexual) (García, 2015).

Se ubican dentro del *Phylum Apicomplexa* por que como ya se mencionó poseen un complejo apical (figura 4); que es un órgano complejo situado, como su nombre lo indica en el polo apical del organismo.

Cuadro 2. Clasificación taxonómica de Babesia.

Dominio	<i>Eucaryota</i>
Reino	<i>Protista</i>
Subreino	<i>Protozoo</i>
Phyllum	<i>Apicomplexa</i>
Clase	<i>Aconoidasida</i>
Subclase	<i>Piroplasmea</i>
Orden	<i>Piroplasmida</i>
Superfamilia	<i>Babesioidea</i>
Familia	<i>Babesiidae</i>
Genero	<i>Babesia</i>
Especie	<i>Babesia bovis,</i> <i>bigemina</i>

Fuente: Modificado a partir de Levine *et al.*, 1980.

El cual se encuentra constituido por estructuras claramente diferenciadas:

- Anillos polares: Estructuras anulares ubicadas en los extremos.
- Conoide: Estructura en forma de cono truncado formado por un espiral de microtúbulos.
- Roptrias: Orgánulos de aspecto piriforme cuya zona estrecha penetra en el conoide desembocando en el polo apical.
- Micronemas: Vesículas elípticas que desde el conoide se extiende hasta aproximadamente un tercio del cuerpo del protozoo.

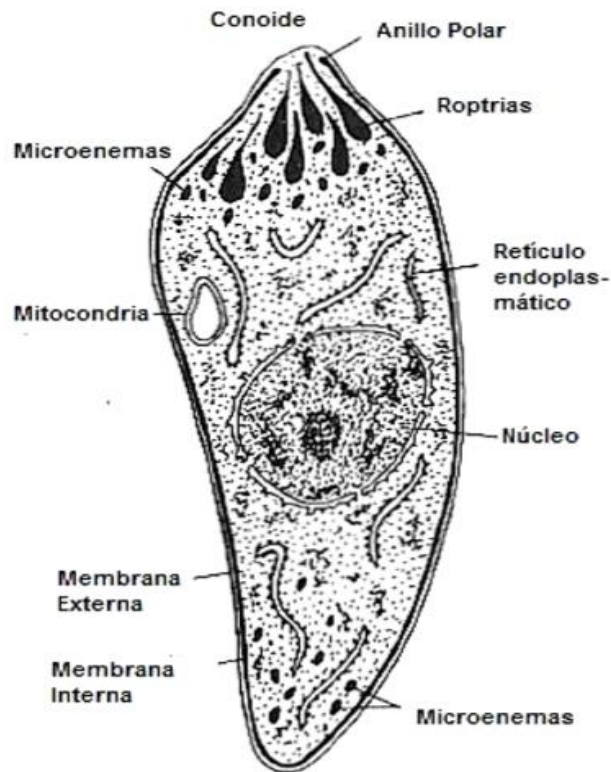


Figura 4. Diagrama de un trofozoito de *Babesia*

Fuente: Adaptado de: Cordero (2002); Gordon y Sibley (2005) y García (2015).

Funcionalmente, este complejo apical se relaciona con la adherencia e invasión de las células del hospedero. El conoide posee una función “perforadora” y las roptrias y micronemas secretan sustancias que facilitan la penetración celular, indispensable para la supervivencia del parásito. Todas éstas estructuras se pueden observar en las fases de esporozoitos y merozoitos; es decir, en las que pueden considerarse formas invasivas del protozoo (Cordero, 2002; Gordon y Sibley, 2005; García, 2015).

4.9 Ciclo biológico.

El bovino se infecta tras la mordedura de la garrapata que inocula a través de la saliva esporozoitos de *Babesia* (Vasco, 2013); estos esporozoitos penetran directamente en los eritrocitos, y es ahí donde se desarrollan todas las fases infectivas del parásito. Después de la invasión de los esporozoitos en el glóbulo rojo se produce un trofozoito y posteriormente dos merozoitos por fisión binaria y éste a su vez lisa el eritrocito y cada merozoito invade uno nuevo produciendo merogonias resultado de la reproducción asexual por división múltiple (Chauvin *et al.*, 2009).

Después de eso, los eritrocitos infectados con los merozoitos de *Babesia* son ingeridos por la garrapata para posteriormente desarrollarse en gametocitos; los gametos desarrollados se fusionan en el lumen del tracto digestivo de la garrapata para formar un cigoto alargado que mide aproximadamente de 8 a 10 μm de longitud que lleva un organelo similar al “pico de una cabeza de flecha”, que facilita su penetración en las células del intestino medio (Chauvin *et al.*, 2009).

El organelo “pico de flecha” toca la membrana celular del intestino medio de la garrapata, que se invagina alrededor de éste en el punto de contacto, en ésta etapa no se forma membrana parasitófora y la membrana celular del intestino medio parece lisarse en el punto de entrada debido a la acción de enzimas liberadas del parásito invasor. La función de dicho organelo parece ser similar a la función de las roptrias y micronemas en todos los parásitos intracelulares. Una vez que el cigoto de *Babesia* se ha internalizado en las células del intestino medio de la garrapata, el

orgánulo se desintegra y el cigoto se transforma en una fase móvil, denominada oocineto (Chauvin *et al.*, 2009).

Este oocineto abandona el epitelio del intestino medio e invade los tejidos del cuerpo de la garrapata, invasión que incluye a los ovarios donde muchos huevos son infectados y se le denomina, transmisión trans- ovárica (CFSPH, 2008).

Posteriormente, los parásitos de *Babesia* se multiplican asexualmente, continuando como esporogonia y el posterior desarrollo de numerosos esporoquinetos que ocurren en cada etapa de la garrapata dando lugar a la transmisión trans-estadial donde la infección se va adquiriendo durante una etapa de la vida de la garrapata a la siguiente. Los esporoquinetos invaden las glándulas salivales de las garrapatas, donde se desarrollan en esporozoitos que representan la fase infecciosa del parásito hacia su hospedero bovino (figura 5) (Chauvin *et al.*, 2009).

En el caso de *B. bovis*, generalmente es infeccioso 2 a 3 días posteriores a que los esporozoitos se unen a las larvas de las garrapatas y se pueden transmitir sólo a través de éstas larvas, ya que en *R. microplus* *B. bovis* no sobrevive más allá del estadio larval (CFSPH, 2008). Por el contrario, *B. bigemina* madura aproximadamente 9 días después de que se une a la larva de garrapata y sólo se transmite a través de ninfas y adultos (CFSPH., 2008; Vasco, 2013).

4.10 Interacción del parásito con su hospedero y su respectiva invasión de eritrocitos.

Los parásitos *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* utilizan distintas moléculas para la invasión de los eritrocitos, durante éste proceso es necesario el reconocimiento de la célula blanco por parte del parásito infectante, esta primera etapa de reconocimiento la llevan a cabo las moléculas de superficie de los merozoitos, mientras que organelos del complejo apical tales como roptrias y micronemas están encargadas de secretar sustancias en el punto de invaginación de la membrana de los eritrocitos en el proceso de invasión, todo esto con el fin de

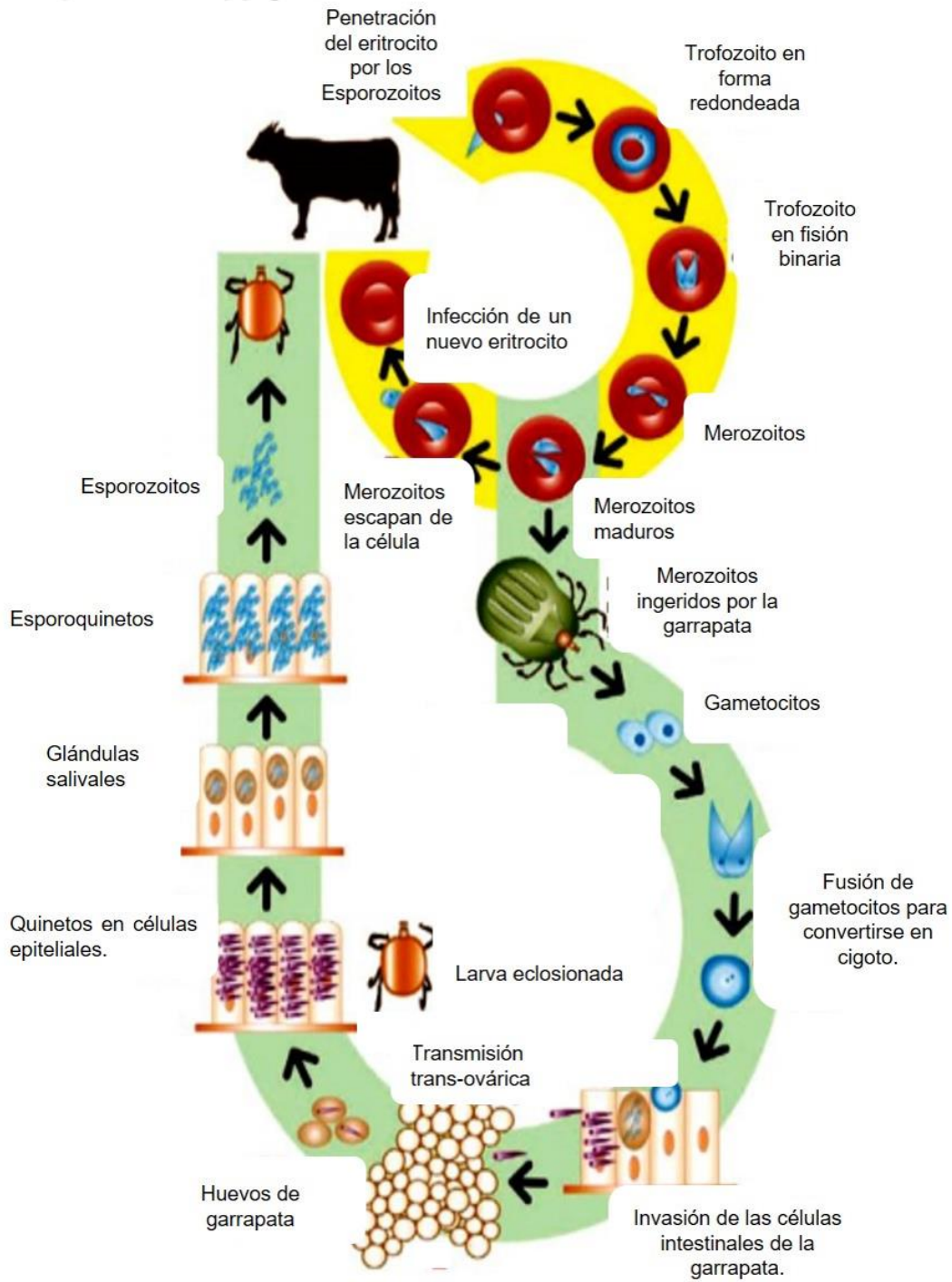


Figura 5. Ciclo biológico de *Babesia*.

Fuente: Adaptado de Mosqueda *et al.*, 2012.

hacer uniones estrechas entre el mismo eritrocito para su adherencia, penetración e internalización del mismo (Yokoyoma *et al.*, 2006). Las moléculas de superficie de los merozoitos constan de 5 categorías: MSA-1, MSA-2, MSA-2a, MSA-2b, y MSA-2c y pertenecen a una familia llamada antígenos variables de la superficie del merozoito (VMSA) las cuales, de todas estas proteínas se ha identificado que sólo MSA-1 y MSA-2 están involucradas en la interacción, reconocimiento y unión inicial del parásito con el eritrocito que también incluye glicoproteínas en su superficie para la relación de las mismas (Gohil *et al.*, 2010).

En cuanto a la secreción de sustancias, los primeros en actuar son los micronemas y ayudan a la orientación del parásito para que la porción apical quede en contacto con la membrana del eritrocito, posteriormente se secretan proteínas de las roptrias y esta liberación de proteínas se correlaciona con la formación de la vacuola parasitófora que rodea al parásito y está formada por una invaginación de la membrana plasmática del eritrocito durante la invasión ocasionando la fusión de esta membrana y la liberación del parásito en la vacuola, la cual funciona como una barrera de difusión para evitar la degradación intracelular del parásito, la liberación del contenido de los cuerpos esféricos ocurre luego de que el parásito ha completado su entrada y todo esto contribuye a la modificación del eritrocito para su completa invasión (cuadro 3) (Yokoyama *et al.*, 2006).

Cuadro 3. Principales proteínas involucradas en la invasión.

Proteína	Peso Molecular (kDa)	Localización celular.	Función
Antígeno de superficie del Merozoito 1 (MSA-1)	42	Superficie de Merozoitos y Esporozoitos	Unión inicial el Merozoito con la membrana del eritrocito
Antígeno de superficie del Merozoito 2 (MSA-2)	44	Superficie de Merozoitos y Esporozoitos	Contribuye al reconocimiento del eritrocito huésped y facilita su invasión

Proteína asociada a roptrias 1 (RAP-1)	60	Región apical de los Merozoitos y Esporozoitos	Modifica la membrana de la célula huésped para la penetración del parásito
Proteína de cuello de las roptrias (RON-2)		Región apical de los Merozoitos y Esporozoitos	Contacto y unión estrecha del parásito con la membrana de la célula huésped
12D3	41	Región apical de los Merozoitos y Esporozoitos	Liberado en forma soluble en el citoplasma del eritrocito durante su invasión.
Antígeno de membrana apical 1 (BbAMA-1)	82	Micronemas y región apical del Merozoito.	Invasión de glóbulos rojos
Proteína anónima relacionada con trombospondina (BbTRAP)	75	Micronemas y región apical del Merozoito	Reconocimiento, fijación e invasión de glóbulos rojos.
La proteína del cuerpo esférico 1 (SBP1 / Bb-1 / Bv80)	80	Esqueleto de la membrana de los glóbulos rojos infectados	Proteínas desplegadas después de la invasión.
Proteína del cuerpo esférico 2 (SBP2 / BvVa1)	225	Orgánulos del cuerpo esférico y esqueleto de la membrana de los glóbulos rojos infectados	Proteínas desplegadas después de la invasión.
La proteína del cuerpo esférico 3 (SBP3)	135	Orgánulos del cuerpo esférico y esqueleto de la membrana de los glóbulos rojos infectados	Asociarse con la membrana de eritrocitos después de la invasión
Antígeno de superficie variante de eritrocitos 1 (VESA1)	100 a 150	Superficie de la "cresta" en eritrocitos infectados.	Citoadhesión y variación antigénica.

Fuente: Adaptado a partir de Gohil *et al.*, 2010.

Los antígenos parasitarios que se han investigado, son señalados como blanco del sistema inmune y están implicados en funciones esenciales para la supervivencia del parásito, como se mencionó anteriormente en la invasión al eritrocito y la variación antigénica del parásito para escapar al sistema inmune del hospedero bovino. El cultivo *in vitro* de *Babesia* y las herramientas de ingeniería genética, han facilitado considerablemente el estudio de las interacciones hospedero-parásito y permitido la caracterización de tales antígenos (Figuroa y Álvarez, 2003).

Cuatro grupos de antígenos han sido particularmente estudiados con el fin de probar su potencial inmunoprotector mediante la inoculación de proteínas recombinantes: Los presentes en la superficie de eritrocitos infectados; los presentes en la superficie de los merozoitos; los presentes en los organelos del complejo apical; y los secretados en el sobrenadante de cultivo *in vitro* (Figuroa y Álvarez, 2003).

En este trabajo se realizará énfasis particularmente en dos proteínas recombinantes utilizadas como antígenos tales como RAP-1 y 12D3. La primera de gran importancia, debido a sus implicaciones dentro del proceso de invasión al eritrocito por el merozoito, y de la disolución de la vacuola parasitófora, los antígenos del complejo apical de *Babesia* contenidos dentro de organelos como las roptrias, micronemas o cuerpos esféricos, se han considerado como candidatos para el diseño de vacunas anti-*Babesia* (Wright *et al.*, 1992). Son los antígenos de las roptrias que pertenecen a una familia multigénica (RAP-1) y que han sido identificados en las especies *B. bovis*, *B. bigemina* y *B. divergens* (Suarez *et al.*, 1991); aun cuando la función de las proteínas RAP no se sabe perfectamente el hecho de que anticuerpos monoclonales anti-RAP-1 inhiban el crecimiento de *Babesia bigemina in vitro* (Figuroa y Buening, 1991) sugiere la implicación de las moléculas RAP-1 en el mecanismo de invasión y la importancia de estas moléculas a nivel inmunológico. Además, las moléculas RAP-1 se encuentran conservadas entre cepas de las diferentes especies (*B. bovis* y *B. bigemina*) y poseen epítomos para células T cooperadoras, siendo altamente inmunogénicos al inducir la

expresión del interferón- γ , y así activar a los linfocitos B para que secreten anticuerpos IgG2 opsonizantes (Brown *et al.*, 1998).

La proteína 12D3 que también es considerada participante en la invasión de los parásitos a los eritrocitos en el proceso de infección, ha sido evaluada, clonada y expresada en forma de proteína recombinante junto con otros dos antígenos (11C5 y 21B4); demostrado en un estudio realizado por Wright en el año de 1999 que dicha proteína recombinante tiene capacidad para inducir una respuesta inmune en animales sometidos a un desafío heterólogo de *Babesia*. 12D3 en combinación con 11C5 estimula al sistema de defensa para inducir una respuesta de protección en bovinos (Wright *et al.*, 1992); sin embargo, la respuesta inmune conferida por esta combinación, no fue tan efectiva comparada con la protección inducida por la vacuna preparada a partir de parásitos vivos atenuados (East, 1997).

Diversos estudios de serología con anticuerpos anti-12D3, han demostrado, que la molécula se encuentra conservada entre distintos aislados de *B. bovis* y en otras especies de *Babesia* tales como *B. bigemina*, *B. divergens*, *B. equi* y *B. canis*, por lo tanto, estas proteínas pueden ser antígenos candidatos para vacunas protectoras contra esas especies (Wright *et al.*, 1992).

Se ha evaluado también la inmunogenicidad producida por la proteína recombinante 12D3 en combinación con MSA-1 y MSA-2c en bovinos expuestos a la infección por *Babesia* sometidos a condiciones naturales y se observa que la utilización de 12D3 en conjunto con estas proteínas si genera anticuerpos específicos que reconocen a los antígenos correspondientes; sin embargo, esta combinación tampoco produce una protección adecuada, debido a que la respuesta inmune específica inducida por estos antígenos produce solamente un 50% de protección, comparada con la vacuna viva atenuada que confiere una protección mayor al 80%. Estos resultados apoyan la idea de encontrar una combinación más adecuada de proteínas recombinantes para la protección exitosa del ganado contra la babesiosis bovina en una confrontación natural con los parásitos (Reyes *et al.*, 2016).

4.11 Patogenia de la babesiosis bovina.

Según Cordero del Campillo (2002), existen tres factores que condicionan la patogenia en la presentación de la enfermedad, el hospedero, el parásito y el ambiente.

En el hospedero, la edad, la raza, el estado de salud y la condición corporal en la que se encuentren los animales se consideran factores de importancia para la manifestación clínica de dicha enfermedad. En la edad, se ha observado que becerros de hasta 6 y 9 meses no manifiestan signos clínicos de importancia, sino que sólo se consideran como portadores cuando son expuestos de una edad temprana a estos parásitos, esto debido a la inmunidad pasiva conferida por la madre. Por otro lado, los animales adultos que nunca estuvieron expuestos, al ser infectados por primera vez, desarrollan signos clínicos severos e incluso mueren (Hernández, 2005; Willadsen, 2006); en cuanto a la raza, también se observa que todas las razas de bovinos pertenecientes al género *Bos taurus* son más sensibles a la infección que los *Bos indicus* (Capítulo 4.4.3. Control genético) (Willadsen, 2006). El estado nutricional y de salud de los animales en la presentación de esta enfermedad se relaciona con la respuesta del sistema inmunológico a la exposición de dichos parásitos, una condición corporal baja y una alta exposición a microorganismos patógenos puede influir de manera severa en las manifestaciones clínicas que presenten los animales infectados, debido a que las respuestas de defensa no pueden reaccionar correctamente para proteger al organismo del animal expuesto (Hernández, 2005; Willadsen, 2006).

En cuanto al parásito, particularmente *Babesia bigemina* presenta una distribución amplia (Friedhoff, 2005; OIE, 2010), y la transmisión de este parásito es exclusivamente por ninfas y adultos de *R. microplus* (Solorio y Rodríguez-Vivas 2005); por este motivo, el período de incubación y por lo tanto el comienzo de las manifestaciones clínicas de *B. bigemina* es relativamente corto presentándose de 4 a 5 días después de la inoculación de sangre infectada (Zintl *et al.*, 2003; OIE, 2014).

El ambiente influye con la presencia e intensidad de los vectores, para la garrapata *R. microplus* la temperatura y la humedad son los factores de mayor importancia en el desarrollo de su ciclo de vida, seguido de la vegetación (Thornton *et al.*, 2009; FAO, 2010). Durante este ciclo de vida las hembras de las garrapatas, después de copular en el hospedero, caen de él y buscan un sitio seguro donde ovipositar, generalmente en el suelo cerca de la vegetación que les proporciona refugio y regulación de la temperatura y la humedad. Bajo estas condiciones climáticas óptimas de temperatura y humedad, las garrapatas depositan sus huevos dentro de los dos días siguientes a la caída del hospedero, pero en estaciones del año frías pueden tardar semanas o meses. Los huevos de las garrapatas duras son depositados en un solo grupo en sitios húmedos, cálidos y protegidos del calor extremo. Después de lo cual la hembra muere; por lo tanto, cada hembra solo oviposita generalmente de 2,500-3,500 huevos una vez en el transcurso de toda su vida. Se sabe que, durante su primera etapa de vida, las garrapatas, capturan agua del medio para evitar la desecación, este mecanismo se realiza por medio de la osmorregulación (Cordero, 2002), para ello, las garrapatas realizan este proceso únicamente en condiciones climáticas adecuadas, con una temperatura entre 14 y los 32 grados centígrados y una humedad relativa de 80% (Corson *et al.*, 2004). Por lo tanto, el éxito de esta familia de garrapatas depende de su habilidad para sobrevivir y reproducirse dentro del ambiente de los animales que parasitan y de los cuales obtienen la sangre de la cual se alimentan (Campos *et al.*, 2006).

El principal mecanismo patogénico de *Babesia* es la producción de anemia hemolítica, al romperse los eritrocitos y liberarse la hemoglobina. Esto origina la producción de la bilirrubina que tiñe las mucosas de color amarillo (Carrique y Ribera, 2000). Esta infección en el organismo por lo general ejerce una acción traumática al liberarse del eritrocito, acción expoliatriz al alimentarse principalmente de hemoglobina, acción mecánica al formar acúmulo de parásitos a nivel capilar y finalmente una acción tóxica con sus productos metabólicos (Quiroz, 2000).

En general, la babesiosis es causa de la destrucción de los eritrocitos parasitados (hemólisis), por lo cual la hemoglobina queda en libertad y es convertida en pigmentos biliares y el exceso de estos pigmentos es depositado en los tejidos,

ocasionando ictericia. Aparece en la orina el exceso de la hemoglobina, que el hígado no pueda transformar, de modo que esta orina se colorea de rojo. Esta enfermedad de manera aguda se va caracterizar por la hemólisis, el edema, la anemia y la trombosis (Vasco, 2013).

Los eritrocitos infectados son fagocitados por células del sistema inmune del hospedero, los cuales se refuerzan por la unión de más glóbulos rojos cuya pared ya ha sido modificada por el mecanismo de invasión del parásito a estos eritrocitos produciendo trombos en la circulación sanguínea (Vasco, 2013). Otro mecanismo que produce trombos en la circulación es la liberación de sustancias enzimáticas (esterasas y proteasas) liberadas por los parásitos en los glóbulos rojos, éstas enzimas favorecen la pérdida de productos de degradación del fibrinógeno y al incrementarse la cantidad de fibrinógeno, la fibrina facilita la formación de trombos, dando lugar a fenómenos de coagulación intravascular diseminada favorecida también en formación de calicreína, por activación de precalicreína que se encuentra de manera natural en la sangre (Cordero, 2002).

La liberación de proteasas en la circulación, también va a influir en procesos de vasodilatación, hipotensión, aumento de la permeabilidad capilar, edema y colapso vascular (Vasco, 2013).

La enfermedad aguda por lo general sigue un curso de una semana; el primer signo es la fiebre que, según León en el año 2002, puede ser de 41 - 42 °C, y dura de 2 a 7 días o más; ésta persiste a lo largo de la enfermedad y se acompaña de inapetencia, aumento de la frecuencia respiratoria y temblores musculares. Este mecanismo de la fiebre se produce por la acción de los monocitos y los macrófagos que durante su reacción en protección del organismo sintetizan y secretan citosinas pirogénicas como interleucina-1 (IL1), interleucina-6 (IL6) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) (Murphy, 1979); estas sustancias entran a la circulación y llegan a las células endoteliales del hipotálamo anterior en la región preóptica particularmente conocido como centro termorregulador principal, donde se unen a receptores específicos induciendo la síntesis de prostaglandinas E2 (PGE 2), estas prostaglandinas inducen la liberación de monoaminas y AMP cíclico las cuales elevan el control del termostato en dicho centro (Petersdorf, 1980). El resultado es

una serie de mecanismos periféricos de conservación de calor mediante vasoconstricción, así como un incremento metabólico (por ello la reacción de aumento de la frecuencia respiratoria y temblores musculares) terminando con la respuesta final de la fiebre (Murphy, 1979). El mecanismo de la fiebre actúa mejorando la respuesta inmunológica de la infección aumentando la migración de fagocitos, así como un incremento de la proliferación de linfocitos T (Petersdorf, 1980).

Cuando se infecta un animal, la multiplicación del parásito en los vasos alcanza un máximo con el desarrollo de hemólisis de eritrocitos clínicamente identificable después de un período de incubación. Esta hemólisis produce anemia intensa y hemoglobinuria, la muerte sobreviene probablemente por anoxia anémica; la afectación del sistema nervioso central (SNC) es debido a la adhesión de eritrocitos parasitados en los capilares del cerebro, por la infección con *Babesia bovis* (Blood *et al.*, 1987).

B. bigemina, dentro de los eritrocitos infectados, muestra capacidad para adherirse a las células endoteliales, lo que lleva a la retención de éstos eritrocitos en la microvasculatura. Esto permite que los parásitos persistan dentro del huésped evitando el paso de eritrocitos infectados en el bazo y, por lo tanto, su eliminación del flujo sanguíneo (Chauvin *et al.*, 2009).

Por otro lado, esta citoadherencia está mediada por el antígeno de superficie de eritrocitos variantes 1 (VESA1), una proteína exportada a la superficie del eritrocito hospedero infectado y que implica un contacto prolongado con el sistema inmune del hospedero. El parásito ha desarrollado así una estrategia para proteger su función adhesiva de la interferencia inmune, en particular preservando la citoadhesión incluso cuando se producen anticuerpos (Chauvin *et al.*, 2009).

4.12 Signos clínicos.

Los animales infectados con *Babesia bigemina* primeramente desarrollan anorexia y fiebre de hasta 42 °C antes que otros signos, posteriormente se presenta hemólisis y anemia, esto es más característico en éste parásito que en *Babesia*

bovis, seguido de pérdida del apetito y aislamiento del hato, los animales infectados también muestran debilidad, depresión y postración, sus membranas mucosas se observan pálidas y hay aumento en la frecuencia cardíaca y respiratoria. Generalmente, se desarrolla hemoglobinuria y hemoglobinemia, así como también diarrea o estreñimiento en algunos casos y en animales muy afectados se manifiesta disnea asociada a un síndrome de insuficiencia respiratoria. En vacas gestantes se puede producir abortos debido a la severa fiebre que presentan. Los signos en el sistema nervioso no son frecuentes en las infecciones con *B. bigemina*. Algunos bovinos que se infectan mueren, pero en los animales que sobreviven, la crisis anémica suele cesar en una semana; estos pueden estar débiles y en malas condiciones, aunque generalmente la mayoría se recupera por completo con el tratamiento adecuado (CFSPH, 2008).

4.13 Inmunidad contra *Babesia* spp.

La respuesta inmune innata es esencial y requiere la producción de Interleucina-12 (IL12) e Interleucina-18 (IL18). A su vez estas interleucinas estimulan las células asesinas naturales (NK) para producir altos niveles de interferón gamma (IFN- γ), que inducen la producción de óxido nítrico (NO) por los macrófagos. Esta respuesta inmune no conduce a la eliminación del parásito, pero ayuda a controlar la parasitemia, mecanismo que se realiza por distintos procesos donde involucra: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos mediada por IgG1, opsonización y neutralización mediada por IgG2, adherencia del merozoito libre y eritrocitos infectados a las células endoteliales y la activación del complemento mediada por IgG1 e IgG2 (Tizard, 2008).

Diversos mecanismos de la respuesta inmune son activados en los bovinos infectados con estas dos especies de *Babesia*. Sin embargo, la primera en actuar en una primoinfección o infección aguda al bovino es la respuesta inmune innata y cabe destacar que animales de entre 6 a 9 meses de edad desarrollan una inmunidad innata mucho más fuerte que los bovinos adultos (Goff *et al.*, 2008), característica que se manifiesta gracias al traspaso de anticuerpos del calostro de

la madre al becerro. Por otro lado, se ha demostrado que la respuesta de los animales jóvenes a la infección involucra la producción temprana de Interleucina-12 (IL-12), Interleucina-18 (IL-18) e interferón gamma (IFN- γ) así como también la presencia de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS). En contraparte, en animales adultos, la producción de IL-12 e IFN γ aparece más tarde en la infección y la iNOS no es inducida. Además, se ha visto que la Interleucina-10 (IL-10) juega un papel importante en la inmunomodulación de la respuesta innata en animales adultos, esto con el fin de evitar una respuesta inflamatoria prolongada que resulta perjudicial para el animal (Goff *et al.*, 2008).

Después de la exposición de los hospederos, cuando los parásitos se encuentran libres en el torrente sanguíneo, los anticuerpos de la subclase IgG1 e IgG2 tienen una función fundamental en esta etapa temprana de la infección para la neutralización y opsonización de los antígenos, colaborando como marcadores para la fagocitosis y bloqueando la entrada de los parásitos al eritrocito. Una vez dentro del eritrocito, los niveles de parasitemia son controlados por las células de este sistema inmune innato, la primera línea de defensa la constituyen las células natural killer (NK), neutrófilos, monocitos y los macrófagos. Esta primera resistencia contra la babesiosis parece ser controlada por la producción de factores solubles, como el IFN γ de las células NK y el TNF α , así como el óxido nítrico e intermediarios reactivos del oxígeno de los macrófagos (Shoda *et al.*, 2000); se ha probado que estos dos compuestos son producidos durante infecciones agudas (Schneider *et al.*, 2011).

Por otro lado, Brown *et al.* (2006), postulan que los mecanismos de control de la infección por *Babesia* requieren tanto de una respuesta inmune innata como adaptativa. Esta última incluye a células colaboradoras del perfil Th1 CD4 y producción de anticuerpos neutralizantes.

Los anticuerpos actúan como opsoninas incrementando la fagocitosis de los parásitos. Asimismo, los anticuerpos son importantes efectores durante una segunda infección por la creación de memoria inmunológica. Como consecuencia de la infección con *Babesia*, se forman complejos inmunes con antígenos del parásito, inmunoglobulinas y la proteína C3 del sistema del complemento. Las

inmunoglobulinas principales de los complejos pertenecen al tipo IgM en bajas concentraciones y a los isotipos IgG1 e IgG2 que son capaces de fijar el complemento y el isotipo IgG2 tiene además mayor capacidad opsonizante (Brown *et al.*, 2006).

Como *Babesia* spp. Es un protozoario estrictamente intraeritrocítico y los glóbulos rojos carecen de antígenos de histocompatibilidad, la respuesta inmune celular depende exclusivamente de la presentación de antígenos del parásito a linfocitos T CD4 por parte de macrófagos que a través de la fagocitosis expresen el complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (CMH II) (Brown y Palmer, 1999).

En los animales persistentemente infectados que han controlado la parasitemia, o en animales inmunizados satisfactoriamente, las células Th1 CD4 antígeno específicas son centrales para la respuesta inmune adaptativa a través de la producción de IFN γ . Además de la activación de los macrófagos para una limpieza eficiente del organismo, el IFN γ potencia la producción de anticuerpos IgG2 con una fuerte actividad opsonizante y capacidad neutralizante los cuales, junto con las IgG1, se sabe que protegen pasivamente al ganado contra el desafío con cepas homólogas (Brown *et al.*, 2006).

De esta forma, la infección aguda con *Babesia bovis* o *Babesia bigemina* en los animales es combatida por la activación de la respuesta inmune innata, mientras que la protección contra la enfermedad clínica en animales persistentemente infectados o inmunizados depende de la rápida activación de la memoria inmunológica y las células Th1 CD4 efectoras que secretan IFN γ y proveen colaboración para la producción de anticuerpos (Tizard, 2008).

4.14 Diagnóstico.

El diagnóstico de la babesiosis bovina es una importante herramienta para el tratamiento, prevención, control y el manejo de la enfermedad (Mosqueda *et al.*, 2012). Inicialmente, se debe realizar un diagnóstico basando en signos clínicos que pudieran llegar a presentar los animales, sospechando de aquellos que presenten signos tales como fiebre, anemia, hemoglobinuria, anorexia, depresión, así como

aumento en la frecuencia cardiaca y respiratoria. Sin embargo, estos signos clínicos no son exclusivos de la babesiosis bovina; por lo tanto, es necesario realizar un análisis más completo para la detección específica del parásito (CFSH, 2008). Durante la etapa aguda de la enfermedad el número de parásitos dentro de los eritrocitos aumenta en una manera tal que pueden ser detectados microscópicamente; sin embargo, en los animales infectados crónicamente donde se produce una forma subclínica de la enfermedad, este método es inútil y otros métodos más sofisticados se deben emplear (Mosqueda *et al.*, 2012). Existen distintas técnicas de diagnóstico de *Babesia* que van desde los extendidos sanguíneos coloreados con Giemsa o naranja de acridina, finos o gruesos (frotis sanguíneos), a técnicas modernas de serología y diagnóstico molecular (OIE, 2010).

4.14.1 Examen microscópico directo.

En la ciudad de Rumania en el año de 1888 el científico Vicktor Babes fue el primero en identificar *Babesia* spp en gotas delgadas de sangre de bovinos infectados (Navarrete *et al.*, 2002). Por su parte, Theobald Smith también estaba buscando el agente causal de la fiebre del ganado desde hace varios años antes, pero fracasó en la identificación del parásito, debido a que estaba buscando en sangre de bovinos infectados crónicamente; sin embargo, fue hasta un caso agudo de la enfermedad que lo acercó a identificar los corpúsculos intraeritrocíticos de estos parásitos. Por lo tanto, el uso de frotis sanguíneo fue el primer método para identificar parásitos de *Babesia* en muestras clínicas (Mosqueda *et al.*, 2012).

Este método tradicional de identificación del agente patógeno en animales infectados es el examen microscópico de frotis sanguíneo en gotas gruesas y delgadas teñidas con Giemsa. El uso de gota delgada de sangre es altamente sensible de tal manera que permite detectar parasitemias de incluso un parásito en 106 glóbulos rojos, así como también la diferenciación de especies es fácil de realizar en estas gotas finas pero deficiente en gotas gruesas. Normalmente, esta técnica es adecuada para la detección de las infecciones agudas, pero no para la detección de los portadores donde las parasitemias son en su mayoría muy bajas.

La identificación y diferenciación del parásito puede mejorarse empleando un colorante fluorescente, como el naranja de acridina, en lugar del Giemsa (OIE, 2014).

Las muestras de animales vivos son de sangre tomada preferentemente de capilares, como los de la punta de la oreja o de la cola de bovinos, ya que *Babesia bovis* es más frecuente en sangre capilar mientras que los parásitos *Babesia bigemina* se encuentran distribuidos uniformemente por los vasos sanguíneos; por lo tanto, si no se pueden realizar extensiones de sangre fresca tomada de capilares, se toma sangre de la vena yugular en un tubo con anticoagulante (Mosqueda *et al.*, 2012); la sangre se mantiene refrigerada generalmente de 4 - 5°C, hasta que se envía al laboratorio en condiciones de campo. En el laboratorio, las extensiones de sangre se preparan depositando una gota de sangre de aproximadamente 50 µl sobre un portaobjetos de vidrio las extensiones de sangre se secan al aire, se fijan en metanol absoluto durante 10-60 segundos, y se tiñen con el colorante Giemsa al 10% durante 15–30 minutos. Esta técnica es más sensible para la detección de *Babesia* spp., porque los eritrocitos se lisan y los parásitos se concentran. Los frotis teñidos se observan al microscopio óptico con aceite de inmersión y utilizando un objetivo de 100x (OIE, 2014).

4.14.2 Inmunofluorescencia indirecta (IFI).

El método por inmunofluorescencia indirecta (IFI), fue descrito por primera vez por Ristic y Sibinovic en 1964 para detectar anticuerpos contra *B. caballii* en caballos con infección crónica. Desde entonces, se ha adaptado a todas las especies de *Babesia* y tiene un alto nivel de especificidad y sensibilidad. Esta prueba se basa en el reconocimiento de antígenos del parásito por anticuerpos séricos en la sangre del animal probado. Los anticuerpos unidos se detectan por un anticuerpo marcado con fluorocromo anti-IgG (anticuerpo secundario). La preparación del antígeno consiste en merozoitos intraeritrocíticos crecidos en cultivo u obtenidos de sangre infectada eliminada de plasma y glóbulos blancos, de modo que los eritrocitos con un alto nivel de parasitemia (> 3%), generalmente mezclados con 5% de albúmina de suero bovino u otra proteína soluble, se extienden en un

portaobjetos de vidrio. Una vez que los frotis se secan, se envuelven individualmente y se almacenan a -20 ° C y de esta manera lograr que puedan durar varios años. Cuando se va a utilizar el antígeno, los portaobjetos se descongelan, se desecan y se fijan con acetona, que permeabiliza e impregna la célula. La técnica de IFI consiste en una serie de pasos de incubación y lavado, primero, el suero a analizar se diluye a 1:80 y después de un período de incubación, el anticuerpo no unido se elimina mediante lavado. Un anticuerpo secundario IgG anti bovino conjugado con un fluorocromo se usa para identificar anticuerpos unidos. Después de una segunda ronda de pasos de lavado, el frotis se seca y se analiza con un microscopio de fluorescencia usando filtros específicos para el fluorocromo. Los resultados positivos dependen de la observación de parásitos fluorescentes que indican la presencia de anticuerpos anti-Babesia en el suero analizado (Mosqueda *et al.*, 2012).

4.14.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Este método permite la amplificación exponencial de secuencias específicas de ADN *in vitro*. La técnica se basa en la utilización de la enzima termoestable *Taq polimerasa* que, en presencia del buffer adecuado, magnesio, desoxiribonucleótidos y oligonucleótidos específicos, permite amplificar un gen o secuencia particular a partir de ADN (Bock *et al.*, 2004).

La PCR es utilizada simultáneamente con los métodos de diagnóstico convencionales, ha probado ser de utilidad para la detección de *B. bovis* y *B. bigemina* en bovinos portadores y como prueba confirmatoria debido a su elevada sensibilidad y especificidad; estas características han permitido su utilización para identificar diferencias genómicas no detectables mediante los métodos de diagnóstico convencionales (Bock *et al.*, 2004).

La PCR convencional permite la amplificación de una secuencia de ácido desoxirribonucleico (ADN) específica en una muestra compleja de material genético a partir del uso de oligonucleótidos que flanquean la región de interés (Lodish, 2005).

Esta técnica se ha empleado para el diagnóstico de especies de *Babesia* que afectan a bovinos y la detección de cepas provenientes de diferentes regiones del mundo (AbouLaila *et al.*, 2010). Así mismo se ha evaluado su uso con diferentes marcadores moleculares, entre los cuales se destacan genes que codifican para el RNA de subunidades ribosomales de *B. bovis* y *B. Bigemina* (Adham *et al.*, 2009).

Con el propósito de mejorar el rendimiento, la especificidad o adaptarse a determinadas condiciones, han surgido numerosas modificaciones de la PCR convencional (Lodish, 2005); como por ejemplo, la PCR en tiempo real que su principal característica de esta técnica es que permite cuantificar la cantidad de ADN o ARN presente en una muestra, para ello se realizan adaptaciones tales como el uso de fluorocromos y sondas específicas durante el proceso de amplificación; el termociclador está conectado a una computadora y el resultado se observa como una curva de amplificación en un software específico de cada equipo (Adham *et al.*, 2009). Por otro lado, también existe la PCR anidada que su objetivo es incrementar la especificidad y el límite de detección, esta reacción comprende dos rondas de amplificación, cada una con diferentes pares de oligonucleótidos; el segundo par se unirá a una secuencia interna del producto amplificado en la primera reacción, obteniéndose productos de PCR más cortos, pero más específicos (Adham *et al.*, 2009).

Uno de los principales inconvenientes de la PCR, es que se requieren sistemas adicionales para visualizar la región amplificada, como lo son el equipamiento para la electroforesis en gel de agarosa y la cámara de luz UV; además, se requiere el uso de agentes intercalantes de ADN para observar la reacción, uno de ellos es el bromuro de etidio, una sustancia tóxica y con efectos carcinógenicos (AbouLaila *et al.*, 2010). Así mismo, es necesaria la estandarización del procedimiento; las temperaturas de alineamiento de los oligonucleótidos, la concentración de magnesio, las concentraciones de oligonucleótidos y otros parámetros para obtener el mejor rendimiento de estas pruebas moleculares (Adham *et al.*, 2009).

4.15 Tratamiento de la babesiosis bovina.

Los medicamentos antiprotozoarios más utilizados en la actualidad para combatir la babesiosis bovina en su ingrediente activo son; dipropionato de imidocarb y diaceturato de diminazeno (León, 2002; Mosqueda *et al.*, 2012).

Aunque se desconoce el mecanismo exacto de acción del dipropionato de imidocarb se ha observado que su incorporación al núcleo del parásito es muy rápida y muestra actividad de interferencia en la síntesis de su ADN, por lo que lo paraliza a las pocas horas de su administración lo que permite que sea atacado por el sistema inmune del hospedero, así como también inhibe drásticamente el metabolismo energético del parásito, relacionado con la interferencia de la glucólisis aeróbica (Flores, 2006).

La dosis utilizada en rumiantes es de 1 a 3 miligramos por cada kilogramo de peso vivo; generalmente se requiere una sola dosis, pero en caso de necesitar repetir el tratamiento se recomienda no hacerlo antes de los 7 días de la primera aplicación; así mismo, su administración en bovinos se recomienda exclusivamente por vía subcutánea (Vial y Gorenflot, 2006).

El periodo de retiro en bovinos destinados a la producción de carne es de 90 días después de la última aplicación y en bovinos destinados a la producción de leche no se recomienda su administración.

Por otro lado, el diaceturato de diminazeno, también bloquea el metabolismo energético del parásito, además de interferir en la síntesis de ADN del protozooario a nivel del núcleo, la multiplicación del parásito queda bloqueada, permitiendo de esta manera, que el sistema inmunológico del animal actúe generando anticuerpos, logrando la recuperación clínica del animal y la instauración de un estado de resistencia (Flores, 2006).

El uso de este medicamento en bovinos es por vía intramuscular profunda en una dosis de 3 a 3.5 miligramos por kilogramo de peso vivo (Vial y Gorenflot, 2006); el tiempo de retiro de los animales destinados a la producción de carne es de tres días y para los bovinos productores de leche no se recomienda su administración.

En cuanto a la inmunización que parece ser el procedimiento que ofrece las mejores perspectivas, se considera que es un método de prevención y/o control como una de las alternativas primordiales para resolver el complejo problema de la babesiosis bovina. Sin importar la fuente o tipo de antígeno, una vacuna ideal contra la babesiosis se considera debe reunir las siguientes cualidades: Prevenir clínicamente la enfermedad en condiciones de campo, proteger contra las dos cepas de los parásitos *B. bovis* y *B. bigemina*, inducir una protección prolongada con solo una o dos inoculaciones, así como también disponibilidad, costo razonable, y que sea segura y fácil de administrar (Ramírez *et al.*, 2003).

Desde finales del siglo XIX se sabe que los bovinos susceptibles, después de sufrir la infección de protozoarios del género *Babesia*, son capaces de desarrollar fuerte inmunidad contra futuras reinfecciones (Callow, 1976). Este hecho dio origen en Australia a la práctica de infectar animales libres de la enfermedad con sangre de bovinos que se habían recuperado de ésta, para aplicar posteriormente un tratamiento específico y evitar su muerte (Callow, 1976). Posteriormente, Callow y Mellors afinaron el proceso y estandarizaron el número de parásitos a inocular, utilizando becerros esplenectomizados como los proveedores de los parásitos, en lugar de simples portadores del protozoario, este método se ha aplicado con buenos resultados en diversas partes del mundo; sin embargo, una seria desventaja es que al reproducir las especies de *Babesia* en becerros, los inmunógenos podrían llegar a contaminarse con otros patógenos y producir su diseminación a otras áreas. (Alonso *et al.*, 1991); este riesgo es eliminado mediante la multiplicación de poblaciones del parásito en condiciones *in vitro* (Vega *et al.*, 1985).

El desarrollo del cultivo *in vitro* de *Babesia* spp, ha permitido y facilitado el estudio molecular de los genes codificadores de las principales proteínas de los parásitos con gran potencial protector para su uso como vacunas. Las vacunas constituidas por antígenos parasitarios solubles (APS) liberados *in vivo* o *in vitro*, en el plasma del animal o en el sobrenadante de cultivo *in vitro*, han probado su poder inmunoprotector contra todas las especies de *Babesia* hasta ahora estudiadas (Vega *et al.*, 1985).

En México, existe un inmunógeno atenuado contra *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, que ha conferido protección a bovinos susceptibles en condiciones controladas. Los bovinos inmunizados con el inmunógeno combinado sobreviven el desafío con dosis conocidas de parásitos virulentos de ambas especies (Cantó *et al.*, 2003); sin embargo, las situaciones reales de campo que inducen estrés, como el traslado o la infección transmitida por garrapatas, no se había considerado, hasta un estudio realizado por Cantó y colaboradores en el año 2003 en el que evaluaron la capacidad inmunoprotectora del inmunógeno atenuado en bovinos inmunizados en una zona libre de *Babesia* y garrapatas, y fueron movilizados a una zona endémica de babesiosis bovina, utilizaron bovinos de raza Charolais, machos, de 18 meses de edad, que se dividieron en dos grupos: Un grupo fue inmunizado con una dosis de 1×10^7 eritrocitos infectados con *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*; el segundo grupo fue inmunizado con eritrocitos no infectados. Dos meses después todos los animales se trasladaron a un potrero localizado en una zona endémica, e infestado con garrapatas *R. microplus* infectadas con ambas especies de *Babesia*. Ahí permanecieron durante todo el tiempo que duró el experimento y nunca recibieron tratamiento ixodicida. Dieciocho días después del inicio de la confrontación, los cinco animales del grupo testigo presentaron signos clínicos severos de la enfermedad aguda; en los frotis sanguíneos se encontraron ambas especies del hemoparásito y temperatura rectal superior a los 40.5°C por varios días y un descenso del volumen celular aglomerado del 48%, por lo que todos los animales de este grupo tuvieron que ser tratados para evitar su muerte. Los bovinos del grupo inmunizado, aunque también presentaron ambas especies del parásito en sangre periférica, temperatura rectal elevada y descenso de 37% en el volumen celular aglomerado, mantuvieron buena condición corporal y no requirieron tratamiento. Este trabajo demostró la capacidad de protección conferida por el inmunógeno combinado en bovinos vacunados en una zona libre de garrapatas y movilizados a una zona endémica de babesiosis.

La vacuna bivalente contra la babesiosis bovina, se utiliza para disminuir la morbilidad y mortalidad del ganado susceptible introducido a zonas tropicales, comúnmente se presentan brotes severos especialmente en bovinos adultos con

tasas de mortalidad que varían entre 25-40%, esto implica altos costos por tratamientos y atención de los animales afectados. Además, la babesiosis dificulta el ingreso de animales de mayor calidad genética y/o susceptible a regiones endémicas. La administración de la vacuna bivalente se debe hacer a bovinos susceptibles, ya sean éstos de importación o nacionales, antes de ser introducidos a zonas endémicas de babesiosis bovina. La vacuna debe manipularse estrictamente en nitrógeno líquido hasta el momento de su uso, a partir de la vacunación, los animales deben mantenerse libres de garrapatas *Boophilus* spp durante al menos 21 días, para asegurar su protección (INIFAP, 2003).

En México no existe una vacuna de manera comercial con las dos especies de *Babesia* que afectan al ganado bovino; sin embargo, en el CENID - SAI localizado en Jiutepec, Morelos se ha desarrollado material vacunal que incluye ambas especies, *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*. Con el uso de esta vacuna se ha demostrado que confiere protección de al menos 80% en animales expuestos a *Babesia* bajo condiciones de campo. Lo que puede permitir una disminución de pérdidas económicas por morbilidad y mortalidad de animales susceptibles a la babesiosis bovina. La vacunación de animales procedentes de zonas libres del país o importados, reducirá las pérdidas por causas de la enfermedad, evitando brotes los cuales regularmente se presentan una vez que los animales son a zonas infestadas por garrapatas, facilitándose de esta manera la movilización de ganado especializado en producción de leche y/o carne a zonas de alta endemicidad (INIFAP, 2003).

V. Hipótesis.

La proteína recombinante RAP-1 es más sensible y más específica que la proteína recombinante 12D3 en la prueba diagnóstica de iELISA que a la vez tiene una concordancia de moderada a casi perfecta con respecto a la prueba estándar de oro IFI.

VI. Objetivos.

6.1 General.

Comparar mediante la técnica de iELISA las proteínas recombinantes RAP-1 y 12D3 usadas como antígenos de *Babesia bigemina*.

6.2 Específicos.

Determinar mediante datos de sensibilidad y especificidad cuál de las dos proteínas recombinantes es mejor para ser utilizada como antígeno de *Babesia bigemina* en la prueba de iELISA y a la vez compararla frente a la prueba IFI con el antígeno crudo de *Babesia bigemina*.

Analizar mediante parámetros de valor predictivo positivo y valor predictivo negativo la validez que tiene la prueba de iELISA para el diagnóstico de la babesiosis bovina con el uso de las proteínas recombinantes RAP-1 y 12D3 como antígenos de *Babesia bigemina*.

Establecer la fuerza de concordancia que tiene la prueba iELISA utilizando cada una de las proteínas recombinantes frente a la prueba de referencia estándar de oro IFI utilizando antígeno crudo de *Babesia bigemina*.

VII. Materiales y Métodos.

7.1 Localización.

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de la Unidad de Babesiosis en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CENID-SAI, INIFAP). Ubicado en el Km. 11.5 de la carretera federal Cuernavaca-Cuautla, Col. Progreso, Jiutepec, Morelos, C.P. 62550.

7.2 Muestras.

Se utilizaron como negativos 60 muestras de sueros de bovinos procedentes de zona libre de garrapata y por lo tanto libre de babesiosis, así como 36 muestras de suero positivos provenientes de bovinos inoculados con las proteínas 12D3 y RAP-1 de *Babesia bigemina*.

7.3 Diseño experimental.

La metodología de este trabajo de investigación es del tipo cuantitativo, debido a que se analizaron los resultados en manera numérica y contable, así como también es un estudio prospectivo con diseño transversal en un análisis del complejo antígeno - anticuerpo de la babesiosis bovina. De esta manera se identificaron resultados positivos y negativos, o en su caso, falsos positivos o falsos negativos de la reacción que desencadenan las proteínas de *Babesia bigemina* usadas como antígenos durante su reconocimiento por anticuerpos. Este tipo de investigación parte de casos concretos para llegar a una descripción general o de comprobación de hipótesis causales.

7.4 Prueba de iELISA.

7.4.1 Materiales.

- Sueros problema: 60 muestras de sueros de bovinos negativos procedentes de una zona libre de garrapatas y como positivos 36 muestras de sueros de bovinos expuestos a *Babesia bigemina*.
- Placas de poliestireno de 96 pozos sensibilizadas con las proteínas recombinantes RAP-1 y 12D3 de *Babesia bigemina*.
- Suero de cabra anti-IgG de bovino conjugado con peroxidasa de rábano.
- Sustrato tetrametil bencidina (TMB).
- Solución amortiguadora de fosfatos 1x (PBS) con pH:7.2
- Solución de bloqueo (leche descremada al 3%)
- Solución de lavado (PBS-Tween 20).
- Pipeta multicanal y puntas estériles desechables.
- Espectrofotómetro.

7.4.2. iELISA.

Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pozos previamente sensibilizadas con las proteínas 12D3 y RAP-1 de *Babesia bigemina*, a las cuales se les realizó una serie de lavados y un bloqueo con leche descremada al 5%. En cada pozo se colocaron 50 µl las muestras de suero problema (dilución 1:200), después de una incubación de las muestras por 60 minutos a 37°C se les realizaron 3 lavados a las placas con solución de PBS 1% y PBS Tween, enseguida se agregó 50 µl del conjugado a cada pozo en dilución 1:10000, posterior a una misma incubación, pero ahora por un tiempo de 30 minutos se lavaron las placas y se agregó a cada pozo 50 µl del sustrato TMB correspondiente, se incubaron nuevamente por 30 min a 37°C y para calcular la absorbancia (densidad óptica), las lecturas de las placas fue realizada en un espectrofotómetro BIO – RAD iMARK a 650 nm de longitud de onda (anexo 2).

El punto de corte para cada uno de los antígenos utilizados en la prueba iELISA se calculó con base a la media aritmética de la densidad óptica de 3 sueros negativos utilizados como control más 3 veces la desviación estándar (Waltisbuhl *et al.*, 1987). La fórmula quedó de la siguiente manera:

$$X + 3S$$

Donde:

X = media aritmética sueros negativos

S = desviación estándar

Para la interpretación de los resultados, las muestras que registraron una densidad óptica por debajo del valor del punto de corte fueron consideradas como negativas, mientras que las muestras con densidad óptica igual o mayor al punto de corte se consideraron como positivas.

7.5 Inmunofluorescencia indirecta (IFI).

7.5.1 Materiales.

- Laminillas con eritrocitos parasitados de *Babesia bigemina* (PEP 4%).
- Sueros problema: 60 muestras de sueros de bovinos negativos procedentes de una zona libre de garrapatas, y como positivos 36 muestras de sueros de bovinos expuestos a *Babesia bigemina*.
- Suero de conejo anti - IgG de bovino conjugado con Alexa Fluor 488.
- Solución amortiguadora de fosfatos 1x (PBS) con pH: 7.2.
- Agua destilada.
- Perlas de sílice.
- Acetona.
- Caja de Coplin de vidrio.
- Vaso de Coplin.

- Lápiz graso.
- Micropipetas y puntas desechables estériles.
- Cámara húmeda.
- Incubadora.
- Agitador.
- Microscopio de epifluorescencia.

7.5.2 Prueba de IFI.

Como antígeno se utilizaron laminillas con eritrocitos parasitados de *Babesia bigemina* obtenidos previamente de cultivo *in vitro*, dichas laminillas se disecaron en perlas de sílice y en incubación por 30 minutos a 37°C, enseguida se introdujeron en acetona por un tiempo de 10 minutos. Posteriormente, en cada una de estas laminillas se marcaron varios círculos con lápiz graso donde se agregaron 5 µl de los sueros problema diluidos 1:80, se incubaron en cámara húmeda por un tiempo de 30 min a 37°C y se les realizaron tres lavados con PBS 1x y agua destilada, después se les agregaron 5 µl del conjugado a cada círculo y se incubaron de nuevo en cámara húmeda por un tiempo y temperatura igual a la incubación anterior. De esta manera se observó por medio de un microscopio de epifluorescencia el reconocimiento por parte de los anticuerpos circulantes en suero de los bovinos hacia el antígeno fijo en la laminilla (anexo 3) (Terkawi *et al.*, 2011). Los valores considerados como positivos y/o negativos se evaluaron de acuerdo a la observación, donde se muestra la unión antígeno-anticuerpo tomando como referencia los controles positivos y negativos empleados.

7.6 Análisis estadístico.

7.6.1 Determinación de la sensibilidad y especificidad.

Los valores de sensibilidad y especificidad se determinaron con la ayuda de un cuadrado de contingencia 2x2 y con base en los resultados obtenidos con las

pruebas de IFI y de iELISA utilizando las proteínas RAP-1 y 12D3 como antígeno, para ello el cálculo se realizó con las siguientes formulas (Cuevas *et al.*, 2010):

Rap-1/12D3/Babesia bigemina				
		(+)	(-)	Total
iELISA/IFI	(+)	a	b	a+b
	(-)	c	d	c+d
	Total	a+c	b+d	n

Cuadro 4. Cuadrado de contingencia 2x2 para la determinación de la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de las pruebas iELISA e IFI.

Donde:

a= verdaderos positivos

b= Falsos positivos

c= Falsos negativos

d= verdaderos negativos

Entonces:

Sensibilidad: $a/a+c*100$

Especificidad: $d/b+d*100$

7.6.2 Determinación de los valores predictivos.

Las siguientes fórmulas fueron empleadas para la determinación de los valores predictivos positivo y negativo, estableciendo estos datos con cada una de las proteínas en la prueba de iELISA, así como también para la prueba de IFI.

Valor predictivo positivo = $(a/a+b)*100$

Valor predictivo negativo = $(d/c+d)*100$

7.6.3 Determinación del índice de concordancia.

Se obtuvo la fuerza de concordancia mediante el índice Kappa comparando los resultados positivos y negativos obtenidos en la prueba de iELISA con cada una de las proteínas recombinantes RAP-1 y 12D3 de *Babesia bigemina* que fueron empleadas como antígeno y la prueba de IFI como estándar de oro para el diagnóstico de la babesiosis bovina. Estos resultados se obtuvieron con el apoyo del siguiente cuadro con sus respectivas fórmulas (García, 2010):

		IFI		
		(+)	(-)	Total
iELISA	(+)	a	b	a+b
	(-)	c	d	c+d
	Total	a+c	b+d	n

Cuadro 5. Cuadrado de contingencia 2x2 para la determinación del índice de concordancia entre las pruebas iELISA e IFI.

$$K = Co - Ce / - Ce$$

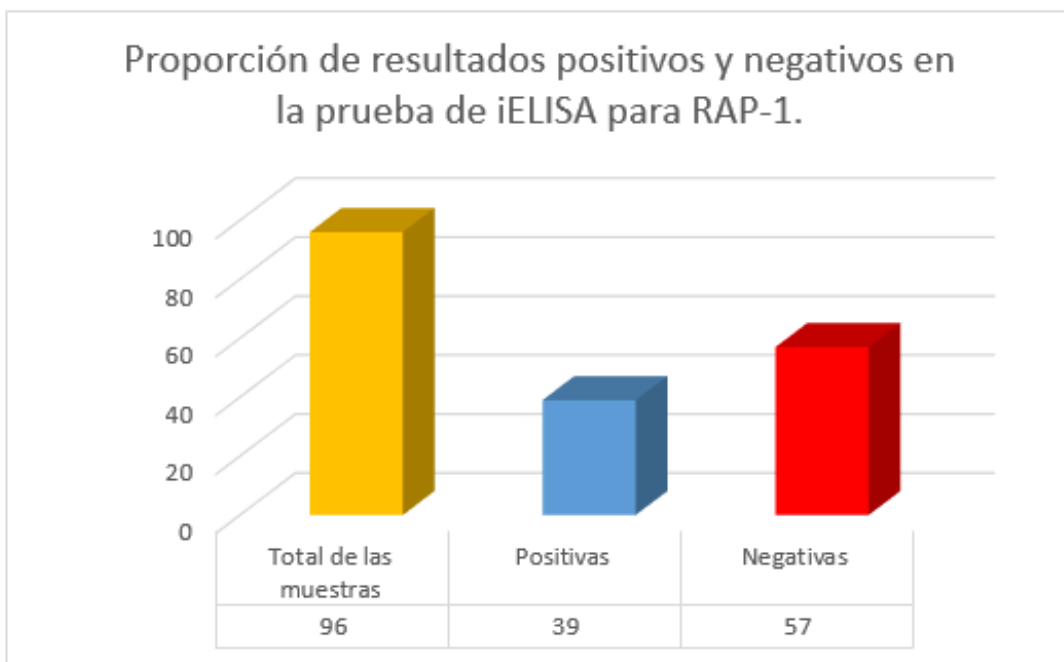
$$\text{Concordancia observada (Co)} = a + d / n$$

$$\text{Concordancia por azar (Ce)} = (a + b) (a + c) + (c + d) (b + d) / n^2$$

VIII. Resultados.

8.1 Prueba de iELISA.

Las 96 muestras de suero se evaluaron mediante la prueba de iELISA estableciendo un punto de corte con los datos de densidad óptica a 650 nm de los controles negativos como se mencionó en la metodología. El punto de corte obtenido para la proteína RAP-1 fue de 0.556 (anexo 4) por lo que en la gráfica 1 se muestran los datos considerados como positivos y negativos de acuerdo a este punto de corte.



Gráfica 1. Muestras positivas y negativas de acuerdo al punto de corte establecido para la proteína recombinante RAP-1 de *Babesia bigemina*.

Para la proteína 12D3 el punto de corte se estableció en 0.629 (anexo 5) mostrando en la gráfica 2 los datos que corresponden a resultados positivos y negativos para dicha proteína.

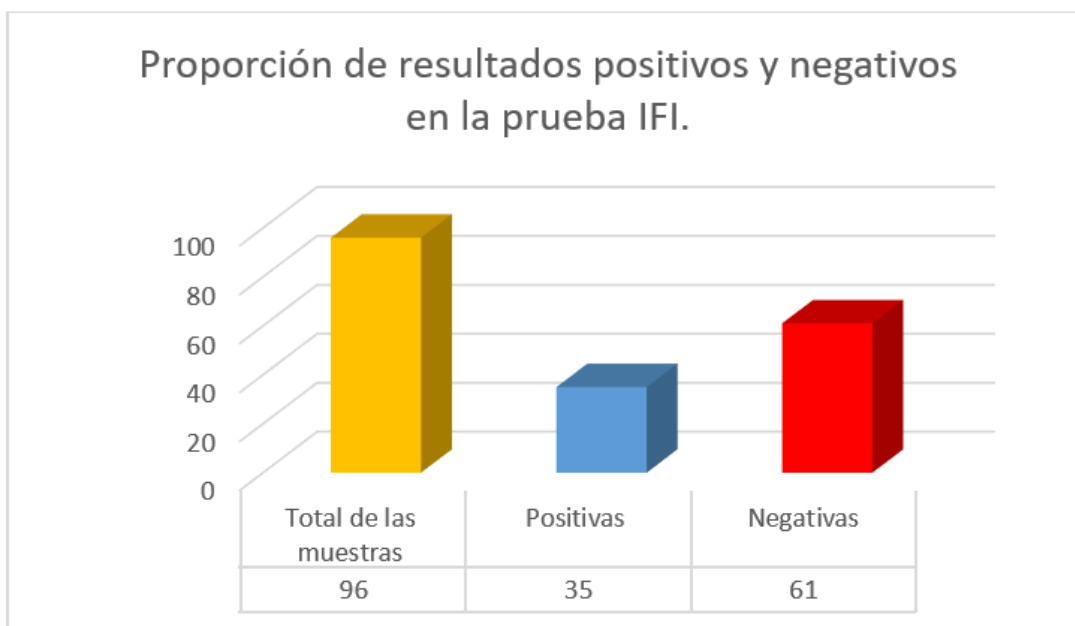


Gráfica 2. Muestras positivas y negativas de acuerdo al punto de corte establecido para la proteína recombinante 12D3 de *Babesia bigemina*.

8.2 Prueba IFI.

Se evaluaron también las 96 muestras de suero mediante la prueba de IFI utilizando antígeno crudo derivado del cultivo *in vitro* de *Babesia bigemina*, para lo cual, los resultados positivos y negativos fueron considerados a través de la observación indirecta de los parásitos de *Babesia bigemina* expresándose en una señal fluorescente al ser excitado por la luz ultravioleta cuando es reconocido por sus respectivos anticuerpos contenidos en las muestras del suero de los bovinos, todo esto por medio de microscopia de epifluorescencia y con la utilización de controles positivos y negativos como referencia para obtener los resultados tal como

se mencionó en la metodología, los resultados obtenidos para esta prueba se muestran a continuación en la gráfica 3.



Gráfica 3. Muestras positivas y negativas utilizando la prueba IFI.

8.3 Análisis estadístico.

8.3.1 Sensibilidad y especificidad.

Las características de las pruebas de iELISA e IFI se determinaron por estadística descriptiva mediante cuadrados de contingencia de 2x2. El análisis estadístico de la prueba de iELISA utilizando como antígeno RAP-1 de *Babesia bigemina* indicó tasas de sensibilidad y especificidad mayores al 90% (cuadro 4).

Sensibilidad RAP-1: $34/36 \times 100 = 94.4\%$.

Especificidad RAP-1: $55/60 \times 100 = 91.6\%$.

RAP-1 <i>Babesia bigemina</i>				
iELISA		(+)	(-)	Total
	(+)	34 Verdaderos positivos	5 Falsos positivos	39
	(-)	2 Falsos negativos	55 Verdaderos negativos	57
	Total	36	60	96

Cuadro 6. Determinación de sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de *Babesia bigemina* en iELISA utilizando como antígeno la proteína recombinante RAP-1.

Para la misma prueba pero con el antígeno 12D3 se establecieron datos en cuanto a sensibilidad y especificidad de 88.8% y 90% respectivamente (cuadro 5).

Sensibilidad 12D3: $32/36 \times 100 = 88.8\%$.

Especificidad 12D3: $54/60 \times 100 = 90\%$.

12D3 <i>Babesia bigemina</i>				
iELISA		(+)	(-)	Total
	(+)	32 Verdaderos positivos	6 Falsos positivos	38
	(-)	4 Falsos negativos	54 Verdaderos negativos	58
	Total	36	60	96

Cuadro 7. Determinación de sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de *Babesia bigemina* en iELISA utilizando como antígeno la proteína recombinante 12D3.

En la prueba IFI, con la utilización del antígeno crudo de *Babesia bigemina*, se obtuvieron datos de sensibilidad de 88.8% y especificidad de 95%, mostrados a continuación y en el cuadro 6.

Sensibilidad IFI: $32/36 \cdot 100 = 88.8\%$.

Especificidad IFI: $57/60 \cdot 100 = 95\%$.

<i>Babesia bigemina</i>				
IFI		(+)	(-)	Total
	(+)	32 Verdaderos positivos	3 Falsos positivos	35
	(-)	4 Falsos negativos	57 Verdaderos negativos	61
	Total	36	60	96

Cuadro 8. Determinación de sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de *Babesia bigemina* en IFI utilizando el antígeno crudo.

8.3.2 Valores Predictivos.

Además de la sensibilidad y especificidad, se determinaron los valores predictivos, tanto positivo como negativo, esto con la finalidad de evaluar la validez de las pruebas iELISA e IFI. Para lo cual, empleando las siguientes fórmulas se obtuvieron los siguientes resultados:

Valor predictivo positivo iELISA RAP-1 = $34/39 \cdot 100 = 87.1\%$.

Valor predictivo negativo iELISA RAP-1 = $55/57 \cdot 100 = 96.4\%$.

Valor predictivo positivo iELISA 12D3 = $32/38 \cdot 100 = 84.2\%$.

Valor predictivo negativo iELISA 12D3 = $54/58 \cdot 100 = 93.1\%$.

Valor predictivo positivo IFI = $32/35 \cdot 100 = 91.4\%$.

Valor predictivo negativo IFI = $57/61 \cdot 100 = 93.4\%$.

8.3.3 Determinación del índice de concordancia Kappa.

El índice de concordancia kappa (κ) obtenido entre la prueba de IFI con antígeno crudo de *Babesia bigemina* y el iELISA con el antígeno RAP-1 fue de 0.89 que de acuerdo a los criterios de Landis y Koch se interpreta como un grado de concordancia casi perfecta (cuadro 7).

IFI (<i>Babesia bigemina</i>)				
iELISA (RAP-1)		(+)	(-)	Total
	(+)	35	2	37
	(-)	2	57	59
	Total	37	59	96

Cuadro 9. Tabla de contingencia para la determinación del índice de concordancia kappa (κ) entre las pruebas de IFI utilizando el antígeno crudo de *Babesia bigemina* y iELISA utilizando como antígeno la proteína recombinante RAP-1.

Índice kappa (k) = $0.95 - 0.52 / 1 - 0.52 = 0.89$.

Concordancia observada (P_o) = $35 + 57 / 96 = 0.95$.

Concordancia esperada (P_e) = $(37)(37) + (59)(59) / 96^2 = 0.52$.

Por otro lado, comparando de igual manera a la prueba de IFI pero ahora con el antígeno 12D3 de *Babesia bigemina* se obtuvo un índice de concordancia de 0.91 lo cual corresponde de acuerdo a los criterios establecidos que tiene un grado de concordancia también de casi perfecta (cuadro 8).

IFI (<i>Babesia bigemina</i>)				
iELISA (12D3)		(+)	(-)	Total
	(+)	35	2	37
	(-)	1	58	59
	Total	36	60	96

Cuadro 10. Tabla de contingencia para la determinación del índice de concordancia kappa (κ) entre las pruebas de IFI utilizando el antígeno crudo de *Babesia bigemina* y iELISA utilizando como antígeno la proteína recombinante 12D3.

$$\text{Índice kappa (k)} = 0.96 - 0.52 / 1 - 0.52 = 0.91$$

$$\text{Concordancia observada (Po)} = 35 + 58 / 96 = 0.96$$

$$\text{Concordancia esperada (Pe)} = (37) (36) + (59) (60) / 96^2 = 0.52$$

IX. Discusión.

El alto impacto económico ocasionado por la enfermedad transmitida por garrapatas al ganado más importante en México, la babesiosis bovina, ha llevado a la búsqueda y desarrollo de técnicas serológicas que sean más efectivas y que faciliten su diagnóstico y control.

El diagnóstico serológico convencional de la babesiosis bovina en México, está basado principalmente en la técnica de IFI por su alta sensibilidad y especificidad mayor al 90% (Domínguez *et al.*, 1995). Sin embargo, debido a la inespecificidad de esta prueba por la reacción cruzada entre animales expuestos a *B. bovis* y/o *B. bigemina*, y a la subjetividad de la misma por parte del analista, recientemente se han utilizado nuevos métodos como la prueba inmunoenzimática de iELISA, misma que se realizó inicialmente usando antígeno crudo purificado de sangre infectada; por ejemplo, datos epidemiológicos realizados en el estado de Yucatán muestran que la sensibilidad y especificidad de la técnica de iELISA en la detección de anticuerpos a *B. bovis* fueron de 97% y 93%, respectivamente (Domínguez *et al.*, 1995). Sin embargo, en esta técnica también se ha observado reactividad cruzada con proteínas séricas de los animales muestreados, lo que ha conducido a la investigación y búsqueda de antígenos recombinantes y anticuerpos monoclonales para aumentar así la especificidad y disminuir la unión y señal inespecíficas. La biotecnología moderna permite la expresión de proteínas altamente antigénicas, que puedan ser utilizadas como antígenos en la prueba de ELISA y que permitan evaluar la presencia de anticuerpos anti-*Babesia* usando un anticuerpo anti-IgG conjugado con una enzima, generalmente peroxidasa (Mosqueda *et al.*, 2012). La utilización de antígenos recombinantes de *B. bovis* y *B. bigemina* para la prueba de iELISA ya ha sido implementada en algunos estudios epidemiológicos cuyas investigaciones muestran datos de sensibilidad y de especificidad diagnósticas mayores al 90% (Arévalo *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 2008; Balbuena *et al.*, 2010; Castañeda *et al.*, 2013).

En esta investigación, las tasas de sensibilidad y de especificidad para iELISA con la utilización del antígeno recombinante RAP-1 de *B. bigemina* se establecieron en 94.4% y 91.6 % respectivamente. En comparación con las características ya reportadas también con el antígeno RAP-1 de *B. bigemina* (Balbuena *et al.*, 2010), aumentó el porcentaje de sensibilidad diagnóstica (90% a 94.4%) y disminuyó el porcentaje de especificidad siendo este de 93.75% a 91.6%. En cuanto al valor predictivo positivo (VPP) también se incrementó de 84.38 % a 87.1%, mientras que el valor predictivo negativo (VPN) no tuvo una diferencia significativa pero si un ligero incremento siendo este de 96.1% a 96.4% (Balbuena *et al.*, 2010). Los cambios obtenidos al comparar estas dos investigaciones posiblemente son atribuibles a que el suero utilizado en la prueba anterior fue: anti-IgG de bovino conjugado a la enzima fosfatasa alcalina y como sustrato p-nitrofenilfosfato (Balbuena *et al.*, 2010); en cambio, en este estudio se utilizó suero anti-IgG de bovino conjugado con peroxidasa de rábano picante y como sustrato Tetrametil-Bencidina (TMB). Así como también para este estudio el volumen utilizado de muestras de suero se redujo de 100 µl a 50 µl en comparación con lo que fue descrito anteriormente (Balbuena *et al.*, 2010).

En otro estudio realizado en el año 2017 donde se mide seroprevalencia de anticuerpos anti-*Babesia* spp. en tres hatos bovinos procedentes de Chiapas, Veracruz y Tamaulipas se evaluó también la efectividad de la técnica de iELISA con la proteína recombinante RAP-1 frente a la técnica de IFI y se reportaron resultados de sensibilidad del 90% y de especificidad del 98.75% (Castillo *et al.*, 2017), observándose una diferencia significativa comparada con este estudio en cuanto al aumento de sensibilidad (de 90% a 94.4%) y a la disminución de la especificidad diagnóstica (de 98.75% a 91.6%), se reportaron también los valores predictivos, positivo y negativo siendo estos del 96.4% y 96.3%, respectivamente (Castillo *et al.*, 2017).

Lo que en comparación con esta investigación disminuye significativamente el valor predictivo positivo a 87.1%, mientras que para el valor predictivo negativo mantiene un ligero aumento a 96.4%. En dicho trabajo se reportó un índice de

concordancia de 0.44 entre el iELISA con la proteína recombinante RAP-1 y la prueba de IFI con el antígeno *B. bigemina* de cultivo *in vitro*, lo cual tuvo una fuerza de concordancia moderada (Castillo *et al.*, 2017). En cambio, el índice de concordancia obtenido para esta investigación fue de 0.89 también entre el iELISA con el antígeno recombinante RAP-1 de *B. bigemina* y con la prueba de IFI con el antígeno crudo de cultivo *in vitro*, lo cual muestra una fuerza de concordancia casi perfecta de acuerdo también a los criterios de Landis y Koch. Para las características en la prueba IFI, se obtuvieron datos de sensibilidad de 88.8% y especificidad de 95%, valores superiores a los reportados también por Castillo en el año 2017 donde mostraron datos de 73.3% y 81.25% en el mismo orden. Los valores obtenidos de las dos investigaciones resultan superiores a los ya reportados (66 % y 76 %) utilizando el antígeno *B. bovis* derivado también de *cultivo in vitro* para la prueba de IFI (Castañeda *et al.*, 2013).

Los cambios obtenidos en estas dos investigaciones son posiblemente debido a que en el trabajo realizado por Castillo en el año 2017 para la sensibilización de las placas utilizó una concentración de proteína RAP-1 de 1.6 µg/ml diluida en buffer de carbonatos, en contraste con este trabajo que se utilizó la misma proteína pero en concentración de 0.84 µg/ml también diluida en buffer de carbonatos, además de que en el trabajo anterior se realizó bloqueo de las placas con 3% de caseína, lo cual difiere al bloqueo realizado en esta investigación que fue del 5% también con leche descremada como fuente de caseína, esta proteína es utilizada por ser naturalmente contenida en el suero de los bovinos y al agregarse a las placas sensibilizadas bloquea espacios donde no se fijaron correctamente los antígenos y pudieran unirse los anticuerpos ocasionando en falsos positivos, por lo tanto, entre mayor concentración se ocupe de caseína mejores resultados de verdaderos positivos se obtendrán.

Por otro lado, las muestras utilizadas como negativas y positivas en el trabajo por Castillo fueron 80 y 30 respectivamente y su punto de corte fue calculado con el promedio de las 80 muestras negativas más dos desviaciones estándar, lo que también marca una diferencia con las muestras utilizadas para este trabajo que

resultan en 60 negativas y 36 positivas y el punto de corte calculado para establecer los datos fue con base al promedio de tres controles negativos más tres veces la desviación estándar de los mismos, este margen de desviaciones estándar utilizadas en este trabajo tiene el propósito de analizar a más del 50% de las muestras sin aumentar el número de falsos positivos.

Para la diferencia de resultados en la prueba IFI, se mantiene similar casi todo el proceso de la técnica en cuanto a incubaciones y lavados, excepto por la dilución de las muestras, que en el trabajo de Castillo fue de 1:100 y en esta investigación se realizó una dilución 1:80, este cambio pudiera ser debido a la subjetividad de la prueba, ya que se ha determinado la dilución óptima del suero de acuerdo a la perspectiva y habilidad de cada analizador de identificar muestras positivas.

Para la proteína 12D3 al estar conservada en distintos aislados de *B. bovis* y *B. bigemina* (Wright *et al.*, 1992), solo se le habían atribuido funciones inmunogénicas y vacúnales en combinación con otras proteínas recombinantes de *Babesia* spp. Sin embargo, estas combinaciones no han proporcionado una protección significativa para los animales desafiados bajo condiciones naturales en zonas de alta endemicidad para babesiosis bovina (Reyes *et al.*, 2016). Por lo tanto, en esta investigación, se realiza mención de esta proteína con respecto a su valor diagnóstico, demostrando una sensibilidad de 88.8% y una especificidad del 90% en la prueba de diagnóstico serológico iELISA, mientras que también se obtuvieron los valores predictivos positivos y negativo establecidos en 84.2% y 93.1%, respectivamente y la concordancia observada para esta prueba frente a la de referencia IFI, mediante el índice kappa, resulto en 0.91, lo cual de acuerdo a los criterios de Landis y Koch se demuestra que al igual que con el uso de la proteína RAP-1 tienen una fuerza de concordancia casi perfecta.

Los datos obtenidos con anterioridad fueron con el fin de poder evaluar en esta investigación de manera correcta una nueva o mejorada prueba diagnóstica con el uso de proteínas recombinantes como antígeno, en este caso, iELISA con RAP-1 y 12D3 de *Babesia bigemina*, por lo tanto, los datos que se obtienen en cuanto a

sensibilidad diagnóstica indican la probabilidad de clasificar correctamente a un animal enfermo que presente resultado verdaderamente positivo a la enfermedad; por otro lado, los datos establecidos de especificidad indican la probabilidad de clasificar correctamente a un animal sano como verdaderamente negativo a la enfermedad.

Los valores predictivos positivo y negativo calculados también en esta investigación se obtienen para estimar el grado con el que se puede confiar en el resultado de la prueba diagnóstica e indican con que exactitud la prueba detectará la presencia o ausencia de la enfermedad. El índice de concordancia permitió establecer datos en cuanto al grado de acuerdo y confiabilidad que tiene esta nueva prueba implementada o mejorada frente a la prueba de referencia o estándar de oro, en este caso, entre mayor fue el índice de concordancia, más precisa es la iELISA probada con proteínas recombinantes como antígeno en relación a la prueba de IFI con el antígeno crudo de *B. bigemina* para el diagnóstico de la babesiosis bovina.

X. Conclusión.

En el presente estudio se demostró mediante la prueba de iELISA la efectividad del uso de la proteína recombinante RAP-1 como antígeno de *Babesia bigemina* al ser más sensible y más específica en comparación con la proteína recombinante 12D3, esta efectividad es también comprobada con el análisis estadístico de los valores predictivos, los cuales demostraron tasas superiores también con RAP-1 que con 12D3 como antígenos en iELISA. Por otro lado, la fuerza de concordancia de casi perfecta que se obtuvo al medir la prueba de iELISA con cualquiera de las dos proteínas como antígenos y frente a la prueba de referencia estándar de oro IFI también comprueba la hipótesis planteada. Por lo que se concluye al revelar la validez, confiabilidad y objetividad de la prueba de iELISA que es sumamente útil para el diagnóstico de la babesiosis bovina con la utilización del antígeno recombinante RAP-1 de *Babesia bigemina* además de resultar más práctica en la realización de estudios seroepidemiológicos al demostrar la capacidad de poder probar una cantidad mayor de muestras al mismo tiempo y eliminar la subjetividad mediante datos estadísticos.

XI. Referencias bibliográficas.

AbouLaila, M., Yokoyama, N., e Igarashi, I. (2010). Development and evaluation of a nested PCR based on spherical body protein 2 gene for the diagnosis of *Babesia bovis* infection. *Veterinary Parasitology*. 169:45-50.

Adham, F., Abdel, E., Gabre, R., y Hussein, H. (2009). Detection of tick blood parasites in Egypt using PCR assay *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Veterinary Parasitology* .105:721-30.

Alonso, M., A., Rodríguez, R., I., Fragoso, H., y Rosario, R. (2006): Ixodicide resistance of the *Boophilus microplus* tick to ixodicides. *Revista de medicina veterinaria*. 38:105-114

Alonso, M., Fadrada, M., Blandino, T., Gómez, E., y Baudín, C. (1991) Atenuación de una cepa cubana de *Babesia bovis* con fines inmunoprolácticos. *Revista Salud Animal*. 13:81-88.

Álvarez, V., Hernández, V., y Romero, J. (2007) Fase no parasítica de *Boophilus microplus* en condiciones ambientales y de laboratorio en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*. 31:49-56.

Arévalo, B., Borgonio, M., Rojas, M., Pérez, J., Álvarez, M., y Figueroa, M. (2008). Clonación y expresión en *Escherichia coli* de RAP-1, GP45 y 12D3: Proteínas de *Babesia bigemina* con potencial uso en prueba diagnóstica. p: 555-560. *Memorias del Congreso Nacional de Buiatría*.

Balbuena, G., Vargas, U., Arévalo, A., Álvarez, M., Rojas, M., y Figueroa, M. (2010). Instrumentación de una prueba de ELISA para identificar animales expuestos a infección por *Babesia bigemina*. Pp. 418-423, In: *Memorias XXXIV Congreso Nacional de Buiatría*.

Barker, S., y Murrell, A. (2004). Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Veterinary Parasitology*. 129:15-36.

Bastos, R., Ueti, M., Knowles, D., y Scoles, G. (2010) The *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Bm86 gene plays a critical role in the fitness of ticks fed on cattle during acute *Babesia bovis* infection. *Parasites & Vectors*. 3:1-11.

Bautista, C., Castañeda, R., Álvarez, J., Rojas, C., Figueroa, J., y Rodríguez, A. (2012). La vacunación simultánea de bovinos con *Lactobacillus casei* y la vacuna bivalente contra babesiosis bovina genera una mejor protección contra *Babesia bovis* y *B. bigemina* transmitidas por garrapatas en condiciones extremas de campo. *Veterinaria México*, 43(3), 189–200.

Blood, D., Henderson, J., y Radostits, O., (1987). *Medicina Veterinaria*. México D.F.: Editorial Interamericana.

Bock, R. (2004). Babesiosis of cattle. *Veterinary Parasitology*. 129: 247–269. DOI: 10.1017/S0031182004005190.

Bock, R., De Vos, A., y Molloy, J. (2006). *Tick diseases*. Australian New Zealand. Subcommittee on Animal Health Laboratory Standards.

Bock, R., Jackson, I., y Jorgensen, W. (2008). Babesiosis of cattle. Ticks: Biology, Disease and Control. Babesiosis of cattle. *Veterinary Parasitology*. 129: 281–307. DOI: 10.1017/S0031182004005190.

Borgonio, V., Mosqueda, A., Genis, A., Falcón, A., Álvarez, A., Camacho, M. y Figueroa, J. (2008). Msa-1 and msa-2c gene analysis and common epitopes assessment in Mexican *Babesia bovis* isolates. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1149, 145-148.

Bravo, S. (2012). *Babesiosis bovina* (Monografía de grado). Universidad de Cuenca. Ecuador.

Brown, W., McElwain, T., Hotzel, I., Ruef, B., Rice, A., Stich, R., Suárez, C., Estes, D., y Palmer, G. (1998). Immunodominant T-cell antigens and epitopes of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Medical Parasitology*. 92: 473- 482.

Brown, W., y Palmer, G., (1999). Designing blood stage vaccines against *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Parasitology today*. 15: 275–81.

Brown, W., Norimine, J., Knowles, D., y Goff, W., (2006). Inmune control of *Babesia bovis* infection. *Veterinary parasitology*. 138: 75–87.

Buczek, A., y Bartosik, K. (2006). Tick host interactions. *Przegląd Epidemiologiczny*. 1:28-33.

Callow, LL. (1976) Tick-borne livestock disease and their vectors. Australian methods of vaccination against anaplasmosis and babesiosis. *Wild Animal Rev*. 18:9-15. doi:10.1016/j.vetpar.2006.01.041

Campos, E., Moraes, J., Facanha, R., Moreira, E., Valle, D., Abreu, L., Manso, P., Nascimento, A., Pelajo, M., Lenzi, H., Masuda, A., Da Silva, I., y Logullo, C. (2006). Kinetics of energy source utilization in *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology* 138: 349-357.

Cantó, G., Álvarez, J., Rojas, E., Ramos, J., Mosqueda, J., Vega, C. y Figueroa, J. (2003). Protección contra babesiosis bovina con una vacuna mixta de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* derivada de cultivo *in vitro* bajo una confrontación de campo. *Veterinaria México*, 34, (4), 323–332.

Carrique, J., y Ribera, H. (2000). Manual Práctico sobre Garrapatas y Enfermedades transmitidas por Garrapatas. *LIDIVET*. 1 - 36.

Casas, E., Trigueros, A., Chávez, A., Tang, J., y Ruiz, F. (2009) Tratamiento y Control de Garrapata *Boophilus microplus*, a través de la combinación de Fluzuron, fipronil, Pour on, en bovinos del trópico. Pucalipa, Perú. Universidad Nacional mayo de San Marcos. 3 - 14.

Castañeda, A. (2010). Instrumentación de la prueba de ELISA con el antígeno recombinante MSA-1 para el diagnóstico de *Babesia bovis*. *Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Mesoamericana. Puebla, México.*

Castañeda, A., Vargas, U., Álvarez, M., Rojas, M., y Figueroa, M. (2013). Prueba de ELISA con antígenos recombinantes para diagnóstico epidemiológico de la babesiosis bovina. p: 1-5. *Memorias del Congreso Veterinario de León*.

Castillo, P., Lira, A., Castañeda, A., Cantú, C., Mejía, E., Polanco, M., Álvarez, M., Rojas, M., y Figueroa, M. (2017). Comparación de pruebas serológicas para el diagnóstico epidemiológico de babesiosis bovina transmitida por garrapatas. *Entomología mexicana*. 4: 621–626.

CFSPH (2008). *Bovine Babesiosis*. Food Security and Public Health. Institute for Internal Cooperation in Animal Biologics.

Chae, J., Hyeon, D., Shringi, S., Klein, T., Chul, H., Chong, S., Lee, I., y Foley, J. (2008) Microbial Pathogens in ticks, rodents and shrews in northern Gyeonggi-do near the DMZ. *Veterinary Science*. 9(3): 285-293.

Chauvin, Moreau E., Bonnet S., Plantard O. y Malandrin L. (2009). Review article Babesia and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Veterinary Research* 40:37.

Chulmi, K., Hiroshi, I., Maria, S., Naoaki, Y., Hiroshi, S., Xuenan, X., Kozo, F., y Ikuo, I. (2007). Development of Taqman-Based Real-Time PCR Assays for Diagnostic Detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Medicine and Hygiene* 77(5), 837–841.

Cordero del Campillo, M. (2002). *Parasitología Veterinaria*. Madrid España: Mc Graw Hill. Tercera Edición.

Corson, M. (2004). Microclimate influence in a physiological model of cattle-fever tick (*Boophilus spp.*) population dynamics. *Ecological Modelling*: 487–514.

Cuevas, C., y Alejo Martínez, A. (2010). Sensibilidad y especificidad de una prueba. <http://www.psicol.unam.mx/Investigacion2/pdf/SENSIBILIDADYESPECIFICIDAD.pdf>. Facultad de psicología, UNAM. Consultado el 28 de enero de 2019.

Davey, R., George, J., y Snyder, D. (2001). Efficacy of a single whole-body spray treatment of spinosad, against *Boophilus microplus* (Acarie: Ixodidae) on cattle. *Veterinary Parasitology*. 99: 41-52.

De la Fuente, J., Almazan, C., Canales, M., Perez de la Lastra, J., Kocan, K., y Willadsen, P. (2007) A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Animal Health Research Reviews* 8 (1): 23-28.

De la Fuente, J., Estrada, A., Venzal, J., Kocan, K., y Sonenshine, D. (2008). Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Frontiers in Bioscience*. 13:693-694.

Domínguez, A., Rodríguez, I., Oura, C., y Galera, L. (1995). Determinación de la especificidad y sensibilidad de las técnicas de Ensayo Inmunoenzimático Indirecto y de inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico de *Babesia bovis*. *Revista Biomédica* 6:17-23.

East, I., Zakrzewski, H., Gale, K., Leatch, G., Dimmock, C., Thomas, M., y Waltisbuhl, D. (1997). Vaccination against *Babesia bovis*: T cells from protected and unprotected animals show different cytokine profiles. *Veterinary Parasitology*. 27:1537-1545.

Estrada, A. (2001). Climate warming and changes in habitat suitability for *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in Central America. *Veterinary Parasitology*. 87 (5): 978-987. 2001.

Estrada, A., y Venzal, M. (2006). High resolution predictive mapping for *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in Mexico and Southern Texas. *Veterinary Parasitology* 142: 350-358.

FAO (2003). Revision of strategies for the control of ticks and tick-borne diseases and their vectors. Rome Italy. *FAO expert consultation* 11-15.

FAO. (2010). Ganadería Bovina en América Latina. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Santiago de Chile. *FAO expert consultation* 14 -16.

Figueroa, J., y Buening, G. (1991). In vitro inhibition of multiplication of *Babesia bigemina* by using monoclonal antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*. 29: 997-1003.

Figueroa, J., y Buening, G. (1995): Nucleic acid probes as a diagnostic method for tick-borne hemoparasites of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*. 75: 75-92,1995.

Figueroa J., y Álvarez J. (2003). Investigaciones sobre aplicación de técnicas moleculares en el diagnóstico y control de la Babesiosis bovina. *Ciencia veterinaria* 9-2003-4.

Flores, T., A. (2006). *Hemoparásitos bovina*. VIRBAC. Salud animal.

Friedhoff, K. (2005). *Transmission of babesia*. In: *Babesiosis of domestic Animals and Man*. Florida USA, ed. CRC Press. 23-52.

García, F. (2015). Género Babesia: Babesiosis bovina equina y canina. Facultad de Ciencias veterinarias de la Universidad Nacional de Venezuela. Documento Scrib. Recuperado de: <http://es.scribd.com/doc/84971496/Babesia-y-Babesiosis-Nueva#scribd>.

García, J. (2010). Medición de la concordancia. Facultad de medicina, UNAM. <http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/censenanza/spiii/spiii/concordanciajj.pdf>. Consultado el 4 de febrero del 2019.

Goff, W., Johnson, W., Molloy, J., Jorgensen, W., Waldron, S., Figueroa, J., Matthee, O., Adams, D., McGuire, T., Pino, I., Mosqueda, J., Palmer, G., Suarez, C., Knowles, D., y McElwain, T., (2008). Validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Babesia bigemina* antibodies in cattle. *Clinical and vaccine immunology*. 15: (9)1316-1321.

Gohil, S., Kats, L., Sturm, A. y Cooke, B. (2010): Recent insights into alteration of red blood cells by *Babesia bovis*: moovin forward. *Trends in Parasitology*. 26(12): 591-599.

Gordon, J. y Sibley, L. (2005). Comparative genome analysis reveals a conserved family of actin-like proteins in apicomplexan parasites, *BMC Genomics* 6:179. Fecha de consultado 20-nov-1018. Doi: 10.1186/1471-2164-6179.

Heath, A., y Cane, R. (2010). A new species *Ixodiphagus* (Hymenoptera: Chalcidoidea: Encyrtidae) parasiting seabird tick in New Zeland. *Journal of Zoology* 37 (2): 147-155.

Hernández, F. (2005). El Manejo integrado en el Control de garrapatas. Manual de Ganadería. Facultad de ciencias veterinarias. Universidad del Zulia. Págs. 85-96.

Hope, M., Jiang, X., Gough, J., Cadogan, L., Josh, P., Jonsson, N., y Willadsen, P. (2010). Experimental vaccination of sheep and cattle against tick infestation using recombinant 5'- nucleotidase. *Parasite Immunology*; 32: 135–142.

Horak, I., Camicas, J., y Keirans, J. (2002). The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. *Experimental and Applied Acarology*. 28:27-54.

Hoskins, J. (1991). *Ixodid and Argasid Ticks, Keys to their identification. En the veterinary clinics of north america, Small practice*. Philadelphia. WB Saunders. Vol. 21 pp 1-5.

Jongejan, F., Uilenberg, G. (2004). The global importance of ticks. *Veterinary Parasitology*; 129:3-14.

Jonsson, N., Mayer, D., y Green, P. (2000) Possible risk factors on Queensland dairy farms for acaricide resistance in cattle tick (*Boophilus microplus*). *Veterinary Parasitology*. 88: 79-92.

Jonsson, N. (2006). The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Veterinary Parasitology*. 137: 1-10.

Jonsson, N., Bock, R., Jorgensen, W. (2008). Productivity and health effects of anaplasmosis and babesiosis on *Bos indicus* cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia. *Veterinary Parasitology*. 155:1-9.

Keirans, J., y Durden, L. (2001). Invasion: exotic ticks (Acari: Argasidae, Ixodidae) imported into the United States. A review and new records. *Journal of Medical Entomology*. 38:850-861.

León A., Ribera, C., y Villegas F. (2002). Detección de anticuerpos IGg contra *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale* en bovinos. *Ciencia veterinaria* 9-2003-4.

Levine, N., Corliss, J., Cox, F., Deroux, G., Grano, J., Honigberg, B., Leedale, G., Loeblich, A., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, D., y Wallace, F. (1980). Una clasificación recientemente revisada de los protozoos. *Diario de los eucariotas Microbiología*, 27: 37-58.

Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Darnell, J. (2005) *Biología celular y molecular*. Madrid, 5ª ed.: Panamericana.

López, G., Frisi, C., Gómez, J., Valencia, L., y González, D. (2009). Evaluación de una mezcla de cipermetrina mas clorperifos sobre la garrapata, en pruebas de campo y de laboratorio en el predio. *Revista CES. Medicina Veterinaria. Y Zootecnia*. 4 (2).

Madrid C., Fuentes H., Romero W., Álvarez A. y Espinoza E. (2012). Reactivación de un cepario de *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* y *Anaplasma marginale*, para estudios experimentales. Unidad de Sanidad Animal. Maracay, Aragua, Venezuela. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). 7 pág.

Meléndez, R. (1990). Anaplasmosis y Babesiosis bovina: Por qué hay brotes de estas hemoparásitos en el trópico. *Rev. Asocria*. 2 (5): 17-22. 1990.

Moissant de Roman, E. (2004). Compilación de trabajos de investigación en ectoparásitos de importancia médico veterinaria (1999-2004). *Cat. De Parasit. Y Enf. Parasit Fac. Cs. Vet. UCV*. 91 pp.

Mosqueda J., Olvera A., Aguilar G. y Cantó G. (2012). *Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis*. Obihiro, Hokkaido, Japan. *Current Medicinal Chemistry*, 19, 1504- 1518.

Murphy, P. (1979). *Temperature regulation and the pathogenesis of fever*. Wiley Medical Publication, First edition. 399-407.

Navarrete, I., Serrano, y Reyna, D. (2002). *Parasitología veterinaria*. Sevilla España, Ed. Toledo. Cap. 19. 283-293.

Odongo, D., Kamau, L., Skilton, R., Mwaura, S., Nitsch, C, Musoke, A., Taracha, E., Daubenberger, C. y Bishop, R. (2009). La vacunación de ganado vacuno con TickGARD induce anticuerpos de reactividad-cruzada enlazado a los péptidos lineales conservados de homólogos Bm86 en *Boophilus decoloratus*. *Vaccine*. 25, 1287-96.

OIE (2010). Bovine Babesiosis. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2010. OIE Terrestrial Manual 2010 Chapter 2.4.2.

Recuperado de:

http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.02_bovine_babesiosis.pdf .Consultado : 5-08-2018

OIE (2013). Bovine Babesiosis. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2010. OIE Terrestrial Manual 2010 Chapter 2.4.2.

Recuperado de:

http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.02_bovine_babesiosis.pdf .Consultado: 5-08-2018

OIE (2014). *Bovine Babesiosis*. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2014. OIE Terrestrial Manual 2014. Chapter 2.4.2. Recuperado de: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.02_bovine_babesiosis.pdf Consultado: 5-08-2018

Petersdorf, R., (1980). *Chilis and fever, IN: Harrison's Principles of Internal Medicine*. McGraw-Hill Book Company, Nineth Edition. 59-68.

Quiroz, R. H. 2000. *Parasitología y Enfermedades Parasitarias de Animales Domésticos*. México D.F. 10 ed. Limusa. pp 187-797.

Quiroz, R. H. (2008). *Parasitología y Enfermedades Parasitarias de Animales Domésticos*. México D.F: 1a ed. Limusa. pp 198-215.

Ramírez, G., Jones, C., Brown, J., y Honhold, N. (2003) Bovine Babesiosis in dual purpose calves in the state of Yucatan, México. *Tropical Animal Health and Production*. 30 45-52.

Reyes, R., Figueroa, J., Bautista, C., Castañeda, R., Vargas, P., Álvarez, J., Rojas, C., y Estrada, F. (2016). Babesiosis: Field assessment of protection in cattle immunized with a mixture of *Babesia bovis* recombinant proteins. *Quehacer Científico en Chiapas* 11 (2): 36-46.

Ristic, M., y Sibinovic, S. (1964). Serologic diagnosis of *Babesia bigemina* infection in cattle by the indirect fluorescent antibody test. *Research in Veterinary Science*. 1964, 9, 557.

Rodríguez, F., Quiñones Ávila, y Ramírez Cruz. (2004). Epidemiología, control y prevención de la babesiosis bovina. Cap. 13 205-225.

Rodríguez-Vivas, R., Ojeda-Chi, M., Pérez-Cogollo, L., y Rosado-Aguilar, J. (2011) Epidemiología y control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en México. Capítulo 33. En: Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos. Editores: Quiroz RH, Figueroa CJA, López AME. AMPAVE. Pp: 477-504.

Rodríguez-Vivas, R., Quiñones, A., y Fragoso, S. (2005) *Epidemiología y control de la garrapata Boophilus en México. En: Enfermedades de importancia económica en producción animal*. México D.F. McGraw-Hill-UADY. Pp: 571-592

Rodríguez-Vivas, R., Rosado, J., Basto, G., García, Z., Rosario, R., y Fragoso, H. (2006). *Manual Técnico para el Control de Garrapatas en el Ganado Bovino*. Publicación Técnica de INIFAP No. 4, pp. 16.

Rodríguez-Vivas, R., Rosado, J., Ojeda, M., Pérez, L., Trinidad, I., y Bolio, M. (2014) Control integrado de garrapatas en la ganadería bovina. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 1(3) 295-308.

Rodríguez VRI, Grisi L, Pérez LAA, Silva VH, Torres AJF, Fragoso SH, Romero SD, Rosario CR, Saldiernah F, García CD, 2017, Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 8(1):61-74.

Sánchez, N., Borgonio, C., Rojas, M., Pérez, R., Álvarez, M., y Figueroa, M. (2008). *Babesia bovis*: Clonación, expresión y purificación de antígenos recombinantes MSA-1, MSA2c y 12D3. p: 544-548. *Memorias del Congreso Nacional de Buiatría*.

SAGARPA, (2006). *Manual técnico para el control de las garrapatas en el ganado bovino CENID- Parasitología Veterinaria*; Publicación técnica No 4.

Schneider, D., Yan, H., Bastos, R., Johnson, W., Gavin, P., Allen, J., Barrington, G., Herrmann-Hoesing, L., Knowles, D., y Goff, W., (2011). Dynamics of bovine spleen cell populations during the acute response to *Babesia bovis* infection: an immunohistological study. *Parasite immunology* 33, 34–44.

SENASICA, (2016). Situación zoonosanitaria la campaña para el control de la garrapata *Boophilus* spp en México. Disponible en: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/situacion-actual-del-control-de-la-garrapata-boophilus-spp>. Consultado el 28-09-2018.

SENASICA. (2018). Situación actual del control de la garrapata *Boophilus* spp. Disponible en: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/situacion-actual-del-control-de-la-garrapata-boophilus-spp>. Consultado el 28-09-2018.

Shoda, L., Palmer, G., Florin-christensen, J., Florin-christensen, M., Godson, D., y Brown, W. (2000). *Babesia bovis* -Stimulated Macrophages Express Interleukin1B, Interleukin-12, Tumor Necrosis Factor Alpha, and Nitric Oxide and Inhibit Parasite Replication In Vitro. *Veterinary parasitology*. 68, 5139–5145.

Solís, C., Rodríguez-Vivas, R., y Dájer, A. (2000). Monitoreo de IgG e IgM a *Babesia bigemina* (Haemosporidia: Babesiidae) en becerros del trópico mexicano. *Revista de biología tropical*. 46: 1123-1128.

Solorio, R., y Rodríguez-Vivas, R. (2005). Epidemiología de la babesiosis bovina II. Indicadores epidemiológicos y elementos para el diseño de estrategias de control. *Revista Biomedica*. 8: 95-105.

Suarez, C., McElwain, T., Stephens, E., Mishra, V., y Palmer, G. (1991). Sequence conservation among merozoite apical complex proteins of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and other Apicomplexa. *Veterinary Parasitology*. 49: 329-332.

Terkawi, M., Huyen, N., Shinuoa, C., Inpankaew, T., Maklon, K., Aboulaila, M., Ueno, A., Goo, Y., Yokoyama, N., Jittapalapong, S., Xuan, X, y Igarashi, I. (2011). Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes in the northeast region of Thailand. *Veterinary Parasitology*, 178: 201–207.

Thornton, P. K., Van de Steeg, J., Notenbaert, A., y Herrero, M. (2009). The impacts of climate change on livestock and livestock systems in developing countries: A review of what we know and what we need to know. *Agricultural systems*. 101, 113-127.

Tizard, I.R. (2008). *Veterinary Immunology: An introduction*. Philadelphia. 8^a ed. Saunders.

Valdez, U. (2015). "Identificación de epítomos conservados en aislados de *Babesia bigemina*". Tesis de Maestría en Salud y Producción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 15-106 pp.

Vargas, M., Montero, C., Sánchez, D., Pérez, D., Valdés, M., Alfonso, A., Joglar, M., Machado, H., Rodríguez, E., Méndez, L., Leonart, R., Suárez, M., Fernández, E., Estrada, M.P., Rodríguez-Mallón, A. y Farnós, O. (2010). Dos vacunas iniciales con la vacuna Gavacplus a base de Bm86 contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* induce similar supresión reproductiva a tres vacunas iniciales bajo condiciones de producción. *BMC Veterinary Research*. 6, 43-50.

Vasco A. (2013). *Estandarización de la técnica de análisis de fusión de alta resolución para la detección de Babesia en garrapatas utilizando polimorfismos de nucleótidos*. Tesis, Universidad Central del Ecuador., 2013, pp.98.

Vega, C., Buening, G., Green, T., y Carson, C. (1985) *In vitro* cultivation of *Babesia bigemina*. *Veterinary Research*. 1985; 46:416- 420.

Vial, H., y Gorenflot, A. (2006). Chemotherapy against babesiosis. *Veterinary parasitology*. 138, (1-2), 147-160.

Waltisbuhl, D., Goodger, B., Wright, I., Commins, A., y Mahoney, D. (1987). Immunosorbent assay to diagnose *Babesia bovis* infection in cattle. *Parasitology Research*. 73:126-131.

Willadsen, P. (2006). Tick Control: Thoughts on a research agenda. *Veterinary Parasitology*.138: 161-168.

Wright, I., Casu, R., Commins, M., Dalrymple, B., Gale, K., Goodger, B., Riddles, P., Waltisbuhl, D., Abetz, I., y Berrie, D. (1992). The development of a recombinant *Babesia* vaccine. *Veterinary Parasitology*. 44: 3-13,1992.

Yokoyoma, N., Okamura, M., y Igarashi, I. (2006): Erythrocyte invasión by *Babesia* parasites: current advances in elucidation of the molecular interections

between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage. *Veterinary Parasitology*. 138(1-2): 22-32.

Zintl A., Mulcahy G., Skerrett H., Taylor S., & Gray J. (2003). *Babesia divergens*: A bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance. *Clinical Microbiology Reviews*.16, 622–636.

XII. Anexos.

12.1 Anexo 1. Preparación de soluciones.

1. 1 litro de PBS 10x (Solución amortiguadora de fosfatos) con pH: 7.2.

En 200 mililitros de agua destilada se agregó 2.62 gramos de fosfato de sodio monobásico monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$) y 11.50 gramos de fosfato de sodio difásico anhídrido (Na_2HPO_4) se aforó a 1000 mililitros y se ajustó el pH para alcalinizarlo con hidróxido de sodio (NaOH) y para acidificarlo con ácido clorhídrico (HCl), para así alcanzar un pH: 7.2 y guardar a 4°C.

2. Solución de PBS 1x, 1 litro.

A 900ml de agua destilada se le agregó 100 mililitros de PBS 10x.

3. 200 mililitros de solución de lavado PBS-Tween al 0.1 %.

200 μl de Tween 20 por cada 100 ml que se va ocupar, entonces:

A 200 mililitros de PBS 1x se le agregó 400 microlitros (μl) de Tween 20 y se homogenizó lentamente para no ocasionar espuma.

4. 50 mililitros de leche al 5 % como solución de bloqueo.

A 40 mililitros de PBS-Tween se le agregó 2.5 gramos de leche descremada al 3%, se homogenizó y se aforó a 50 mililitros añadiendo más PBS-Tween.

12.2 Anexo 2. Procedimiento de la técnica de iELISA.

1. Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pozos previamente sensibilizadas con las proteínas 12D3 y RAP-1 de *Babesia bigemina* a una concentración de 0.84 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

2. A dichas placas se les realizó un lavado con PBS 1x añadiendo 50µl a cada pozo y secando vigorosamente sobre toallas de papel.
3. Se realizó un segundo lavado con PBS-Tween agregando 50µl a cada pozo, y se colocó la placa en el agitador a 150 rpm durante 5 minutos secando vigorosamente sobre toallas de papel.
4. Se realizó un tercer lavado igual al segundo.

Bloqueo

5. Una vez secas las placas, se le agregó a cada pozo 50 µl de solución de leche descremada al 5%.
6. Se incubaron las placas por 30 minutos a 37°C.

Lavados

7. Repetir pasos 2, 3 y 4.

Adición de muestras

8. Se agregó 50 µl a cada pozo de los sueros problema diluidos 1:200 en solución de PBS 1x filtrado, así como también se asignaron pozos para agregar 3 controles positivos, 3 controles negativos, 3 sólo de PBS y 3 más de conjugado. Después de eso se incubaron a 37°C durante por 60 minutos.

Lavados

9. Repetir pasos 2, 3 y 4.

Adición de Conjugado

10. Se agregaron 50µl de suero anti-IgG de bovino producido en cabra conjugado con peroxidasa de rábano en cada pozo diluido 1:10 000 en solución PBS 1x filtrado incluyendo controles.
11. Posteriormente se incubaron las placas a 37°C por 30 minutos.

Lavados

12. Repetir pasos 2, 3 y 4.

Adición de TMB

13. Se agregaron a cada pozo 50µl de sustrato TMB incluyendo controles, y se incubó a 37°C por 30 minutos.

Lecturas

14. Pasados 30 minutos de incubación se realizó lecturas de las placas en espectrofotómetro a 650 nm de densidad óptica.

12.3 Anexo 3. Procedimiento de la técnica IFI.

Antígeno

1. Se utilizaron laminillas con antígenos derivados de *cultivo in vitro* de *B. bigemina* con un porcentaje de eritrocitos parasitados (PEP) de 4%.
2. Se colocaron en perlas de sílice para incubar a 37°C por 30 min. para su secado.
3. Posteriormente, se fijaron en acetona por 10 minutos y se marcaron círculos con lápiz graso, a cada círculo se le agregaron 5 µl de muestra de suero diluidas 1:80 así como un control positivo, un control negativo uno solo de PBS y otro más solo de conjugado. Se introdujeron las laminillas en cámara húmeda y se incubaron a 37°C durante 30 minutos

Lavados

4. Se colocaron las laminillas en la caja de Coplin con PBS 1x y se llevaron al agitador por 10 minutos a 110 rpm. Se desechó el líquido en la tarja.
5. Se realizó un segundo lavado, también con PBS, en el agitador a 110 rpm durante 5 min. Se desechó el líquido en la tarja.

6. Se realizó un tercer lavado con agua destilada en agitador a 110 rpm durante 5 min. Se desechó el líquido en la tarja.

Adición de segundo anticuerpo marcado

7. Se agregaron 5µl de suero anti - IgG de bovino producido en cabra conjugado con Alexa flúor 488 en una dilución 1:1800 en PBS 1x filtrado a todos los círculos marcados.
8. Se incubaron las laminillas en cámara húmeda a 37 °C por 30 min.

Lavados

9. Se cubrió la caja de Coplin con papel aluminio para evitar la exposición a la luz.
10. Se repitieron los pasos 4,5 y 6.

Lectura

11. Se realizó la observación por medio de microscopía de epifluorescencia.

12.4. Anexo 4. Punto de corte para iELISA con RAP-1.

Densidades ópticas de los 3 controles negativos incluidos en la placa como referencia para la obtención de resultados:

0.288	0.105	0.298
-------	-------	-------

Promedio de las densidades ópticas:

0.230333

Tres veces la desviación estándar de las tres densidades ópticas de los tres controles negativos:

0.325971

Suma del promedio de las densidades ópticas de los tres controles negativos más tres veces la desviación estándar de los mismos:

0.556304

12.5. Anexo 5. Punto de corte para iELISA con 12D3.

Densidades ópticas de los 3 controles negativos incluidos en la placa como referencia para la obtención de resultados:

0.277	0.101	0.352
-------	-------	-------

Promedio de las densidades ópticas:

0.243333

Tres veces la desviación estándar de las tres densidades ópticas de los tres controles negativos:

0.386527

Suma del promedio de las densidades ópticas de los tres controles negativos más tres veces la desviación estándar de los mismos:

0.62986

12.6 Anexo 6. Densidades ópticas de los 96 sueros probados a 650 nm en la prueba de iELISA con RAP-1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.624	0.603	0.6	0.567	0.611	0.617	0.628	0.631	0.745	0.596	0.58	0.722
B	0.613	0.9	0.679	0.608	0.825	0.56	0.631	0.536	0.62	0.598	0.523	0.493
C	0.536	0.682	0.814	0.652	0.683	0.682	0.589	0.518	0.678	0.613	0.649	0.561
D	0.296	0.422	0.537	0.526	0.41	0.432	0.532	0.527	0.521	0.514	0.541	0.532
E	0.529	0.554	0.55	0.552	0.715	0.463	0.53	0.52	0.727	0.511	0.314	0.529
F	0.511	0.41	0.518	0.461	0.516	0.431	0.542	0.555	0.489	0.684	0.504	0.469
G	0.54	0.535	0.689	0.795	0.52	0.524	0.512	0.501	0.545	0.521	0.503	0.481

39 Positivos	57 Negativos
--------------	--------------

12.7 Anexo 7. Densidades ópticas de los 96 sueros probados a 650 nm en la prueba de iELISA con 12D3.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.655	0.651	0.7	0.635	0.647	0.689	0.705	0.709	0.699	0.654	0.649	0.755
B	0.685	0.831	0.801	0.75	0.637	0.77	0.667	0.744	0.664	0.711	0.797	0.465
C	0.719	0.668	0.682	0.481	0.629	0.77	0.612	0.714	0.716	0.628	0.776	0.568
D	0.381	0.432	0.579	0.417	0.474	0.553	0.576	0.672	0.541	0.6	0.561	0.545
E	0.722	0.624	0.621	0.607	0.676	0.594	0.591	0.702	0.635	0.542	0.33	0.617
F	0.625	0.319	0.589	0.289	0.587	0.616	0.617	0.601	0.593	0.562	0.544	0.518
G	0.584	0.474	0.831	0.718	0.616	0.557	0.562	0.592	0.532	0.623	0.489	0.489
H	0.494	0.532	0.62	0.546	0.534	0.561	0.566	0.613	0.601	0.499	0.455	0.502

38 Positivos 58 Negativos

12.8. Anexo 8. Resultados de las 96 muestras de suero probados en la prueba de IFI.

+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

35 Positivos 61 Negativos