



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO  
CENTRO UNIVERSITARIO UAEM AMECAMECA**

**LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

“PUESTA A PUNTO DE UNA PRUEBA SEROLÓGICA PARA  
ESTUDIOS DE SEROPREVALENCIA DE BABESIOSIS BOVINA  
UTILIZANDO PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *Babesia*  
*bigemina* COMO ANTÍGENOS”

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

PRESENTA:  
**XÓCHITL ALONDRA PÉREZ MONTERO**

ASESOR:

Dr. Juan José Ojeda Carrasco

CO-ASESOR:

Dr. Julio Vicente Figueroa Millán

## RESUMEN

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Babesiosis del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Salud Animal e Inocuidad del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias (CENID-SAI INIFAP), el objetivo fue poner a punto el Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas Indirecto (iELISA) para estudios serológicos de babesiosis bovina con el uso de proteína recombinante RAP-1 como antígenos para *Babesia bigemina*, mediante la inoculación de esta proteína en dos ovinos, con el fin de observar reconocimiento de la proteína a nivel inmunológico (formación de inmunocomplejos), ya que la enfermedad es específica de bovinos. Se realizaron seis inoculaciones para un ovino y siete para el otro, con espacio de 14 días entre inoculaciones a una concentración total de 1900µl/ml junto con adyuvante de Freund vía intramuscular, se extrajeron muestras sanguíneas de cada día que se administró la proteína y se centrifugaron en el Laboratorio de babesiosis del CENID-SAI del INIFAP para obtención de suero sanguíneo y la posterior realización de pruebas serológicas; las cuales fueron Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para la observación microscópica por epifluorescencia de la reacción antígeno nativo–anticuerpo reconocidos en las muestras (considerada como “la prueba de oro” en babesiosis bovina) y el Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas indirecto (iELISA), para poder identificar reconocimiento antígeno recombinante–anticuerpo. Los resultados obtenidos para la técnica de IFI demostraron positivas las muestras a partir del segundo muestreo para un ovino y partir del tercer muestreo. En la prueba de iELISA resultaron positivos a partir del segundo muestreo para ambos ovinos. De esta forma se demostró que existe reconocimiento inmunológico en ambas técnicas y que los productos derivados de las inoculaciones de la proteína recombinante RAP-1 de *Babesia bigemina* a ovinos fueron anticuerpos policlonales adquiridos exitosamente.

Por otro lado, se determinó la concordancia entre ambas pruebas serológicas para medir el grado de acuerdo entre ellas (precisión) obteniendo una concordancia sustancial.

Posteriormente se realizaron pruebas serológicas de un hato proveniente de una zona endémica para comprobar que el antígeno recombinante puede reconocer para el antígeno completo de *B. bigemina* de campo. Del mismo modo se realizó la prueba de Inmunofluorescencia indirecta para confirmar el reconocimiento de anticuerpos y determinar que efectivamente el ganado estuvo en contacto con los antígenos, posteriormente se realizó Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas, para determinar que el antígeno recombinante RAP-1 de *Babesia bigemina* es capaz de reconocer al antígeno completo de *Babesia bigemina*. Los resultados demostraron que el antígeno recombinante RAP-1 reconoce al anticuerpo completo de *Babesia bigemina*, siendo de utilidad para estudios epidemiológicos de babesiosis bovina.

Palabras clave: *Babesia bigemina*, RAP-1, reconocimiento, IFI, ELISA.

## ABSTRACT

The present work was carried out in the Babesiosis laboratory of the National Center for Disciplinary Research in Animal Health and Safety of the National Institute of Agricultural and Livestock Research (CENID-SAI INIFAP), the objective was to develop the Indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay (iELISA) for serological studies of bovine babesiosis with the use of recombinant protein RAP-1 as antigens for *Babesia bigemina*, by inoculating this protein in two sheep, in order to observe recognition of the protein at the immunological level (formation of immunocomplexes). Six inoculations were performed for one sheep and seven for the other, with a space of 14 days between inoculations at a total concentration of 1900µl/ml together with Freund's intramuscular adjuvant, blood samples were taken from each day that the protein was administered and centrifuged in the Babesiosis Laboratory of the CENID-SAI of the INIFAP to obtain blood serum and the subsequent realization of serological tests; which were Indirect Immunofluorescence (IFI) for the microscopic observation by epifluorescence of the antigen-antibody reaction recognized in the samples (considered as "the gold test" in bovine babesiosis) and the Indirect Enzyme Linked Immunoabsorption Assay (iELISA) , to be able to identify recombinant antigen-antibody recognition. The results obtained for the IFI technique showed positive samples from the second sampling for an ovine and from the third sampling. In the iELISA test they were positive from the second sampling for both sheep. In this way it was demonstrated that there is immunological recognition in both techniques and that the products derived from the inoculations of the recombinant protein RAP-1 from *Babesia bigemina* to sheep were successfully acquired polyclonal antibodies.

On the other hand, the agreement between the two serological tests was determined to measure the degree of agreement between them (accuracy), obtaining a substantial concordance.

Subsequently, serological tests were performed on a herd from an endemic area to verify that the recombinant antigen can recognize the complete antigen of *B. bigemina* in the field. In the same way the indirect immunofluorescence test was carried out to confirm the recognition of antibodies and to determine that the cattle were effectively in contact with the antigens, later Enzyme-Linked Immunosorbent Assay was performed, to determine that the recombinant antigen RAP-1 of *Babesia bigemina* is able to recognize the complete antigen of *Babesia bigemina*. The results showed that the recombinant antigen RAP-1 recognizes the complete antibody of *Babesia bigemina*, being useful for epidemiological studies of bovine babesiosis.

**Key words:** *Babesia bigemina*, RAP-1, recognition, IFI, ELISA.

## DEDICATORIA

A Dios, por bendecirme y reglarme la oportunidad de ser mejor cada día.

Con el mismo amor que ellos me dan, dedico este trabajo a mis abuelitos Judith y Miguel que con tanto esfuerzo y sacrificio me brindaron la oportunidad de culminar mi carrera universitaria, han creído en mí y me han apoyado incondicionalmente tanto en lo personal como en lo profesional, sin ellos esto no hubiera sido posible.

Al niño de mis ojos, mi amado hijo Mateo, quien me inspira a ser cada día mejor, es por quien me mantengo firme en mis convicciones y no me dejo caer.

El pequeño gigante que amo con toda mi alma.

A mi madre, Alma, no sólo me regaló la vida, me supo educar y mantener en el camino correcto, si no fuera por sus consejos jamás hubiese estudiado esta hermosa profesión.

A mis tíos Martha y Miguel, que siempre estuvieron ahí para mí, y me apoyaron en todo momento, depositaron su amor y confianza en mí y jamás dudaron de mi capacidad.

A mi novio Octavio, juntos concluimos la carrera y todo el tiempo se mantuvo cerca de mí, brindándome todo su amor y apoyo, me acompañó en la movilidad estudiantil y siempre se preocupó por mí.

## **AGRADECIMIENTOS**

Infinitas gracias a mis abuelitos Judith y Miguel y a mi madre, por el regalo de la educación y su apoyo incondicional en mi trayectoria académica y personal, por su amor, sus consejos y sus correcciones para no tomar caminos equivocados, por estar a mi lado siempre.

A la M. en C. Rebeca Montserrat Santamaría Espinosa, gracias por su apoyo en todo el proceso de realización de la tesis, por compartir sus conocimientos conmigo, y por su bonita amistad.

Agradezco a mi asesor interno Dr. Juan José Ojeda Carrasco por regalarme de su tiempo y paciencia, a mi asesor externo Dr. Julio Vicente Figueroa Millán por aceptarme en el CENID-SAI, INIFAP y darme la oportunidad de ser parte del proyecto de investigación “Problemas Nacionales” No. 1-1.6-1373533989-P-M.2-2, financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Gracias a todos los integrantes de la unidad de babesiosis por compartir sus conocimientos conmigo y todo el apoyo recibido. Del mismo modo agradezco a los integrantes de las unidades de anaplasmosis, artrópodos y helmintos, así como al área de administración del instituto, por recibirme con los brazos abiertos.

A mi alma máter el C.U UAEM Amecameca y maestros de Medicina Veterinaria y Zootecnia por recibirme y formarme en mi carrera como M.V.Z.

Gracias a familiares y amigos que siempre preguntaron por mí, y me apoyaron desde la lejanía con palabras llenas de amor y buena vibra.

## ÍNDICE

|   |           |
|---|-----------|
| <b>I. INTRODUCCIÓN</b>                              | <b>1</b>  |
| <b>II. ANTECEDENTES</b>                             | <b>4</b>  |
| <b>2.1 Babesiosis bovina</b>                        | <b>4</b>  |
| <b>2.2 Etiología</b>                                | <b>4</b>  |
| <b>2.3 Morfología</b>                               | <b>5</b>  |
| <b>2.4 Epidemiología</b>                            | <b>6</b>  |
| <b>2.5 Transmisión</b>                              | <b>9</b>  |
| <b>2.6 Ciclo biológico</b>                          | <b>10</b> |
| <b>2.7 Patogenia</b>                                | <b>14</b> |
| <b>2.8 Signos clínicos</b>                          | <b>16</b> |
| <b>2.9 Inmunología</b>                              | <b>18</b> |
| <b>2.10 Lesiones postmortem</b>                     | <b>21</b> |
| <b>2.11 Diagnóstico de campo</b>                    | <b>22</b> |
| <b>2.12 Diagnóstico de laboratorio</b>              | <b>22</b> |
| <b>2.12.1 Técnicas directas:</b>                    | <b>22</b> |
| <b>2.12.1.1 Frotis sanguíneo</b>                    | <b>22</b> |
| <b>2.12.1.3 Improntas de órganos afectados</b>      | <b>23</b> |
| <b>2.12.1.3 Pruebas de hemolinfa</b>                | <b>23</b> |
| <b>2.12.2 Técnicas indirectas:</b>                  | <b>24</b> |
| <b>2.12.2.1 Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)</b> | <b>24</b> |
| <b>2.12.2.2 Prueba de ELISA</b>                     | <b>25</b> |
| <b>2.13 Diagnóstico diferencial</b>                 | <b>25</b> |
| <b>2.14 Tratamiento</b>                             | <b>26</b> |
| <b>2.15 Prevención y control</b>                    | <b>27</b> |



|        |   |    |
|--------|---|----|
| 2.15.1 | Control del vector  | 27 |
| 2.15.2 | Control de la movilización del ganado   | 28 |
| 2.15.3 | Uso de ganado resistente  | 28 |
| 2.15.4 | Inmunización  | 29 |
| 2.16   | Antígeno  | 30 |
| III.   | PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA  | 31 |
| IV.    | JUSTIFICACIÓN   | 33 |
| V.     | OBJETIVOS   | 35 |
| 5.1    | General   | 35 |
| 5.2    | Específicos   | 35 |
| VI.    | HIPOTESIS   | 36 |
| VII.   | MATERIALES Y MÉTODOS  | 37 |
| 7.1    | Localización  | 37 |
| 7.2    | Diseño experimental   | 37 |
| 7.3    | Técnica de IFI  | 38 |
| 7.3.1  | Materiales para la técnica de IFI   | 38 |
| 7.4    | Técnica de iELISA   | 40 |
| 7.4.1  | Materiales para la técnica de iELISA  | 40 |
| 7.5    | Coeficiente de Concordancia “Kappa”   | 42 |
| VIII.  | RESULTADOS  | 44 |
| 8.1    | Resultados de ovinos inoculados experimentalmente con la proteína recombinante RAP-1 de <i>Babesia bigemina</i> . | 44 |
| 8.1.1  | Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)   | 44 |
| 8.1.2  | Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas indirecto (iELISA)  | 46 |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 8.2    | Resultados de seroprevalencia de un hato de Pichucalco, Chiapas. _____      | 48 |
| 8.2.1  | Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) _____                                   | 48 |
| 8.2.2  | Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas indirecto (iELISA) _____        | 49 |
| 8.3    | Resultados de concordancia (índice de kappa) _____                          | 50 |
| 8.3.1  | Índice de kappa de ovinos inoculados _____                                  | 50 |
| 8.3.2  | Índice de kappa de seroprevalencia de un hato de Pichucalco, Chiapas. _____ | 52 |
| X.     | DISCUSIÓN _____   | 54 |
| XII.   | CONCLUSIÓN _____  | 58 |
| XIII.  | SUGERENCIAS _____   | 59 |
| XIV.   | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____  | 60 |
| XV.    | ANEXOS _____  | 75 |
| 15.1   | ANEXO 1 _____   | 75 |
| 15.1.1 | PBS 10X Stock _____   | 75 |
| 15.1.2 | PBS 1X Stock _____  | 75 |
| 15.1.3 | Solución de lavado PBS-Tween, 200ml _____                                   | 75 |
| 15.1.4 | Solución de bloqueo, Leche al 3%, 50ml _____                                | 75 |
| 15.1.5 | Diluciones de sueros problema. _____  | 76 |
| 15.1.6 | Dilución de conjugados. _____   | 76 |
| 15.2   | ANEXO 2 _____   | 76 |
| 15.2.1 | Técnica IFI _____   | 77 |
| 15.2.2 | Técnica iELISA _____  | 78 |
| 15.3   | ANEXO 3 _____   | 79 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Diagrama de un merozoito de <i>Babesia</i> spp. _____  | 5  |
| Figura 2. Frotis sanguíneos teñidos con Giemsa: Eritrocitos parasitados, A) <i>B. bigemina</i> y B) <i>B. bovis</i> , bajo el objetivo de 100x. ____ | 6  |
| Figura 3. Mapa de la distribución mundial de babesiosis bovina _____   | 8  |
| Figura 4. Distribución de la garrapata <i>Boophilus</i> spp _____  | 10 |
| Figura 5. Ciclo biológico de <i>Babesia bovis</i> _____  | 13 |
| Figura 6. Mecanismo de acción patógena en babesiosis de rumiantes  | 16 |
| Figura 7. Mecanismos de respuesta inmune innata y adaptativa propuestos contra <i>B. bovis</i> _____   | 20 |
| Figura 8. Organización de muestras en placa para iELISA. _____   | 41 |
| Figura 9. Dinámica de anticuerpos de los ovinos mediante la técnica de Inmunofluorescencia indirecta. _____  | 45 |
| Figura 10. Títulos de anticuerpos en inmunofluorescencia indirecta del ovino 197 con objetivo 100X en microscopio de epifluorescencia. ____          | 46 |
| Figura 11. Resultados de muestreos en iELISA. _____  | 48 |
| Figura 12. Resultados de seroprevalencia por Inmufnofluorescencia indirecta _____  | 49 |
| Figura 13. Resultados de seroprevalencia mediante la técnica iELISA  | 50 |

## ÍNDICE DE CUADROS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Cuadro 1. Tabla de Concordancia Kappa</b>  | <b>42</b> |
| <b>Cuadro 2. Criterios de medición de la consistencia de Landis y Koch.</b>   | <b>43</b> |
| <b>Cuadro 3. Resultados de iELISA mediante espectrofotómetro.</b>   | <b>47</b> |
| <b>Cuadro 4. Resultados concordantes y discordantes obtenidos por las técnicas de iELISA e IFI en muestras de ovinos inoculados con proteína RAP-1.</b> | <b>51</b> |
| <b>Cuadro 5. Resultados concordantes y discordantes obtenidos por las técnicas de iELISA e IFI en muestras de un hato de Pichucalco, Chiapas.</b>       | <b>53</b> |
| <b>Cuadro 6. Resultados de la técnica por Inmunofluorescencia indirecta del ovino 197.</b>  | <b>79</b> |
| <b>Cuadro 7. Resultados de la técnica por Inmunofluorescencia indirecta del ovino 198.</b>  | <b>80</b> |

## I. INTRODUCCIÓN

Las garrapatas y las enfermedades que transmiten se encuentran ampliamente distribuidas en el mundo, especialmente en zonas tropicales y subtropicales (Rodríguez *et al.*, 2014); en el año 1982 el 80% del ganado bovino a nivel mundial estaba infestado con garrapatas. Sin importar la especie de garrapata, ya que es muy parecido el daño que producen; transmisión de toxinas, estrés, daño de piel por mordedura, anemia, entre otros problemas que provoca la garrapata por sí sola, sin contar que son vía de transmisión de diversos agentes patógenos, pues son vectores de ciertos microorganismos que provocan enfermedades en los bovinos, generando mermas en la producción de leche y/o carne, además de diversos cuadros clínicos y en ocasiones la muerte, además de las considerables pérdidas económicas (Solorio y Rodríguez, 1997a).

En México, una de las enfermedades que afecta bastante al sector ganadero es la babesiosis bovina, causada por protozoarios intraeritrocíticos; *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, que tiene como vector a la garrapata *Rhiphicephalus microplus* (antes *Boophilus microplus*) y *Rhiphicephalus annulatus* (antes *Boophilus annulatus*) con mayor y menor distribución respectivamente, ocupando entre ambas aproximadamente un 66% del territorio nacional (zonas tropicales y subtropicales) (Murrel y Barker, 2003; Figueroa *et al.*, 2015; SENASICA, 2018). Por otro lado, de las 33,779,290 de cabezas de ganado existentes en México (SIAP, 2016), el 75% de estos se encuentran dentro del 66% de la distribución del vector, lo que da como resultado que más de 25 millones de bovinos están expuestos al vector y las enfermedades que transmiten (Bautista-Garfias *et al.*, 2012). Cabe mencionar que las mermas ocasionadas por babesiosis bovina es menor en zonas endémicas con ganado nativo ya que se mantiene un equilibrio enzoótico entre el vector, el agente causal y el hospedero, donde los animales mantienen anticuerpos contra *Babesia* de por vida y mayor en animales provenientes de zonas libres que son

introducidos zonas de alta endemicidad, ya que hay mayor susceptibilidad y existe un elevado riesgo de que el ganado introducido tenga un alto porcentaje de morbilidad y mortalidad, provocando así pérdidas económicas para el ganadero.

Las pérdidas económicas que son atribuibles únicamente al vector *Rhiphicephalus (Boophilus) microplus* son de US \$ 573'608,076, en donde US \$ 68'878,694 son pérdidas en hatos lecheros y US \$ 504'729,382 en ganado de carne (Rodríguez *et al.*, 2017). Sin embargo, aún no existe ninguna estimación que reporte las cifras ocasionadas por la babesiosis bovina. Aunque si se puede acceder a información en bases de datos de los brotes de Babesiosis que han surgido en el territorio nacional donde se puede tener una idea de las grandes pérdidas que esta enfermedad causa. La OIE reportó en un periodo de enero de 2015 a abril de 2017 86 nuevos focos de infección, teniendo 133 casos de babesiosis y 18 muertes, involucrando a los estados de Colima, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Sinaloa, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán; en donde Tamaulipas reportó mayor número de animales susceptibles, sin reportar muertes y Puebla tuvo mayor número de muertes reportadas, cabe destacar que no todos los casos o muertes por babesiosis son reportados a las autoridades (OIE-WAHIS, 2017).

Debido al desequilibrio en la triada epidemiológica, se genera una inestabilidad enzoótica, dando como resultado brotes, sin embargo, cuando hay un diagnóstico oportuno, se podría controlar la tasa de morbilidad y mortalidad del ganado, del mismo modo es importante dar tratamiento temprano a los animales afectados. Por lo general, la babesiosis se diagnostica mediante observación directa al microscopio de frotis sanguíneos teñidos con Giemsa, para identificar a los parásitos dentro de los eritrocitos (Figuroa y Álvarez, 2003); sin embargo, este método no es lo suficientemente sensible como para detectar los parásitos en la etapa de infección subclínica o crónica (Terkawi *et al.*, 2011).

Por otro lado, el control principal que se ha manejado ha sido hacia el vector, por medio de ixodicidas, pero su uso inadecuado ha provocado resistencia de garrapatas a los químicos utilizados (Rodríguez *et al.*, 2014). Debido a esta resistencia es por lo que se debe tomar gran importancia en crear un control integrado de garrapatas para lograr un mayor impacto en la reducción del problema, manteniendo una estabilidad enzoótica y que el daño económico de producción se evite (Cantú y García, 2013).

Finalmente, es importante mencionar que el presente trabajo tiene como propósito poner a punto una prueba serológica para fines de investigación sobre el diagnóstico de babesiosis bovina, mediante la inoculación experimental de proteínas recombinantes RAP-1, como antígeno de *Babesia bigemina* a ovinos, con el fin de obtener anticuerpos policlonales, de esta forma se evaluará si existe o no reacción inmunológica entre el antígeno nativo y el antígeno recombinante con los anticuerpos policlonales mediante técnicas serológicas.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Babesiosis bovina

La babesiosis bovina también es conocida como piroplasmosis, fiebre de garrapata, ranilla roja, fiebre de Texas, tristeza bovina, fiebre hematórica, aguas rojas. (Gasque, 2008; Rovid *et al.*, 2010). Es una de las enfermedades más importantes del ganado bovino en áreas tropicales y subtropicales de todo el mundo, es transmitida por un vector (garrapatas), causada por parásitos intraeritrocíticos obligados del género *Babesia* (Hernández *et al.*, 1990). En México se han reconocido dos especies: *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, cuya presencia y distribución se encuentra asociada con su garrapata vector, *Rhiphicephalus microplus* y *Rh. Annulatus* (Rojas *et al.*, 2004).

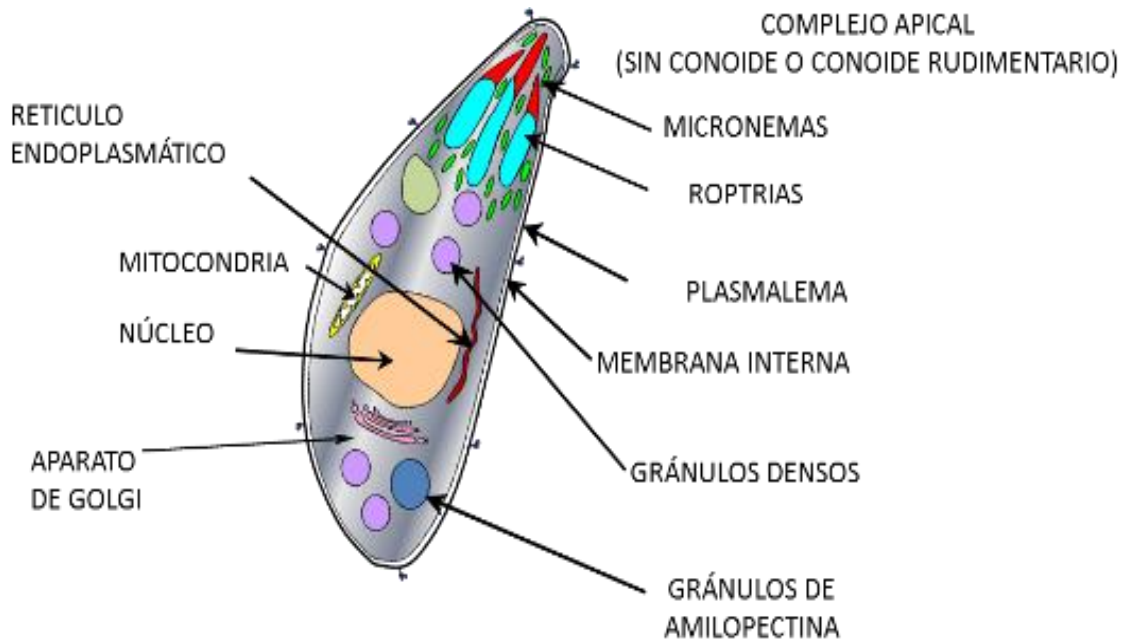
Generalmente, *B. bovis* es más patógena que *B. bigemina*, ya que afecta el sistema nervioso central (SNC) (Gasque, 2008). Las infecciones se caracterizan por pirexia, ataxia, anorexia, shock circulatorio general y en ocasiones signos nerviosos como resultado del secuestro de los eritrocitos infectados en los capilares cerebrales (sólo con *B. bovis*). En condiciones naturales, ambas especies de *Babesia* se presentan como coinfección, causando una condición patológica con severo daño e incluso la muerte de los animales, particularmente en ganado susceptible a los parásitos (García *et al.*, 2003; OIE, 2008).

### 2.2 Etiología

El género *Babesia* pertenece a la: Clase *Sporozoa*, subclase *Piroplasmae*, familia *Babesiidae*. Son Apicomplexa (complejo apical), aunque incompleto (sin conoide, pero con roptrias de aspecto piriforme, anillo polar y, a veces, con microtúbulos subpediculares y micronemas), las roptrias y los micronemas participan en la adhesión e invasión a la célula blanco; también presenta organelos comunes de células eucariotas como se muestra en la figura 1.



*Babesia* es típica de reproducción alternante sexual y asexual. Los gametos no tienen flagelos y se alimentan por pinocitosis a partir de glóbulos rojos, cuya hemoglobina hidrolizan, sin dejar pigmentos, al contrario de lo que ocurre con *Plasmodium*. Metabolizan la glucosa dando lugar a la formación de ácido láctico, así como la manosa, el inositol y las proteínas (Navarrete *et al.*, 1999).



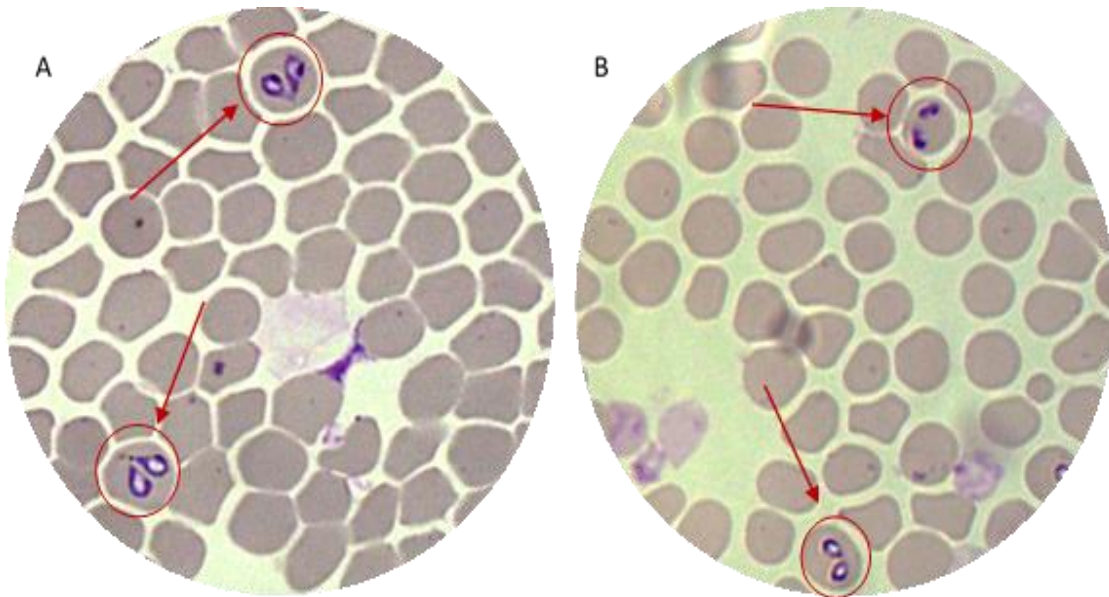
**Figura 1.** Diagrama de un merozoito de *Babesia* spp.

Fuente: Parasitología Interactiva, 2018.

### 2.3 Morfología

*Babesia bigemina* es grande y pleomórfica; se identifica por un par de corpúsculos en forma de pera unidos en ángulo agudo dentro del eritrocito maduro. También hay formas redondas que miden entre 2 y 3  $\mu\text{m}$  y aquellas en forma de pera o alargadas que miden entre 4 y 5  $\mu\text{m}$ . En cambio *B. bovis*, aunque también es pleomórfica, es pequeña, está identificada como pequeños corpúsculos redondos o como corpúsculos en pares en forma de pera unidos en ángulo obtuso dentro de un eritrocito maduro. Las formas redondas miden

de 1 a 1.5  $\mu\text{m}$  y las de forma de pera de 1.5 a 2.4  $\mu\text{m}$  (Gasque, 2008). Por su parte, Núñez (2007), menciona que el eritrocito maduro del bovino mide 5.5  $\mu\text{m}$  de diámetro; de modo que *Babesia bigemina* abarca casi todo el eritrocito y *B. bovis* solo de una a dos cuartas partes del eritrocito maduro, como se observa en la figura 2.



**Figura 2.** Frotis sanguíneos teñidos con Giemsa: Eritrocitos parasitados, A) *B. bigemina* y B) *B. bovis*, bajo el objetivo de 100x.

Fuente: Unidad de Babesiosis, CENID-Salud Animal e Inocuidad, INIFAP.

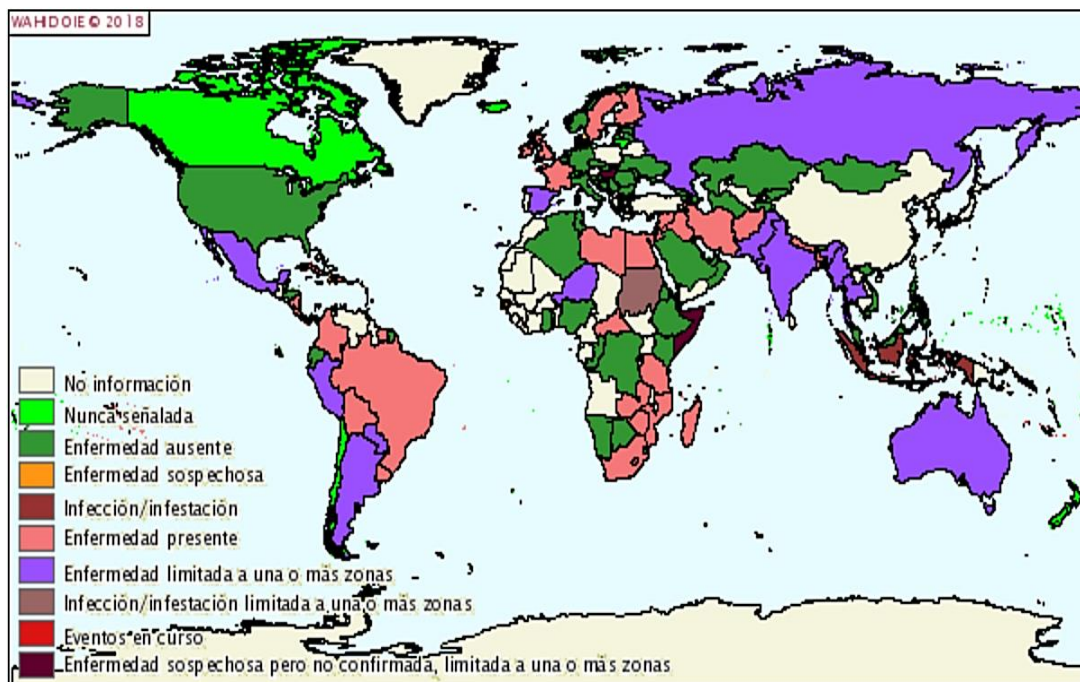
## 2.4 Epidemiología

La babesiosis bovina tiene tres componentes epidemiológicos principales: el vector, el agente causal y el huésped, a esta relación se le denomina triada epidemiológica y, el estado de equilibrio que existe entre estos tres elementos establece a la estabilidad enzootica (Meléndez, 1998). Además de la interacción de estos componentes, el modelo biológico puede manifestar otras características de acuerdo con las condiciones ambientales y sistemas de producción particulares (Solorio y Rodríguez, 1997a). Cabe destacar que

también se incluyen tres eslabones importantes, el primero formado por los animales enfermos o los portadores sanos; un segundo que sería el entorno ambiental, que regula la presencia de vectores en él y, por último, un tercer eslabón constituido por los animales receptivos (Navarrete *et al.*, 1999).

La babesiosis bovina se puede encontrar en cualquier lugar donde existan garrapatas, siendo más frecuente en zonas tropicales y subtropicales. *B. bovis* y *B. bigemina* son especialmente importantes en Asia, África, América Central y del Sur, partes del Sur de Europa y Australia (OIE-WAHIS, 2017). *Babesia divergens* es un parásito importante en partes de Europa (Reino Unido, España y el norte de Europa); su vector, *Ixodes ricinus*, puede sobrevivir desde el norte de Escandinavia hacia el Mediterráneo; por su parte, *Babesia major* se puede encontrar en algunas regiones de Europa, China, Noroeste de África y Asia; mientras que *Babesia ovata* se ha descrito en Japón, China y este asiático; *Babesia occultans* se ha informado de su presencia en África, y *Babesia jakimovi* en Siberia (Rovid *et al.*, 2010), la distribución mundial de *Babesia* spp. ocasionando la enfermedad en bovinos se representa en la figura 3, donde se puede observar la concordancia de la presencia de la enfermedad con los agentes patógenos descritos anteriormente con sus respectivos países, recalcando que en color verde se identifican los países donde la enfermedad está ausente, muy probablemente por las condiciones ambientales que no son óptimas para el desarrollo del vector.

En México las infecciones por *Babesia* comienzan a aparecer en los meses de abril y mayo, mientras que de junio a agosto es el periodo de máxima incidencia; descende la presentación del proceso en otoño y presentándose como escasa o nula incidencia en invierno (Navarrete *et al.*, 1999). Sin embargo, se han registrado focos de infección mayormente de julio a diciembre de 2005 a 2017 (OIE-WAHIS, 2017); esto de alguna forma es atribuido al calentamiento global y cambios climáticos globales (Cortés, 2010).



**Figura 3.** Mapa de la distribución mundial de babesiosis bovina. (OIE-WAHIS, 2017).

Se ha observado que se presenta baja morbilidad en el ganado vacuno que habita en zonas endémicas, debido a la resistencia por anticuerpos desarrollada frente al parásito o adquirida por calostro materno en becerros, gracias a la estabilidad enzoótica establecida (Polanco y Ríos, 2016). Por consiguiente, sólo se presenta la enfermedad cuando se rompe el equilibrio entre los tres componentes epidemiológicos por causas externas a estos, o cuando penetran en zonas endémicas hospedadores susceptibles, procedentes de otras áreas donde no han tenido contacto con *Babesia* spp y que tampoco se les haya realizado un plan de control y al no poseer un sistema inmunitario desarrollado por la presencia del protozoario, éste puede llegar a órganos vitales, producir alteraciones irreversibles y finalmente la muerte. Es por lo que se deben tomar en cuenta todos los factores que podrían afectar al ganado que se está introduciendo a una zona endémica y tomar ciertas medidas y prevenciones para evitar pérdidas ganaderas considerables (Navarrete *et al.*, 1999; Carriquiry, 2010).

## 2.5 Transmisión

La transmisión del parásito al bovino es por medio del vector *Rhiphicephalus microplus* y *Rh. annulatus* (anteriormente clasificadas como *Boophilus microplus* y *Boophilus annulatus*) con mayor y menor frecuencia respectivamente debido a su distribución (Figueroa *et al.*, 2015). En México se reconoce a los Estados de Sonora, Tlaxcala, Aguascalientes, Baja California y Chihuahua como libres del ectoparásito *Boophilus* spp, que comprende el 30.60% del territorio nacional.

En fase de erradicación (4) se encuentran los Municipios de Los Cabos y la parte sur de La Paz en Baja California Sur; los municipios de Ahome, El Fuerte y Choix en el norte de Sinaloa, en su margen derecha del río El Fuerte; los municipios de la zona Desierto del estado de Coahuila: Cuatro Ciénegas, Ocampo y Sierra Mojada en que abarca el 3.44% y el resto del país en control con el 65.96% (SENASICA, 2018).

Ha sido ampliamente estudiado que *Babesia bigemina* la transmite la garrapata solo en estadios de ninfa y adulto, mientras que *Babesia bovis* en estadio de larva, además de que el desarrollo y la alimentación de la garrapata vector tienen una influencia importante en la transmisión de la enfermedad (Dalglish *et al.*, 1978; Alonso *et al.*, 1992; Rovid *et al.*, 2010). Estos parásitos pueden transmitirse por vía transovárica a varias generaciones, aunque esto varía según la especie de *Babesia* y la de garrapata (Bravo, 2012).

*Babesia* también se puede transmitir entre animales por inoculación directa. Las moscas y los fómites contaminados por sangre infectada podrían actuar como vectores mecánicos, aunque se piensa que este método de transmisión no tiene gran importancia (Bravo, 2012).





**Figura 4.** Distribución de la garrapata *Boophilus spp.*

Fuente: SENASICA, 2019.

## 2.6 Ciclo biológico

*Babesia* tiene un complejo ciclo biológico, con formas evolutivas diferentes en el hospedador definitivo (bovino) y en el hospedador intermediario o vector (garrapata). Cuando la garrapata succiona sangre inocula los esporozoítos de *Babesia spp.* que se introducen en los glóbulos rojos del bovino, donde realiza una reproducción asexual (fisión binaria) después se lisa el glóbulo rojo y cada merozoito invade un nuevo eritrocito produciéndose merogonias sucesivamente. La multiplicación es asíncrona y se pueden presentar varias etapas de división del parásito en el torrente sanguíneo al mismo tiempo que invaden nuevos glóbulos rojos (Carrique y Rivera 2000; Chauvin *et al.*, 2009).

La multiplicación de los parásitos en los vertebrados tiene lugar en los eritrocitos mediante un proceso de gemación (esquizogonia), que da lugar a dos, cuatro o más trofozoítos, estas formas salen de los hematíes e invaden a otros, repitiéndose el proceso hasta que esté parasitado un gran número de glóbulos rojos. El ciclo continúa cuando una garrapata ingiere eritrocitos parasitados. Los trofozoítos de *Babesia* spp. se liberan del glóbulo rojo mediante un proceso de digestión en la garrapata (Soulsby, 1987; Quiroz, 2008).

Cuando los eritrocitos infectados con *Babesia* son ingeridos por las garrapatas, la mayoría de los parásitos se degeneran y se destruyen; sin embargo, algunos estadios específicos del parásito (pre-gametocitos) sobreviven para desarrollarse en gametocitos, estos se transforman en gametos masculinos y femeninos que se fusionan en el lumen del tracto digestivo de la garrapata para formar un cigoto alargado de 8 a 10  $\mu\text{m}$  de longitud que lleva un organelo similar al pico de una cabeza de flecha, que facilita su penetración en las células del intestino medio formando un cigoto después de la fusión (Chauvin *et al.*, 2009).

Posteriormente, el cigoto se desarrolla en una etapa infecciosa, después de cuatro días penetra en las células epiteliales de los tubos de Malpighi de la garrapata donde tiene lugar una fisión múltiple del núcleo, formando cuerpos de fisión y de ellos se desarrollan vermículos o kinetos móviles que destruyen las células intestinales, escapan a la hemolinfa y se distribuyen en los diferentes tipos de células y tejidos, incluyendo los ovarios donde muchos huevos son infectados con *Babesia* spp. (transmisión transovárica). Cuando la garrapata hembra pone sus huevos, los embriones ya están infectados (Navarrete *et al.*, 1999; Rovid *et al.*, 2010).

A medida que las larvas se desarrollan, penetran en las células epiteliales del intestino donde tiene lugar una fisión múltiple del núcleo, con formación de más vermículos, los cuales migran a las glándulas salivales de la garrapata (Olsen, 1977; Quiroz, 2008). Posteriormente, *Babesia* se multiplica asexualmente, continuando como esporogonia y el desarrollo de numerosos kinetos

(esporoquinetos), algunos kinetos invaden las glándulas salivales de las garrapatas, donde se desarrollan en esporozoitos (Rovid *et al.*, 2010).

Al romperse las células epiteliales infectadas, los vermículos pasan al lumen intestinal, y la hemolinfa, emigran a las glándulas salivales de la ninfa, se redondean y aumentan de tamaño, reproduciéndose de nuevo asexualmente, donde permanecen hasta ser inoculados (Olsen, 1977; Quiroz, 2008). Los parásitos de *B. bovis* generalmente pueden ser infecciosos 2 a 3 días posteriores a que se prenden a las larvas de las garrapatas y se pueden transmitir a través de las larvas. En *R. microplus*, *B. bovis* no sobrevive más allá del estadio larval. Por el contrario, *B. bigemina* madura aproximadamente 9 días después de que la larva de garrapata se prende y sólo se transmite a través de ninfas y adultos (Rovid *et al.*, 2010).

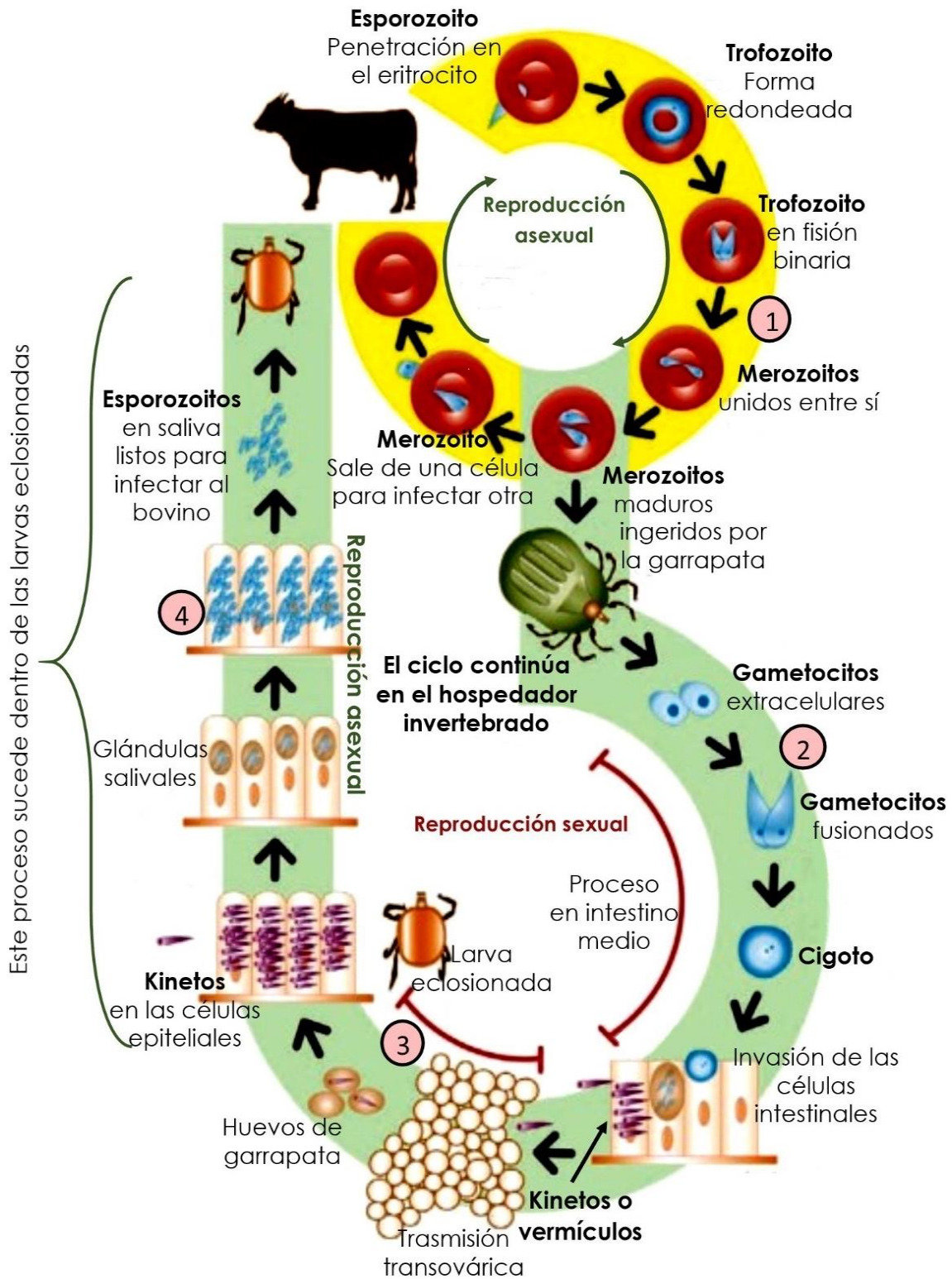
Se ha visto que, al momento de alimentarse del hospedero vertebrado, los esporozoítos penetran con la saliva y pasan a la sangre, apareciendo en los eritrocitos entre los 8 a 12 días posteriores. En esencia, el desarrollo y la transmisión de *Babesia* spp. en las garrapatas de un hospedador se realiza por vía transovárica, puesto que, una vez fijada la larva, el resto de las fases del desarrollo tienen lugar en el mismo animal (Soulsby, 1987; Quiroz, 2008).

El ciclo puede resumirse en cuatro etapas de reproducción de *Babesia* spp.

1. Fisión binaria en los eritrocitos
2. Fisión múltiple en epitelio intestinal y túbulos de Malpighi
3. Fisión múltiple en ovarios e invasión de huevos.
4. Fisión múltiple en intestino y glándulas salivales de larva o ninfa (Quiroz, 2008).

Estas etapas se muestran detalladamente en la figura 5, implementando la explicación gráfica del ciclo biológico.





**Figura 5.** Ciclo biológico de *Babesia bovis*

Fuente: Modificado de (Mosqueda *et al.*, 2012).

## 2.7 Patogenia

Existen tres factores que podrían condicionar la patogenia de la enfermedad.

1. Dependientes del hospedador, por ejemplo, que los becerros son más resistentes que los adultos y más sensibles los *Bos taurus* que los *Bos indicus*, los bovinos esplenectomizados son más susceptibles que los completos, la alimentación, sanidad y estado fisiológico en el que se encuentra el animal.
2. Dependientes del parásito: la especie *B. bovis* es más patógena que *B. bigemina*, tropismo del parásito y capacidad de multiplicación.
3. Dependientes del medio ambiente, como la presencia e intensidad de los vectores competentes (Navarrete *et al.*, 1999).

La infección se produce por la saliva de las garrapatas infectadas al morder al bovino o por inoculación parenteral de sangre; *Babesia* ejerce acción traumática al liberarse del eritrocito, acción expoliatriz al alimentarse de hemoglobina, acción mecánica al formar acúmulo de parásitos a nivel capilar y finalmente una acción tóxica con los productos metabólicos de merozoítos demostrada a nivel de SNC (Quiroz, 2008).

*Babesia bovis* es mucho más patógena que *Babesia bigemina* al inducir un fenómeno de coagulación intravascular diseminada, lo que origina un cuadro de tipo hemorrágico en diversos órganos y posibles alteraciones en el sistema nervioso, al bloquearse el riego sanguíneo al cerebro (Carrique *et al.*, 2000). En cambio, *Babesia bigemina* se multiplica primero en los eritrocitos de los capilares de los órganos internos y posteriormente aparecen en la sangre periférica (Quiroz, 2008).

En la presentación de la enfermedad por lo general hay hemólisis, edema, anemia, trombosis, al igual que formación de inmunocomplejos que se depositan en la membrana basal de los epitelios, y provocan procesos vasculares y digestivos en la enfermedad. Los eritrocitos (parasitados o no) son marcados por el complemento y al ser fagocitados y capturados por macrófagos

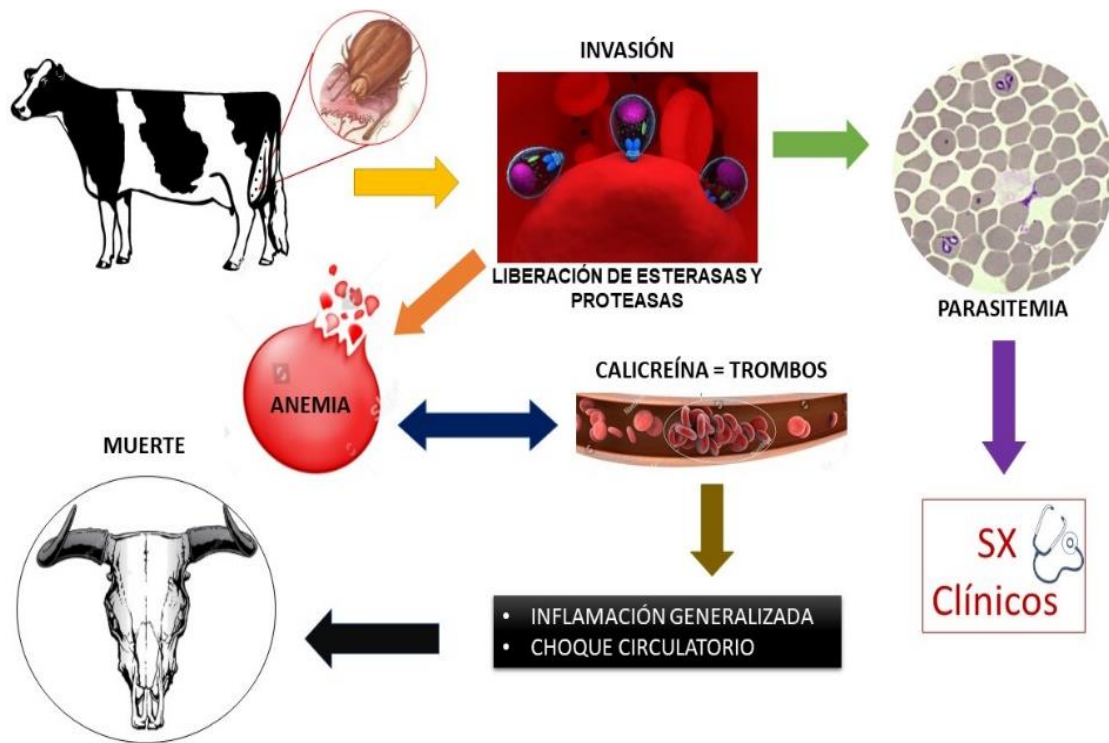
que reconocen a aquellos hematíes dan lugar a la formación trombos (Navarrete *et al.*, 1999).

Mecanismos tales como la disfunción hepática, desequilibrio electrolítico, presencia de coagulación intravascular diseminada, alteración de plaquetas debido a la trombocitopenia, nitrógeno ureico, bilirrubina aumentados e incluso la presencia de los metabolitos del parásito conducen a una inflamación generalizada, choque circulatorio y muerte del animal (Boero, 1976; Quiroz, 2008 y Bravo, 2012).

Se genera una pérdida de productos de degradación del fibrinógeno, debido a que los merozoítos liberan dentro de los glóbulos rojos sustancias enzimáticas (esterasas y proteasas), por esta causa se forman trombos, dando lugar a procesos de coagulación intravascular diseminada favorecida por formación de calicreína, por activación de precalicreína que se encuentra de manera natural en la sangre (Navarrete *et al.*, 1999). Los antígenos fijadores del complemento tienen amplio rango para ambas enzimas; estas hemolizan tanto la hemoglobina natural como la desnaturalizada (Quiroz 2008). En cepas virulentas de *B. bovis* estas enzimas han mostrado ser quimioatrayentes para leucocitos polimorfonucleares; se presentan cambios morfológicos en la membrana plasmática y los eritrocitos infectados quedan retenidos en capilares pulmonares y cerebrales causando el secuestro de eritrocitos y neutrófilos provocando anoxia (Uilenberg 1995; Brown y Palmer 1999; Ortega *et al.*, 2009). Las coagulopatías ocasionadas por *Babesia*, junto a la liberación de sustancias tóxicas procedentes de excretas y detritus celulares y tisulares, y a la destrucción de glóbulos rojos, explican la actividad patógena de hipoxia de los órganos y tejidos del animal afectado (Navarrete *et al.*, 1999).

En la figura 6 se observa un esquema de la patogenia de la enfermedad desde la mordedura de la garrapata (inoculación del parásito al bovino), posterior invasión de eritrocitos gracias a la liberación de metabolitos, hay lisis de glóbulos rojos, parasitemia y signología clínica; cabe mencionar que la lisis de eritrocitos causa anemia y activación de calicreína que provoca trombosis

general, de esta manera se provoca una inflamación generalizada, choque circulatorio y la muerte del animal.



**Figura 6.** Mecanismo de acción patógena en babesiosis de rumiantes.

Fuente: Elaborado por el autor; imágenes tomadas del INIFAP (Laboratorio de babesiosis), Shutterstock y Google imágenes.

## 2.8 Signos clínicos

Los signos clínicos en el hospedador varían en intensidad, dependiendo de la virulencia de la cepa de *Babesia*, la cantidad inoculada, la edad del animal, el estrés, la raza, estado fisiológico y en los animales jóvenes de zonas endémicas, el grado de inmunidad transferida por el calostro (Morilla, 1981).

La enfermedad en el ganado bovino adulto se caracteriza por aumento súbito de la temperatura de hasta 42°C. La fiebre permanece por tres días o más, acompañada de depresión, pérdida de apetito, atonía del rumen y constipación,

aumento del pulso y respiración, postración y rápida disminución de la producción en vacas lecheras. Al inicio de la enfermedad las mucosas se tornan pálidas y la orina no presenta anomalías; cuando los eritrocitos se destruyen, las mucosas se tornan ictericas, el animal se debilita y pierde masa muscular, la frecuencia cardiaca y respiratoria aumentan bastante y la orina es de color rojo vino o café (hemoglobinuria); puede manifestarse un síndrome de insuficiencia respiratoria con disnea, postración en tres o cuatro días, temblor muscular, lagrimeo y salivación en animales afectados gravemente (Quiroz, 2008; Rovid *et al.*, 2010).

La fiebre puede producir abortos en vacas preñadas y los toros a veces presentan una disminución temporal de la fertilidad; parte del ganado bovino puede aparecer postrado con movimientos involuntarios en las piernas y la mayoría de los animales con signos nerviosos muere (Rovid *et al.*, 2010).

Los animales que sobreviven a la fase aguda desarrollan un síndrome crónico que puede durar varias semanas y sigue un curso irregular, con elevaciones intermitentes de la temperatura que a veces alcanzan de 40 a 40.6 °C; hay adelgazamiento y emaciación, aunque en esta fase la hemoglobinuria no es marcada y finalmente los animales se recuperan. En animales jóvenes la infección suele ser asintomática, y generalmente va asociada a una carga parasitaria baja (Soulsby, 1987).

La infección en los becerros está caracterizada por fiebre moderada, inapetencia y depresión de pocos días de duración, con ligera destrucción de eritrocitos y no hay hemoglobinuria; la recuperación es rápida después de que la fiebre declina y los becerros recuperados permanecen como portadores de la infección de por vida y son medianamente resistentes a reinfecciones (Quiroz, 2008).

## 2.9 Inmunología

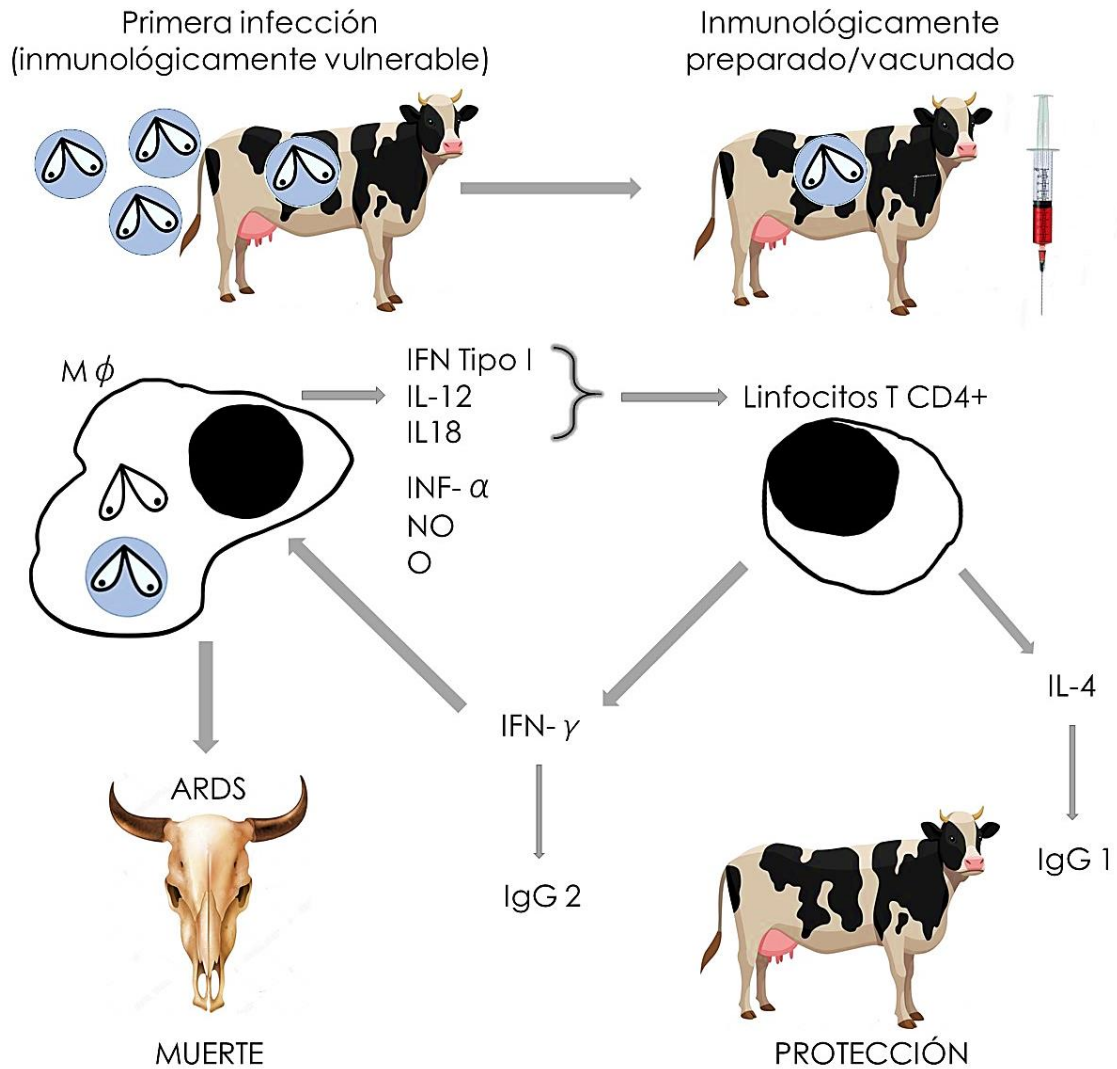
La inmunidad innata y adaptativa están involucradas en el mecanismo de defensa en los bovinos ante infecciones por babesiosis. Sin embargo, es importante recalcar que la inmunidad innata es mucho mayor en terneros de 6 a 9 meses que en animales adultos, debido a los anticuerpos provenientes del calostro materno. Además, la respuesta inmunológica en terneros involucra la producción temprana de IL-12 e INF- $\gamma$  y la inducción de la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS) y en animales adultos, la producción de IL-12 e INF- $\gamma$  aparece más tarde en la infección y la iNOS no es inducida (Goff *et al.*, 2002).

En una primera exposición a *Babesia* spp. (primoinfección), los esporozoítos se liberan en el plasma sanguíneo por un periodo de tiempo muy corto, aparecen inmunoglobulinas de tipo M, por ser el inicio de la infección, pero estas IgM no son específicas para la babesiosis; después se elevan los niveles de otro tipo de inmunoglobulinas, las de tipo G (IgG), que son las específicas para este parásito. En ese momento, las IgG intervienen en la etapa temprana de la infección y actúan como opsonizantes marcadores para la fagocitosis, neutralizando a los esporozoítos antes de que éstos penetren a los eritrocitos (Homer *et al.*, 2000; Quiroz, 2008). Después, cuando el parásito establece la infección intraeritrocítica, el merozoíto tiene como función localizar, adherirse e invadir los glóbulos rojos del hospedero, ya que *Babesia* invade únicamente eritrocitos; esta especificidad implica la presencia de un receptor en el eritrocito, que es reconocido por un ligando complementario en el parásito. Se ha demostrado que varias moléculas de *Babesia* tienen la capacidad de unirse a los hematíes in vitro por lo que desempeña un papel importante en la invasión (Cheryl, 2005). Durante esta etapa, la parasitemia se puede agudizar y las células de la respuesta inmunitaria innata son responsables de controlar los niveles de parasitemia del parásito. Si el sistema inmune del bovino se encuentra inmunocomprometido y no hay suficiente existencia de la primera línea de defensa (macrófagos, monocitos activados y células asesinas "Natural Killer" (NK) para atacar los mecanismos invasivos desarrollados por *Babesia*,

se desarrolla una parasitemia alta en un periodo corto; la inhibición es llevada a cabo por la producción de factores solubles como el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), por células NK y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), óxido nítrico (NO) y especies reactivas del oxígeno (ROS) producidos por los macrófagos (Homer *et al.*, 2000). Se sabe que el óxido nítrico, puede penetrar al eritrocito para atacar a los merozoitos y destruirlos dando como resultado formas de crisis (Bautista-Garfias, 2016).

Posterior a esto, los niveles de parasitemia en la babesiosis generalmente alcanzan un máximo y luego disminuyen. La disminución en el número de parásitos parece deberse en parte, a la degeneración intracelular dentro del eritrocito. Por otro lado, los linfocitos T son células responsables del aclaramiento del parásito, específicamente los linfocitos T CD4+, que producen INF- $\gamma$  e Interleucina-4 (IL-4), donde activarán la producción de IGg2 y la IL-4 que desencadena activación de IGg1, estas inmunoglobulinas serán las encargadas de dar protección inmunológica larga al bovino contra la siguiente exposición de cepas homólogas y heterólogas (Homer *et al.*, 2000; Ortega *et al.*, 2009). Aunque existe la contraparte, que el INF- $\gamma$  provoque sobreproducción del Factor de Necrosis Tumoral (TNF- $\alpha$ ), oxígeno (O<sub>2</sub>) y óxido nítrico (NO) que, aunque anteriormente se mencionó que favorece a la destrucción del parásito dentro del eritrocito, si hay producción masiva provoca intoxicación al bovino y por consiguiente la muerte del individuo (figura 7). Esto depende mucho del sistema inmunológico de cada animal. (Brown y Palmer, 1999; Bautista-Garfias, 2016).

Es importante destacar que, después de la primera infección, el hemoparásito permanecerá dentro del hospedador durante prácticamente toda su vida, pero el animal ya no sufrirá de nuevo la enfermedad (estado de premunidad), además este hecho será detectable porque el animal siempre tendrá niveles de IgG específicas para *Babesia* en su sangre (Carrique *et al.*, 2000).



**Figura 7.** Mecanismos de respuesta inmune innata y adaptativa propuestos contra *B. bovis*.

Fuente: Adaptado de (Brown y Palmer 1999).

Durante la infección aguda de un bovino inmunológicamente vulnerable, los macrófagos activados producen citoquinas proinflamatorias e intermediarios reactivos del oxígeno y el nitrógeno. Sin embargo, la sobreproducción de  $TNF\alpha$  puede ocasionar una patología caracterizada por babesiosis cerebral y síndrome de distrés respiratorio agudo en bovinos adultos (ARDS) y muerte. En el ganado immuno-preparado, los macrófagos activados producen citocinas como  $IFN-\alpha$ , IL-12 e IL-18 que promueven producción de  $IFN-\gamma$  por células T



CD4+. Se requiere INF- $\gamma$  para activar los macrófagos para producir moléculas babesicidas y para mejorar una respuesta opsonizante de anticuerpos tipo IgG2. Las células T CD4+ también producen IL-4, lo que mejora la producción de IgG1. Tanto el anticuerpo como las células T CD4+ activadas son importantes para mantener la inmunidad protectora (Brown y Palmer, 1999).

## **2.10 Lesiones postmortem**

En el ganado que muere en la fase inicial de la infección, los pulmones pueden estar edematosos y congestionados, el saco pericárdico puede contener líquido serosanguíneo y hemorragias subepicárdicas y subendocárdicas de tipo petequiral; el hígado se encuentra aumentado de tamaño e icterico, y la vesícula biliar puede mostrar hemorragias en la superficie mucosa y estar distendida con bilis gruesa y de color verde oscuro, el bazo está marcadamente aumentado con consistencia pulposa y obscura. El abomaso y la mucosa intestinal se pueden observar ictericos y, en algunas partes, con hemorragias subserosas. La sangre está delgada y acuosa; la vejiga urinaria frecuentemente está distendida, la orina oscura de color rojo café; la ictericia comúnmente está distribuida en el tejido conectivo; los ganglios linfáticos están edematosos y pueden presentar petequias (Bravo, 2012).

En el ganado que ha sufrido un proceso más prolongado, las lesiones agudas son menos evidentes, se pueden encontrar hemorragias petequiales subepicárdicas; el cadáver generalmente está emaciado e icterico y la sangre es delgada y acuosa, las fascias intermusculares están edematosas, el hígado de color café, y la bilis puede contener escamas de material semisólido. Los riñones se ven pálidos, con frecuencia edematosos y la vejiga puede contener orina normal, dependiendo de cuánto ha pasado desde la crisis hemolítica hasta la realización de la necropsia; aun cuando el bazo se ve aumentado, la pulpa es más firme que en la babesiosis aguda (Gasque, 2008).

Los capilares de la materia gris del cerebro y del cerebelo están distendidos con eritrocitos infectados, generalmente no hay evidencia de una degeneración neuronal o de hemorragia. En casos de *B. bovis* se aprecia dilatación de los espacios perivasculares y edema intersticial (Gasque, 2008).

## **2.11 Diagnóstico de campo**

Se realiza por la observación de signología clínica: fiebre, anemia, ictericia y hemoglobinuria, ya que estos son signos clínicos sugestivos de babesiosis en el bovino localizado en zonas con poblaciones de garrapatas *Rhiphicephalus*. Si estos signos están también ligados a esplenomegalia y a lesiones *post mortem* asociadas con destrucción eritrocítica, el diagnóstico de babesiosis se refuerza. El diagnóstico positivo requiere la identificación de la *Babesia* en los frotis sanguíneos o pruebas serológicas positivas (Núñez y Bouda, 2007).

## **2.12 Diagnóstico de laboratorio**

Para realizar un diagnóstico preciso, es muy importante que se correlacionen los datos anamnésticos, diagnóstico clínico y los resultados de los análisis de laboratorio; existen 2 tipos de métodos de diagnóstico, las técnicas directas e indirectas (Camacho, 2002).

### **2.12.1 Técnicas directas**

#### **2.12.1.1 Frotis sanguíneo**

Le llaman la “prueba de oro”, por su rapidez y economía para el diagnóstico de la babesiosis aguda (Lew y Jorgensen, 2005, Costa-Júnior *et al.*, 2006); esta técnica es de observación microscópica de parásitos de un extendido/barrido sanguíneo teñido. Aunque existen dos tipos de extendidos sanguíneos: los gruesos y los delgados, para babesiosis sólo se utiliza el de tipo delgado, se fija con metanol y se tiñe generalmente con Giemsa, aunque también se utilizan las tinciones de tipo Romanowsky y las modificadas de esta (Gasque, 2008).

### **2.12.1.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

La técnica de PCR es un método enzimático “*in vitro*”, que amplifica millones de veces secuencias de ADN específicas, esta técnica involucra la combinación de una muestra de ADN con oligonucleótidos iniciadores, trifosfatos de desoxinucleótidos y una enzima termoestable (Solorio y Rodríguez, 1997b).

Esta técnica ha facilitado el desarrollo de numerosos métodos para identificar y caracterizar bacterias, parásitos y virus de importancia en medicina humana y veterinaria (Pfeffer *et al.*, 1995). Debido a su alta sensibilidad, especificidad y velocidad, la PCR ofrece ventajas sobre los métodos de diagnóstico convencionales (Pfeffer *et al.*, 1995; Solorio y Rodríguez, 1997b; Sharma *et al.*, 2016).

### **2.12.1.3 Improntas de órganos afectados**

Las improntas se realizan postmortem de los animales afectados, con un portaobjetos fijadas con metanol y se tiñen de igual forma que un frotis sanguíneo para confirmar al agente patógeno causante (SENASA 2006). Por ejemplo, si el animal muere con signología nerviosa, las improntas cerebrales son de gran ayuda para detección de *B. bovis*, ya que este parásito se aloja principalmente en los capilares cerebrales causando el secuestro de eritrocitos infectados (Solorio y Rodríguez, 1997b; OIE, 2014). Para detección de babesiosis también son útiles otros órganos irrigados, como el corazón, bazo o riñón (Lew y Jorgensen, 2005).

### **2.12.1.3 Pruebas de hemolinfa**

Para esta técnica, lo que se hace es cortar una pata de la garrapata con unas tijeras pequeñas para obtener una gota de hemolinfa sobre un portaobjetos. Por lo general, la gota es demasiado pequeña para hacer un barrido, por lo que se deja secar, fijar y teñir como una muestra de sangre regular. Esta prueba

requiere un microscopista con experiencia ya que las garrapatas hembra recolectadas de ganado en áreas endémicas tienen una cantidad muy baja de kinetos (Mosqueda, *et al.*, 2012).

## **2.12.2 Técnicas indirectas**

### **2.12.2.1 Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)**

Con la inmunofluorescencia indirecta (IFI) se logra poner en función un único antisuero marcado, común para cualquier antígeno que se logra mediante la inmunización de una cabra u oveja, con la inmunoglobulina de un bovino sano, de donde se obtiene un complejo inmunológico de anticuerpo (anti-inmunoglobulina) de bovino. Este complejo se marca con un fluorocromo y puede reaccionar por tanto con cualquier anticuerpo de bovino como si se tratase de un antígeno (Franco, 2005).

Esta técnica se basa en el reconocimiento de antígenos del parásito por anticuerpos séricos en la sangre del animal a examinar. Los anticuerpos unidos se detectan por un anticuerpo marcado con fluorocromo (anticuerpo secundario) anti-Inmunoglobulina (Mosqueda, *et al.*, 2012). La reacción se visualiza al ser iluminada con luz ultravioleta de alta intensidad, la observación de fluorescencia verde sobre el parásito y eritrocitos indica la presencia de anticuerpos específicos en el suero problema (Echaide *et al.*, 1995).

El isotiocianato de fluoresceína (FITC) se ha utilizado como el fluorocromo estándar para esta técnica serológica, sin embargo, tintes fluorescentes más nuevos como Alexa-488 (Invitrogen, EE. UU.), o Dylight-488 (Jackson Immuno Research, EE. UU.), ofrecen mejores opciones debido a su mejor fotoestabilidad y brillo y un rango de pH más amplio (Mosqueda *et al.*, 2012).

La técnica de IFI tiene limitaciones prácticas, pues la técnica es subjetiva y necesita personal bastante capacitado y con experiencia, además de que el

número de muestras que se pueden procesar son escasas (Echaide *et al.*, 1995; Mosqueda *et al.*, 2012).

#### **2.12.2.2 Prueba de ELISA**

El procedimiento del Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés), fue publicado por primera vez por Enevall y Perlmann en 1971. A diferencia de la técnica por IFI no es subjetiva, más bien objetiva, además de que se pueden leer una mayor cantidad de muestras de manera más fácil y rápida (Mosqueda *et al.*, 2012). La reacción de la técnica es la unión covalente de enzimas a las moléculas de las inmunoglobulinas produciendo un instrumento inmunológico que posee alta especificidad y alta sensibilidad. Las enzimas enlazadas, incluyen peroxidasa, fosfatasa alcalina y galactosidasa ya que son catalizadores y producen color al reaccionar (Ramírez y Ayala, 2014).

Los métodos del ELISA recientes incluyen el uso de antígenos recombinantes y anticuerpos monoclonales, aumentando así la especificidad y disminuyendo la unión y señal inespecíficas (Mosqueda *et al.*, 2012); entre los antígenos recombinantes se destacan las proteínas superficiales RAP-1 de 58 kDa (Molloy *et al.*, 1998) y la p200 (Tebele *et al.*, 2000).

### **2.13 Diagnóstico diferencial**

La babesiosis se asemeja a otras enfermedades que producen fiebre y anemia hemolítica, el diagnóstico diferencial incluye en primer lugar a la anaplasmosis, ya que esta enfermedad provoca signos clínicos muy similares a la babesiosis, además de que también es transmitida por la garrapata *R. microplus*, (Rovid *et al.*, 2010; OIE, 2015); tripanosomiasis que produce fiebre, anemia, pérdida de peso y también es transmitida por vectores, entre ellos la garrapata *R. microplus* (Rovid *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2003); intoxicación crónica por cobre, que provoca el rompimiento de los eritrocitos provocando así hemoglobinuria

(Tarazona *et al.*, 1986), leptospirosis ya que también provoca hemoglobinuria (Vanzini y Ramírez, 1994), hemoglobinuria bacilar que como su nombre lo dice, ocasiona hemoglobinuria (Morales, 2010), entre otras como la eperitrozonosis y teileriosis, pero estas dos últimas no están presentes en México (Ríos y Osorno, 1971). La rabia y encefalitis también pueden ser consideraciones de diagnóstico diferencial para babesiosis por *B. bovis* en el ganado bovino por la signología nerviosa presentada. Aunque cabe mencionar que México no presenta riesgo de encefalopatía espongiiforme bovina (Bravo, 2012; SENASICA, 2016).

## **2.14 Tratamiento**

El control de la babesiosis bovina se puede realizar mediante la inmunización, con fármacos anti-babesiales o por la combinación de estas (Suárez y Noh, 2011). El Tripan azul, es la sal sódica del ditolil-diazo-bis-8 amino-1-naftol-3, 6 del ácido bisulfúrico; fue de los primeros que se utilizaron; es efectivo contra *Babesia bigemina*, pero no contra *Babesia bovis*. Tiene el inconveniente de teñir los tejidos de color azul verde, es cáustico, por lo que debe aplicarse por vía endovenosa, en solución al 1% en dosis de 50 a 100ml (Navarrete *et al.*, 1999). Asimismo, el aceturato de diminazeno, se emplea para el tratamiento de babesiosis, en dosis única de 3 a 8 mg/kg peso vivo, por vía intramuscular. El dipropionato de imidocarb, actúa directamente sobre la glucólisis del parásito bloqueando la replicación del ADN, además de tener actividad terapéutica, tiene una acción protectora frente a la *Babesia* que dura entre 4 a 6 semanas; se aplica dosis única de 1.2 mg/kg peso vivo, subcutáneo. Para esterilización de portadores se requiere una dosis de 2 mg/kg peso vivo (Rebhun *et al.*, 1999; Bravo 2012).

## **2.15 Prevención y control**

Para el establecimiento de programas adecuados de prevención y control de la enfermedad, no solo se necesita saber la prevalencia de la enfermedad en los animales hospederos, sino que es primordial conocer el grado de infestación por garrapatas en los bovinos, así como también la prevalencia e intensidad de infección de las garrapatas por *Babesia* (Figuroa *et al.*, 2015).

Existe una serie de métodos y estrategias identificadas, las cuales son aplicables al control de la babesiosis (Ramírez *et al.*, 1997), éstas incluyen:

- Control del vector
- Control de la movilización del ganado
- Uso de ganado resistente
- Inmunización

### **2.15.1 Control del vector**

El control es químico y rompe con el ciclo de vida del ácaro, aunque se sabe que ya no funcionan del mismo modo estas sustancias químicas debido al uso inadecuado y ha provocado resistencia de las garrapatas a ciertos químicos (Cantú y García, 2013; Rodríguez *et al.*, 2014). También se utilizan con baños de inmersión, fumigación por aspersión y con mochilas o espray de mano, este último requiere mayor mano de obra, además de que no siempre se llega a cubrir todo el cuerpo (Bravo, 2012).

Existe una vacuna contra garrapatas, y su efecto es sobre las células del epitelio intestinal, donde se localiza el antígeno Bm86 provocando la muerte; y disminuyendo paulatinamente la carga parasitaria a las siguientes generaciones. Esta vacuna no elimina por completo el uso de químicos, pero sí es de gran apoyo para intercalar vacuna e inmersión y así reducir la resistencia (Rosario *et al.*, 2010).

Otros métodos de control serían el descanso de praderas, de esta manera se evita que las larvas o ninfas tengan huéspedes para alimentarse en su estado de vida libre, provocando así su muerte; la quema de praderas también afecta directamente a las garrapatas y su protección vegetativa; la introducción de depredadores naturales como garzas y pájaros es de gran apoyo para su control (Rodríguez *et al.*, 2014).

### **2.15.2 Control de la movilización del ganado**

Dentro del manejo integral de la enfermedad se ha considerado que el ganado que se va a movilizar esté libre de garrapatas para evitar la introducción de vectores infectados a regiones libres de vectores y enfermedades que transmiten. Sin embargo, lo más importante es vacunar o premunizar al ganado que será introducido a zonas endémicas de la enfermedad, sobre todo aquel que proviene de zonas libres de garrapatas (Hernández *et al.*, 2010).

### **2.15.3 Uso de ganado resistente**

Por lo general, los becerros nacidos de madres resistentes a garrapatas están protegidos hasta el destete. Se ha demostrado que la resistencia es hereditaria y aumenta mediante la selección de animales. Las razas europeas *Bos taurus* son más susceptibles en comparación con razas *Bos indicus* que llegan alcanzar hasta un 99% de resistencia. Los bovinos del genotipo *B. indicus*, presentan de 10 a 20% menos garrapatas que las *B. taurus* (Rodríguez *et al.*, 2011). Por su parte, Rodríguez *et al.*, (2006), afirman que “la resistencia a las garrapatas por parte del bovino se manifiesta con una reducida repleción de la hembra, prolongados períodos de alimentación, disminución en la oviposición, baja o nula viabilidad de los huevos, cese de etapas evolutivas y muerte de ninfas”.



#### 2.15.4 Inmunización

Ramírez *et al.*, (1997), mencionan que la inmunización es de las mejores alternativas para resolver la enfermedad y que, sin importar la fuente o tipo de antígeno, la vacuna ideal contra la babesiosis debe reunir las siguientes cualidades:

- Prevenir clínicamente la enfermedad en condiciones de campo.
- Proteger contra todas las cepas de los parásitos.
- Inducir una protección prolongada con solo una o dos inoculaciones.
- No contener antígenos o infecciones contaminantes.
- Disponibilidad en grandes cantidades.
- Costo razonable.
- Segura y fácil de administrar.

Actualmente no existe ninguna vacuna comercial en México que proteja al ganado bovino contra la babesiosis. Sin embargo, en el Centro Nacional de Investigación disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CENID-SAI, INIFAP) se desarrolló una vacuna viva atenuada contra *Babesia bovis* y *B. bigemina* (Cantó *et al.*, 2003). La cual puede ser obtenida mediante convenios para experimentos en el CENID-SAI, INIFAP.

En la mayoría de los casos 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 alto valor genético o susceptibles a regiones endémicas. La vacuna debe conservarse y manipularse estrictamente en nitrógeno líquido hasta el momento de su uso. A partir de la vacunación, los animales deben mantenerse libres de garrapatas *Rhiphicephalus* spp. durante al menos 21 días, para asegurar su protección (INIFAP, 2003).

## 2.16 Antígeno

Los parásitos Apicomplexa contienen varios organelos secretores, que incluyen roptrias y micronemas que son necesarios para importantes funciones del parásito, incluida la invasión de la célula huésped (Suraez *et al.*, 1991a).

Los genes más estudiados de *Babesia bigemina* son: *rap-1*, *msa-1*, *msa-2c*, *sbp-1*; de la proteína asociada a roptrias (RAP-1) se han identificado variantes con polimorfismo de secuencia en las regiones amino-terminal y carboxi-terminal, lo que propone que la variación en las regiones con dimorfismo en secuencia de RAP-1 son inmunológicamente significativas. RAP-1 es una proteína muy conservada tanto en la especie como en el género por ello se utiliza en técnica de diagnóstico por PCR con elevada sensibilidad (Pérez *et al.*, 2012). Por otro lado, Suraez *et al.* (1991b), identificaron el gen de la proteína 1 asociada a roptrias de *B. bovis* (*rap-1*) que codifica un polipéptido de membrana apical de merozoíto de 60 kDa.

La actividad de RAP-1 tiene un papel importante en los mecanismos de invasión de células hospedadoras (Perkin, 1992; Suraez *et al.*, 1991a). Primero, el parásito involucra a los antígenos de la cubierta superficial para adherirse a receptores en la membrana de los eritrocitos y se liberan antígenos de organelos de *Babesia*, como los micronemas que ayudan a la orientación del parásito, de manera tal que su porción apical quede en contacto con la membrana del eritrocito y logre la penetración, facilitando la invaginación mediante la liberación de proteínas asociadas a roptrias y de los cuerpos esféricos (Jack y Ward, 1981; Mosqueda *et al* 2012a). RAP-1 es fuertemente inmunogénico para células T cooperadoras (Th) de ganado inmune de *B. bovis* y que, al igual que los epítomos de células B, los epítomos de células T se conservan en diferentes cepas de *B. bovis*, pero no en RAP-1 de *B. bigemina* (Brown *et al.*, 1996).

El uso de RAP-1 en pruebas de ELISA se ha reportado por varios grupos investigadores con diversos resultados (Boonchit *et al.*, 2002).

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La babesiosis bovina es una de las principales enfermedades que afecta al ganado bovino de clima tropical en México, ocasionando grandes pérdidas económicas a los productores. Por otro lado, el cambio climático ha desencadenado consecuencias de diferente índole en la tierra; influyendo de forma directa en la epidemiología de las enfermedades transmitidas por vectores; ya que el aumento de temperatura ha favorecido la probabilidad de muchas de estas enfermedades en nuevas áreas, como es el caso de la babesiosis bovina.

Se ha observado que el problema climático es un factor que favorece la presentación de babesiosis a nivel mundial, ya que produce condiciones ambientales óptimas para la garrapata y por consiguiente para el agente patógeno (*Babesia* spp.) y su desarrollo dentro del hospedero vertebrado. Además de que contribuye a que haya focos de infección en épocas donde era escaso o nulo y la presentación de la enfermedad en zonas donde se supone no son endémicos (no tropicales).

Por esas causas es que se han hecho estudios sobre la babesiosis, y aunque se ha recorrido un largo camino en la investigación de la enfermedad, aún no se sabe a profundidad el tema del control del vector, ya que no es recomendable tener sobrepoblaciones de garrapatas, debido a las reacciones que provoca en los animales y las consecuencias como la baja de producción lechera o cárnica por estrés. Algunos autores explican lo importante que es llevar a cabo un control integrado de garrapatas, sin afectar a la estabilidad enzoótica.

Otro tema importante de investigación es para encontrar un diagnóstico rápido de la enfermedad, del cual aún hay información que se desconoce, pues no existe un diagnóstico rápido y preciso de la enfermedad, debido a que generalmente es mediante la observación de la signología, presencia del vector y comprobación por medio de pruebas complementarias de laboratorio; es por esto por lo que hay alta morbilidad y mortalidad con efectos económicos altos;

si bien es muy importante diagnosticar la enfermedad de manera oportuna para disminuir las pérdidas económicas y la baja producción de leche o carne.

Hoy en día se cuentan con pruebas para el diagnóstico directo o indirecto de la enfermedad; no obstante, se debe realizar investigación pertinente que permita mantener o incluso aumentar la especificidad y sensibilidad diagnóstica de las pruebas, así como reducir los tiempos de ejecución, los costos de realización y que permitan incrementar el diagnóstico en un número de muestras mayor.

Por lo antes descrito, es de suma importancia evaluar la capacidad de anticuerpos (policlonales), con técnicas serológicas como Inmunofluorescencia indirecta o ELISA, esto para determinar su reactividad con el antígeno nativo y el antígeno recombinante de *Babesia bigemina* y continuar con un proyecto mayor.

#### IV. JUSTIFICACIÓN

Se ha mencionado que la babesiosis bovina es una de las enfermedades que mayor impacto económico tiene en la ganadería mexicana por las pérdidas económicas que produce en ganado productor de leche y carne; es una enfermedad de distribución mundial en climas tropicales y afecta gravemente a la producción bovina provocando un incremento en los costos de producción cada vez que hay un brote.

Los parásitos del género *Babesia* son transmitidos por garrapatas y las especies que afectan a los bovinos en México son *Babesia bovis* y *B. bigemina*, transmitidos principalmente por *Rhiphicephalus microplus* y en menor cantidad por *Rhiphicephalus annulatus*, se ha estudiado que si no existe una estabilidad enzoótica se desarrolla la enfermedad, principalmente en ganado adulto.

Debido a las grandes pérdidas que provoca esta enfermedad es que se hacen investigaciones encaminadas a determinar la forma más adecuada de realizar el control sin afectar la estabilidad enzoótica; pero sobre todo un diagnóstico de mayor rapidez y eficacia.

En el laboratorio de babesiosis del CENID-SAI, del INIFAP, se está trabajando con algunas investigaciones sobre el diagnóstico de la babesiosis; sin embargo, hasta el momento se tienen pruebas que apoyan en el diagnóstico de la enfermedad, ya que solo confirman el diagnóstico presuntivo del Médico Veterinario; mediante observación por microscopía óptica con frotis sanguíneos teñidos y detectar la especie de *Babesia* que está ocasionando patologías. Mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que también apoya en el reconocimiento de la especie de *Babesia* involucrada; sin embargo, esta técnica se utiliza con fines de investigación, ya que el precio de elaboración no es rentable para los productores.

Por último, se tienen las pruebas serológicas; Inmunofluorescencia indirecta (IFI) y Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA), ambas tienen como fundamento el reconocimiento antígeno-anticuerpo. La IFI es considerada

“estándar de oro” para la babesiosis bovina, ya que permite detectar por medio de microscopía de epifluorescencia la presencia de anticuerpos contra *Babesia* spp. no obstante, es una técnica con limitantes tales como la subjetividad, el tiempo de elaboración es prolongado, así como el tiempo de lectura y el número de muestras a desafiar no es amplio. En el ELISA no se detectan visualmente los anticuerpos, pero es objetiva y se pueden procesar mayor número de muestras, con menos tiempos de elaboración y lectura.

Por último, es importante destacar que estas técnicas serológicas no son útiles para diagnóstico de la enfermedad, pero si son muy utilizadas para estudios de epidemiología e investigaciones experimentales sobre babesiosis bovina. Por otro lado, es conveniente mencionar que, aún no existe en México un diagnóstico que detecte de manera oportuna y definitiva la presencia de la enfermedad en bovinos y es imprescindible la investigación profunda sobre diagnóstico, para que con los resultados que se obtengan más adelante se contribuya a la disminución de pérdidas económicas en la ganadería mexicana con el acceso a diagnósticos eficientes y rentables para los productores.

## V. OBJETIVOS

### 5.1 General

- ✓ Poner a punto la prueba serológica iELISA para estudios de seroprevalencia de babesiosis bovina con el uso de la proteína recombinante RAP-1 de *Babesia bigemina* como antígeno.

### 5.2 Específicos

- ✓ Identificar el reconocimiento de inmunocomplejos (anticuerpo-anti-RAP-1 de *B. bigemina*) con los anticuerpos policlonales en sueros de ovinos inoculados con la proteína recombinante RAP-1 de *B. bigemina* ante el antígeno nativo y el antígeno recombinante.
- ✓ Determinar la seroprevalencia de babesiosis bovina (*B. bigemina*) en bovinos del Sitio Experimental del INIFAP, Pichucalco, Chiapas, empleando las técnicas iELISA e IFI y el antígeno recombinante RAP-1 de *B. bigemina*
- ✓ Calcular la concordancia entre las técnicas serológicas iELISA e IFI.

## **VI. HIPÓTESIS**

Los anticuerpos policlonales producidos en ovinos inoculados experimentalmente con proteína recombinante RAP-1 forman inmunocomplejos frente a la presencia del antígeno nativo y el antígeno recombinante 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 Investigaciones Disciplinarias 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.

Los ovinos inoculados se mantuvieron en el CENID-SAI, por otra parte, las muestras recolectadas para el estudio de seroprevalencia de babesiosis bovina fueron provenientes de un hato ubicado en el Centro de Investigación Regional (CIR) INIFAP Pichucalco, al Norte del Estado de Chiapas, en las coordenadas 17,31° latitud Norte y a los 93,05° latitud Oeste del meridiano de Greenwich, a una altitud promedio de 50msnm, donde se mantienen precipitaciones todo el año, en promedio 3747mm y clima tropical con una temperatura promedio de 26.2°C; una vez recolectadas, fueron procesadas en el laboratorio de Babesiosis del CENID-SAI, INIFAP.

### **7.2 Desarrollo del trabajo**

La metodología de investigación del presente trabajo es de tipo cuantitativo, ya que permite examinar los resultados de manera contable, es un estudio prospectivo con diseño transversal del análisis de seroprevalencia de babesiosis bovina y el reconocimiento inmunológico ante el antígeno nativo y el antígeno recombinante de ovinos inoculados experimentalmente con la proteína recombinante RAP-1.

Para llevar a cabo el siguiente estudio, fue necesario realizar un esquema de inmunización para dos ovinos macho de raza Black Belly con I.D 197 y 198. Se les administraron siete dosis al ovino 197 y seis dosis al ovino 198 de la proteína

recombinante RAP-1 de *Babesia bigemina* a una concentración total 1900µl/ml junto con adyuvante de Freund vía subcutánea, con un intervalo de 14 días entre inoculaciones. Para cada día de aplicación se colectaron muestras sanguíneas, y fueron centrifugadas y almacenadas en el laboratorio para el uso de los sueros resultantes en las pruebas serológicas de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) y Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas indirecto (iELISA) con el fin de identificar formación de inmunocomplejos en los sueros de ovinos inoculados ante el antígeno nativo y el antígeno recombinante.

Posteriormente se obtuvieron muestras sanguíneas de 99 bovinos provenientes una la zona endémica de babesiosis (Pichucalco, Chiapas) y se procesaron en el laboratorio (CENID-SAI, INIFAP), para la obtención de suero sanguíneo y el posterior proceso de las pruebas serológicas con el fin de estudiar la seroprevalencia de ese hato, utilizando como antígenos: al antígeno nativo en la técnica IFI y antígeno recombinante en iELISA. Para la obtención de resultados no se realizaron repeticiones ya que el estándar o prueba confirmatoria es la Inmunofluorescencia indirecta, debido a que en ella se puede observar de manera visual el reconocimiento antígeno-anticuerpo mediante microscopía de epifluorescencia.

### **7.3 Técnica de IFI**

#### **7.3.1 Materiales para la técnica de IFI**

- ✓ Acetona
- ✓ Agitador
- ✓ Agua destilada
- ✓ Alexa flúor 488 (Conjugado IgG anti-bovino)
- ✓ Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Conjugado IgG anti-ovino)
- ✓ Antígeno nativo de *Babesia bigemina* derivado de cultivo “*in vitro*”
- ✓ Caja de Coplin
- ✓ Cámara húmeda
- ✓ Incubadora

- ✓ Lápiz graso
- ✓ Micropipetas y puntas estériles y desechables
- ✓ Microscopio de epifluorescencia
- ✓ Perlas de sílice
- ✓ Solución amortiguadora de fosfatos 1X (PBS) con pH:7.2
- ✓ Sueros controles (positivo y negativo)
- ✓ Sueros de ovinos inmunizados con proteína RAP-1
- ✓ Sueros de un hato proveniente de una zona endémica

Para la realización de la inmunofluorescencia indirecta se utilizaron laminillas con antígeno adherido de *B. bigemina* derivado de cultivo *in vitro*, mantenidas en congelación a una temperatura de -20°C, las cuales se disecaron en piedras de sílice, se fijaron con acetona y posteriormente se realizaron delimitaciones circulares con un lápiz graso donde se llevó a cabo todo el procedimiento; en una primera etapa, se añadieron los sueros de los ovinos (anticuerpos primarios), se incubaron durante 30 minutos a 37° y se realizaron 3 lavados con PBS y agua destilada; se continuó con la segunda etapa, que consistió en agregar el segundo anticuerpo unido a un fluorocromo (IgG anti-ovino) seguido de una incubación a 37° durante 30 minutos, para finalizar se realizaron 3 lavados con PBS y agua destilada. Se leyeron en microscopio de epifluorescencia, ya que este emite una luz ultravioleta que excita al fluorocromo proyectado con fluorescencia al ser visualizado. De esta manera se encontró al antígeno de importancia (Anexo 2).

El procedimiento antes descrito para la elaboración de la técnica de Inmunofluorescencia indirecta fue la misma para determinar la seroprevalencia de los 99 bovinos de Pichucalco, Chiapas; modificando en la primera etapa al anticuerpo primario, utilizando sueros de los 99 bovinos y en la segunda etapa se usó un conjugado específico de bovino (IgG anti-bovino).

## 7.4 Técnica de iELISA

### 7.4.1 Materiales para la técnica de iELISA

- ✓ Agitador
- ✓ Alfombrilla de goma selladora de placa de 96 pozos
- ✓ Antígeno recombinante: RAP-1
- ✓ Conjugados: IgG anti-ovino e IgG anti-bovino
- ✓ Espectrofotómetro
- ✓ Pipeta multicanal y puntas estériles desechables
- ✓ Placa de poliestireno de 96 pozos
- ✓ Reservorio de pipeta multicanal
- ✓ Solución amortiguadora de fosfatos 1X (PBS) con pH:7.2
- ✓ Solución de bloqueo (leche descremada al 3%)
- ✓ Solución de lavado (PBS-Tween 20)
- ✓ Sueros de ovinos de los diferentes muestreos
- ✓ Sueros controles (positivo y negativo)
- ✓ Sueros de un hato proveniente de una zona endémica
- ✓ Sustrato de membrana cromogénico (TMB)

En el Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas (ELISA) se utilizó una placa de poliestireno de 96 pozos, donde se colocaron las muestras y soluciones. Se utilizó la misma placa para ambos ovinos, la primera mitad (del 1 al 6) para el ovino con I.D 197 y la otra mitad para el ovino con I.D 198 (figura 7). Esta placa se sensibilizó con la proteína recombinante RAP-1 y se incubó durante 20hrs a una temperatura de 4°C, lo que permitió la adsorción de la proteína a los pozos de la placa, posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS y PBS-Tween y se hizo un bloqueo con leche descremada al 3% para cubrir espacios vacíos y evitar inespecificidad, se incubó durante 30 minutos a 37°C y se realizaron 3 lavados con PBS y PBS-Tween, después de añadieron los sueros de los diferentes muestreos de los ovinos inoculados con la proteína recombinante RAP-1 (anticuerpos primarios), se incubó la placa a 37° durante

1 hora y se realizan 3 lavados iguales a los antes descritos, posterior a eso se agregó el segundo anticuerpo, conjugado IgG anti-ovino, marcado con la enzima peroxidasa y se incubó durante 30 minutos a 37°, se realizaron 3 lavados y se agregó sustrato TMB, se incubó durante 30 minutos a 37° (Anexo 2).

En cuanto a la distribución de muestras, para el ovino 197 se utilizaron las filas 1-3 para agregar las diluciones de la A-F donde se colocaron 3 repeticiones de los 6 muestreos a la misma dilución (1:200). Del mismo modo se hizo con el ovino198, 3 repeticiones de los 7 muestreos a una dilución 1:200. En la fila consecutiva se adicionó PBS y en las 2 últimas fueron de conjugado (figura 7).

|   | 1         | 2 | 3 | 4   | 5    | 6    | 7         | 8 | 9 | 10  | 11   | 12   |
|---|-----------|---|---|-----|------|------|-----------|---|---|-----|------|------|
| A | Muestra 1 | 1 | 1 | PBS | Conj | Conj | Muestra 1 | 1 | 1 | PBS | Conj | Conj |
| B | 2         | 2 | 2 | PBS | Conj | Conj | 2         | 2 | 2 | PBS | Conj | Conj |
| C | 3         | 3 | 3 | PBS | Conj | Conj | 3         | 3 | 3 | PBS | Conj | Conj |
| D | 4         | 4 | 4 | PBS | Conj | Conj | 4         | 4 | 4 | PBS | Conj | Conj |
| E | 5         | 5 | 5 | PBS | Conj | Conj | 5         | 5 | 5 | PBS | Conj | Conj |
| F | 6         | 6 | 6 | PBS | Conj | Conj | 6         | 6 | 6 | PBS | Conj | Conj |
| G | -         | - | - | PBS | Conj | Conj | 7         | 7 | 7 | PBS | Conj | Conj |
| H | -         | - | - | PBS | Conj | Conj | -         | - | - | PBS | Conj | Conj |

**Figura 8.** Organización de muestras en placa para iELISA.

Para la interpretación, las placas fueron leídas a los 30 minutos posteriores al término del procedimiento. Para determinar el punto de corte (CUT OFF) se utiliza la siguiente fórmula:

CUT OFF = (3 x desviación estándar de los controles negativos) + promedio de las muestras.

Se toman como resultados positivos a los valores mayores o iguales al punto de corte y como negativos a los valores inferiores al punto de corte.

En la elaboración de la técnica de iELISA con los 99 bovinos, se utilizó el mismo protocolo con las siguientes modificaciones: los anticuerpos primarios fueron los sueros del hato de 99 bovinos y el anticuerpo secundario fue un conjugado específico para bovinos (IgG anti-bovino). La distribución de muestras en la placa fue de sueros problemas del 1 al 96 en una placa, del 97 al 99 y controles positivos y negativos en otra placa. Para la obtención de resultados cuantitativos, se realizó un cálculo de cut off con la misma fórmula utilizada para los ovinos.

### 7.5 Coeficiente de Concordancia “Kappa”

Se realizó un estudio comparativo mediante una evaluación de concordancia de Kappa (K) entre las técnicas de inmunofluorescencia indirecta e iELISA, con apoyo en la tabla de concordancia y su fórmula.

**Cuadro 1.** Tabla de Concordancia Kappa

| Tabla de Coeficiente de concordancia “Kappa” |           | IFI       |           | TOTAL |
|--|-----------|-----------|-----------|-------|
|  |           | Positivos | Negativos |       |
| ELISA  | Positivos | a         | b         | E     |
|  | Negativos | c         | d         | F     |
| TOTAL  |           | G         | H         | N     |

Fórmula del coeficiente de kappa:  $K = \frac{Co - Ce}{1 - Ce}$

Donde:

$$\text{Concordancia observada (Co)} = \frac{(a+d)}{N}$$

$$\text{Concordancia por azar (Ce)} = \frac{(E) \cdot (G)}{N^2} + \frac{(F) \cdot (H)}{N^2}$$

**Cuadro 2.** Criterios de medición de la consistencia de Landis y Koch.

| <b>Valor Kappa</b> | <b>Fuerza de concordancia</b> |
|--------------------|-------------------------------|
| <b>&lt; 0</b>      | Pobre                         |
| <b>0 a 0.20</b>    | Leve                          |
| <b>0.21 a 0.40</b> | Mediana                       |
| <b>0.41 a 0.60</b> | Moderada                      |
| <b>0.61 a 0.80</b> | Sustancial                    |
| <b>0.81 a 1.00</b> | Casi perfecta - Perfecta      |

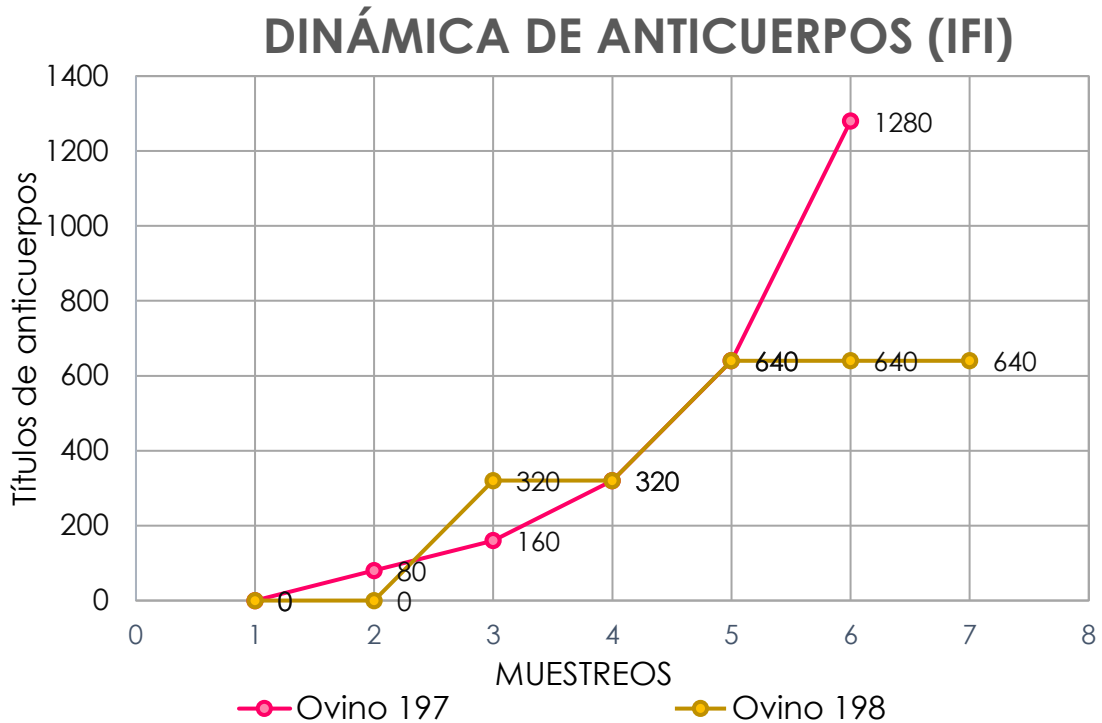
## VIII. RESULTADOS

### 8.1 Resultados de ovinos inoculados experimentalmente con la proteína recombinante RAP-1 de *Babesia bigemina*.

#### 8.1.1 Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

Los resultados obtenidos en la prueba serológica de inmunofluorescencia indirecta, entre el antígeno crudo de *B. bigemina* derivado de cultivo *in vitro* y los anticuerpos policlonales anti-RAP-1 a partir de muestras obtenidas de ovinos inoculados experimentalmente revelaron que, del ovino con I.D. 197, el resultado seropositivo fue a partir del segundo muestreo a una dilución 1:80; sin embargo, el máximo título de anticuerpos fue de 1:1280 en el sexto muestreo (Anexo 3: cuadro 6); mientras que en el ovino con I.D. 198, la respuesta inmunológica fue menor, obteniendo seropositivos hasta la tercera muestra, con título de anticuerpos de 1:320, llegando al máximo título al quinto muestreo con 1:640, manteniendo el título de anticuerpos en los muestreos posteriores (Anexo 3: cuadro 7). De la misma forma se observa la dinámica de anticuerpos, obteniendo una dinámica ascendente y equitativa en el ovino 197 y una dinámica menos representativa en el ovino 198 (figura 9).

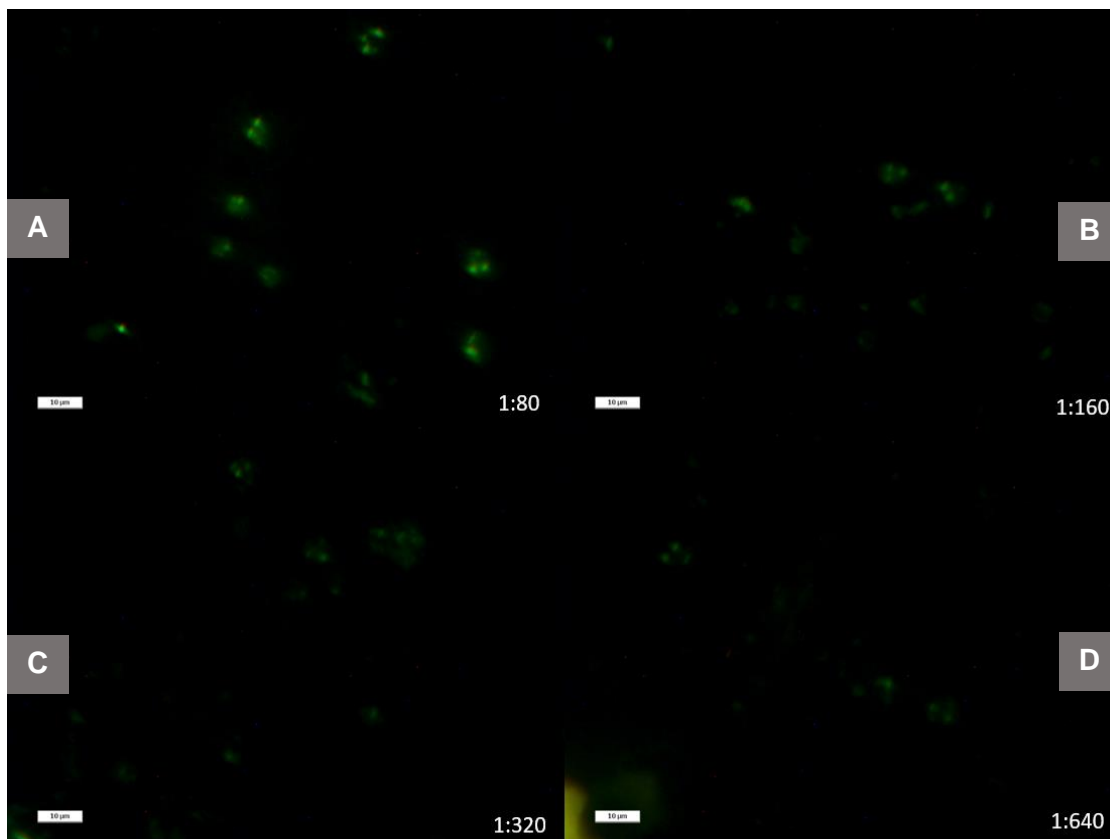




**Figura 9.** Dinámica de anticuerpos de los ovinos mediante la técnica de Inmunofluorescencia indirecta.

A partir del segundo muestreo (muestreos cada 14 días) el ovino 197 ascendió su título de anticuerpos de manera proporcional hasta llegar a 1:1280 en el sexto muestreo, a diferencia del ovino 198, quien mostró un máximo título de anticuerpos de 1:640 manteniendo este título en el quinto, sexto y séptimo muestreo.

En cuanto a los resultados visibles, en la figura 10 se observa la identificación mediante microscopía de epifluorescencia. Los resultados de Inmunofluorescencia indirecta en objetivo de 100X del ovino 197.



**Figura 10.** Títulos de anticuerpos en inmunofluorescencia indirecta del ovino 197 con objetivo 100X en microscopio de epifluorescencia.

En el panel A se observa el muestreo dos con un título de anticuerpos 1:80, en el B el tercer muestreo con 1:160, en el panel C el cuarto muestreo con 1:320 y en el D, el quinto muestreo con un título de anticuerpos 1:640.

### **8.1.2 Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas indirecto (iELISA)**

Los resultados de ELISA en las muestras de suero revelaron la presencia de anticuerpos específicos para la proteína RAP-1 en ambos ovinos, ya que los valores de absorbancia de los sueros obtenidos a partir del segundo muestreo estuvieron por encima del punto de corte, considerando así la reacción como positiva (cuadro 3).

**Cuadro 3.** Resultados de iELISA mediante espectrofotómetro.

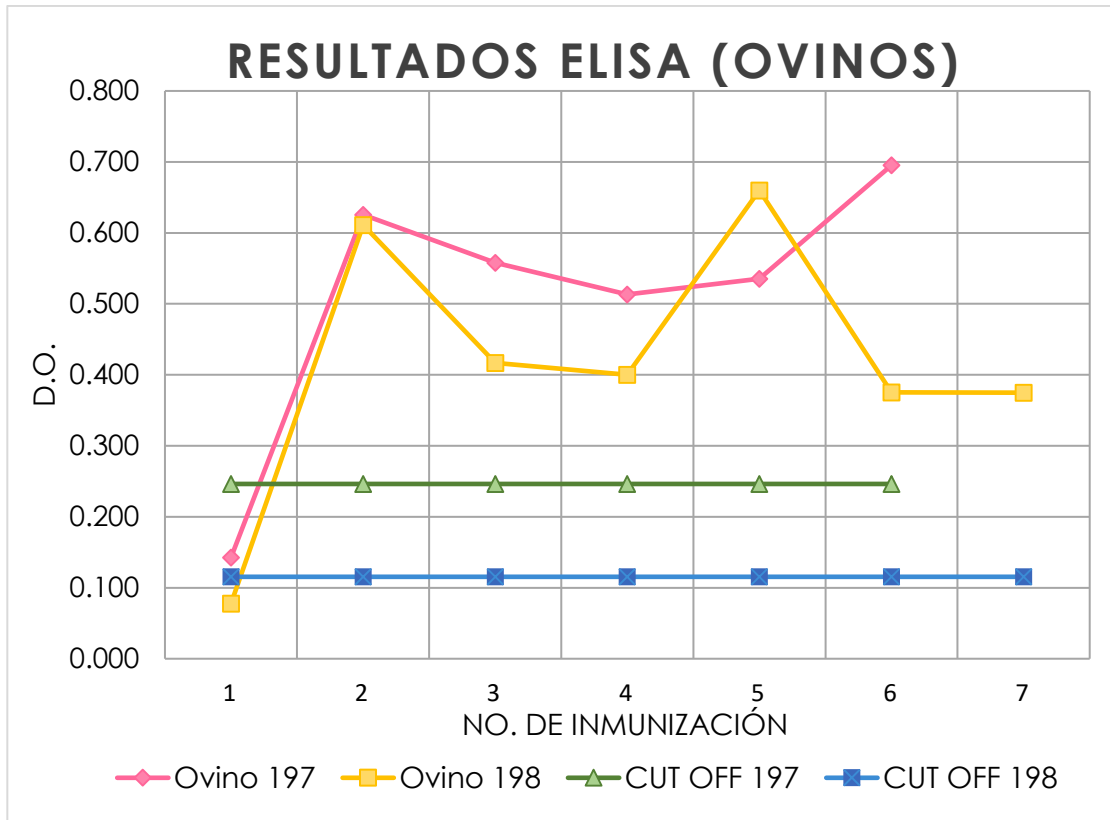
|   | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A | 0.103 | 0.166 | 0.159 | 0.066 | 0.059 | 0.058 | 0.066 | 0.091 | 0.076 | 0.06  | 0.053 | 0.031 |
| B | 0.663 | 0.671 | 0.543 | 0.07  | 0.06  | 0.067 | 0.638 | 0.615 | 0.58  | 0.103 | 0.057 | 0.033 |
| C | 0.567 | 0.517 | 0.59  | 0.256 | 0.07  | 0.079 | 0.584 | 0.548 | 0.119 | 0.109 | 0.071 | 0.036 |
| D | 0.47  | 0.466 | 0.604 | 0.114 | 0.066 | 0.075 | 0.347 | 0.369 | 0.485 | 0.058 | 0.059 | 0.031 |
| E | 0.554 | 0.564 | 0.488 | 0.088 | 0.113 | 0.098 | 0.681 | 0.633 | 0.666 | 0.057 | 0.06  | 0.02  |
| F | 0.465 | 0.533 | 1.088 | 0.116 | 0.099 | 0.079 | 0.347 | 0.36  | 0.419 | 0.413 | 0.059 | 0.037 |
| G | 0.075 | 0.068 | 0.108 | 0.147 | 0.092 | 0.075 | 0.329 | 0.298 | 0.497 | 0.062 | 0.064 | 0.033 |
| H | 0.085 | 0.074 | 0.07  | 0.07  | 0.069 | 0.067 | 0.06  | 0.059 | 0.065 | 0.079 | 0.075 | 0.032 |

De acuerdo con el cálculo de cut off, los valores marcados en color rojo son los muestreos basales y se encontraron por debajo del punto de corte, resultando como negativos, en verde se encuentran los muestreos siguientes por encima del punto de corte y corresponden a valores positivos.

$$\text{CUT OFF Ovino 197} = (3 \times (0.03453018) + 0.142666667) = 0.246257207$$

$$\text{CUT OFF Ovino 198} = (3 \times (0.012583057) + 0.077666667) = 0.115415839$$

Para el ovino 197 se determinó un cut off en 0.246 y para el ovino 198 en 0.115. Los valores superiores al cut off son considerados positivos y los valores que se encuentran por debajo del punto de corte se consideran como negativos (figura 11).

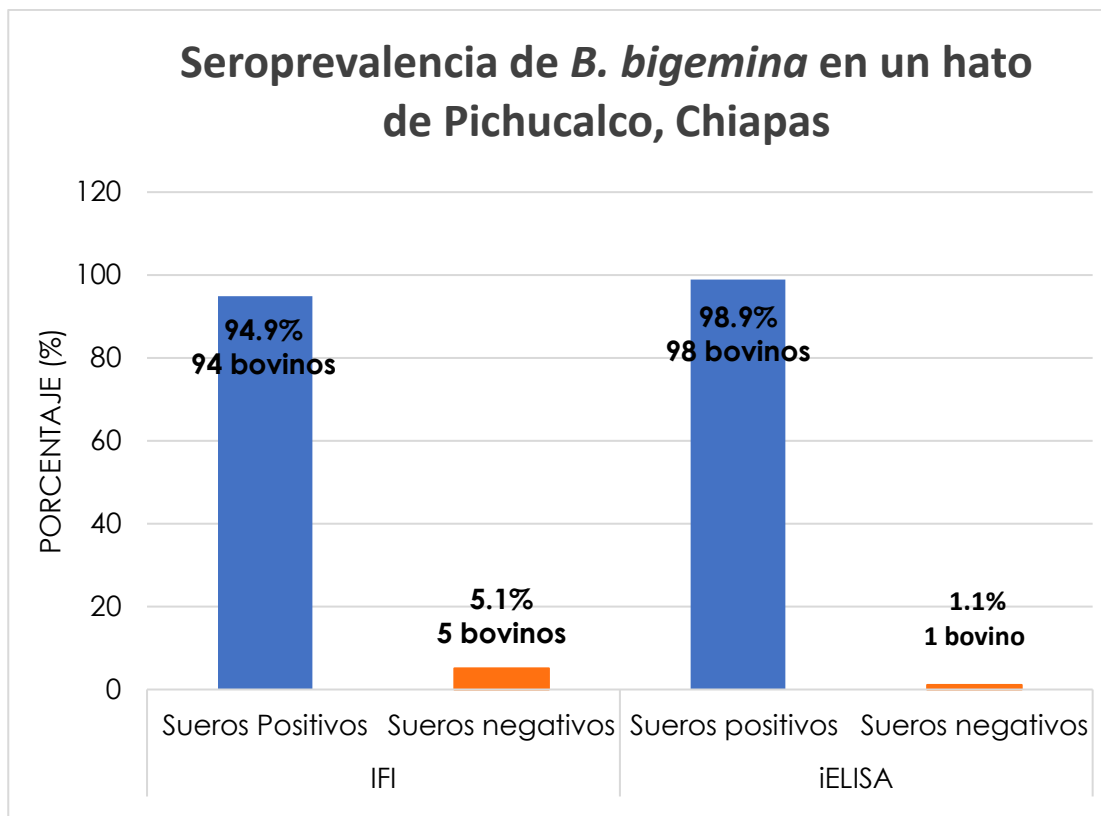


**Figura 11.** Resultados de muestreos en iELISA.

## 8.2 Resultados de seroprevalencia de un hato de Pichucalco, Chiapas.

### 8.2.1 Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

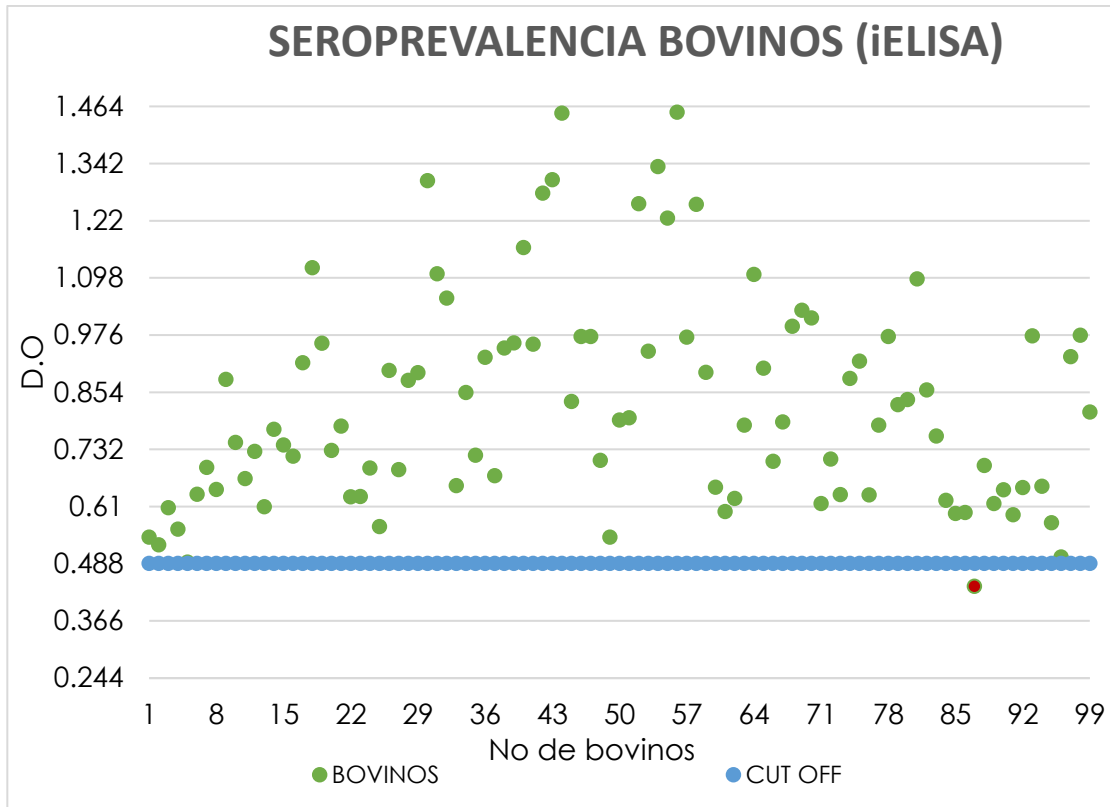
Por otra parte, los resultados obtenidos por IFI en cuanto a los 99 sueros de bovinos provenientes de una zona endémica (Pichucalco, Chiapas) demostraron que, 94 de los sueros se identificaron como seropositivos y 5 negativos, dando un porcentaje de seroprevalencia del 94.9% (figura 12).



**Figura 12.** Resultados de seroprevalencia en Inmufnofluorescencia indirecta e iELISA.

### 8.2.2 Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas indirecto (iELISA)

En cuanto a los resultados obtenidos por iELISA, se obtuvo un punto de corte de 0.488 para los 99 sueros de bovinos analizados, de los cuales 98 muestras fueron seropositivas, encontrándose por encima del cut off y una muestra negativa con valor inferior al punto de corte (figura 13); el porcentaje de seroprevalencia obtenido por esta técnica fue del 98.9% (figura 12).



**Figura 13.** Resultados de lecturas en iELISA de los muestreos del hato en densidad óptica.

### 8.3 Resultados de concordancia (índice de kappa)

#### 8.3.1 Índice de kappa de ovinos inoculados

De los 13 sueros previamente analizados por la técnica de inmunofluorescencia indirecta, el 76.9% (10 sueros) correspondió a muestras positivas y el 23.1% (3 sueros) a muestras negativas. Estos mismos sueros, analizados por la técnica iELISA para la determinación de anticuerpos contra RAP-1 de *B. bigemina*; el resultado fue de 84.6% (11 sueros) de muestras positivas y 15.4% (2 sueros) de muestras negativas. Del total de sueros analizados, 10 sueros (76.9%) presentaron resultados positivos por ambas pruebas, 2 sueros (15.4%) presentaron resultados negativos por las dos técnicas y 1 suero (7.7%) resultó positivo en una de las dos pruebas (iELISA).

El cuadro 4 muestra los resultados concordantes y discordantes, tanto positivos como negativos, obtenidos por las dos técnicas (IFI e iELISA). Se obtuvieron 10 sueros positivos y 3 sueros negativos por la técnica de IFI y 11 sueros positivos y 2 sueros negativos por la técnica iELISA. Además, 1 muestra que fue negativa por IFI, fue positiva por la técnica de iELISA, y ninguna muestra que fue positiva por IFI, fue negativa por la técnica de iELISA.

**Cuadro 4.** Resultados concordantes y discordantes obtenidos por las técnicas de iELISA e IFI en muestras de ovinos inoculados con proteína RAP-1.

| Tabla de Coeficiente de concordancia "Kappa" |           | IFI       |           | TOTAL     |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|
|  |           | Positivos | Negativos |           |
| iELISA                                       | Positivos | 10        | 1         | 11        |
|  | Negativos | 0         | 2         | 2         |
| TOTAL  |           | 10        | 3         | <b>13</b> |

El coeficiente de kappa de concordancia entre la prueba de ELISA y la inmunofluorescencia indirecta fue de 0.75 (concordancia sustancial).

### **8.3.2 Índice de kappa de seroprevalencia de un hato de Pichucalco, Chiapas.**

Fueron analizados 99 sueros de bovinos provenientes de zona endémica para determinar la seroprevalencia de Babesiosis bovina en este hato por dos técnicas serológicas, por la técnica de inmunofluorescencia indirecta, el 94.95% correspondió a muestras positivas (94 sueros) y el 5.05% a muestras negativas (5 sueros). Estos 99 sueros fueron analizados también por la prueba iELISA; el resultado fue de 98.9% para muestras positivas (98 sueros) y 1.01% para muestras negativas (1 suero).

Del total de sueros analizados (99 sueros), 94 sueros (94.95%) presentaron resultados positivos por ambas pruebas, 1 suero (1.01%) presentó resultados negativos por las dos técnicas y 4 sueros (4.04%) resultaron positivos en una de las dos pruebas (iELISA).

En el siguiente cuadro se muestran los resultados obtenidos por las dos técnicas serológicas, en donde se demuestran las concordancias y discordancias de los resultados positivos y negativos, obtenidos por las dos técnicas (IFI e iELISA). Se obtuvieron 94 sueros positivos y 5 sueros negativos por la técnica de IFI y 98 sueros positivos y 1 suero negativo por la técnica iELISA. Además, 4 sueros que fueron negativos por IFI, fueron positivos por la técnica de iELISA, y ninguna muestra que fue positiva por IFI, fue negativa por la técnica de iELISA (cuadro 5).



**Cuadro 5.** Resultados concordantes y discordantes obtenidos por las técnicas de iELISA e IFI en muestras de un hato de Pichucalco, Chiapas.

| Tabla de Coeficiente de concordancia<br>"Kappa" |           | IFI       |           | TOTAL     |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|
|   |           | Positivos | Negativos |           |
| iELISA  | Positivos | 94        | 4         | 98        |
|   | Negativos | 0         | 1         | 1         |
| TOTAL   |           | 94        | 5         | <b>99</b> |

Teniendo como resultado del coeficiente de kappa de concordancia de las técnicas serológicas IFI e iELISA 0.33, es decir, fuerza concordancia mediana.

## X. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en las pruebas serológicas de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) y Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas indirecto (iELISA) sobre los ovinos inoculados experimentalmente con la proteína recombinante RAP-1 de *B. bigemina*, se comprobó reconocimiento de inmunocomplejos con los anticuerpos policlonales obtenidos de los sueros de los ovinos tanto en la técnica de IFI con el antígeno nativo como en iELISA con el antígeno recombinante. Presentando un mejor título de anticuerpos el ovino 197 en la técnica de IFI y dinámica de anticuerpos similar para ambos ovinos en la técnica de iELISA.

Asimismo, se determinó la seroprevalencia de babesiosis bovina (*B. bigemina*) con el uso del antígeno nativo en la prueba de IFI y el antígeno recombinante en iELISA. Los resultados obtenidos demostraron que el antígeno recombinante reconoce a los anticuerpos de *B. bigemina* de forma muy similar al antígeno nativo, sin presentar diferencia significativa, obteniendo resultados similares de seroprevalencia en ambas pruebas, donde se representó con un porcentaje de concordancia de 0.33 y que a pesar de tener una fuerza concordancia mediana se considera que la proteína recombinante reconoce anticuerpos para *B. bigemina* al igual que el antígeno nativo.

Además, es importante destacar que la presente investigación no solo radica en la identificación del reconocimiento de inmunocomplejos, sino en seleccionar los antígenos adecuados. Para dicha selección, fue necesario tener presente varios aspectos de la biología del patógeno: los antígenos involucrados en el proceso de invasión a la célula blanco, la diversidad antigénica de los diferentes estadios infectivos y el grado de conservación de los antígenos entre la diversidad de cepas virulentas presentes en la naturaleza.

Pese a que aún no se ha reportado literatura que proporcione información sobre producción de anticuerpos policlonales de *B. bigemina* con los cuales se puedan comparar los resultados obtenidos en este trabajo, si existen reportes

de estudios que integran la utilización o producción de anticuerpos policlonales específicos para otros microorganismos tales como *Toxoplasma gondii*, *Giardia intestinalis*, *Giardia duodenalis* por mencionar algunos (García *et al.*, 2005; Padilla-Londoño *et al.*, 2008; Moreno-González *et al.*, 2013; Guerra *et al.*, 2016). Cabe mencionar que, de los agentes patógenos antes descritos, *Toxoplasma gondii* es un protozooario del filo Apicomplexa y que al igual que *Babesia* spp. es intraeritrocítico obligado.

Padilla y colaboradores (2008), trabajaron en la producción de anticuerpos policlonales IgG contra una proteína recombinante de *Toxoplasma gondii*, inmunizando a dos grupos de conejos Nueva Zelanda con la proteína recombinante (NOS-Tg-r) y dos adyuvantes inmunológicos, hidróxido de aluminio y adyuvante de Freund para grupo 1 y 2 respectivamente. Utilizaron las técnicas serológicas empleadas en este trabajo, Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas indirecto (iELISA) e Inmunofluorescencia indirecta (IFI); en ambas técnicas se demostraron positivos los sueros a partir del segundo muestreo y obtuvo mejor respuesta inmunológica el grupo que se le administró adyuvante de Freund que el grupo al que se le administró hidróxido de aluminio. En el presente trabajo solo se utilizó adyuvante de Freund en conjunto con la proteína recombinante RAP-1 y se utilizaron ovinos para la obtención de mayor cantidad de suero (anticuerpos policlonales). Comparando los resultados de estos autores con el presente estudio, se puede determinar que en ambas investigaciones se obtuvieron resultados exitosos, observando reconocimiento de anticuerpos policlonales ante los antígenos recombinante y nativo.

Por otra parte, el resultado del índice de kappa entre iELISA e IFI de este trabajo fue de 0.75, según los márgenes para estimar el grado de acuerdo en función del índice kappa, se interpreta como un grado de acuerdo sustancial. Padilla y Colaboradores (2008), no realizaron protocolos de concordancia entre las técnicas serológicas utilizadas en su trabajo. Sin embargo, Cortés y Mancera, (2009), realizaron un trabajo de medición de la concordancia entre ELISA e IFI

para la determinación de anticuerpos tipo IgG contra *Toxoplasma gondii*, donde se obtuvieron resultados de 0.95 (casi absoluto). A pesar de que obtuvieron un resultado de concordancia mayor al demostrado en el presente trabajo, sí se observó un grado de concordancia sustancial lo que demuestra que existe un buen margen de concordancia entre pruebas serológicas, se considera que en el presente estudio se obtuvo un porcentaje menor al presentado por los autores antes mencionados, ya que ellos trabajaron con antígenos completos (mezcla de antígenos) y en la presente investigación se trabajó con una parte del antígeno completo (proteína recombinante RAP-1).

Por último, en la instrumentación de las pruebas serológicas IFI e iELISA para la obtención de seroprevalencia de un hato, se utilizó la proteína recombinante RAP-1 donde se comprobó que esta proteína es capaz de reconocer al antígeno completo de *B. bigemina* y el antígeno recombinante. Rojas y colaboradores (2004), realizaron un estudio de prevalencia de *Babesia bovis* y *B. bigemina* en un hato de Axochiapan Morelos, donde llevaron a cabo estudios de prevalencia en los diferentes meses del año, se obtenían porcentajes altos en los meses julio y agosto, pero mayor incidencia de enfermedad en el mes de marzo. Con los porcentajes de prevalencia obtenidos en los diferentes meses, se obtuvo un promedio, teniendo una prevalencia general del 37%. Por otro lado, Yucatán ha tenido valores del 57% a 66% de prevalencia, determinados por IFI y PCR respectivamente. En el estado de Yucatán, se ha observado una prevalencia a *B. bigemina* de 57% determinada por IFI (Ramos *et al.*, 1992), y de 66% determinado por PCR (Figueroa *et al.*, 1993). Estos estudios fueron realizados con el uso del antígeno completo (mezcla de antígenos) de *B. bigemina*. Sin embargo, en el presente trabajo se realizó con el uso de un antígeno específico de *B. bigemina*, en este caso la proteína recombinante RAP-1, donde se observó que el antígeno específico antes mencionado mantiene antigenicidad ante sueros de bovinos en campo, del mismo modo que si se utilizara el antígeno completo de *B. bigemina*. Y aunque los resultados obtenidos en este estudio fueron de 94% y 98% de seroprevalencia para IFI e iELISA respectivamente, se debe tener en cuenta muchos factores tanto positivos

como negativos, y especular sobre ellos, por ejemplo, que el antígeno recombinante provoque inespecificidad provocando falsos positivos, pero por otro lado es importante resaltar que, el cambio climático ha ido aumentando con el paso de los años, provocando temperaturas ambientales elevadas, propiciando así las condiciones idóneas para el desarrollo de la garrapata vector y el agente patógeno y en consecuencia a esto es que ha aumentado el porcentaje de prevalencia de babesiosis bovina en México.

## XII. CONCLUSIÓN

Se logró poner a punto el Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas indirecto (iELISA) en ambos experimentos, primero al observar el reconocimiento antígeno-anticuerpo de inmunocomplejos en ovinos inoculados con la proteína recombinante RAP-1; y segundo, para la obtención de seroprevalencia de babesiosis bovina de un hato de 99 bovinos, con el uso de la proteína recombinante RAP-1 de *B. bigemina* como antígeno.

La proteína recombinante RAP-1, logro ser inmunogénica para los ovinos, de tal forma que, al evaluar los sueros colectados a lo largo de las inmunizaciones, mostraron reconocimiento con los antígenos tanto nativos como recombinantes, mediante la técnica de IFI y iELISA, respectivamente. Lo cual permitirá emplear la proteína recombinante (RAP-1) y los anticuerpos policlonales IgG de ovino anti- RAP-1, como antígeno y anticuerpo específicos de *Babesia bigemina* para el desarrollo de innovadoras pruebas de diagnóstico en la babesiosis bovina.

### **XIII. SUGERENCIAS**

Para fortalecer los resultados obtenidos, se sugiere repetir los experimentos realizados en este trabajo, del mismo modo se pueden utilizar un mayor número de animales experimentales, para identificar si el comportamiento inmunológico de los resultados obtenidos se asocia al antígeno recombinante (RAP-1) y/o, también puede influir el sistema inmunológico individual de los ovinos.

Por otro lado, algunos autores han trabajado con inmunizaciones para el ganado con cocteles de proteínas recombinantes (Willadsen, 2008; Álvarez *et al.*, 2010), proponiendo una buena protección. En el caso de la producción de anticuerpos policlonales, podría ser de gran utilidad trabajar con inoculaciones de mezclas de antígenos recombinantes, para *B. bigemina* las proteínas: 12D3, PG55 y RAP-1, de esta manera se podrían obtener anticuerpos policlonales con mayor reconocimiento al antígeno nativo.

Finalmente, también podrían ser útil la reproducción de la técnica serológica iELISA con el uso de la proteína recombinante RAP-1 de *B. bigemina* y sueros de animales infectados únicamente con *Babesia bovis* y MSA-1 de *B. bovis* con animales infectados con *B. bigemina* para descartar reacción cruzada en las técnicas serológicas.

#### XIV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso, M., Arellano-Sota, C., Cereser, V., Cordoves, C., Guglielmone, A., Kessler, R., Mangold, A., Nari, A., Patarroyo, J., Solari, M., Vega, C., Vizcaíno, O., y Camus, E. (1992). Epidemiology of Bovine Anaplasmosis and Babesiosis in Latin America and the Caribbean. *Revue Scientifique Et Technique De L'oie*, 11(3), 713–733. DOI: 10.20506/RST.11.3.623.
- Álvarez, J., López, U., Rojas, C., Borgonio, V., Sánchez, V., Castañeda, R., Vargas, P. y Figueroa, J. (2010). Immunization of Bos taurus Steers with *Babesia bovis* Recombinant Antigens MSA-1, MSA-2c and 12D3. *Transboundary and Emerging Diseases*, 57 87–90. DOI: 10.1111/j.1865-1682.2010.01117.x
- Bautista-Garfias, C. (2016). *Respuesta inmunitaria innata de los bovinos y su papel en la babesiosis (1ra ed.)*. Libro científico No. 3 del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. pp. 20-30.
- Bautista-Garfias, C., Castañeda-Arriola, R., Álvarez-Martínez, J., Rojas-Martínez, C., Figueroa-Millán, J., y Rodríguez-Lozano, 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. Recuperado de: <http://www.scielo.org.mx/pdf/vetmex/v43n3/v43n3a1.pdf>
- Boero, J. (1976) *Parasitosis Animales*. Argentina: Editorial Universal De Buenos Aires. pp. 207-215.
- Boonchit, S., Xuan, X., Yokoyama, N., Goff, W., Wagner, G., y Igarashi, I. (2002). Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Recombinant Rhoptry-Associated Protein 1 Antigen against *Babesia bovis* for the Detection of Specific Antibodies in Cattle. *Journal of Clinical*



*Microbiology*, 40(10), 3771–3775. DOI: 10.1128/JCM.40.10.3771–3775.2002

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

Brown, W y Palmer, G. (1999). Designing Blood-stage Vaccines against *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Tick-borne diseases*, 15 (7): 275-81. Recuperado de: [sci-hub.tw/10.1016/s0169-4758\(99\)01471-4](http://sci-hub.tw/10.1016/s0169-4758(99)01471-4).

Brown, W., McElwain, T., Ruef, B., Suraez, C., Shkap, V., Chitko-Mckown, C., Tuo, W., Riece-Ficht, A., y Palmer, G. (1996). *Babesia bovis*: rhoptry-associated protein 1 is immunodominant for T helper cell epitopes conserved among geographically distant *B. bovis* strains. *Infection and Immunity*. 64:3341-3350. Recuperado de: <https://iai.asm.org/content/iai/64/8/3341.full.pdf>

Camacho, A. (2002). Diagnóstico Laboratorial de las Piroplasmosis Bovinas. *Tratado de Veterinaria bovis, España* 0(108); 53-56.

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. Recuperado de: <http://www.ejournal.unam.mx/rvm/vol34-04/RVM34403.pdf>

Cantú, A., y García, Z. (2013). Estrategias para el Control Integrado de Garrapata (*Boophilus* spp.) en la Producción de Bovinos de Carne en Pastoreo en Tamaulipas. *Folleto Técnico de INIFAP No. MX-0-310402-43-03-14-09-36*. Recuperado de: [http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/3952/CIRNE\\_01020829000051407ok.pdf?sequence=1](http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/3952/CIRNE_01020829000051407ok.pdf?sequence=1)

- Carrique, J.; Ribera, H. (2000). *Manual Práctico sobre Garrapatas y Enfermedades transmitidas por Garrapatas*. Santa Cruz, Bolivia. LIDIVET. pp. 1 - 36.
- Carriquiry, R. (2010). Tristeza parasitaria: causas y prevención. *Bienestar y Salud Animal*, 56–58. Recuperado de: [https://www.planagropecuario.org.uy/publicaciones/revista/R134/R\\_134\\_56.pdf](https://www.planagropecuario.org.uy/publicaciones/revista/R134/R_134_56.pdf)
- Chauvin, M., 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. *Vet. Res.* 40:37 DOI: 10.1051/vetres/2009020. DOI: 10.1051/vetres/2009020
- Cortés, J. (2010). Cambios en la distribución y abundancia de las garrapatas y su relación con el calentamiento global. *Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia*. 57:65-75. Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/rfmvz/v57n1/v57n1a04.pdf>
- Costa-Júnior, L., Leite, E., Martins, O., y Barbosa, M. (2006). Comparison of different direct diagnostic methods to identify *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in animals vaccinated with live attenuated parasites. *Veterinary Parasitology*. 139:231-236. DOI:10.1016/j.vetpar.2006.02.034
- Dalgliesh, J., Stewart, P. y Callow L. (1978) Transmission of *Babesia bigemina* by transfor of adult male *Boophilus microplus*. *Aust Vet J*, 54:205-206. Recuperado de: [sci-hub.tw/10.1111/j.1751-0813.1978.tb02455.x](http://sci-hub.tw/10.1111/j.1751-0813.1978.tb02455.x)
- Echaide, S., Echaide, I., Gaido, A., Mangold, A., Lugaresi, C., Vanzini, V. y Guglielmone, A. (1995) Evaluation of an enzyme-linked immunoabsorbent assay kit to detect *Babesia bovis* antibodies in cattle. *Prev. Vet. Med.* 24: 277-283. Recuperado de: [sci-hub.tw/10.1016/0167-5877\(95\)00485-f](http://sci-hub.tw/10.1016/0167-5877(95)00485-f)

Engvall, E. y Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Inmunochimistry*. 8: 871-874 Recuperado de: [sci-hub.tw/10.1007/978-1-60327-375-6\\_37](http://sci-hub.tw/10.1007/978-1-60327-375-6_37).

Figueroa J. y Álvarez J. (2003). Investigaciones sobre la aplicación de técnicas moleculares en el diagnóstico y control de la babesiosis bovina. *Ciencia Veterinaria*, 9(4), 75-104. Recuperado de: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol9/CVv9c3.pdf>

Figueroa, J., Álvarez, J.; Ramos, J., A., Vega, C., y Buening, G.M. (1993). Use of a multiplex polymerase chain reaction based assay to conduct epidemiological studies on bovine hemoparasites in Mexico. *Revue Élev. Méd., Vét. Pays trop.* 46: (1-2):71- 75. Recuperado de: <http://revues.cirad.fr/index.php/REMVT/article/view/9401>

Figueroa-Millán, J., Lira-Amaya, J., Polanco-Martínez, D., Álvarez-Martínez, J., Rojas-Martínez, C., y Bautista-Garfias, C., (2015). Diferenciación de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* mediante el uso de una prueba molecular en ADN extraído de garrapatas repletas. *Entomología Mexicana* Vol. 2: 706-713. Recuperado de: <http://www.socmexent.org/entomologia/revista/2015/EV/PAG%20%20706-713.pdf>

Franco, Y. (2005). Reseña de "La Microscopía de Fluorescencia y su Aplicación en el Diagnóstico de Bacterias Fitopatógenas". *Fitosanidad*, 9(3), 65-68. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/2091/209116189013.pdf>

García, D., Álvarez, J., Figueroa, J., y Vega, C. (2003). Babesiosis bovina: Características relevantes de la respuesta inmune. *Ciencia Veterinaria*, 9(4), 105-121. Recuperado de: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol9/CVv9c4.pdf>

García, D., Nicholls, R., Arévalo, A., Torres, O., y Duque, S. (2005). Obtención, purificación y caracterización de anticuerpos policlonales IgY

desarrollados en gallina, dirigidos contra aislamientos colombianos de *Giardia duodenalis*. *Biomédica*. 25:451-63. Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/bio/v25n4/v25n4a05.pdf>

Gasque, R. (2008). *Enciclopedia Bovina UNAM*. México, D.F.: Comité Editorial de la FMVZ. Documento de Scribd. DOI: 10.1017/CBO9781107415324.004

Goff, W., Johnson, W., Tuo, W., Valdez, R., Parish, S., Barrington, G. y Davis, W. (2002). Respuesta inmune innata relacionada con la edad en terneros a *Babesia bovis*. Implica la inducción de IL-12 y la modulación de IL-10. *Anales de la Academia de Ciencias de Nueva York*, 969 (1), 164–168. DOI: 10.1111 / j.1749-6632.2002.tb04371.x

Goodger, B. (1973). *Babesia argentina*: Intraerythrocytic Location of Babesial Antigen Extracted from Parasite Suspensions. *Int. J. Parasitol.*, 3: 387-391. DOI: 10.1016 / 0020-7519 (73) 90118-5

Goodger, B. (1976). *Babesia argentina*: studies on the nature of an antigen associated with infection. *Int. J. Parasitol.* 6: 213-216. DOI: 10.1016 / 0020-7519 (76) 90036-9

Guerra, A., Calvo, E., Wasserman, M., y Chaparro-Olay, J. (2016). Production of recombinant proteins from *Plasmodium falciparum* in *Escherichia coli*. *Biomédica*. 36(1): 97-108. DOI: 10.7705 / biomedica.v36i3.3011

Hernández, R., Álvarez, J., Buening, G., Cantó, G., Monroy, M., Ramos, J., y Vega, C. (1990). Diferencias en la virulencia y en la inducción de protección de aislamientos de *Babesia bigemina* derivados de cultivo *In vitro*. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 28 (2), 51-61. Recuperado de: <http://cienciaspecuarias.inifap.gob.mx/index.php/Pecuarias/article/view/3554/2974>

Hernández, R., Falcón, A., García, M., Palacios, A., Mosqueda, J., Preciado, J., Francisco., Mejía, F., Ramos, J., Rosas, J., Cantú, A., Rojas, E., Alpírez, F., Vega, C., Solís, J., y Rodríguez, S. (2010). Control Integrado de Garrapatas y Enfermedades que Transmiten en Ganado Bovino, Babesiosis y Anaplasmosis. *Folleto técnico del INIFAP No. 10*, pp. 13-19. Recuperado de: <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/3123/CONTROLINTEGRADODEGARRAPATA.pdf?sequence=1>

Homer, M., Aguilar-Delfín, I., Telford, S., Krause, P., y Persing, D. (2000). Babesiosis. *Clin. Microb. Rev.* 13 (3):451- 469. DOI: 10.1128 / CMR.13.3.451

INIFAP (2003). Validación de la Vacuna Bivalente Contra la Babesiosis Bovina. *Fichas Tecnológicas Sistema Producto*. Recuperado de: <http://utep.inifap.gob.mx/tecnologias/3.%20Bovinos%20Doble%20Prop%C3%B3sito/4.%20Sanidad/VALIDACI%C3%93N%20DE%20LA%20VACUNA%20BIVALENTE%20CONTRA%20LA%20BABESIOSIS%20BOVIN A2P.pdf>

Jack, R y Ward, P. (1981). The entry process of *Babesia* merozoites into red cells. *Am J Pathol*; 102(1):109-113. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1903442/pdf/amjpathol00220-0115.pdf>

Lew, A. y Jorgensen, W. (2005) Molecular approaches to detect and study the organism causing bovine tick-borne diseases: babesiosis and anaplasmosis. *African Journal of Biotechnology*.4: (4), pp. 292-302. Recuperado de: [https://www.researchgate.net/publication/228638384\\_Molecular\\_approaches\\_to\\_detect\\_and\\_study\\_the\\_organisms\\_causing\\_bovine\\_tick\\_borne\\_diseases\\_Babesiosis\\_and\\_anaplasmosis](https://www.researchgate.net/publication/228638384_Molecular_approaches_to_detect_and_study_the_organisms_causing_bovine_tick_borne_diseases_Babesiosis_and_anaplasmosis)

- Machado, R., McElwain, T., Suarez, C., Stephen, A., Palmer, G., (1993). *Babesia bigemina*: isolation and characterization of merozoite rhoptries. *Exp. Parasitol.* 77, 315-325. Recuperado de: <https://eurekamag.com/pdf/002/002307649.pdf>
- Meléndez, R. (1998). Revisión Integral de los Factores Epidemiológicos que Inciden en la Relación *Boophilus microplus*-Bovino-*Babesia* spp. *Revista Científica.* 3(1), 25–34. Recuperado de: <http://www.produccioncientifica.luz.edu.ve/index.php/cientifica/article/viewFile/14305/14283>
- Molloy, J., Bowles, P., Jeston, P., Bruyeres, A., Bowden, J., Bock, R., Jorgensen, W., Blight, G., y Dalgliesh, R. (1998). Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Babesia bigemina* in cattle. *Parasitol. Res.* 84: 651-656. Recuperado de: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02762001000200017](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762001000200017)
- Morales, J. (2010). Complejo Clostridial en Bovinos y Muerte Súbita. 1er. *Simposium de Salud y Producción de Bovinos de Carne en la Zona Norte-Centro de México. Aguascalientes, Ags. Mayo 2010. En el Marco de La Feria de San Marcos 2010*, pp 5-7.
- Moreno-González, P., Díaz, G., y Ramírez Hernández, M. (2013). Producción y purificación de anticuerpos aviares (igYs) a partir de cuerpos de inclusión de una proteína recombinante central en el metabolismo del NAD<sup>+</sup>. *Revista Colombiana de Química,* 42(2). Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=309032109002>
- Morilla, A. (1981). Inmunología de la Babesiosis. *Ciencia Veterinaria,* 1(3), 239-275. Recuperado de: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol3/CVv3c09.pdf>

- Mosqueda, J., Falcón, A., Ramos, J., Cantó G. y Camacho-Nuez, M. (2012a). Estrategias genómicas y moleculares para el control de la babesiosis bovina. *Rev Mex Cienc Pecu.*;3 (Supl 1):51-59. Recuperado de: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-11242012000500007](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242012000500007)
- Mosqueda, J., Olvera, A., Aguilar, G. y Cantó, G. (2012b). Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis. *Current Medicinal Chemistry*, 19, 1504- 1518. DOI: 10.2174 / 092986712799828355
- Murrell, A. y Barker, S. (2003). Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Systematic Parasitology*. 56:169-172. *Ixodidae*. DOI: 10.1023 / b: sya.0000003802.36517.a0
- Navarrete, I., Serrano, F., y Reina, D. (1999). Parasitosis hemáticas. En: M. Cordero, F. Rojo, A. Martínez, C. Sánchez, S. Hernández., I. Navarrete., Díaz, P., Quiroz, H., y Carvalho, M. *Parasitología Veterinaria* (1a ed). Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España. pp. 283-293
- Núñez, L., y Bouda, J. (Ed.) (2007). *Patología Clínica Veterinaria*. Ciudad de México. FMVZ-UNAM. Recuperado de: <https://es.scribd.com/doc/114710430/LIBRO-PATOLOGIA-CLINICA-VETERINARIA-Nunez>
- OIE (2008). *Babesiosis bovina*. En: Manual de la OIE sobre animales terrestres 2008. Capítulo 2.4.2. pp. 97-101.
- 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.

OIE (2015). *Anaplasmosis bovina*. Versión adoptada por la Asamblea Mundial de Delegados de la OIE en mayo de 2015. Capítulo 2.4.1. Recuperado de: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/2.04.01\\_A\\_naplasmosis\\_bovina.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.04.01_A_naplasmosis_bovina.pdf)

OIE-WAHIS (2017). *Base de datos*. Disponible en: [http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home) Washington

Olsen, W. O. (1977). *Parasitología Animal*. 1er Tomo. (3 ed.). España: Aedos. pp. 21- 30.

Ortega, J., Sedeño, J., y López, E. (2009). *Setenta y cinco años de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*. Libro del Instituto Politécnico Nacional. pp. 292-301.

Padilla-Londoño, J., Trejos-Suárez, J., Coronado, S., y Cardona-Pérez, N. (2008). Producción de anticuerpos policlonales IgG contra una proteína con actividad de óxido nítrico sintetasa de *Toxoplasma gondii* recombinante (NOS-Tg-r) y marcación inmunológica en taquizoítos. *Asociación Colombiana de Infectología*, 12(2): 340-348. Recuperado de: <http://www.revistainfectio.org/index.php/infectio/article/view/115/0>

Parasitología interactiva, Universidad Complutense de Madrid (2018). Recuperado de: <http://www.ingenius-learning.com/saluvet/pages/babesiafd.html>

Pérez, J., Vargas, P., Álvarez, A., Rojas, C., González, V., y Figueroa, J. (2012). Identificación inicial de genes en *Babesia bigemina* mediante análisis de Etiquetas de Secuencia Expresadas en el estadio intraeritrocítico del parásito. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 3(1):61-87. Recuperado de: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S2007-11242012000500008&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2007-11242012000500008&lng=es&nrm=iso&tlng=es)



- Perkin, M. (1992). Rhoptry organelles of apicomplexan parasites. *Parasitol. Today* 8:28-32. DOI: 10.1016 / 0169-4758 (92) 90308-o
- Pfeffer, M., Wiedmann, M., y Batt, C. (1995). Applications of DNA amplification techniques in veterinary diagnostics. *Veterinary Research Communications*, 19: 375-407. DOI: 10.1007 / bf01839319
- Polanco, D., y Ríos, L. (2016). Aspectos biológicos y ecológicos de las garrapatas duras. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 17(1):81-95. DOI: [https://doi.org/10.21930/rcta.vol17\\_num1\\_art:463](https://doi.org/10.21930/rcta.vol17_num1_art:463)
- Quiroz, H. (2008). *Parasitología y Enfermedades Parasitarias de Animales Domésticos* (2<sup>da</sup>ed). México D.F. Limusa, pp 187-199.
- Ramírez, G., Domínguez, J., y Sierra, E. (1997). La inmunización contra *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* como método de control de la babesiosis bovina. *Revista Biomedica*. 8(99): 240–246. Recuperado de: <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb97846.pdf>
- Ramírez, J., y Ayala, M. (2014) "Enzimas: ¿qué son y cómo funcionan?" Revista Digital Universitaria [en línea]. 1 de noviembre de 2014, Vol. 15, No.11. Disponible en Internet: <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art91/index.html> ISSN: 1607-6079.
- Ramos, J., Álvarez, J., Figueroa, J., Solís, J., Rodríguez, R., Hernández, R. Buening, G., y Vega, C. (1992). Evaluation of a colorimetric *Babesia bigemina*-DNA probe within an epidemiological survey. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 87(3): 213- 217. DOI: 10.1590 / s0074-02761992000700035
- Rebhun W., C., Guard C., y Richards C., M. (1999). *Enfermedades del ganado vacuno lechero*. Zaragoza: Editorial ACRIBIA S.A. 84-200.

- Ríos, R., y Osorno, B. (1971). Aislamiento e Identificación de una Cepa de *Eperythrozoon wenyonii* en México. *Tec. Pec. en Méx.*, 19:21-24. Recuperado de: <https://cienciaspecuarias.inifap.gob.mx/index.php/Pecuarias/article/view/1902>
- Rodríguez, R., Grisi, L., Pérez, A., Silva, H., Torres, J., Fragoso, H., Romero, D., Rosario, R., Saldierna, F., y García, D. (2017). Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. *Revista Mexicana Pecuaria*. 8 (1), 61–74. DOI: <https://doi.org/10.22319/rmcp.v8i1.4305>
- Rodríguez, R., Quiñones, F., Ramírez, G. y Ruiz, H. (2003). Presencia del género *Trypanosoma* en la garrapata *Boophilus microplus* en el trópico mexicano. *Rev Biomed*. 14:29-33. DOI: <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v14i1.337>
- Rodríguez, 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, 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. Recuperado de: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-90282014000300009](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-90282014000300009)
- Rodríguez, R., Torres, J., Ramírez, G., Rosado, J., Aguilar, A., Ojeda, M., y Bolio, M. (2011). Control de Parásitos Internos y Externos que Afectan al Ganado Bovino en Yucatán, México. Manual Técnico UADY, pp 17. Recuperado de: [https://www.researchgate.net/profile/Roger\\_Ivan\\_Rodriguez\\_Vivas/publication/268223768\\_Rodriguez-Vivas\\_RI\\_Torres\\_AJF\\_Ramirez\\_CGT\\_Aguilar\\_RJA\\_Aguilar\\_CAJ\\_Ojeda](https://www.researchgate.net/profile/Roger_Ivan_Rodriguez_Vivas/publication/268223768_Rodriguez-Vivas_RI_Torres_AJF_Ramirez_CGT_Aguilar_RJA_Aguilar_CAJ_Ojeda)

\_CMM\_Bolio\_GME\_2011\_Manual\_tecnico\_Control\_de\_parasitos\_internos\_y\_externos\_que\_afectan\_al\_ganado\_bovino\_en\_Yucatan\_Mexico\_UADY-C/links/54664de20cf2f5eb18016c5f/Rodriguez-Vivas-RI-Torres-AJF-Ramirez-CGT-Aguilar-RJA-Aguilar-CAJ-Ojeda-CMM-Bolio-GME-2011-Manual-tecnico-Control-de-parasitos-internos-y-externos-que-afectan-al-ganado-bovino-en-Yucatan.pdf

- Rojas, E., Domínguez, P., García, M., Cruz-Vázquez, C., Figueroa, J., y Ramos, J. (2004). Prevalencia e incidencia de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en un hato bovino en Axochiapan, Morelos. *Revista de investigación y difusión científica*. 8 (2): 1-8. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=83780207>
- Rosario, R., Domínguez, D., Rojas, E., Ortiz, M., y Martínez, F. (2010). Estrategias para el Control de la Garrapata *Boophilus microplus* y la Mitigación de la Resistencia a los Pesticidas. 1er. Simposium de Salud y Producción de Bovinos de Carne en la Zona Norte-Centro de México. Aguascalientes, Ags. mayo 2010. En el Marco de La Feria de San Marcos 2010. Pp. 1-22.
- Rovid, A., Roth, J., y Galyon, J. (2010). *Enfermedades Emergentes y Exóticas de los Animales* (1st ed.). Iowa (Estados Unidos): The Center for Food Security & Public Health, pp. 100-103.
- SENASA (2006). Manual de anaplasmosis y babesiosis. *Sitio Argentino de Producción Animal*. pp. 1-11. Recuperado de: [http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad\\_intoxicaciones\\_metabolicos/parasitarias/Bovinos\\_garrapatas\\_tristeza/26-Manual\\_Anaplasmosis\\_Babesiosis.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/parasitarias/Bovinos_garrapatas_tristeza/26-Manual_Anaplasmosis_Babesiosis.pdf)

SENASICA (2016). La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, por sus siglas en francés) reconoció a México como país con un riesgo insignificante de Encefalopatía Espongiforme bovina (EEB) durante su Sesión General de Delegados. Disponible en: <https://www.gob.mx/senasica/prensa/consigue-mexico-reconocimiento-internacional-por-riesgo-insignificante-ante-enfermedad-de-vacas-locas-35386>

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>.

Sharma, A., Singla, L., Ashuma, Batth, B., y Kaur, P. (2016). Clinicopatho-Biochemical Alterations Associated with Subclinical Babesiosis in Diary Animals. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*. 10 (2), 258-266. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4906765/pdf/JAD-10-258.pdf>

SIAP - SAGARPA. (2016). Bovino Carne y Leche, Población ganadera 2007-2016. Recuperado de: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/276006/Bovino.pdf>.

Solorio, L. y Rodríguez, R. (1997a). Epidemiología de la babesiosis bovina. I. Componentes epidemiológicos. *Revista Biomédica*, 8, 37-47.

Solorio, L. y Rodríguez, R. (1997b). Epidemiología de la babesiosis bovina. II. Indicadores epidemiológicos y elementos para el diseño de estrategias de control. *Revista Biomédica*, 8, 95-105. Recuperado de: <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb97825.pdf>

Soulsby, E. (1987). *Parasitología y Enfermedades parasitarias en los Animales Domésticos*. (7 ed.). México D.F: Interamericana. pp. 719 – 767.

- Suárez C. y Noh S. (2011). Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. *Veterinary parasitology* 180, (1-2), 109-125. DOI: 10.1016 / j.vetpar.2011.05.032
- Suruez, C., McElwain, T., Stephens, E., Mishra, V., y Palmer. G. (1991a). Sequence conservation among merozoite apical complex proteins of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and other Apicomplexa. *Mol. Biochem. Parasitol.* 49:329-332. DOI: 10.1016 / 0166-6851 (91) 90077-j
- Suruez, C., Palmer, G., Jasmer, D., Hines, S., Perryman, L., y McElwain, T. (1991b). Characterization of the gene encoding a 60-kilodalton *Babesia bovis* merozoite protein with conserved and surface-exposed epitopes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 46:45-52. DOI: 10.1016 / 0166-6851 (91) 90197-e
- Tarazona, J., Muñoz, M., y Ortiz, A. (1986). La intoxicación por cobre en los animales domésticos. *Revista de extensión agraria*, 5:111-115. Recuperado de: <https://es.scribd.com/document/330461439/Intoxicacion-Por-Cobre-en-Los-Animales-Domesticos>
- Tebele, N., Skilton, R., Katende, J., Wells, C., Nene, V., McElwain, T., Morzaria, S. y Musoke, A. (2000). Cloning, characterization, and expression of a 200-kilodalton diagnostic antigen of *Babesia bigemina*. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2240-2247. Recuperado de: <https://jcm.asm.org/content/38/6/2240.short>
- Terkawi, M., Huyen, N., Shinuo, C., Inpankaew, T., Maklon, K., Aboulaila, M., Ueno, A., Goo, Y., Yokoyama, N., Jittapalapong, S., Xuan, X., & 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. DOI: 10.1016 / j.vetpar.2011.01.041

- Uilenberg, G. (1995). International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. *Veterinary Parasitology*, 57(1-3), 19-41. DOI: 10.1016/0304-4017(94)03107-8
- Vanzini, V., y Ramírez, L. (1994). Babesiosis y Anaplasmosis Bovina, Diagnóstico Epidemiología y Control. *Sitio Argentino en Producción Animal*, 25(3), 137-190. Recuperado de: [http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad\\_intoxicaciones\\_metabolicos/parasitarias/Bovinos\\_garrapatas\\_tristeza/56-babesiosis\\_y\\_anaplasmosis\\_bovina.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/parasitarias/Bovinos_garrapatas_tristeza/56-babesiosis_y_anaplasmosis_bovina.pdf)
- Willadsen, P. (2008). Antigen cocktails: valid hypothesis or unsubstantiated hope?. *Trends in Parasitology*, 24(4) 164-167. DOI: 10.1016/j.pt.2008.01.005.

## XV. ANEXOS

### 15.1 ANEXO 1

Preparación de soluciones para pruebas serológicas

#### 15.1.1 PBS 10X Stock

Disolver en 200ml de agua destilada.

| <u>Reactivo</u>  | <u>Cantidad (g)</u> |
|--|---------------------|
| Fosfato de sodio monobásico monohidratado<br>( $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ ) | 2.62                |
| Fosfato de sodio difásico anhidro<br>( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )                           | 11.5                |

Aforar a 1000 ml con agua destilada, ajustar pH a 7.2 y mantener a 4°C.

#### 15.1.2 PBS 1X Stock

En 900 ml de agua destilada se agregarán 100ml de PBS 10X

#### 15.1.3 Solución de lavado PBS-Tween, 200ml

$200\text{ml} \times 0.1\% = 400,000 = 400\mu\text{l}$

A 200ml de PBS 1X se le agregan 400 $\mu\text{l}$  de Tween 20 y se homogeniza a manera de no provocar espuma.

#### 15.1.4 Solución de bloqueo, Leche al 3%, 50ml

100ml..... 3grs (3%)

50ml.....1.5grs

A 40ml de PBS-Tween se le agregan 1.5grs de leche al 3%, se homogeniza y se completan los 50ml añadiendo más PBS-Tween.

#### **15.1.5 Diluciones de sueros problema.**

>> Para IFI se realizan ocho diluciones dobles seriadas de los siete muestreos de las diferentes fechas de extracción sanguínea de los dos ovinos, utilizando PBS 1X filtrado. Iniciando en dilución 1:80. En el caso de los sueros problema de los 99 bovinos, se hizo una dilución única 1:80 de cada una de las muestras.

>> Para iELISA se elabora una dilución de cada muestra a 1:200 con PBS 1X filtrado.

#### **15.1.6 Dilución de conjugados.**

>> Para IFI ovinos se realizó una dilución 1:250. 1µl de anti-IgG de ovino y 249µl de PBS 1X filtrado. Para IFI de bovinos se hizo una dilución 1:500 de anti-IgG de bovino.

>> Para iELISA se elaboró una dilución de conjugado anti-IgG de ovino 1:10000 y una dilución de conjugado anti-IgG de bovino 1:10000 en PBS 1X filtrado

Cabe mencionar que las cantidades utilizadas para la realización de las técnicas serológicas fueron estandarizadas en trabajos anteriores.

## **15.2 ANEXO 2**

Procedimientos de las técnicas serológicas utilizadas



### 15.2.1 Técnica IFI

1. Se utilizaron laminillas con antígenos derivados de cultivo *in vitro* de *B. bigemina* con un porcentaje de eritrocitos para citados (PEP) de 3% mantenidos en congelación a -20°C.
2. Se retiraron del congelador y se colocaron inmediatamente en perlas de sílice, posteriormente se incubaron a 37°C para su secado durante 15 min.
3. Posteriormente se sumergieron en acetona por seis minutos para su fijación y se delimitaron áreas circulantes con lápiz graso donde se colocaron las muestras.
4. A cada círculo se le agregaron 5µl de cada una de las muestras de suero de ovino previamente diluidas, incluyendo un control positivo y negativo.
5. Enseguida se colocaron las laminillas en la cámara húmeda y se incubaron a 37°C durante 30 minutos
6. Se realizaron 3 lavados, el primero con PBS 1X y se colocaron en el agitador por 10 minutos a 110rpm. Un segundo lavado similar, a 110rpm durante 5 minutos; por último, un lavado con agua destilada por 5 minutos a 110rpm en agitador.
7. Se agregó 5µl de conjugado anti-IgG de ovino con isotiocianato de fluoresceína (FITC) previamente diluido a 1:250 a todos los círculos marcados. Se repetirá paso 5 y 6.
8. Se realizó lectura de microscopio de epifluorescencia (34473-B LEICA DMLB) en objetivo de 100x, agregando a cada delimitación una gota de glicerina fosfatada (1:10) en PBS 1X.

### 15.2.2 Técnica iELISA

1. Se sensibilizó la microplaca de poliestireno de 96 pozos con 100µg/ml de proteína recombinante RAP-1, en tampón de carbonatos. Con ayuda de una micropipeta multicanal se agregaron 50µl a cada pozo. Se colocó la alfombrilla de goma sobre la placa y se envolvió con papel aluminio, se rotuló e incubó a 4°C durante 16-20hrs.
2. Se realizaron 3 lavados, un lavado rápido añadiendo 50µl de PBS a cada pozo y secando vigorosamente sobre toallas de papel. Se procedió a un segundo lavado agregando 50µl de PBS-Tween a cada pozo, colocando la placa en el agitador a 150 rpm durante 5 minutos, se secó vigorosamente sobre toallas de papel y se hizo un tercer lavado igual al segundo.
3. Una vez seca la placa, se le añadieron 50µl de solución de leche descremada al 3% a cada pocillo y se cubrió con la alfombrilla y el papel aluminio.
4. Se incubó por 30 minutos a 37°C. Se repitieron lavados del paso 2.
5. Se colocó en la placa 50µl a cada pozo de los sueros problema previamente diluidos (1:200 c/u) y se cubrió e incubó a 37°C durante 60 minutos. Se repitieron lavados del paso 2.
6. Se colocaron 50µl de conjugado anti-IgG de ovino en cada pozo. Previamente diluido a 1:10000 en PBS 1X filtrado.
7. Se cubrió e incubó a 37°C por 30 minutos. Se repitieron lavados del paso 2.
8. Se agregaron 50µl de sustrato cromogénico TMB, se tapó con la alfombrilla y el papel aluminio, posteriormente se incubó a 37°C por 30 min.

9. Se realizaron las lecturas en espectrofotómetro (BIO-RAD, Imark 14710) a 650nm de densidad óptica.

NOTA: Para la obtención de resultados de seroprevalencia de un hato de 99 bovinos provenientes del campo experimental Pichucalco, Chiapas (zona endémica), se llevaron a cabo las técnicas serológicas antes descritas, a diferencia de los sueros y conjugados utilizados.

### 15.3 ANEXO 3

Cuadros de resultados de ovinos inoculados experimentalmente con la proteína recombinante RAP-1 de *Babesia bigemina* en Inmunofluorescencia indirecta.

**Cuadro 6.** Resultados de la técnica por Inmunofluorescencia indirecta del ovino 197.

| RAP-1 OVINO 197 |    |     |     |     |      |      |      |       |
|-----------------|----|-----|-----|-----|------|------|------|-------|
|                 | 80 | 160 | 320 | 640 | 1280 | 2560 | 5120 | 10240 |
| 1               | -  | -   | -   | -   | -    | -    | -    | -     |
| 2               | +  | -   | -   | -   | -    | -    | -    | -     |
| 3               | +  | +   | -   | -   | -    | -    | -    | -     |
| 4               | +  | +   | +   | -   | -    | -    | -    | -     |
| 5               | +  | +   | +   | +   | -    | -    | -    | -     |
| 6               | +  | +   | +   | +   | +    | -    | -    | -     |

**Cuadro 7.** Resultados de la técnica por Inmunofluorescencia indirecta del ovino 198.

| RAP-1 OVINO 198 |    |     |     |     |      |      |      |       |
|-----------------|----|-----|-----|-----|------|------|------|-------|
|                 | 80 | 160 | 320 | 640 | 1280 | 2560 | 5120 | 10240 |
| 1               | -  | -   | -   | -   | -    | -    | -    | -     |
| 2               | -  | -   | -   | -   | -    | -    | -    | -     |
| 3               | +  | +   | +   | -   | -    | -    | -    | -     |
| 4               | +  | +   | +   | -   | -    | -    | -    | -     |
| 5               | +  | +   | +   | +   | -    | -    | -    | -     |
| 6               | +  | +   | +   | +   | -    | -    | -    | -     |
| 7               | +  | +   | +   | +   | -    | -    | -    | -     |