



**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 bovis* COMO ANTÍGENOS"**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

MIGUEL PALACIOS CÁRDENAS

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

DR. JUAN JOSÉ OJEDA CARRASCO

**M. EN C. REBECA MONTSERRAT
SANTAMARIA ESPINOSA**

AMECAMECA, ESTADO DE MÉXICO

MAYO DE 2019

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
III. JUSTIFICACIÓN	6
IV. MARCO TEÓRICO.....	7
4.1 El género <i>Babesia</i>	7
4.1.1 Morfología	7
4.2 Ciclo biológico	8
4.2.1 Ciclo biológico de <i>Babesia bigemina</i> y <i>Babesia bovis</i>	8
4.3 Mecanismo de invasión al eritrocito.....	10
4.4 Patogenia	14
4.5 Signos Clínicos.....	15
4.6 Epidemiología.....	16
4.7 Inmunología	19
4.8 Diagnóstico	23
4.8.1 Diagnóstico de laboratorio	23
4.8.2 Diagnóstico Post-mortem	28
4.9. Estrategias de Control.....	29
4.9.1 Control del vector.....	29
4.9.2 Control de movilización de ganado.....	30
4.9.3 Uso de ganado resistente	30
4.9.4 Inmunización	31
4.10 Búsqueda de antígenos.....	32
4.11 Tratamiento.....	35
V. HIPÓTESIS.....	37
VI. OBJETIVOS	38
6.1 Objetivo general.....	38
6.2 Objetivos particulares.....	38
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	39

7.1 Diseño de Estudio.....	39
7.1.1 Localización.....	39
7.1.2 Reconocimiento inmunológico en ovinos	39
7.1.3 Seroprevalencia de babesiosis bovina.....	40
7.2 Material del Ensayo inmunoenzimático indirecto (iELISA) ovinos y bovinos.	42
7.3 Ensayo inmunoenzimático indirecto (iELISA)	43
7.4 Material de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) ovino y bovino.	44
7.5 Inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	44
XIII. RESULTADOS	46
8.1 Reconocimiento inmunológico en ovinos.....	46
8.1.1 Ensayo Inmunoenzimático Indirecto (iELISA) ovinos	46
8.1.2 Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) ovinos.....	47
8.2 Seroprevalencia de babesiosis bovina.....	50
8.2.1 Ensayo inmunoenzimático indirecto (iELISA) e Inmunofluorescencia indirecta (IFI) en bovinos nativos del C.E. Pichucalco.....	50
IX. DISCUSIÓN.....	54
9.1 Reconocimiento inmunológico en ovinos.....	54
9.2 Seroprevalencia de babesiosis bovina.....	56
X. CONCLUSIÓN	58
10.1 Reconocimiento inmunológico en ovinos y Seroprevalencia de babesiosis bovina.....	58
XI. SUGERENCIAS.....	59
Bibliografía.....	60
XIII. ANEXOS.....	77
13.1 Anexo 1	77
13.2 Anexo 2	78
13.3 Anexo 3	79
13.4 Anexo 4	81
13.4 Anexo 5	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de <i>Babesia bovis</i>	10
Figura 2. Representación del reconocimiento e invasión de eritrocitos por merozoítos de <i>Babesia bovis</i>	13
Figura 3. Campaña nacional para el control de la garrapata <i>Rhipicephalus</i> antes <i>Boophilus</i> spp	16
Figura 4. Coexistencia de la triada en babesiosis bovina.	18

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tabla de concordancia.....	41
Tabla 2. Tabla de valoración de índice Kappa	42

Agradecimientos

Primero que nada quiero agradecer a mis padres por la oportunidad de existir, por su sacrificio en algún tiempo incomprendido por su ejemplo de superación incansable, por su comprensión y confianza para brindarme la oportunidad de continuar preparándome y su apoyo incondicional incluso pasando malos ratos.

Agradezco a mis directores de tesis, la M. en C. Rebeca Montserrat Santamaria Espinosa y al Dr. Juan José Ojeda Carrasco por brindarme la oportunidad de colaborar en este proyecto y compartir conmigo sus conocimientos, por su paciencia y orientación. Cabe mencionar que esta tesis se llevo a cabo con recursos del proyecto No. 1-1.6-1373533989-P-M.2-2 "Desarrollo de pruebas de diagnostico rápido para la babesiosis bovina" del INIFAP a cargo del Dr. Julio Vicente Figueroa Millan.

Gracias al MVZ José Juan Lira Amaya por el apoyo y la oportunidad para poder realizar mi estancia en la unidad de babesia, por su infinita paciencia y apoyo durante el tiempo de estancia.

A todos los integrantes del Laboratorio de Babesiosis del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), por haberme recibido con los brazos abiertos y sus consejos .

Gracias a ese amor que estuvo conmigo durante este largo proceso, por el gran apoyo que me brindaste y todas las cosas buenas que me enseñaste y compartiste conmigo.

Finalmente a todas las personas familiares y amigos, que han estado presentes en buenos como en malos momentos.

Dedicatorias

A Dios por la oportunidad de vivir y brindarme las fuerzas necesarias para salir adelante con cada caída.

Con gran amor hacia mis padres por ser mis grandes guías y apoyo incondicional, al mismo tiempo a mis hermanas por su apoyo y cariño.

Para el amor que me acompañó en el proceso y por su apoyo incondicional.

A todos aquellos familiares y amigos que estuvieron a mi lado durante todo este trayecto.

I. INTRODUCCIÓN

La babesiosis bovina, "Piroplasmosis", "Fiebre de Texas" o "Fiebre de Garrapatas" (Meléndez, 1998); es una enfermedad parasitaria febril, transmitida por garrapatas y causada por uno o más protozoarios del género *Babesia*, generalmente se caracteriza por ocasionar una lisis eritrocítica que conduce a anemia y muerte (Bravo, 2012).

La babesiosis fue reportada por primera vez en 1888 por Viktor Babes, en Rumania, quien identificó al parásito tras analizar muestras sanguíneas de bovinos con signos de anemia hemolítica y hemoglobinuria. En 1893 Theobald Smith y Frederick Kilborne demostraron que la garrapata *Boophilus annulatus* (ahora perteneciente al género *Rhiphicephalus*) era la responsable de transmitir la enfermedad en los bovinos (Smith y Kilborne, 1893).

En México, se ha identificado la presencia de las dos especies más importantes *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, siendo la primera, la especie más patógena seguida por *B. bigemina* la cual presenta una mayor distribución (Álvarez y Canto, 1985; Vázquez, 2010; OIE, 2014). La transmisión de esta enfermedad se da por medio de un vector el cual es la garrapata *Rhiphicephalus (Boophilus) microplus*, la cual tiene un ciclo biológico de un solo hospedero siendo en ocasiones un complejo de esta enfermedad (Vázquez, 2010); y de acuerdo con reportes de SENASICA (2018), se encuentra ampliamente distribuido en zonas tropicales, subtropicales y templadas del país, debido a que *Babesia* requiere de la garrapata para completar su ciclo de vida, las zonas libres del vector también se consideran libres de babesiosis. Por lo cual Callow *et al.* (1997); así como Bock *et al.* (2004), mencionan que en México la presencia de garrapatas del género *R. microplus* determina la presencia de *B. bovis* y *B. bigemina*.

El impacto económico negativo de la garrapata del género *R. microplus* a la ganadería se debe a las pérdidas de millones de dólares que causan anualmente

a los ganaderos por los daños a las pieles a causa de las picaduras, anemia por la pérdida de sangre y baja producción de leche y carne. Así mismo, por ser vectores de los patógenos *B. bovis* y *B. bigemina* causantes de la piroplasmosis (Brown *et al.*, 2006a; De la Fuente *et al.*, 2006). Aunque el costo ocasionado por la presencia de la garrapata y las enfermedades que trasmite como la babesiosis y la anaplasmosis no ha sido estimado recientemente, en 1975 éstas fueron de alrededor de 186 millones de dólares, muchos de los cuales son atribuidos a las pérdidas en la producción de carne y leche (Beltran, 1975).

Morfológicamente *Babesia bigemina* se observa e identifica por un par de corpúsculos en forma de pera unidos en un ángulo agudo dentro del eritrocito maduro. También hay formas redondas que miden entre 2 y 3 micras y aquellas en forma de pera, que miden entre 4 y 5 micras (Gasque, 2008).

Por su parte, *Babesia bovis* puede ser identificada como un solo corpúsculo, pequeños corpúsculos redondos o como corpúsculos pares en forma de pera unidos en un ángulo obtuso dentro del eritrocito maduro. Las formas redondas miden de 1 a 1.5 micras y las formas de pera de 1.5 a 2.4 micras (Gasque, 2008).

Es por esta razón que a *B. bigemina* se le incluye dentro de las babesias “grandes” y a *B. bovis* dentro del grupo de las “pequeñas” (Petrigh, 2010).

El cuadro clínico de un animal infectado con *Babesia* varía según la edad del animal, su estado inmunológico y patogenicidad de la cepa del parásito. Los bovinos menores a 9 meses en zonas enzoóticas generalmente no presentan signos debido al grado de inmunidad transferida por el calostro, por lo que la mayoría de los casos clínicos de babesiosis se observan en animales adultos (Jaramillo, 2016).

En los casos donde se presenta la infección con *Babesia bovis* se caracteriza por fiebre alta, ataxia, anorexia, shock circulatorio general y, a veces, también signos nerviosos como resultado del secuestro de eritrocitos infectados en capilares cerebrales. En una fase más avanzada de la enfermedad puede aparecer anemia y hemoglobinuria. Sin embargo en infecciones por *B. bigemina* los signos más

importantes consisten en fiebre, hemoglobinuria y anemia. En las infecciones por *B. bigemina* no se produce secuestro intravascular de eritrocitos infectados (OIE, 2014).

El diagnóstico de la babesiosis en bovinos puede ser relativamente fácil cuando los signos clínicos son evidentes y están apoyados por el examen microscópico de frotis sanguíneos teñidos con Giemsa (Mallick *et al.*, 1987). Esta técnica requiere de mucha práctica y conocimiento de la patología, así como siempre tener ayuda del laboratorio para su confirmación.

Las técnicas para el diagnóstico de la babesiosis son: Las pruebas de inmunofluorescencia, Ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISA) con algunas pequeñas diferencias en sus valores de sensibilidad y especificidad, tal es así, que permiten identificar animales portadores asintomáticos (Álvarez, 1991).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México se cuenta con un potencial ganadero importante, principalmente en aquellos estados que se encuentran limitando con el Golfo de México, es por esta razón que se localizan entre las regiones más importantes productoras de ganado bovino, principalmente en producción extensiva de ganado de carne, debido a la diversidad climática con la que se cuenta y la cual llega a favorecer la producción; pero así como también se convierten en zonas de riesgo por presentar de manera natural algunas enfermedades infecciosas y parasitarias

Las enfermedades parasitarias representan un problema importante en la ganadería, debido a las limitantes en salud y rendimiento productivo de los animales; como lo es el caso de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* la cual se encuentra ampliamente distribuida en regiones ganaderas cercanas a la zona del Golfo de México, y es vector de los protozoarios *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, agentes causales de la babesiosis o piroplasmosis bovina. Está enfermedad representa un alto riesgo en las zonas ganaderas tropicales ya que se llega a presentar de manera clínica la enfermedad, principalmente en animales adultos, ocasionando pérdidas productivas (pérdida de peso y disminución de la producción láctea) y económicas (costos por tratamiento de animales enfermos y en ocasiones muerte de los mismos), así como una limitante en la importación de ganado para el mejoramiento de los hatos en estas zonas tropicales.

Por lo antes mencionado, es necesario el diagnóstico de la enfermedad mediante pruebas que permitan conocer la situación epidemiológica en zonas consideradas como de riesgo, es así que por varios años se ha realizado investigación sobre la babesiosis bovina por medio del diagnóstico inmunológico empleando pruebas serológicas, como lo son; Inmunofluorescencia indirecta (IFI), técnica que se caracteriza por la sensibilidad y especificidad que presenta, pero la cual se puede llegar a ver afectada, ya que dependerá de la experiencia e interpretación por parte del personal que la realice, de igual manera por el tiempo de realización y la cantidad de muestras que pueden llegar a ser analizadas; por lo tanto, se ha

realizado la comparación con el ensayo inmunoenzimático (ELISA), esto debido a que permite analizar un mayor número de muestras, la interpretación se realiza por medio de la medición de densidad óptica en un espectrofotómetro; en la que se basa para establecer un punto de corte de tal forma que los resultados son considerados positivos o en su caso negativos, para poder determinar los datos epidemiológicos y su representación.

Es así que la detección temprana de la enfermedad sería un elemento esencial para el control de la babesiosis. Para ello se requiere de métodos mejorados en el diagnóstico que permitan evaluar de forma eficiente el estado inmunológico (detección de anticuerpos) de los animales, métodos en los que se han empleado antígenos recombinantes de la superficie del merozoíto de *B. bovis* y así evaluar la condición epidemiológica de la zona en la que se encuentran, del mismo modo se debe indagar sobre como el ganado puede ser protegido contra estos agentes patógenos para lograr un óptimo rendimiento.

III. JUSTIFICACIÓN

La ganadería es una de las principales actividades productivas en México, se puede tener ganadería extensiva, intensiva y de autoconsumo, las cuales se pueden encontrar en tres regiones: 1) árida y semi-árida; 2) templada, y 3) trópico húmedo, sub húmedo y seco. En esta última, se aprovecha el buen potencial que se tiene para la producción de plantas forrajeras (debido a las características ecológicas de la zona) en áreas no arables que dificulta su uso para cultivos agrícolas básicos. Pero también favorece la presencia de ectoparásitos siendo los principales parásitos que causan problemas en los bovinos.

La garrapata *R. (Boophilus) microplus* representa a los ectoparásitos de mayor importancia económica y sanitaria en México, ya que, ocasiona año con año grandes pérdidas en explotaciones ganaderas, así como la transmisión de agentes infecciosos causantes de la babesiosis bovina (*Babesia bigemina* y *Babesia bovis*), los cuales pueden ocasionar la muerte del ganado, por ende el diagnóstico de la babesiosis es un instrumento importante para la prevención y/o control, así como el manejo de la enfermedad, con base en esto es necesario realizar investigación científica para la elaboración de programas sobre el control de la enfermedad, y se tiene la necesidad de mejorar los métodos de diagnóstico, para ello las investigaciones se deberán centrar en el desarrollo de técnicas diagnósticas sensibles y específicas. En tal sentido, esta búsqueda se ha dirigido a las proteínas de membrana de merozoítos y esporozoítos, las cuales son capaces de inducir una respuesta inmune específica ya que sueros de animales inmunes inoculados con proteína MSA-1 reconocen los antígenos de superficie.

IV. MARCO TEÓRICO

4.1 El género *Babesia*

Babesia bovis pertenece:

Reino *Protista*

Subreino *Protozoa*

Filo *Apicomplexa*

Clase *Sporozoa*

Subclase *Piroplasmia*

Orden *Piroplasmida*

Suborden *piroplasmorina*

Familia *babesiidae*

Género *Babesia*.

Especie *Babesia bovis*

(Levine, 1971).

4.1.1 Morfología

4.1.1.1 *Babesia bigemina*

Característicamente se observa y se identifica por un par de corpúsculos en forma de pera unidos en un ángulo agudo dentro del eritrocito maduro. También hay formas redondas que miden entre 2 y 3 micras y aquellas en forma de pera o alargadas, que miden entre 4 y 5 micras (Gasque, 2008).

4.1.1.2 *Babesia bovis*

Está típicamente identificada como un sólo corpúsculo, 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 micras y las de forma de pera de 1.5 a 2.4 micras (Gasque, 2008).

Es por esta razón que a *B. bigemina* se le incluye dentro de las babesias “grandes” y a *B. bovis* dentro del grupo de las “pequeñas” (Petrih, 2010).

4.2 Ciclo biológico

Babesia bovis así como *Babesia bigemina* presentan formas evolutivas diferentes tanto en el hospedador definitivo (bovino) como en el hospedador intermediario o vector (garrapata) (Bravo, 2012). El bovino se infecta tras la mordedura de la garrapata por la inoculación de esporozoítos de *Babesia bovis* y/o *Babesia bigemina* con la saliva (Vasco, 2013).

4.2.1 Ciclo biológico de *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*

El ciclo biológico de *B. bigemina* y *B. bovis* consta de una etapa sexual en la garrapata y una etapa asexual en los eritrocitos del bovino.

La etapa sexual se inicia en el intestino de las hembras de *R. microplus* después de la ingestión de sangre de bovinos portadores de *B. bovis* y/o *B. bigemina*. Las condiciones propias del intestino medio de la garrapata estimulan la producción de dos poblaciones de células denominadas cuerpos radiados o "Strahlenkorper" derivadas de los gametocitos diferenciados en los eritrocitos del bovino. Los cuerpos radiados se multiplican formando fragmentos multinucleados, y posteriormente se fragmentan en unidades haploides que se fusionan en pares (singamia) para formar cigotos, proceso que incluye una división meiótica. Cada cigoto se multiplica en las células digestivas y luego en las células basofílicas, para generar los kinetos, proceso conocido como esporogonia. Los kinetos se

liberan en la hemolinfa desde donde invaden células de diferentes órganos, incluidos los ovarios, en los que se producen sucesivos ciclos de esporogonia secundaria. La invasión de los ovarios permite la transmisión transovárica del parásito a la próxima generación de garrapatas (Mackenstedt *et al.*, 1995).

El esporozoíto, estadio infectante maduro en las glándulas salivales de la garrapata *R. (Boophilus) microplus*; *B. bovis*, llega a ser infeccioso dos a tres días posteriores que las larvas se prenden al bovino, sin embargo *B. bigemina*, puede ser infeccioso nueve días después de que las larvas han infestado al bovino, momento en el que alcanza su etapa de ninfa y continúa en su etapa adulta (Antonio, 2013). Los esporozoítos son inoculados directamente al torrente sanguíneo a través del hipostoma de la garrapata y transportados por la saliva (Hodgson, 1992).

De acuerdo con Hernández *et al.* (2010), solo el estadio larval de la garrapata *R. microplus* puede transmitir *B. bovis*, en estadio de ninfa se pierde esta capacidad, a pesar de mantener la infección.

Cada esporozoíto infecta un eritrocito a través de un mecanismo que incluye la selección del eritrocito, adherencia, reorientación e invasión. Esta última depende de la integridad del complejo apical, y se encuentra situado en el extremo agudo de las formas invasivas del parásito, el cual incluye organelos llamados roptrias y micronemas, que se abren en la parte anterior de la célula y secretan adhesinas que permiten al parásito la adherencia al eritrocito, la modificación de su membrana plasmática y la rápida invasión dentro de una vacuola parasitófora que se desintegra antes de la división del trofozoíto. Esta nueva forma sin los organelos del complejo apical, inicia el estadio de merogonia caracterizado por la división binaria, asexual, la que finaliza con la formación de dos nuevas formas invasivas denominadas merozoítos (Figura 1.) (Young y Morzaria, 1986).

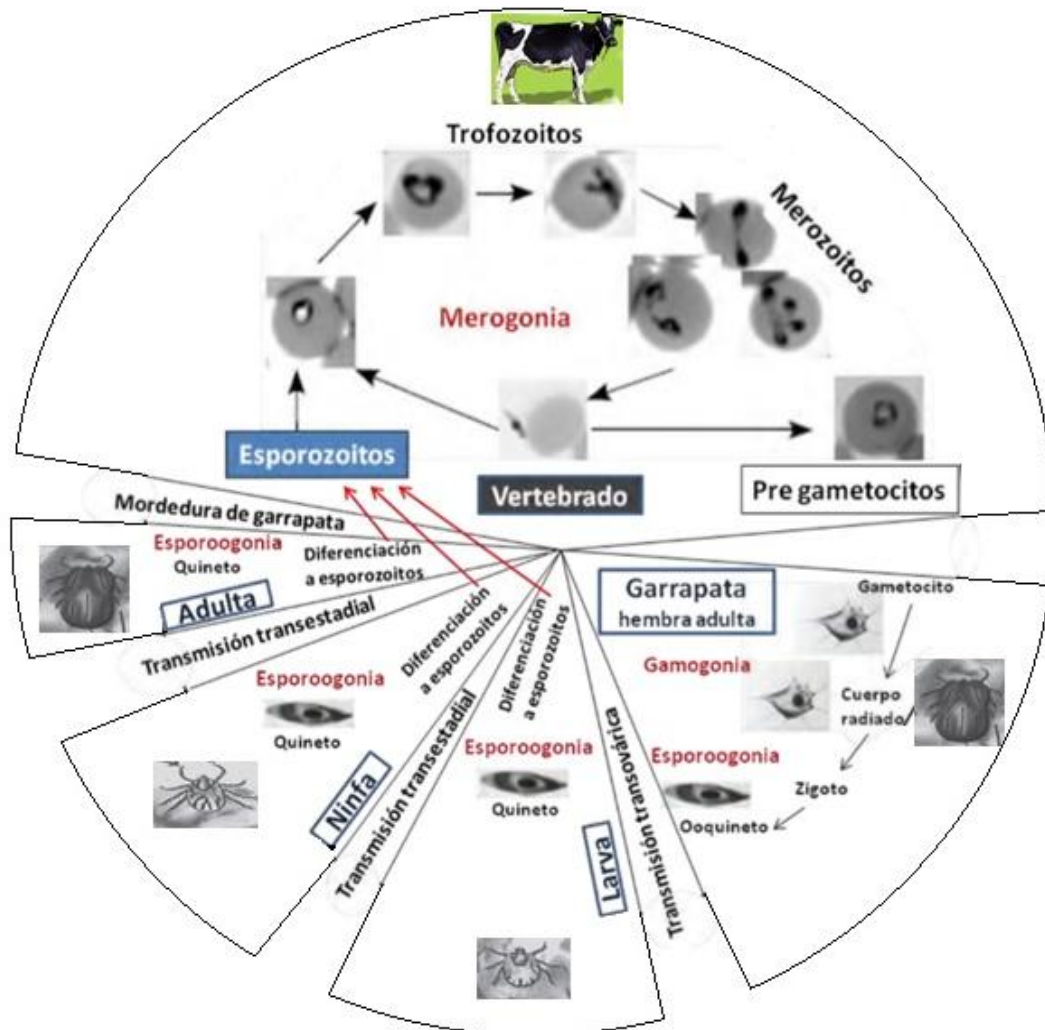


Figura 1. Ciclo biológico de *Babesia bovis* (Modificado de Chauvin *et al.*, 2009).

4.3 Mecanismo de invasión al eritrocito

De acuerdo con Gratzer y Dluzewski, (1993); Miller *et al.* (2002); Yokoyama *et al.* (2006), son cinco los pasos que se distinguen en el proceso de invasión al eritrocito, los cuales son los siguientes:

1. Ataque

2. Reorientación y deformación del eritrocito
3. Formación de unión estrecha merozoíto-eritrocito
4. Invasión
5. Internalización

1. Ataque

La interacción inicial entre merozoíto y eritrocito probablemente se trate de una colisión al azar, el cual involucra interacciones irreversibles entre proteínas de la superficie del parásito y del eritrocito hospedador. Mediante ensayos bioquímicos se ha llevado a cabo la identificación de al menos dos miembros de la familia de antígenos variables de la superficie del merozoíto (VMSA) de *B. bovis*, denominados MSA-1 y MSA-2, los cuales se encuentran involucrados en la interacción inicial entre parásito al eritrocito (Gohil *et al.*, 2010).

2. Reorientación y deformación del eritrocito

Posterior a la unión al eritrocito, el parásito se reorienta de tal manera que la porción apical es yuxtapuesta a la membrana del eritrocito. Esta reorientación coincide con una deformación transitoria del eritrocito. El contenido de la porción apical es expulsado cuando el parásito invade, lo que no ocurre cuando el proceso invasivo es bloqueado por anticuerpos anti MSA-1 y MSA-2 de *B. bovis*, lo cual indica que la porción apical cumple un rol en el proceso de invasión (Sam-Yellowe, 1996).

Gohil *et al.* (2010), propusieron que en *B. bovis* los cuerpos esféricos cumplen una función similar a los gránulos densos de *Toxoplasma gondii* los cuales descargan su contenido, en base a esto se ven implicados en la modificación de la célula hospedadora.

3. Formación de unión estrecha merozoíto-eritrocito

Después de la reorientación del merozoíto y la descarga de los micronemas se forma una estrecha unión entre el parásito y la célula hospedadora. Posiblemente proteínas del micronema son importantes para la formación de la unión. Entre las

proteínas localizadas en los micronemas se encuentran AMA1 (apical membrane antigen) y TRAP (thrombospondin-related adhesive protein) en *Plasmodium* y *Babesia* (Aikawa *et al.*, 1992; Morrissette y Sibley, 2002; Allred, 2003; Gaffar *et al.*, 2004; Gohil *et al.*, 2010). El hecho interesante en el caso de la proteína AMA1 es que reconoce residuos de ácido siálico de la glicoforina, lo cual indica que probablemente está involucrada en interacciones ligando-receptor con proteínas expuestas en la superficie del eritrocito (Reed *et al.*, 2000; Morrissetts y Sibley, 2002).

4 y 5. Invasión e internalización

Proteínas presentes en la membrana del eritrocito son redistribuidas al momento de la unión, de manera tal que el área de contacto sobre la membrana del eritrocito esté libre de proteínas. Cuando la incipiente vacuola parasitófora está siendo formada, la unión parásito-hospedador al inicio posee forma de anillo, y el parásito parece moverse a través de estas estructuras anulares durante la expansión de la membrana vacuolar parasitófora (PVM). Las citocalasinas inhiben la entrada del merozoíto, pero no el ataque o adhesión. Por medio de esta inhibición se sugiere que las fuerzas requeridas para la invasión del parásito están basadas en elementos del citoesqueleto tales como actina y miosina. La capacidad de la miosina para generar fuerza motriz está bien caracterizada (por ejemplo, en la contracción muscular). Una única miosina de Apicomplexa ha sido identificada sobre la membrana plasmática de *Plasmodium* y *Babesia* (Pinder *et al.*, 2000; Morrissette y Sibley, 2002; Hettmann *et al.*, 2000; Yokoyama *et al.*, 2006).

El motor de miosina, presuntamente asociado con la porción citoplasmática del ligando del parásito, puede moverse a través de los filamentos de actina dentro del parásito y desplazar el complejo ligando transmembranal/receptor a través de la bicapa lipídica hacia la región posterior del parásito. El movimiento de la unión tipo anillo entre parásito y hospedador hacia atrás del merozoíto resulta en una internalización del parásito.

Una vez que el parásito ha entrado completamente, las uniones desaparecerán y la respectiva membrana vacuolar parásitofora se fusionará con la membrana del eritrocito. El cuerpo ya separado indica que el proceso de invasión se ha completado (Figura 2.) (Yokoyama *et al.*, 2006).

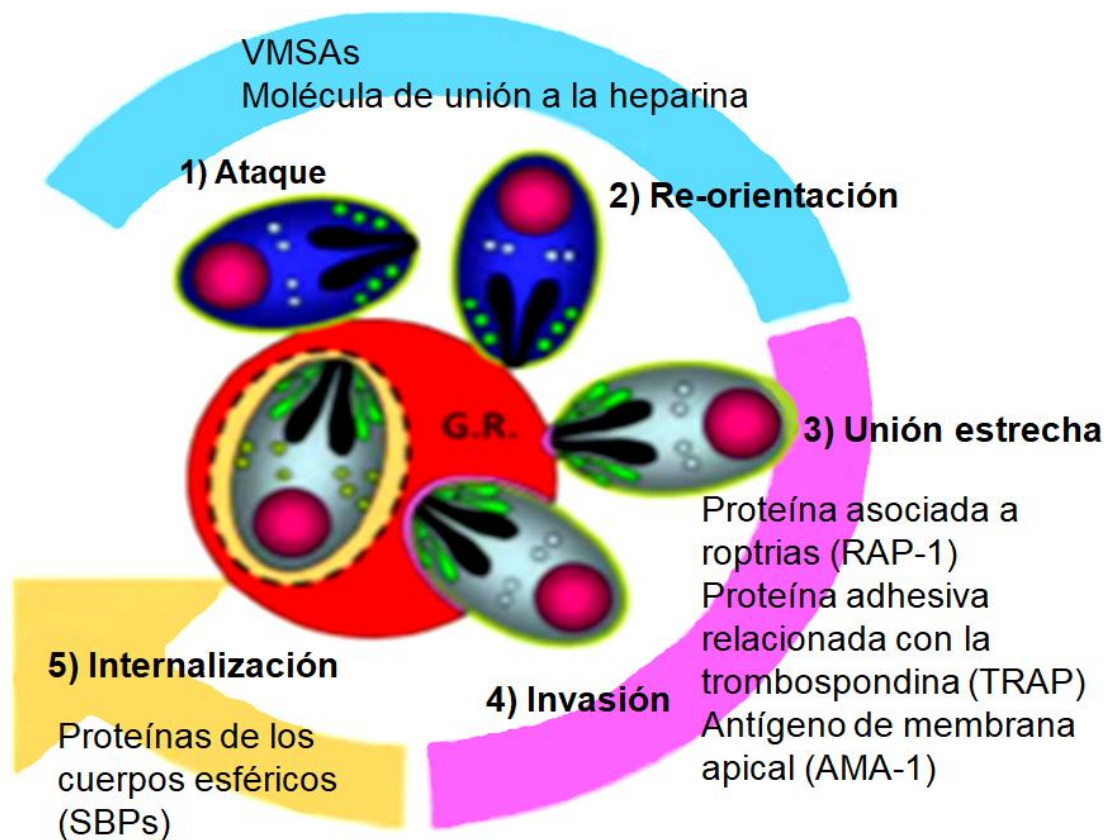


Figura 2. Representación del reconocimiento e invasión de eritrocitos por merozoítos de *Babesia bovis* Adaptado de Yokoyama *et al.* (2006).

4.4 Patogenia

En la babesiosis se pueden desarrollar diferentes tipos de acciones patógenas, tales como: acción mecánica (ruptura de glóbulos rojos); acción tóxica (liberación y excreción como resultado del metabolismo de los zoítos), demostrada a nivel del Sistema Nervioso Central (SNC) y acción expoliadora en cuanto compete por determinadas sustancias del organismo hospedador (hemoglobina) (Navarrete *et al.*, 1999).

El ganado infectado con *B. bovis*, presenta fiebre alta (41°C a 41.5°C), marcada depresión, anemia y en casos severos un síndrome cerebral caracterizado por lesiones neurológicas, combinado con inflamación generalizada, no específica; trastornos de la coagulación y estasis de los eritrocitos en los capilares; en cambio infecciones con *B. bigemina*, los efectos patogénicos se relacionan más con la destrucción de eritrocitos (Howell *et al.*, 2007).

Según Mahoney (1977), se tienen dos eventos importantes en la patogenia de la babesiosis: en primer lugar, se tiene la liberación de sustancias farmacológicamente activas que producen un choque, y en segundo lugar la anemia.

Liberación de sustancias farmacológicamente activas

Las alteraciones clínicas se hacen presentes pronto en el curso de la infección incluso antes de poder detectar los anticuerpos. Este fenómeno se acentúa en animales esplenectomizados e inoculados por vía intravenosa, en los cuales se presenta un periodo de incubación aproximado de tres a cuatro días, indicando que el complejo antígeno anticuerpo no es el responsable de los signos clínicos, pero puede contribuir a ello. Con base en esto, se sugiere que sustancias liberadas por *Babesia* que tengan actividad farmacológica o sean capaces de activar mecanismos fisiológicos que liberen sustancias farmacológicamente activas, sean las responsables de ocasionar el choque terminal.

En un estudio realizado por Wright y Mahoney (1974), en el cual se observó la actividad de la calicreína en plasma de bovinos esplenectomizados e infectados con *B. argentina* (ahora *B. bovis*). Estos autores reportaron que la velocidad de conversión de calicreinógeno a calicreína aumentó uno a dos días antes de la presencia de los parásitos en sangre periférica; se considera que la calicreína desempeña un papel importante en el choque terminal que se observa en la infección por *B. argentina* (ahora *B. bovis*).

4.5 Signos Clínicos

El cuadro clínico de un animal infectado con *Babesia* varía según la edad del animal, su estado nutricional e inmunológico y la patogenicidad de la cepa del parásito. Los bovinos menores a 9 meses generalmente no presentan síntomas debido al grado de inmunidad transferida por el calostro, por lo que la mayoría de los casos clínicos de babesiosis se observan en animales adultos (Jaramillo, 2016).

Las infecciones por *Babesia bovis* se caracterizan por fiebre alta que va acompañada por decaimiento general, anorexia, shock circulatorio general y en ocasiones, también signos nerviosos como resultado del secuestro de eritrocitos infectados en capilares cerebrales. Puede aparecer anemia y hemoglobinuria en una fase más avanzada de la enfermedad. En las infecciones por *B. bigemina*, los signos más importantes consisten en fiebre, hemoglobinuria y anemia y no se produce secuestro intravascular de eritrocitos infectados (OIE, 2014).

Las alteraciones clínicas que se observan en animales con parasitemias bajas, probablemente no sean provocadas por la destrucción de los eritrocitos debido a la entrada y salida de *Babesia*, sino a través de la activación de mecanismos fisiológicos del hospedador que provocan una inflamación generalizada y un choque (Morilla, 1981).

4.6 Epidemiología

Las especies de *Babesia* asociadas a la infección de ganado bovino son *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* (Vieira y Sastre, 2007; Oliveira *et al.*, 2008); y su transmisión se encuentra relacionada con la presencia de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y las condiciones climáticas y ecológicas, características de las zonas tropicales y subtropicales que determinan su reproducción y supervivencia (Figura 3.) (Guglielmo, 1995; Nari, 1995; Meléndez, 1998; Reggasa *et al.*, 2003).



Figura 3. Campaña nacional para el control de la garrapata *Rhipicephalus* antes *Boophilus* spp (SENASICA, 2018).

Epidemiológicamente se reconocen a la Babesiosis y a la Babesiasis como términos para definir la manifestación, en un sitio determinado, de las infecciones del ganado con alguna especie de *Babesia*. Es así como el término Babesiosis hace referencia a casos de enfermedad clínica en poblaciones de individuos

susceptibles; y el termino Babesiasis se aplica en zonas enzoóticas y está relacionado con la existencia de infecciones subclínicas, ya sea en animales recuperados de la enfermedad o en animales jóvenes con un estatus inmune que les permite no ceder a la infección (Ristic, 1981; García, 1989; Solís, 1991; Ramírez, 1993).

En la categorización perteneciente a la Babesiasis se considera un objetivo deseable y principal apoyar el concepto de estabilidad enzoótica, término en el cual se caracterizan las zonas donde se presenta un equilibrio entre el número de vectores, la tasa de inoculación del agente y la calidad de respuesta del sistema inmune del bovino, cuya consecuencia es la manifestación de una inmunidad de hato y ausencia de problemas clínicos. Bajo estas circunstancias, la infección de los animales en una edad donde todavía poseen inmunidad pasiva suficiente para resistir la enfermedad, es un elemento clave (McCosker, 1981; Ristic, 1981; García, 1989; Brown *et al.*, 1990; Solís, 1991).

La transmisión de la babesiosis bovina se encuentra determinada por la coexistencia de la triada epidemiológica, vector-parásito-hospedador (Figura 4) y está condicionada por la presencia de factores bióticos y abióticos que afectan la transmisión (Benavides, 1992; Regassa *et al.*, 2003; Jonsson *et al.*, 2008). En las zonas enzoóticas, la dinámica de transmisión puede llegar a un estado de equilibrio entre el proceso infeccioso y la adquisición de inmunidad por parte de los hospedadores bovinos, estado epidemiológico conocido como estabilidad enzoótica (Benavides, 1992; Regassa *et al.*, 2003; Jonsson *et al.*, 2008). En esta condición, los hospedadores bovinos se infectan con el protozooario a una edad temprana, en la cual no manifiestan signos clínicos, ya que cuentan con una inmunidad pasiva transferida desde la madre, que perdura aproximadamente hasta los 9 meses de edad (Carrique *et al.*, 2000; Regassa *et al.*, 2003). A partir de esta edad se desarrolla una inmunidad adquirida condicionada por la constante inoculación de parásitos, lo cual permitirá que el reto inmunológico permanente garantice a los hospedadores la ausencia de signos de la enfermedad (Betancourt, 1996; Jonsson *et al.*, 2008).

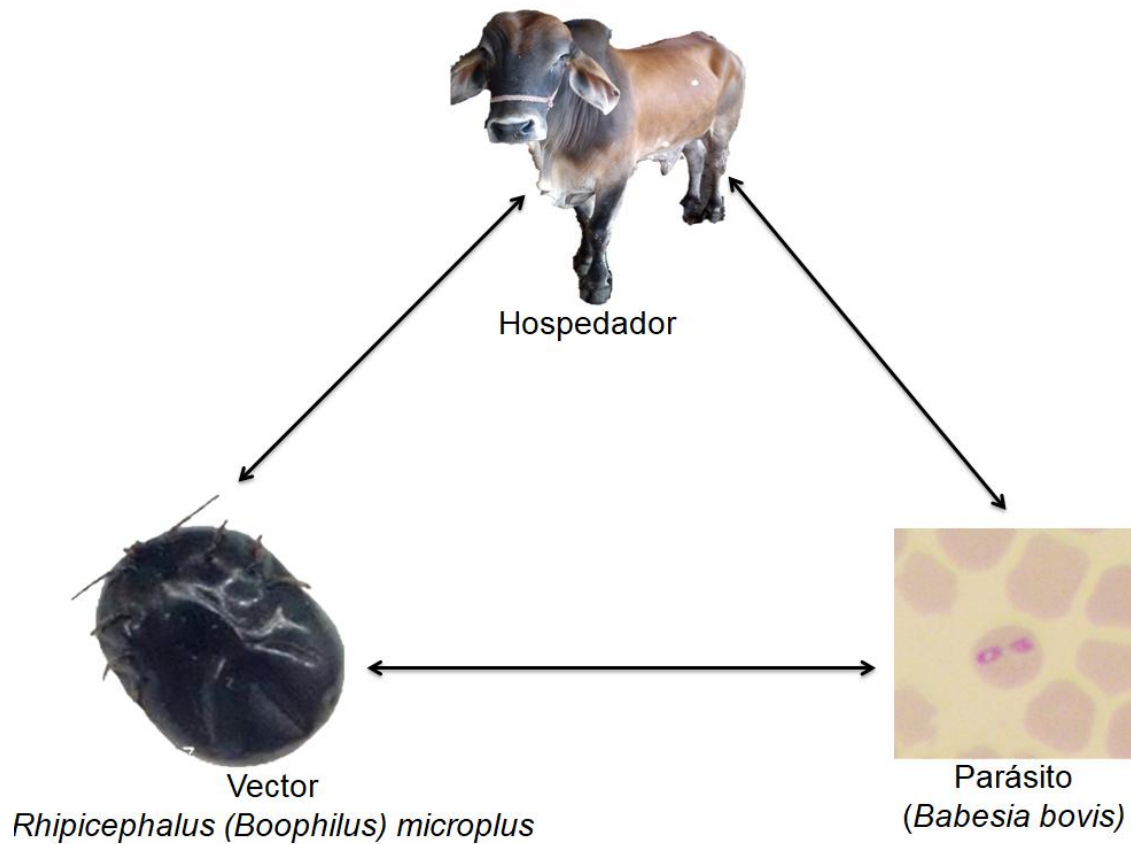


Figura 4. Coexistencia de la triada en babesiosis bovina. Adaptado de Meléndez (1998).

Cuando se interrumpe el equilibrio en la transmisión, conlleva a presentarse una inestabilidad enzoótica, la cual es una situación donde los animales no se infectan hasta posterior a un tiempo de su nacimiento a pesar de estar expuestos al vector y parásito, por ende, no desarrollan una inmunidad contra *Babesia*. Es así que se presentan brotes epizooticos lo que implica la manifestación de signos clínicos de la enfermedad, así como disminución en la producción láctea y cárnica, postración de los animales y finalmente llegar a la muerte de ganado; adicionalmente se presenta un incremento en los costos de manejo del sistema de producción por efecto de tratamientos farmacológicos, atención médico veterinaria y control de vectores (Blood, 2002; Ogden *et al.*, 2005; Jonsson *et al.*, 2008); Por lo que una

estrategia adecuada es la vacunación, empleando la vacuna bivalente viva atenuada (No disponible comercialmente) derivada de cultivo *in vitro* (conteniendo *Babesia bovis-Babesia bigemina*), la cual es capaz de inducir una respuesta inmune sólida para proteger a los animales de granjas ubicadas en zonas tropicales, ya que la protección conferida por la vacunación fue de alrededor de un 93 %; por ende se propone el uso de la vacuna no solo en aquel ganado proveniente de zonas libres de babesiosis, sino también en el ganado que se encuentra en áreas hiperendémicas (Ojeda *et al.*, 2010).

Para la determinación de zonas estables o inestables para babesiosis bovina se ha utilizado como indicador epidemiológico, la medición de anticuerpos tipo IgG totales, específicos para las especies de *Babesia* en bovinos entre 3 y 9 meses de edad (Benavides, 1992; Regassa *et al.*, 2003). Así, una zona presenta una estabilidad enzoótica para babesiosis bovina cuando el 75% o más de los bovinos entre 3 y 9 meses de edad son serorreactivos para *Babesia* (Vizcaíno, 1983; Quijano, 1996).

4.7 Inmunología

Las respuestas inmunitarias humoral y celular están involucradas en la inmunidad presente en la babesiosis. En la infección primaria cuando la infección por medio de la garrapata ocurre, los esporozoítos están libres en plasma en el flujo sanguíneo por un periodo corto; en esta etapa las inmunoglobulinas G (IgG's) pueden prevenir la infección y neutralizar los esporozoítos después de haber invadido las células blanco (eritrocitos). Un nuevo estado comienza cuando las babesias establecen la infección intraeritrocítica. Durante esta etapa la parasitemia se puede agudizar y las células de la respuesta inmunitaria innata son responsables de controlar el crecimiento del parásito y evitar la extensión de la parasitemia. En la ausencia de macrófagos y células NK, se desarrolla una parasitemia alta en periodo corto, la inhibición es probablemente consumada por

la producción de factores solubles como el Interferon gamma (IFN- γ), por células NK y Factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), óxido nítrico (NO) y especies reactivas del oxígeno (ROS) por macrófagos (Homer *et al.*, 2000).

Los mecanismos inmunitarios se dirigen contra los eritrocitos infectados con *B. bovis* o contra los merozoítos libres. El papel de la respuesta celular en la protección contra el parásito se demuestra por la alta susceptibilidad de los animales esplenectomizados a la infección por *babesia*. Además, las respuestas inmunitarias llevaron a la aparición de formas intracelulares de "crisis" (Callow y Dalgliesh, 1982; Gray *et al.*, 1985). El desarrollo de estos parásitos degenerantes parece ser causado más por las respuestas inmunes celulares que por las respuestas inmunes humorales (Zintl *et al.*, 2005). Durante la infección aguda con *B. bovis*, la respuesta inmune innata parece ser esencial y requiere la producción de interleucina-12 (IL12) e interleucina18 (IL18). Estos estimulan las células asesinas naturales (NK) para producir altos niveles de interferon gamma (IFN- γ) (García *et al.*, 2004; Goff *et al.*, 2006; Shoda *et al.*, 2000); que inducen la producción de óxido nítrico (NO) por los macrófagos (Goff *et al.*, 2006). Durante la infección crónica, la lisis de los glóbulos rojos infectados (iRBC) también está mediada principalmente por el NO producido por los macrófagos esplénicos activados por IFN- γ y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Este mecanismo es entonces regulado por las citoquinas tipo 1 y es inhibido por la interleucina-4 (IL4) y la interleucina-10 (IL10) (Goff *et al.*, 2001; Goff *et al.*, 2002). La respuesta inmune humoral no permite la eliminación del parásito, pero varios mecanismos ayudan a controlar la parasitemia (Brown, 2001): citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mediada por IgG1, descrita *in vitro* por Goff *et al.* (1984), opsonización mediada por IgG2, neutralización de la adherencia de los merozoítos libres a RBC y de la citoadherencia de iRBC a células endoteliales (Brown *et al.* 2006b) y activación del complemento mediado por IgG1 e IgG2 (Brown y Palmer, 1999).

La evolución de la infección aguda depende del momento y la ubicación de la producción de las citocinas inflamatorias de tipo 1 y de las cantidades producidas. Una comparación de la respuesta inmune de los terneros y el ganado adulto contra *B. bovis* mostró que la respuesta innata solo es protectora si el IFN- γ y la IL12 se producen antes, de la producción de IL10. Cuando se producen al mismo tiempo IL10, IL12 e IFN- γ , la respuesta de tipo 1 y la producción de NO en el bazo se retrasan o disminuyen, lo que permite la expresión de la enfermedad (Goff *et al.*, 2001). Por el contrario, durante la infección crónica, el nivel bajo de persistencia del parásito requiere la activación de la respuesta inmune adaptativa: los linfocitos Th0 y Th1 activan la producción de IgG, en particular los mecanismos de lisis opsonizantes de IgG2 e iRBC mediados por macrófagos y NO (Brown, 2001).

Durante el primer paso de la invasión a los eritrocitos, el merozoíto de *Babesia* usa moléculas localizadas en la superficie de la membrana del parásito para unirse a la célula hospedera. En el caso de *Babesia bovis* la superficie de los merozoítos posee al menos cinco proteínas que pertenecen a la familia de los antígenos variables de la superficie del merozoíto (VMSA). El antígeno 1 de superficie del merozoíto (MSA-1) y antígeno 2 de superficie del merozoíto (MSA-2) están localizados en la superficie de ambos merozoítos derivados del esporozoíto de la garrapata. Notablemente los anticuerpos contra MSA-1 inhiben la adhesión de los esporozoítos al eritrocito *in vitro*, así mismo bloquea la invasión del merozoíto. Los esporozoítos y merozoítos de *Babesia bovis* invaden la misma célula blanco, el eritrocito; esto ha sugerido que las superficies de sus membranas son similares y usan las mismas moléculas para atacar e invadir a los eritrocitos. Las RAP-1 (proteína asociada a roptria), son responsables de la patogenicidad de protozoarios como *Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Eimeria* y *Babesia*, son el blanco para desarrollar vacunas. RAP-1 es un antígeno inmunodominante para los linfocitos T y es reconocido por los LcT CD4+ de memoria (Clawson *et al.*, 2002; Norimine *et al.*, 2002; Matsuo *et al.*, 2005).

En cepas virulentas de *B. bovis*, se liberan solo dos proteasas, algunas han mostrado ser quimiotácticas para leucocitos polimorfonucleares, y por razones aún no determinadas, parecen tener especificidad por los capilares del pulmón y posiblemente del cerebro causando el secuestro de los eritrocitos y neutrófilos y consecuentemente anoxia (Aguilar *et al.*, 2009).

En las infecciones con *B. bovis* los parásitos inducen cambios en la membrana y la trombospondina (TPS) una proteína derivada de varias células incluyendo células endoteliales y trombocitos, se ha observado que está directamente involucrada en la citoadherencia. Estas glicoproteínas no solo se unen a los trombocitos y superficie de células endoteliales sino también a heparina, fibronectina y colágeno (Timms *et al.*, 1990).

Cuando los eritrocitos son secuestrados, empiezan a producirse citocinas pro inflamatorias como el TNF y la Interleucina-1 (IL-1) estas aumentan la expresión de moléculas de adherencia en la superficie del endotelio vascular, incluyendo ICAM (molécula de adhesión intracelular) VCAM (molécula de adhesión a la célula vascular) y P-selectin (expresada en endotelio vascular y plaquetas), e inducen generación del óxido nítrico. El óxido nítrico tiene efectos homeostáticos y patogénicos. Puede inhibir la respiración mitocondrial y la bomba de Na⁺/K⁺ lo cual puede causar la deformidad del eritrocito y la muerte del parásito. La activación inmunológica intensa crea un entorno inflamatorio que promueve el secuestro del eritrocito, hipoglucemia, acidosis metabólica, coagulopatías y trombocitopenia. El resultado final es una patología similar en el cerebro, pulmón, riñón y otros órganos (Krause *et al.*, 2007).

Las formas respiratorias y cerebrales de esta enfermedad son resultado del secuestro de los eritrocitos en capilares, una consecuencia de la sobreproducción de óxido nítrico (NO) y las citocinas inflamatorias TNF- α e IFN- γ en respuesta a la infección. Se ha propuesto que la resolución de la infección aguda en becerros infectados con *B. bovis* con una cepa virulenta, depende de una sólida respuesta inmunitaria innata en el bazo que causa la activación de macrófagos vía IFN- γ y productos derivados del parásito, que da por resultado la aniquilación de los

organismos por fagocitosis y producción de metabolitos tóxicos del macrófago, incluyendo NO (McCormick *et al.*, 2000).

4.8 Diagnóstico

4.8.1 Diagnóstico de laboratorio

En la actualidad, se dispone de numerosos métodos como: los microscópicos, serológicos y moleculares para el diagnóstico de la babesiosis. Los primeros identifican directamente los hemoparásitos en las muestras clínicas; los segundos, detectan la respuesta humoral específica, mientras que las pruebas moleculares detectan el material genético (Guevara *et al.*, 2011).

Como se ha mencionado anteriormente existen métodos microscópicos y moleculares los cuales son considerados métodos directos y métodos serológicos los cuales son considerados indirectos en el diagnóstico de la babesiosis.

Debido a que los glóbulos rojos parasitados quedan retenidos en los capilares razón por la cual la mejor muestra es sangre capilar; sin embargo, en casos de infección por *B. bovis* debido a la multiplicación en los capilares cerebrales el porcentaje de falsos negativos en los frotis de sangre aumenta. Como los glóbulos rojos parasitados se concentran en la red capilar y la fragilidad aumenta considerablemente, se recomienda realizar frotis de sangre periférica tomada por punción capilar. Muestras con más de cuatro horas de colectadas pueden generar falsos negativos (Cotrino *et al.*, 2007).

La toma de una muestra sanguínea de calidad, venosa (yugular o coccígea) o capilar (oreja, punta de la cola) es crucial para iniciar el diagnóstico de laboratorio de infecciones por *Babesia* (Chatel *et al.*, 1999). *B. bovis* a diferencia de *B. bigemina* es escaso en sangre periférica y se ubica de preferencia en capilares de órganos como el cerebro, riñón, hígado y bazo (Tananyutthawongese *et al.*, 1999).

4.8.1.1 Métodos directos

- **Frotis sanguíneo**

Se define como frotis a la preparación microscópica delgada y transparente, extendida entre dos cristales (porta o cubreobjetos), obtenida de un líquido orgánico espeso o tejido semilíquido o pastoso (sangre, aspirados, secreciones, exudados, etc.). El estudio e interpretación del frotis de sangre periférica representa la extensión morfológica del estado de los elementos celulares de la sangre. Constituye un examen rutinario que cuando es debidamente interpretado por el observador tiene una enorme utilidad diagnóstica para el médico y puede considerarse el paso más importante en la identificación del mecanismo responsable de una anemia (Grinspan, 1985; Gallo, 2014).

La presencia de *B. bovis* y *B. bigemina* en la sangre de los bovinos puede ser detectada por observación al microscopio óptico de extendidos finos de sangre periférica coloreados con la tinción de Giemsa. En estos preparados, los eritrocitos infectados contienen distintas formas del parásito, las formas simples ovaladas (merozoítos), las formas de anillo (trofozoíto) y las formas pares (merozoítos) luego de la división celular (Petrigh, 2010).

Los frotis gruesos son útiles en la detección de pequeñas cantidades de parásitos, pues se analiza una cantidad diez veces mayor que en el frotis fino; sin embargo, la identificación de especies se realiza de mejor manera con frotis finos, se puede identificar bajo un microscopio con el lente de inmersión (100X), donde se observan todos los estadios divisionales del parásito. La sensibilidad es de un parásito por cada 10⁶ glóbulos rojos; sin embargo, esto depende en gran medida de la parasitemia que se presente en el momento de realización del diagnóstico (Vasco, 2013).

- **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco, es copiada fielmente (Tamay, 2013).

La PCR descrita por Mullis en 1983, supuso un gran avance para la universalización de las técnicas moleculares (Lejona *et al.*, 2006). El método posee características especiales de sensibilidad, especificidad, versatilidad, rapidez y accesibilidad que la hacen útil en identificación y diagnóstico. Es eficiente en la detección de un patógeno a nivel de subgénero, identificación de la especie, complejo o serotipo del organismo presente en una muestra determinada y en la identificación individual (Añez *et al.*, 2007).

Los ensayos de PCR múltiple en el campo veterinario, inicialmente fueron descritos para *B. bovis*, *B. bigemina* y *Anaplasma marginale* (Figueroa *et al.*, 1993). En esta técnica, la eficiencia de numerosos juegos de iniciadores (primers) desarrollados depende en gran medida del uso de secuencias conservadas (Lew y Jorgensen, 2005; Adham *et al.*, 2009). Entre los protocolos múltiples para el diagnóstico simultáneo de infecciones mixtas que incluyan a *Babesia*, se citan la detección en bovinos de *A. marginale*, *Trypanosoma evansi*, *B. bovis*, *B. bigemina* y *Theileria sp.* siendo de gran ayuda en estudios epidemiológicos, ya que permite la disminución en el requerimiento de costos, tiempo y personal (Tananyutthawongese *et al.*, 1999).

De acuerdo con Figueroa *et al.* (1993), los primers BilA/BilB y BoF/BoR diseñados y ensayados a nivel de campo han evidenciado una alta prevalencia de bovinos infectados con *B. bigemina* y *B. bovis*, así como la identificación de infecciones subclínicas y crónicas. Este mismo juego de primers así como otros sintetizados a partir de diferentes regiones del parásito han sido utilizados para el diagnóstico de infecciones en el vector *R. microplus* contribuyendo al mejor entendimiento de la

verdadera epidemiología de la infección (Oliveira-Sequeira *et al.*, 2005; Quintao-Silva *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2008; Ogo *et al.*, 2012).

Pese a lo anteriormente señalado, en el diagnóstico de estos agentes, la tecnología nPCR (nested PCR o PCR anidado) pareciera ser de mayor valía (Oliveira *et al.*, 2008; Cantu *et al.*, 2009) y la mayor prevalencia en algunas áreas geográficas se justificaría por la mayor sensibilidad de esta variante en comparación a PCR convencionales o mPCR (multiplex PCR o PCR múltiple) (Martins *et al.*, 2010; Awad *et al.*, 2011). En tal sentido utilizando juegos de primers específicos a nivel de especie sintetizados para ampliar la región espaciadora interna transcrita (ITS), ha permitido detectar prevalencias de 21% y 12% respectivamente para *B. bigemina* y *B. bovis* con 6,5% de infección mixta en el norte de Tailandia (Cao *et al.*, 2012).

4.8.1.2 Métodos indirectos

Los métodos indirectos son aquellos que permiten la detección de anticuerpos específicos circulantes, para la identificación de bovinos portadores asintomáticos y reservorios (Álvarez y Cantó, 1991).

- **Fijación del complemento**

En 1962, aparece la información de la prueba de fijación del complemento para babesiosis (Mahoney, 1962). La prueba se basa en la competencia para fijar el complemento entre dos sistemas antígeno-anticuerpo, uno de ellos formado por eritrocitos-hemolisina y el otro por el sistema de prueba que contiene el antígeno específico. Primero se hace reaccionar el sistema específico con el suero problema y el complemento, añadiéndose después el sistema hemolítico. Si la reacción específica es positiva, el complemento se fijará al primero, el segundo sistema se sedimentará formando un botón de eritrocitos en el fondo del tubo. Por el contrario, si no hubo anticuerpos específicos, el complemento se añadirá

entonces al sistema hemolítico, provocando la lisis de los eritrocitos (reacción negativa) (Vega, 1989).

- **Inmunofluorescencia indirecta (IFI)**

El desarrollo de la técnica de inmunofluorescencia se debe a Albert Coons de la Universidad de Harvard (Coons *et al.*, 1941). Las técnicas de inmunofluorescencia pueden aplicarse como técnicas directas para investigar la presencia de antígenos virales, parasitarios, bacterianos o micóticos en muestras clínicas y también se utiliza en su modalidad indirecta; es decir, para investigar la presencia de anticuerpos contra determinado antígeno, esta técnica, de gran versatilidad y aplicación al diagnóstico presupone contar con un anticuerpo marcado con fluoresceína, anticuerpo dirigido contra la inmunoglobulina, este anticuerpo marcado recibe el nombre de conjugado y puede unirse a la inmunoglobulina (Guzmán y Bernal, 1999).

La técnica de inmunofluorescencia existe la modalidad directa que detecta antígeno y la modalidad indirecta más utilizada en encuestas serológicas para detectar la presencia de anticuerpos, esta última está basada en la capacidad de la globulina del anticuerpo (IgG) para acoplarse químicamente con su correspondiente antígeno en una primera reacción donde esta reacción no se visualiza y luego en una segunda reacción con un conjugado marcado con un colorante fluorescente o fluorocromo (Anti-IgG bovino) (Benito y Gil, 2008).

Posiblemente IFI, es la técnica más utilizada para el diagnóstico de animales portadores asintomáticos de *Babesia*. Debido a su gran sensibilidad y al hecho de que los hemoparásitos poseen antígenos comunes, prácticamente da reacción cruzada con todas las especies de *Babesia*, requiriéndose establecer títulos mínimos de reacción específicos para cada uno (Ross y Lohr, 1968; Zwart y Van den Ende, 1968).

- **Inmunoabsorción enzimática (ELISA)**

El ensayo inmunoenzimático indirecto (iELISA) al igual que la IFI, también permite la detección de anticuerpos circulantes en sangre, entre las principales ventajas con las que cuenta esta técnica son la capacidad para procesar un elevado número de muestras durante una jornada laboral, la objetividad de los resultados y la elevada sensibilidad y especificidad diagnóstica.

El enzimoimmunoanálisis (ELISA) y el ELISA de competición (C-ELISA) con proteínas recombinantes de merozoíto de *B. bovis* y *B. bigemina* ha sustituido la inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la detección de anticuerpos contra *Babesia* sp., debido a la eficiencia del procesado y la objetividad en la interpretación de los resultados (OIE, 2014).

4.8.2 Diagnóstico Post-mortem

Las lesiones que se encuentran en la necropsia pueden ser excesiva cantidad de fluido seroso en las cavidades, edema subcutáneo y pulmonar, esplenomegalia (aumento del tamaño del bazo), hepatomegalia (aumento del tamaño del hígado) y riñones inflamados y frecuentemente hemorrágicos (Mehlhor, 1993). En tejidos mantenidos en refrigeración, los glóbulos rojos parasitados pueden durar hasta doce horas, de ahí la importancia de enviar tejidos (hígado, bazo y cerebro) para el diagnóstico (Cottrino *et al.*, 2007).

- **Improntas cerebrales**

Es un método diagnóstico con mayor utilidad en el caso de infecciones con *Babesia bovis*, por la característica que tiene el parásito de acumularse en grandes cantidades dentro de los capilares cerebrales de los animales infectados (Buening, 1991).

Las improntas se realizan con material de órganos muy irrigados como riñón, corazón, bazo o cerebro. La observación microscópica directa es el método más eficiente por su rapidez y economía para el diagnóstico de la babesiosis aguda causada por *B. bovis* y *B. bigemina* (Lew y Jorgensen, 2005). Además, permite la diferenciación entre especies de Babesia por su morfología y la determinación de la parasitemia (proporción de eritrocitos parasitados).

4.9. Estrategias de Control

Para el control de las enfermedades transmitidas por garrapatas se ha considerado la integración de actividades dirigidas al vector, al parásito y/o al hospedero (FAO, 1989).

De acuerdo con Álvarez (1991), existe una serie de métodos y estrategias identificadas, las cuales son aplicables al control de la *babesiosis* las cuales incluyen:

4.9.1 Control del vector

En los países tropicales y subtropicales, uno de los principales problemas económicos en la ganadería bovina son las garrapatas y las enfermedades que éstas transmiten. Por su importancia económica y sanitaria la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus)* es el género principal bajo control y erradicación en la campaña realizada en México. La estrategia más utilizada para controlar las garrapatas consiste en romper el ciclo de esta a través de la aplicación de tratamientos con garrapaticidas, sobre el cuerpo de los animales infestados a intervalos específicos determinados por la región ecológica, especies a las que se van a combatir y eficacia residual del garrapaticida (Rodríguez *et al.*, 2006).

Las familias de productos químicos que se utilizan para el control de las garrapatas son: Organofosforados, Piretroides, Amidinas y Lactonas Macroclínicas. Estos productos han sido utilizados con éxito en el control de las garrapatas; sin embargo, su uso irracional ha ocasionado la generación de cepas de garrapatas *R. microplus* resistentes a la acción de la mayoría de estos productos químicos (Rodríguez *et al.*, 2006).

4.9.2 Control de movilización de ganado

La movilización controlada es recomendada cuando se desea evitar que ganado portador de la enfermedad o infectado con garrapatas sea introducidos a regiones libres (Osorno, 1978). Movilizar ganado sin garrapatas y así evitar introducir vectores infectados a regiones libres de garrapatas y de la enfermedad. 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).

4.9.3 Uso de ganado resistente

Consiste en seleccionar ganado cebuino (*Bos indicus*) lo cual ha sido practicado en Australia, América Central y Sudamérica (Álvarez, 1991). Estos animales han mostrado habilidad para desarrollar inmunidad a la infestación con garrapatas, pretendiendo una estabilidad endémica y considerándose las pérdidas de ganado local o indígena insignificantes. Un inconveniente es que la baja productividad de este ganado ha conducido al uso de ganado de tipo europeo encastado con cebuino.

4.9.4 Inmunización

Desde finales del siglo XIX se sabe que los bovinos susceptibles, después de sufrir la infección de protozoarios del género *Babesia*, son capaces de desarrollar fuerte inmunidad contra futuras reinfecciones (Connaway y Franics, 1899).

El método inmunoprolifático que se utiliza con mayor frecuencia fue desarrollado en Australia, mediante el cual se infectaba animales libres de la enfermedad con sangre de bovinos que se habían recuperado de ésta, para aplicar posteriormente un tratamiento específico y evitar su muerte (Callow, 1976). Por su parte, Callow y Mellors (1966), estandarizaron el número de parásitos a inocular, utilizando becerros esplenectomizados como los proveedores de los parásitos. Esta metodología ha sido posteriormente aplicada en Argelia, Sri Lanka, Argentina, Uruguay, Sudáfrica, Israel y Cuba (Callow, 1976; Echaíde *et al.*, 1993; REDLAB, 1994). Este método, consiste en el uso de organismos vivos de reducida virulencia, los cuales se obtienen al realizar pases seriados rápidos de sangre infectada en becerros esplenectomizados en el caso de *B. bovis* (Callow, 1976), y pases lentos en becerros sin esplenectomizar, en el caso de *B. bigemina* (Dalglish *et al.*, 1981).

Una seria desventaja de este procedimiento es que al reproducir las especies de *Babesia* en becerros, los inmunógenos podrían llegar a contaminarse con otros patógenos y producir su diseminación a otras áreas (Rogers *et al.*, 1988). Este riesgo es eliminado mediante la multiplicación de poblaciones del parásito en condiciones *in vitro* (Rodríguez *et al.*, 1983; Vega *et al.*, 1985).

La inmunización parece ser el procedimiento que ofrece las mejores perspectivas; este método de prevención y/o control se considera una de las alternativas primordiales para resolver el complejo problema de la babesiosis bovina.

Sin importar la fuente o tipo de antígeno, una vacuna ideal contra la babesiosis se considera debe reunir las siguientes cualidades (Álvarez, 1991):

- 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.

En México se desarrolló una vacuna bivalente, en el CENID-PAVET (Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria) del INIFAP, la cual fue elaborada con una cepa de *Babesia bigemina* (Bis) originalmente aislada de un caso clínico en México, mantenida en cultivo *in vitro* y criopreservada, que ha mostrado características de reducida virulencia, también contiene la cepa de *B. bovis* (Bor) originalmente derivada de un aislado de campo, la cual fue clonada en laboratorio e irradiada con una fuente de cobalto y retornada a cultivo . Esta vacuna ha mostrado una adecuada protección en animales vacunados y desafiados en campo; sin embargo, tiene el inconveniente del manejo, ya que se tiene que mantener en congelación en nitrógeno líquido hasta momentos antes de ser aplicada, razón por la cual puede estar disponible solo como un paquete tecnológico en el que se ofrece la asesoría necesaria para su uso adecuado (Hernández *et al.*, 2010).

4.10 Búsqueda de antígenos

Las investigaciones recientes sobre babesiosis bovina se han centrado en la determinación de su taxonomía, el desarrollo de técnicas diagnósticas sensibles y específicas, aspectos de la fisiopatología y búsqueda del mejoramiento de métodos de quimioterapia e inmunoprolifaxis (Aktas *et al.*, 2007).

En la literatura científica, desde la década de los noventa se han reportado secuencias nucleotídicas de cepas circulantes de *B. bovis* y *B. bigemina* de

diferentes regiones, reportándose genotipos idénticos en Asia, África, América, Europa y Oceanía (Alhassan *et al.*, 2005; Altangerel *et al.*, 2009); Sin embargo, se han reportado cepas con variaciones genéticas asociadas a modificaciones endógenas y exógenas inducidas por tratamientos antiparasitarios, mecanismos de respuesta inmune del hospedador y procesos evolutivos que han generado mecanismos de resistencia y patogenicidad que garantizan su permanencia en el tiempo (Criado *et al.*, 2006).

En el estudio y caracterización de los antígenos de la *Babesia* existe el problema de su obtención en forma pura. Esto obedece a que *Babesia* se encuentra dentro del eritrocito, y ha sido difícil su obtención en una forma libre por los métodos tradicionales de lisar los glóbulos rojos parasitados ya sea con agua destilada, congelación y descongelación, sonicación, o utilización de saponinas, entre otros. De acuerdo con Gravely y Kreir, (1974) al utilizar la técnica de sonicación de flujo continuo, se ha obtenido una preparación con gran cantidad de parásitos libres de estroma de eritrocitos, lo cual permitirá efectuar estudios más completos de los antígenos. Por otro lado, para entender los mecanismos de resistencia del hospedador se debe tomar en cuenta que los antígenos de la *Babesia* deben variar de acuerdo con los diferentes estadios del ciclo. Se considera que los primeros antígenos con los que el hospedador tiene contacto son los del esporozoíto (inoculado por la garrapata); antígenos poco estudiados por la dificultad de su obtención y purificación. Debido a que no se ha demostrado una fase reproductiva exoeritrocítica, probablemente el siguiente estadio del ciclo sea el eritrocítico, en el cual *Babesia bovis* dentro del eritrocito se convierte en trofozoíto que se divide formando los merozoítos, los cuales salen del eritrocito para invadir a otros eritrocitos. Cada fase debe estar constituida por un mosaico antigénico, siendo la más estudiada la fase eritrocítica, en que los antígenos se encuentran en el eritrocito o libres en el plasma (Ross y Lohr, 1968).

La necesidad de mejorar los métodos de diagnóstico de la babesiosis bovina y de desarrollar nuevas vacunas, ha conducido a la búsqueda, identificación y caracterización de antígenos. En tal sentido, todas las búsquedas se han dirigido a

la familia de las proteínas variables de la membrana de merozoítos (Hodgson *et al.*, 1992), a las del complejo apical en particular a las proteínas de las roptrias (Brown *et al.*, 1998; Brown y Palmer, 1999) y a las proteínas de la superficie de eritrocitos infectados (Shompole *et al.*, 1993).

Con la publicación de la secuencia del genoma completo de *B. bovis* (Brayton *et al.*, 2007), y la casi terminada secuenciación del genoma de *B. bigemina* por el Instituto Sanger, es posible ahora el estudio a nivel genómico de estos patógenos, y ha proporcionado a la fecha información valiosa sobre las características esenciales de la composición de su genoma y la comparación de éste con el de otros protozoarios apicomplexa de importancia en salud humana y animal, como aquéllos de los géneros *Plasmodium* y *Theileria*. Esta información ha permitido la incorporación de diversos análisis con programas de bioinformática que hacen posible la identificación de genes nuevos, o que son homólogos en otras especies, además del estudio de las proteínas predichas, su análisis comparativo y las características físico-químicas, antigénicas y filogenéticas que permiten un primer examen del potencial de estos genes putativos como candidatos para su uso como agentes de diagnóstico o vacunal (Mosqueda *et al.*, 2012).

Se han utilizado genes que codifican antígenos de organelos y de la cubierta de superficie de *Babesia* spp, específicamente la proteína asociada a las roptrias 1a (RAP-1a), el antígeno de la superficie del merozoíto 1 y 2 (MSA-1, MSA-2), la glicoproteína de superficie 45 (GP-45) y algunos citoplasmáticos como la proteína de choque térmico 20 (HSP-20) (Mosqueda *et al.*, 2012).

El antígeno de superficie del merozoíto 1 (MSA-1) de *Babesia bovis*, miembro de la familia de antígenos variables de superficie del merozoíto (VMSA), es una glicoproteína inmunodominante que produce anticuerpos que inhiben la invasión de eritrocitos. MSA-1 es un candidato a utilizar porque está codificada por un gen de copia única, se encuentra en la superficie del merozoíto, es altamente inmunogénica en su estado nativo, y los anticuerpos contra versiones nativas y recombinantes del antígeno principal de *Babesia bovis* MSA-1 neutralizan la

infectividad de los merozoítos de las cepas de Texas y México *in vitro* (Hines *et al.*, 1992; Mosqueda *et al.*, 2002).

Desde hace mucho se han estudiado antígenos que fueron identificados por su capacidad para inducir respuestas inmunológicas protectoras a bovinos inmunizados. Algunos de estos antígenos incluyen aquellos localizados en la membrana de la superficie del merozoíto (MSA). Sin embargo, estos antígenos han mostrado una gran variabilidad antigénica, que se traduce en una ausencia de reconocimiento por anticuerpos contra cepas con MSA distintos (Hines *et al.*, 1992; Leroith *et al.*, 2005) y que compromete su uso como antígenos vacunales. Sin embargo, un análisis bioinformático más detallado de las secuencias de estos genes obtenidas de cepas de distintas zonas geográficas, pueden permitir identificar regiones conservadas que se han usado para generar péptidos sintéticos específicos. Estos péptidos pueden entonces usarse como agentes vacunales, y que al ser aplicados como inmunógenos en bovinos susceptibles, induzcan anticuerpos que neutralicen el proceso de invasión y por lo tanto eviten el establecimiento de la infección (Florin-Christensen *et al.*, 2007).

Aunque existen diferencias entre las distintas especies durante el proceso de invasión, lo cierto es que las vacunas basadas en un sólo antígeno tienen pocas posibilidades de conferir una protección adecuada, independientemente del tipo de antígeno usado.

4.11 Tratamiento

El tratamiento exitoso de los animales con babesiosis depende mucho de un diagnóstico temprano y la administración oportuna de medicamentos efectivos (Medellín, 1998).

La terapéutica debe ir encaminada a cubrir dos aspectos importantes; por un lado, ayudar al organismo de luchar contra el parásito, exterminándolo o, al menos,

consiguiendo establecer el equilibrio parásito-hospedador y por otro lado que el parásito, si persiste quede controlado, en cuanto a su reproducción se refiere (Cordero, 2002).

Un tratamiento específico y efectivo para la piroplasmosis es el Dipropionato de Imidocarb que está indicado para el tratamiento, control y prevención de la babesiosis, a una dosis de 1.2 a 3 mg/kg de peso por vía subcutánea o intramuscular. En México existen otras formulaciones a base de Diminazina, Dibenzamidina y Diazoaminodibenzamidina pero que no tienen un efecto residual tan prolongado como el Dipropionato de Imidocarb (Flores, 2006).

Así mismo el Diaceturato de Diaminodibenzamidina a dosis de 3 a 5 mg/kg por vía intramuscular y de Imidocarb en dosis de 1.2 a 3 mg/kg por vía subcutánea son eficaces. El tratamiento de soporte y buena alimentación son necesarios para ayudar a la recuperación (Medellín, 1998).

V. HIPÓTESIS

La utilización de anticuerpos policlonales anti MSA-1, reconocerán a las proteínas nativas y el antígeno crudo, mediante la técnica de ELISA e IFI, respectivamente, para el serodiagnóstico de *Babesia bovis*.

VI. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Poner a punto la prueba serológica iELISA mediante el uso de la proteína recombinante MSA-1 de *Babesia bovis*.

6.2 Objetivos particulares

Detectar el reconocimiento inmunológico de anticuerpos policlonales anti-MSA-1 en muestras de ovinos inoculados experimentalmente con la proteína MSA-1.

Determinar la seroprevalencia de babesiosis bovina en el campo experimental "Pichucalco" empleando como antígeno la proteína recombinante MSA-1 de *Babesia bovis*.

Contrastar los resultados de la prueba de iELISA, con resultados obtenidos en la prueba estándar, inmunofluorescencia indirecta para detección de anticuerpos anti-*Babesia bovis*.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Diseño de Estudio

7.1.1 Localización

El estudio se realizó en las instalaciones del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI), ubicado en el municipio de Jiutepec, en el Estado de Morelos. El municipio cuenta con un clima cálido subhúmedo, con una temperatura promedio anual de 21°C, con una precipitación pluvial promedio anual de 1,021 milímetros cúbicos al año, la temporada de lluvias es entre los meses de junio y octubre.

7.1.2 Reconocimiento inmunológico en ovinos

Se emplearon sueros de dos ovinos machos de 6 meses de edad de la raza Black belly, los cuales fueron inoculados con proteína recombinante MSA-1, que ha sido clonada y purificada en trabajos previos en el laboratorio perteneciente a la unidad de babesiosis del CENID-SAI, al realizar la inoculación se complementó con adyuvante de Freund. La cantidad utilizada de proteína recombinante fue de 6,740 µl (Dosis total), así como 12.900 ml de adyuvante de Freund (Dosis total), los cuales fueron inoculados en siete aplicaciones por vía subcutánea (Con intervalo de 14 días entre inoculaciones).

La toma de muestras sanguíneas se llevó a cabo antes de cada inoculación a partir de la punción de la vena yugular utilizando el sistema de vacío vacutainer, las muestras sanguíneas fueron analizadas en el laboratorio perteneciente a la unidad de Babesiosis del CENID-SAI en el cual se obtuvo el suero sanguíneo y se empleó como muestras problema en la elaboración de las pruebas como el Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas indirecto (iELISA) e Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para detección de anticuerpos.

7.1.3 Seroprevalencia de babesiosis bovina

Se llevó a cabo un estudio observacional descriptivo transversal sobre prevalencia serológica de babesiosis bovina, empleando 99 muestras (total de animales en el hato) de suero bovino provenientes del campo experimental Pichucalco, perteneciente al INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias), ubicado en el municipio de Pichucalco, Chiapas; el municipio cuenta con un clima cálido húmedo, con una temperatura la cual llega a variar entre los 20 y los 35 °C, con presencia de lluvias todo el año, estos sueros se emplearon en técnicas como lo son, iELISA en la cual se empleó como antígeno proteína recombinante MSA-1 de *Babesia bovis*, e IFI utilizando eritrocitos parasitados con *Babesia bovis* derivados de cultivo *in vitro*, para lograr la obtención de los datos correspondientes sobre sueros positivos y negativos, los cuales se utilizaron para el estudio de prevalencia serológica de babesiosis bovina, de tal manera se empleó la siguiente fórmula:

Seroprevalencia: (Animales seropositivos/Total de animales muestreados) *100

Se realizó la comparación entre las técnicas iELISA e IFI, por lo cual se determinó la concordancia específica como lo llevado a cabo por Ortiz *et al.* (2018), esta medida representa la proporción en la cual se reportan resultados iguales entre dos observadores en este caso entre ambas pruebas, para lo cual se empleó una tabla (ver tabla 1) en la que se realizó el registro de positivos y negativos obtenidos de cada prueba; y de igual manera haciendo uso del índice kappa el cual fue propuesto por Cohen (1960).

Tabla 1. Tabla de concordancia

	ELISA		
IFI	(+)	(-)	Total
(+)	a	b	a+b
(-)	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	N= a+b+c+d

a= Muestras positivas en ambas pruebas

b= Muestras positivas en IFI (Negativas en iELISA)

d= Muestras negativas en ambas pruebas

c= Muestras positivas en iELISA (Negativas en IFI)

y en el cual se hace uso de las siguientes fórmulas:

Índice Kappa:
$$k = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$$

en la cual **P_o** es la porción de acuerdos esperados y **P_e** la porción de acuerdos esperados en la hipótesis (acuerdos por azar).

y se substituyen los datos en la siguientes fórmulas de la siguiente manera:

$$P_o = \frac{(a + d)}{N}$$

$$P_e = \frac{[(a + c) * (a + b)] + [(b + d) * (c + d)]}{N^2}$$

Una vez obtenidos los datos se utilizó la tabla empleada por Landis y Koch (1977), la cual ha sido ampliamente utilizada en la valoración del índice kappa.

Tabla 2. Tabla de valoración de índice Kappa

Kappa	Grado de acuerdo
<0.00	Sin acuerdo
0.00-0.20	Insignificante
0.21-0.40	Mediano
0.41-0.60	Moderado
0.61-0.80	Sustancial
0.81-1.00	Casi perfecto

7.2 Material del Ensayo inmunoenzimático indirecto (iELISA) ovinos y bovinos.

- Antígeno (Proteína recombinante MSA-1)
- Sueros control positivo
- Sueros control negativo
- Sueros problema (ovino y bovino)
- Conjugado comercial (anti-IgG de ovino y anti-IgG de bovino unido a la enzima Peroxidasa de rábano picante)
- Solución amortiguadora de carbonatos
- Solución salina de fosfatos pH 7.2 (Phosphate Buffered Saline también llamado PBS por sus siglas en inglés)
- Solución de bloqueo
- Sustrato TMB (Tetrametil-Benzidina en un Buffer ligeramente ácido)
- Solución de lavado (PBS-Tween 20)
- Agua destilada
- Pipeta multicanal y puntas desechables
- Placas de poliestireno de 96 pozos
- Espectrofotómetro
- Papel aluminio

7.3 Ensayo inmunoenzimático indirecto (iELISA)

Para llevar a cabo el reconocimiento de anticuerpos (IgG) de ovino contra MSA-1 de *B. bovis* se empleó la prueba de iELISA, siguiendo la descripción siguiente: Se realizaron diluciones de la proteína recombinante MSA-1 en buffer de carbonatos (60ng/Pozo), para posteriormente colocar la dilución en cada pozo de la placa de ELISA, y colocar a sensibilizar mediante adsorción de la proteína recombinante MSA-1 durante toda la noche a una temperatura de 4°C (unión del antígeno a la placa).

Se procedió a lavar con solución buffer PBS para retirar elementos que no son de interés y se realizó el bloqueo de la placa con leche descremada al 3 %, seguidamente a esto se realizaron nuevamente lavados de la placa, para posteriormente proceder a colocar sueros control positivo y sueros problema dilución 1:200 en PBS (pH 7.2), y mediante incubación se dará la reacción antígeno-anticuerpo.

Se colocó el conjugado con un segundo anticuerpo el cual se encuentra unido a una enzima (Peroxidasa de rábano), sustrato TMB por el cual se obtendrá coloración en la placa y se empleó un espectrofotómetro para determinación de la densidad óptica en 650nm. (Anexo 2)

El punto de corte para determinar positivos y negativos se realizó mediante los resultados de densidad óptica, tomando como referencia la metodología descrita por Lunn *et al.* (2012).

En el cual se toma la densidad óptica (DO) de tres controles negativos (CN), de los cuales se obtuvo la media (\bar{X}), así como la desviación estándar (DE) de estos controles negativos.

$$\text{Cut Off} = \bar{X} + 3 (\text{DE}) = ?$$

(Para llevar a cabo el estudio de prevalencia serológica se realizaron cambios en la técnica como lo fue el empleo de muestras de suero bovino provenientes del

campo experimental Pichucalco, de igual manera empleando como segundo anticuerpo anti-IgG de bovino, llevando a cabo la técnica previamente descrita con muestras de suero ovino, realizando ambas técnicas por separado)

7.4 Material de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) ovino y bovino.

- Antígeno fijado a una laminilla (Eritrocitos parasitados con *B. bovis* procedentes de cultivo *in vitro*)
- Sueros problemas: sueros de ovinos inmunizados experimentalmente con la proteína recombinante MSA-1, como antígeno de *Babesia bovis* y sueros de bovinos localizados en el C. E. Pichucalco, Chiapas.
- Conjugado: Fluorocromo (Isotiocianato de fluoresceína también llamado FITC por sus siglas en inglés) unido a un anticuerpo (anti-IgG de ovino), así como Alexa Fluor 488 (anticuerpo de cabra anti-IgG de bovino)
- Solución salina de fosfatos pH 7.2 (Phosphate Buffered Saline también llamado PBS)
- Agua destilada
- Micropipetas y puntas de plástico para pipetas
- Microscopio de epifluorescencia
- Caja coplin
- Papel aluminio

7.5 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

La identificación de IgG de ovino anti-MSA-1, se realizó mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta, la cual brevemente se describe a continuación; como antígeno se empleó extendidos de eritrocitos parasitados con *Babesia bovis* derivado del cultivo *in vitro*, mantenidos a -20°C. Al realizar la prueba se retiraron de la congelación y se incubaron a 37°C por 10 min. y se fijaron con acetona por 15 min. Se continuó con la delimitación de las áreas empleando un lápiz graso,

posteriormente se colocaron las muestras de suero de los ovinos a partir de la dilución 1:80 en PBS (pH 7.2) y se incubaron nuevamente a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, se adiciono el conjugado anti-IgG de ovino en conejo con Isotiocianato de fluoresceína (Anexo 3). La observación se realizó con un microscopio de epifluorescencia (Terkawi *et al.*, 2011).

Se llevó a cabo la determinación de positividad de las muestras comparándolas con controles negativos y positivos en diluciones 1: 80 en PBS (pH 7.2) colocados en la laminilla.

Para determinar la presencia de IgG ANTI- Babesia bovis, se realizó el mismo procedimiento antes mencionado, sin embargo, los sueros problema fueron sueros de bovinos, provenientes del C. E. Pichucalco, empleando como segundo anticuerpo Alexa Fluor 488

XIII. RESULTADOS

8.1 Reconocimiento inmunológico en ovinos

8.1.1 Ensayo Inmunoenzimático Indirecto (iELISA) ovinos

Los resultados obtenidos en el presente trabajo en la prueba iELISA, utilizando como antígeno la proteína recombinante MSA-1 por medio de la lectura en el espectrofotómetro en 650nm se muestran en la tabla 3 (anexo 4); el cálculo del punto de corte (Cut Off) de la prueba se determinó tomando como referencia el trabajo realizado por Lunn, *et al.* (2012), en el cual se empleó la prueba de ELISA.

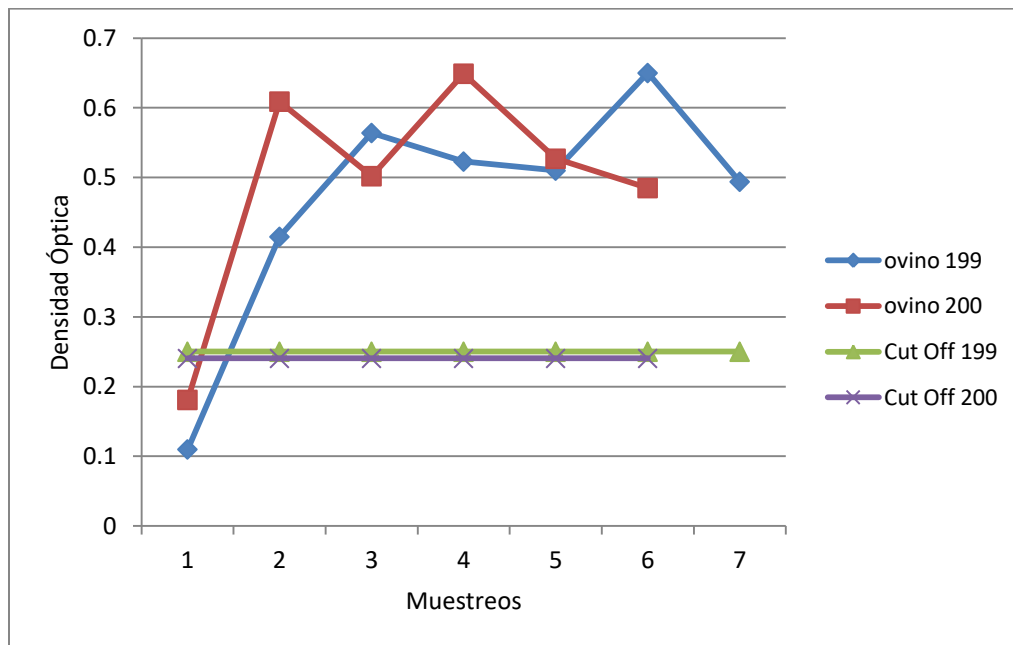
Para lo cual se emplea la densidad óptica (DO) de 3 controles negativos (CN) colocados en los pozos A1, A2 y A3, para el ovino 199 y en los pozos A7, A8 y A9 para el ovino 200 resultando valores de: 0.11, 0.181 y 0.13, así como 0.181, 0.136 y 0.178 para el ovino 199 y 200 respectivamente, se llevó a cabo la obtención de la media (\bar{X}) de estos controles teniendo como resultado: 0.140 para el ovino 199 y 0.165 para el ovino 200; de la misma manera se llevó a cabo la determinación de la desviación estándar obteniendo valores de: 0.036610563 y 0.025159491 para el ovino 199 y 200, respectivamente.

El valor del punto de corte (Cut Off) se tomó como: $\bar{X} + 3$ (DE) obteniendo como resultado: 0.250165023 para el ovino identificado con el arete 199 y 0.240478474 para el ovino 200.

Por lo tanto, mediante la lectura de la placa en el espectrofotómetro y con la determinación del punto de corte, aquellos valores en los que se encontró una densidad óptica por encima al valor del punto de corte (Cut Off) determinado fueron considerados positivos (Tabla 3, Anexo 4).

En la gráfica 1 se muestra el cruzamiento de las líneas entre el punto de corte (correspondiente a cada ovino inmunizado) y la respuesta de anticuerpos que presentaron, por lo cual a partir de la segunda toma de muestras los resultados se

consideran positivos a la producción de anticuerpos específicos (IgG) contra la proteína recombinante MSA-1, con base a la lectura realizada en espectrofotómetro ya que muestran densidades ópticas de 0.675 y 0.609 para el ovino 199 y 200 respectivamente, y presentando una densidad elevada hasta el sexto muestreo teniendo una densidad de 0.765 en el ovino 199, en caso de el ovino 200 presentó una densidad de 0.649 esto en el tercer muestreo, por ende se mostró reconocimiento de la proteína recombinante a partir del segundo muestreo por parte de los anticuerpos, por consiguiente deberá ser considerada para su posterior empleo en pruebas diagnósticas de babesiosis.



Grafica 1. Grafica de resultados positivos en prueba de iELISA

8.1.2 Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) ovinos

En la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), la cual es considerada la prueba de oro en la detección de babesiosis bovina, se obtuvieron resultados con una titulación positiva a partir del segundo muestreo en el caso del ovino 199 en

diluciones a partir de 1:80 hasta 2,560, 5,120 y 10,240 en algunos de los sueros problema (Tabla 4, Anexo 5), en lo que confirió al ovino 200 se encontraron resultados positivos a partir del tercer muestreo en diluciones 1:80 hasta 1,280 y 2,560 (Tabla 5, Anexo 5).

En la gráfica 2 se representa la dispersión de los títulos de anticuerpos contra la proteína recombinante MSA-1 de *Babesia bovis* en muestras de los ovinos inoculados, en caso del ovino 199 se mostró un comportamiento regular ya que va en aumento a partir del segundo muestreo hasta el quinto, el cual presenta una continuidad con el sexto y en la toma de muestras número 7 se tiene un descenso de anticuerpos lo cual puede atribuirse a distintas causas. En el caso del ovino 200, manifestó un comportamiento irregular y el cual presentó incremento en los muestreos 3º y 4º, ya que en el quinto se tiene un descenso y posteriormente un aumento en el sexto muestreo en el cual fue dado de baja, debido a que fue sangrado para obtención de suero.



Grafica 2. Titulación de Ac en sueros de ovinos (IFI)

Con base a los resultados mostrados en cada técnica se lleva a cabo el cálculo del coeficiente Kappa de Cohen empleando la tabla a continuación:

IFI	ELISA		
	(+)	(-)	TOTAL
(+)	10	1	11
(-)	0	2	2
TOTAL	10	3	13

Así como empleando la siguiente fórmula:

$$k = \frac{Po - Pe}{1 - Pe}$$

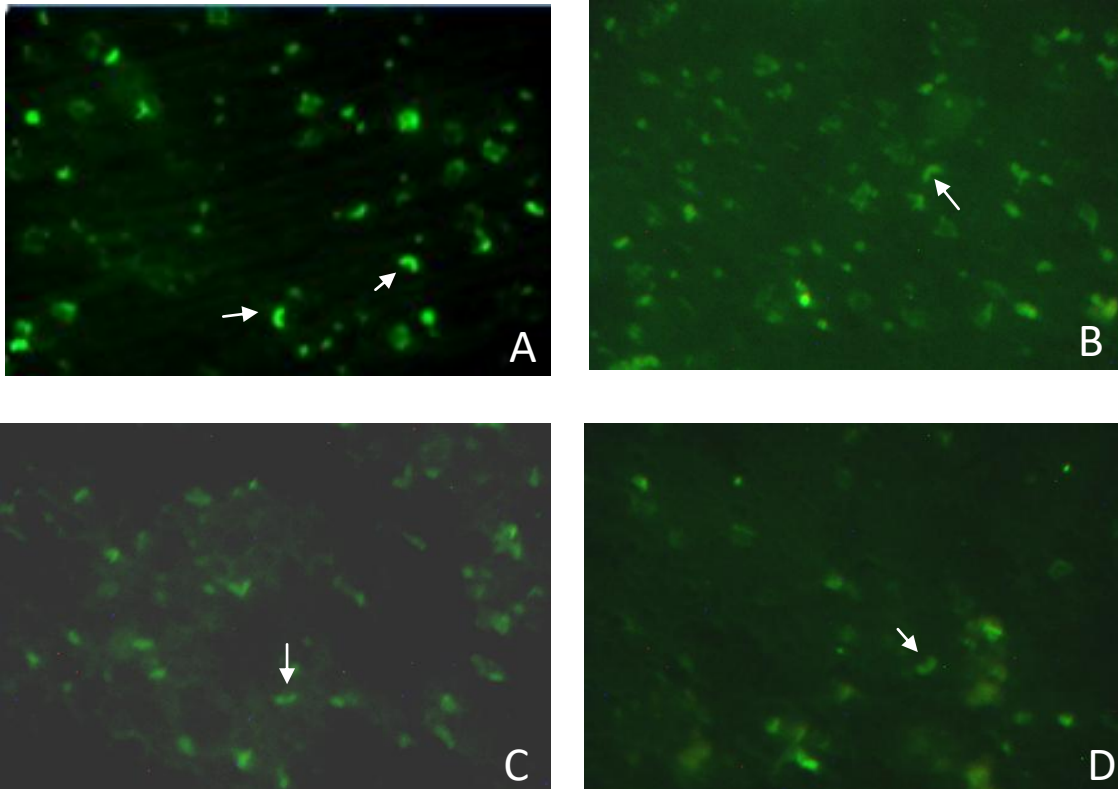
En la cual se necesita realizar la sustitución de los valores **Po** y **Pe** como se muestra a continuación:

$$Po = \frac{(10 + 2)}{13}$$

$$Pe = \frac{[(10) * (11)] + [(3) * (2)]}{13^2}$$

Teniendo como resultado valores de **Po**=0.923 y **Pe**=0.686

Obteniendo como índice Kappa el valor de $k=0.75$, el cual al emplear la tabla de Landis y Koch (1977), se obtuvo un grado de concordancia "sustancial" entre estas pruebas.



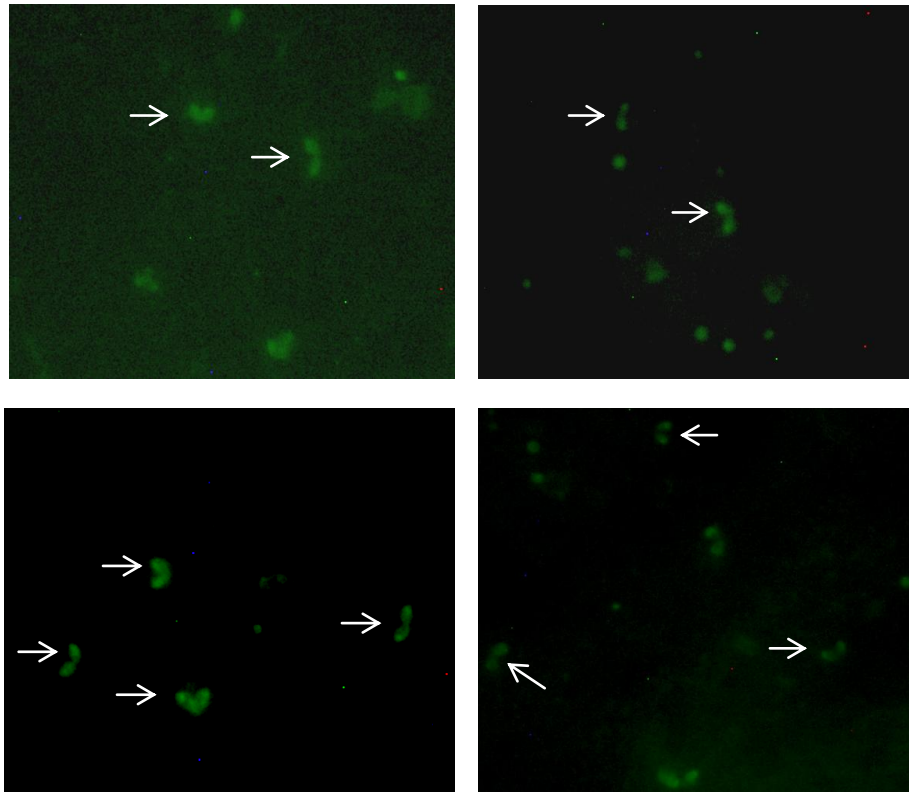
Identificación de anticuerpos anti-MSA-1 en muestras de suero de ovino en distintas diluciones por medio de microscopio de epifluorescencia. Panel A) dilución 1:80, B) dilución 1:160, C) dilución 1:320 D) dilución 1:640.

8.2 Seroprevalencia de babesiosis bovina

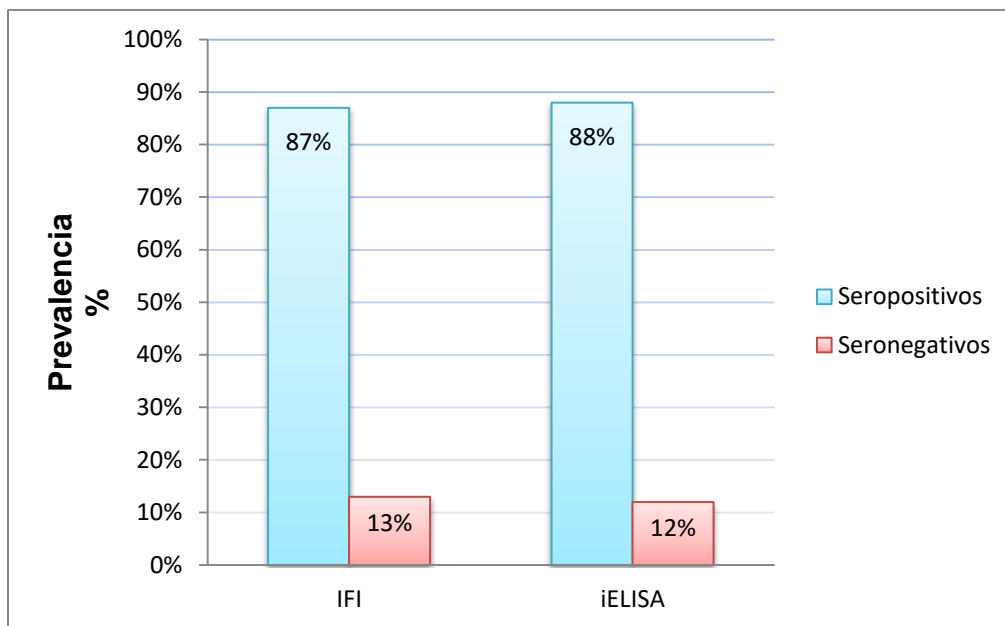
8.2.1 Ensayo inmunoenzimático indirecto (iELISA) e Inmunofluorescencia indirecta (IFI) en bovinos nativos del C.E. Pichucalco

Con base en los resultados obtenidos por la lectura en el espectrofotómetro de la placa de iELISA utilizando como antígeno la proteína recombinante MSA-1, se obtuvieron las densidades ópticas de los controles negativos siguiendo la técnica antes descrita para realizar el cálculo del punto de corte, se determinó un total de 87 animales seropositivos, resultado que muestra un título elevado de anticuerpos anti-*B. bovis* en el hato del campo experimental Pichucalco, este dato representa que existe una estabilidad enzoótica con una prevalencia del 88% (Grafica 3).

Mediante el empleo de la técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI), se obtuvo como resultado 86 animales seropositivos, esto al realizar la observación en microscopio de epifluorescencia de las laminillas empleadas, utilizando diluciones de los sueros problema 1:80, por lo que se estimó una seroprevalencia del 87% (Grafica 3).



Detección de anticuerpos anti-*B. bovis* en sueros de bovinos del C.E. Pichucalco en microscopio de epifluorescencia en objetivo 100X.



Grafica 3. Seroprevalencia en IFI e iELISA

Mediante la obtención de los resultados en ambas técnicas se procedió a la elaboración del coeficiente Kappa de Cohen, el cual determinó la concordancia entre ambas técnicas.

Para la cual se empleó la siguiente tabla:

IFI	ELISA		TOTAL
	(+)	(-)	
(+)	86	0	86
(-)	1	12	13
TOTAL	87	13	99

Así como la fórmula para obtención del índice Kappa:

$$k = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$$

En la cual se necesita sustituir los valores P_o y P_e de la siguiente manera:

$$P_o = \frac{(87 + 13)}{99}$$

$$P_e = \frac{[(86) * (87)] + [(13) * (12)]}{99^2}$$

Obteniendo como resultado $P_o = 1$ y $P_e = 0.77$

Con lo cual el resultado del índice Kappa es de $k = 1$, con el cual de acuerdo a la tabla empleada por Landis y Koch (1977), el grado de concordancia entre estas pruebas es "Casi perfecto".

IX. DISCUSIÓN

9.1 Reconocimiento inmunológico en ovinos

Existen numerosas pruebas serológicas y prácticamente todas ellas se han utilizado en el diagnóstico sobre babesiosis. La mayor popularidad en algunas de ellas se debe básicamente a la aparente facilidad para obtener los reactivos necesarios en el laboratorio donde se realizan dichas pruebas (Vega, 1989). Para realizar el diagnóstico inmunológico de babesiosis bovina existen pruebas que han sido implementadas en diversos estudios epidemiológicos, entre ellas se encuentra la prueba de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) considerada como la prueba de oro y caracterizada por su elevada sensibilidad y especificidad diagnóstica ($\geq 90\%$) (Bautista *et al.*, 2012), y el ensayo inmunoenzimático (ELISA) cuya semi-automatización permite el análisis de un mayor número de muestras al mismo tiempo (Rodríguez *et al.*, 1999).

El reactivo determinante o más importante para las pruebas serológicas es sin duda alguna, el antígeno cuando se trata de detectar anticuerpos en sueros problema. Para lo cual a Vega (1989), le resulta conveniente hacer mención al comentario "En los últimos años se ha tratado de resolver el problema de la falta de especificidad de las pruebas serológicas mediante el diseño de pruebas más sensibles, cuando en realidad el problema consiste en la falta de antígenos purificados" (Barriga, 1981). Es así como se llevó a cabo el estudio de proteínas recombinantes como antígenos y su empleo en pruebas serológicas, tema abordado en el presente trabajo y en el proyecto al cual pertenece el que lleva por nombre "Desarrollo de pruebas de diagnóstico rápido para la babesiosis bovina".

Como alternativa diagnóstica, se han desarrollado un gran número de métodos de diagnóstico inmunológico, los cuales se basan principalmente en la identificación de anticuerpos circulantes producidos por el hospedero hacia los antígenos babesiales, y algunos basados en la identificación misma de los antígenos parasitarios (Buening, 1991). Como se realizó en el presente trabajo detectando

anticuerpos en sueros de ovinos los cuales fueron inoculados con la proteína recombinante MSA-1, como antígeno de *B. bovis* para lograr la obtención de anticuerpos policlonales para su posterior evaluación en la prueba serológica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el inmunoensayo enzimático indirecto (iELISA), así como lo realizado por Cortés y Mancera (2009), quienes llevaron a cabo la determinación de presencia de IgG contra *Toxoplasma gondii*, basándose en reportes de altos índices de morbilidad, por lo cual se ha motivado a diversos investigadores a realizar estudios inmunológicos los cuales han sido encaminados al diagnóstico temprano de la enfermedad, mediante el desarrollo de técnicas fundamentadas en la determinación de anticuerpos específicos contra *T. gondii* (Ishizuka *et al.*, 1986; Germani y Pacheco, 2002).

Considerando lo precedente, en investigaciones realizadas se ha hecho la comparación entre pruebas como inmunofluorescencia indirecta (IFI), el inmunoensayo enzimático (ELISA), y la prueba comercial Chagatek® trabajo en el cual se determinó la concordancia entre IFI y ELISA para poder obtener un mejor diagnóstico de la enfermedad de chagas basados en el reporte realizado por Bucio *et al.* (1999), informando que el uso de cepas autóctonas aumenta la sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* en una población mexicana.

Derivado de lo anterior, en este trabajo se realizó la comparación de la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para lograr la identificación del antígeno crudo de *B. bovis* y el inmunoensayo enzimático indirecto (iELISA) en el cual se efectuó la detección de la proteína recombinante como antígeno como fue planteado inicialmente y de igual forma se llevó a cabo la determinación de la concordancia entre ambas pruebas, caso similar haciendo uso de cepas de cultivo *in vitro*, así como la proteína recombinante clonada y purificada en el laboratorio perteneciente a la unidad de babesiosis del CENID-Salud Animal e Inocuidad.

Con base en los resultados obtenidos tras efectuar el análisis de las muestras en la prueba de oro (IFI) se logró observar el reconocimiento por parte de los anticuerpos policlonales producidos por los ovinos hacia el antígeno crudo de *B.*

bovis, asimismo se observó el descenso de los anticuerpos en su titulación al día 84 proceso el cual se puede atribuir a factores como lo son edad, sexo, genética y plan nutricional del ovino, en la prueba de iELISA los anticuerpos presentan su descenso en el día 42 dato obtenido mediante el valor de densidad óptica, pero manteniendo su presencia hasta el día 84 y prueba en la que se tuvo reconocimiento el antígeno recombinante (proteína MSA-1) objetivo primordial del trabajo realizado, por lo cual siguiendo su desarrollo y mediante la interpretación de datos se determinó una concordancia de 0.75 valor atribuido al uso de antígeno recombinante purificado tanto en la inmunización de ovinos y en pruebas serológicas así como material biológico de cultivo *in vitro* (parásito *B. bovis*) valor que presenta una similitud al reportado en el trabajo de comparación entre las pruebas de ELISA e IFI teniendo una concordancia de 0.93, mientras que para las pruebas de IFI y Chagatek® fue de 0,43 y para las pruebas de ELISA y Chagatek® fue de 0,49. Por lo cual, estos autores refieren que la concordancia entre la prueba de ELISA y la prueba de IFI puede deberse al uso en ambos casos de formas epimastigotas procedentes de cultivo *in vitro* de cepas colombianas del parásito como antígeno (Cortés y Mancera, 2009).

9.2 Seroprevalencia de babesiosis bovina

Para complemento del presente estudio y mediante el empleo de antígenos recombinantes se realizó la determinación de la seroprevalencia en una zona donde los animales se encuentran en constante exposición al agente causal de la babesiosis, quedando en evidencia su utilidad en pruebas serológicas.

Los resultados obtenidos en el análisis de las muestras del presente trabajo en cuanto a seroprevalencia indican que el hato del Campo Experimental Pichucalco se encuentra en una zona endémica de babesiosis bovina. Las seroprevalencias obtenidas mediante el empleo de la prueba de iELISA, así como Inmunofluorescencia indirecta (IFI), son consideradas elevadas y coinciden con las reportadas por Lira *et al.* (2015), en regiones de alta endemicidad (Veracruz y Tamaulipas), donde se obtuvieron resultados de seroprevalencia con valores de:

90.2 % en el caso de *B. bovis* y 83.7 % para *B. bigemina* en el hato localizado en Tamaulipas, mientras tanto el hato localizado en el estado de Veracruz mostró una seroprevalencia de 73.1 % para *B. bigemina* y 64.5 % para *B. bovis*, la cual fue considerada baja ya que en estudios realizados anteriormente se determinó una prevalencia hasta del 80 % para *Babesia* spp. mencionando que de acuerdo a lo reportado por Álvarez *et al.* (2007), a fin de tener en cuenta que la baja prevalencia de anticuerpos circulantes en las muestras del estado de Veracruz, podría explicarse debido a la aplicación del programa de control integral del vector, la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Las seroprevalencias de aquellos animales que se encuentran en zonas endémicas como lo son los Estados de Veracruz y Tamaulipas para las especies de *B. bovis* (64.5 % y 90.2 %) y *B. bigemina* (73.1 % y 83.7 %), reportadas por Lira *et al.* (2015) así como las mostradas en el presente estudio, muestran niveles altos, en comparación con lugares considerados de baja endemicidad como lo reportado en el estado de Morelos por Rojas *et al.* (2004), mostrando seroprevalencias de 58 % y 60 % para *B. bovis* y *B. bigemina*; respectivamente, trabajo en el cual se realizó la determinación mediante el empleo de la prueba de Inmunofluorescencia indirecta (IFI).

X. CONCLUSIÓN

10.1 Reconocimiento inmunológico en ovinos y Seroprevalencia de babesiosis bovina

En el presente estudio se muestra que el reconocimiento del antígeno nativo, así como el antígeno recombinante MSA-1 de *Babesia bovis* tuvo lugar después de la segunda inmunización de los ovinos de acuerdo con la evaluación de los sueros en las pruebas de IFI e iELISA. Por lo cual, se deduce que la proteína recombinante MSA-1 de *B. bovis* al ser inmunogénica para los ovinos al lograr estimular el sistema inmune para la producción de anticuerpos policlonales, es buen candidato para su empleo en pruebas diagnósticas de babesiosis bovina. Así mismo, la producción de estos anticuerpos serán empleados para siguientes estudios, especialmente respecto al diagnóstico de esta enfermedad con impacto económico en la ganadería tropical de México y el mundo.

En lo que concierne al posible empleo de antígenos recombinantes para determinación de seroprevalencia utilizando como referencia muestras del hato del C.E. Pichucalco, se confirma la utilidad de este tipo de antígenos en base al valor de concordancia entre los resultados en la prueba considerada como estándar de oro IFI y la prueba puesta a punto iELISA, sin embargo iELISA ha presentando mejora en la subjetividad al realizar la lectura e interpretación de los resultados, así como la optimización de tiempo al procesar mayor número de muestras en un periodo de tiempo más corto.

XI. SUGERENCIAS

En un proyecto como al que pertenece el presente trabajo, se pretende una continua mejora del mismo, por ello se sugiere la implementación de repeticiones sobre el trabajo llevado a cabo con la finalidad de poder confirmar los resultados presentados, en el cual se podría llevar a cabo la inoculación de nuevos animales para poder realizar nuevamente la evaluación de los anticuerpos producidos por los mismo, empleando las pruebas serológicas utilizadas. Del mismo modo se puede emplear una segunda proteína (RAP-1) como antígeno para poder tener confirmación de no tener reacción cruzada con *Babesia bigemina*.

Bibliografía

- Adham, F., Abd-El-Samie, E., Gabre, R. y El Hussein, H. (2009). Detection of tick blood parasites in Egypt using PCR assay I-*Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Parasitol Res.* 105,721-730.
- Aguilar, B.R., Caravantes, A. y Noguera, B. (2009). Inmunología de la babesiosis bovina. En Ortega, J., Sedeño, J. E. y López, E. (Comps.), Setenta y cinco años de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. (p. 292-303). México.
- Aikawa, M., Pongponratn, E., Tegoshi, T., Nakamura, K., Nagatake, T., Cochrane, A. y Ozaki, L. (1992). A study on the pathogenesis of human cerebral malaria and cerebral babesiosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* p. 297-301.
- Aktas, M., Altay, K. y Dumanli, N. (2007). Determination of prevalence and risk factors for infection with *Babesia ovis* in small ruminants from Turkey by polymerase chain reaction. *Parasitol Res.* 100(4), 797-802.
- Allred, D. (2003). Babesiosis In The Face Of Adversity. *Trends Parasitol.* 19(2): 51-55.
- Altangerel, K., Alhassan, A., Iseki, H., Sivakumar, T., Boldbaatar, D., Yokoyama, N. e Igarashi, I. (2009). Evaluation of *Babesia bigemina* 200 kDa recombinant antigen in enzyme-linked immunosorbent assay. *Parasitol Res.* 105(1), 249-54.
- Alhassan, A., Pumidonming, W., Okamura, M., Hirata, H., Battsetseg, B., Fujisaki, K., Yokoyama, N. e Igarashi, I. (2005). Development of a single-round and multiplex PCR method for the simultaneous detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in horse blood. *Vet Parasitol.* 129(1-2), 43-9.
- Álvarez, J.A. y Canto, G. (1985). Epidemiología de la babesiosis. Memorias del 25 Aniversario de la Sociedad Mexicana de Parasitología. A. C. Volumen Conmemorativo. México, D.F. pp. 55-72.

- Álvarez, J.A., y Cantó, G. (1991). Diagnóstico de la babesiosis bovina. En: Quiróz, R. ed. Diagnóstico y control de parásitos de animales y el hombre. División del sistema universidad abierta. FMVZ-UNAM. p. 62-71.
- Álvarez, J.A. (1991). Métodos más comunes para la prevención de la babesiosis bovina. En Garrapatas y enfermedades que transmiten. Segundo Seminario Internacional de Parasitología Animal. Oaxtepec, Morelos. 9-11 de octubre, 1991:200-208.
- Álvarez, J.A., Alpírez, M.F., Rojas, M.C. y Figueroa, J.V. (2007). Probabilidad diaria de infección para *Babesia* spp mediante PCR anidado. En: INIFAP, UV, CP, UACH, ITUG, ITBOCA, UNAM (eds): Avances en la Investigación Agrícola, Pecuaria, Forestal y Acuícola en el Trópico Mexicano, Veracruz, México, 4:397-402.
- Antonio, R. (2013). Piroplasmosis en bovinos. Monografía de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, División Regional de Ciencia Animal.
- Añez, N., Cristante, G., Bolívar, A.M. y Añez-Rojas, N. (2007). Utilización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el diagnóstico de tripanosomiasis y anaplasmosis en muestras de sangre de animales domésticos. Taller Teórico Práctico. UNESUR. Santa Bárbara del Zulia. p. 1-29.
- Awad, H., Antunes, S., Galindo, R., do Rosário, V., de la Fuente, J., Domingos, A. y El Husseina, A. (2011). Prevalence and genetic diversity of *Babesia* and *Anaplasma* species in cattle in Sudan. *Vet Parasitol.*
- Barriga, O. (1981). *The Immunology of Parasitic Infections*. University Park Press. Baltimore, MD, USA.
- Bautista, C.R., Castañeda, R., Álvarez, J.A., Rojas, C., Figueroa, J.V. y Rodríguez, A. (2012). La vacunación simultánea de bovinos con *Lactobacillus casei* y la vacuna bivalente contra babesiosis bovina genera una mejor protección contra *Babesia bovis* y *B. bigemina* transmitidas por garrapatas en condiciones extremas de campo. *Vet. Méx.*, 43 (3): 198-200.
- Beltran, L.G. (1975). National anti-Tick Campaign. In: Ectoparasites Seminar. CIAT.

- Benavides, E. (1992). Control de garrapatas, moscas y hemoparásitos en bovinos del trópico. *Rev. ICA Informa (Colombia)*. 26(1): 9-15.
- Benito, R. y GIL, J. (2008) “SERIE: Técnica de inmunofluorescencia (IF)”. Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa. Zaragoza.
- Betancourt, A. (1996). Epidemiología y control de hemoparásitos en bovinos. En: CORPOICA. *Epidemiología, Diagnóstico y Control de Enfermedades Parasitarias en bovinos*. Compendio N° 2. CORPOICA, Medellín. 711pp.
- Blood, D. (2002). *Enfermedades Causadas por Protozoos*. Manual de Medicina Veterinaria. 9na Ed. Mcgraw Hill Interamericana, España. 1-864pp.
- Bock, R., Jackson, L., De Vos, A., y Jorgensen, W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology*. Cambridge University Press. United Kingdom. 129; 247-269.
- Bravo, S. (2012). *Babesiosis Bovina*. Monografía de licenciatura. Universidad Estatal de Cuenca-Ecuador.
- Brayton K. A., Lau A. O., Herndon D. R., Hannick L., Kappmeyer L. S., Berens S. J., *et al.* (2007). Genome sequence of *Babesia bovis* and comparative analysis of apicomplexan hemoprotozoa, *PLoS Pathog.* 3:1401–1413.
- Brown, C.G.D., Hunter, A.G., y Luckins, A.G. (1990). Diseases caused by protozoa. In: Sewell MMH, Brocklesby DW, ed. *Handbook on animal diseases in the tropics*. Great Britain: Baillière Tindall. 161-170.
- Brown, W.C., McElwain, T.F., Hotzel, I., Ruef, B.J., Rice-Ficht, A.C., Stich, R.W., Suárez, C.E., Estes, D.M. y Palmer, G.H. (1998). Immunodominant T-cell antigens and epitopes of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 92, 473–482.
- Brown, W.C. y Palmer, G.H. (1999). Designing blood-stage vaccines against *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Parasitol Today.* 15, 275–281.

- Brown, W.C. (2001). Molecular approaches to elucidating innate and acquired immune responses to *Babesia bovis* a protozoan parasite that causes persistent infection. *Vet. Parasitol.* 101:233–248.
- Brown, W.C., Normine, J., Goff, W.L., Suarez, C.E. y McElwain, T.F. (2006a). Prospects for recombinant vaccines against *Babesia bovis* and related parasites. *Parasite. Immunol.* 28(7), 315-27.
- Brown, W.C., Norimine, J., Knowles, D.P. y Goff W.L. (2006b). Immune control of *Babesia bovis* infection. *Vet. Parasitol.* 138:75–87.
- Bucio, M.I., Cabrera, M., Segura, E.L., Zenteno, E. Y Salazar-schettino P.M. (1999). Identification of Immunodominant Antigens in Mexican Strains of *Trypanosoma cruzi*, *Immunological Investigations*, 28:4, 257-268, DOI: [10.3109/08820139909060860](https://doi.org/10.3109/08820139909060860)
- Buening, G.M. (1991). Diagnosis of Babesiosis: Past, present and future. En: *Memorias del II seminario internacional de parasitología animal. Garrapatas y enfermedades que transmiten.* Morelos, México. p. 180-189.
- Callow, L.L. (1976). Métodos australianos de vacunación contra la anaplasmosis y babesiosis. *Rev. Mundial Zootec.* 18:9.
- Callow, L.L. y Dalglish, R.J. (1982). Immunity and immunopathology in babesiosis, in: Cohen S., Warren K.S. (Eds.), *Immunology of parasitic infections*, 2nd ed., Blackwell scientific publications. pp. 475– 526.
- Callow, L. L., Dalglish, R. J. y de Vos, A. J. (1997) Development of effective living vaccines against bovine babesiosis – the longest field trial? *Int J Parasitol* 27 (7): 747–767.
- Callow, L.L. y Mellors, L.T. (1966). A new vaccine for *Babesia argentina* infection prepared in splenectomised calves. *Aust. Vet. J.* 42,464–465.

- Cantu, A., Ortega, A., García, Z., Mosqueda, J., Henke, S. y George, J. (2009). Epizootiology of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in free-ranging white-tailed deer in northeastern México. *J Parasitol.* 95(3), 536- 542.
- Cao, S., Oluga, G., Terkawi, L., Yu, L., Kamyngkird, K., Luo, Y., Li, Y., Goo, Y., Yagamishi, J., Nishikawa, Y., Yokoyama, N., Suzuki, H., Igarashi, I., Maeda, R., Inpankaew, T., Jittapalapong, S. y Xuan, X. (2012). Molecular detection and identification of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle in northern Thailand. *Parasitol Res.* 2960-2964.
- Carrique, J., Morales, G., Edelsten, M. (2000). Endemic Instability for Babesiosis and Anaplasmosis in Cattle in the Bolivian Chaco. *Vet. J.* 160: 162-164.
- Chatel, G., Gullea, M., Matteelli, A., Marangoni, A., Signorini, L., Oladeji, O. y Calagaris, S. (1999). Short report: diagnosis of tick-borne relapsing fever by the quantitative buffy coat fluorescence method. *Ann J Trop Med Hyg.* 60(5),738-739.
- Chauvin, A., Moreau, E., Bonnet, S., Plantard, O. y Malandrin, L. (2009). *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Vet. Res.* 40:1-18.
- Clawson, L. M., Paciorkowski, N., y Rajan, T.V. (2002). Cellular Immunity, but Not Gamma Interferon, Is Essential for Resolution of *Babesia microti* Infection in BALB/c Mice. *American Society for Microbiology* 70:53045306.
- Cohen J. A. (1960). Coefficient of agreement for nominal scales. *Educ. Psychol. Meas.* 20: 37-46.
- Connaway, J.W. y Franics, M. (1899). Texas fever. Experiments made by the Missouri experiment station and the Missouri state board of agriculture in cooperation with the Texas experiment station in immunizing northern breeding cattle against Texas fever for the southern trade. *Mo. Agric. Exp. Stn. Bull.* 48,1-64.
- Coons, A.H., Creech, H.J., Jones, R.N. (1941). Immunological properties of an antibody containing fluorescent group. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 47,200-202.

- Cordero, M. (2002). Parasitología veterinaria. Tercera Reimpresión. Editorial McGRAW-HILL-INTERAMERICANA DE ESPAÑA, S.A.U.
- Cortés, L.J. y Mancera, L. (2009). Concordancia entre ELISA e IFI para la determinación de anticuerpos tipo IgG contra *Toxoplasma gondii*. Infectio, 13 (2): 76-82.
- Cotrino, V., Gaviria, C. y Espindola, E. (2007). La Babesiosis en bovinos: una amenaza para la ganadería del altiplano. Laboratorio Médico veterinario Ltda. Bogotá, D.C., Colombia.
- Criado, A., Martínez, J., Buling, A., Barba, J.C., Merino, S., Jefferis, R. e Irwin, P.J. (2006). New data on epizootiology and genetics of piroplasms based on sequences of small ribosomal subunit and cytochrome b genes. Vet Parasitol. 142(3-4),238-47.
- Dalgliesh, R.J., Callow, L.L. Mellors, L.T. y McGregor, W. (1981). Development of a highly infective *Babesia bigemina* vaccine of reduce virulence. Aust. Vet. J. 57:8.
- De La Fuente, J., Naranjo, V., Ruiz-Fons, F., Hofle, U., Villanahua, D., Almazan, C., Torina, A., Caracappa, S., Kocan, K.M., Gortazar, C. (2006). Potential vertebrate reservoir hosts *Anaplasma marginale* and invertebrate vectors of and *Anaplasma phagocytophilum* in central Spain. Vector Borne Zoonotic Dis. 5(4):390-401.
- Echaide, I.E. de Echaide, S.T. y Guglielmone, A.A. (1993). Live and Soluble antigens for cattle protection to *Babesia bigemina*. Vet. Parasitol. 51:35.
- FAO. (1989). Revision of strategies for the control of ticks and tick-borne diseases and their vectors. FAO expert consultation. Rome, Italy 1989:1-15.
- Figuroa, J.V., Chieves, L.P., Jhonson, G.S. y Buening, G.M. (1993). Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. Vet Parasitol. 50:69-81.
- Flores, A. R. (2006). Hemoparasitosis bovina. VIRBAC, No. 7. Salud Animal.

- Florin-Christensen, M., Schnittger, L., Dominguez, M., Mesplet, M., Rodríguez, A., Ferreri, L., Asenzo, G., Wilkowsky, S., Farber, M., Echaide, I. y Suarez, C. (2007). Search for *Babesia bovis* vaccine candidates. *Parassitologia*. 49:9-12.
- Gaffar, F., Yatsuda, A., Franssen, F. y de Vries, E. (2004). A *Babesia bovis* merozoite protein with a domain architecture highly similar to the thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) present in *Plasmodium sporozoites*. *Mol Biochem Parasitol*. 136(1): 25-34.
- Gallo, C.A. (2014). Manual de diagnóstico con énfasis en laboratorio clínico veterinario. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Agraria. Facultad de Ciencia Animal. Managua, Nicaragua.
- García, Z. (1989). La babesiosis en México. En: Memorias del Seminario Internacional de Parasitología Animal. Morelos, México.
- García, T.D., Figueroa, M.J., Ramos, A.J., Rojas, M.C., Canto, A.G., Falcón, N.A. y Álvarez, M.J. (2004). Immune response to *Babesia bigemina* infection in pregnant cows. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1026: 144–148.
- Gasque, R. (2008). En la (Ed.) Enciclopedia Bovina. (Primera Edición, Páginas 97-100). México. Recuperado de: <https://es.scribd.com/doc/55407879/Enciclopedia-Bovina-UNAM>.
- Germani, C. y Pacheco, F. (2002) Comparação entre os testes de inmuno-fluorescencia indirecta e hemaglutinação indirecta para detecção e anticorpos anti-Toxoplasma gondii em soros de suínos. *Acta Scientiae Veterinariae*. 30:185-9.
- Goff, W.L., Wagner, G.G. y Craig, T.M. (1984). Increased activity of bovine ADCC effector cells during acute *Babesia bovis* infection. *Vet. Parasitol.* 16:5–15.
- Goff, W.L., Johnson, W.C., Parish, S.M., Barrington, G.M., Tuo, W. y Valdez, R.A. (2001). The age-related immunity in cattle to *Babesia bovis* infection involves the rapid induction of interleukin-12, interferongamma and inducible nitric oxide synthase mRNA expression in the spleen. *Parasite Immunol.* 23:463–471.

- Goff, W.L., Johnson, W.C., Parish, S.M., Barrington, G.M., Elsasser, T.H., Davis W.C. y Valdez, R.A. (2002). IL-4 and IL-10 inhibition of IFN-gamma- and TNF-alpha-dependent nitric oxide production from bovine mononuclear phagocytes exposed to *Babesia bovis* merozoites. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 84: 237–251.
- Goff, W.L., Storset, A.K., Johnson, W.C. y Brown W.C. (2006). Bovine splenic NK cells synthesize IFN-gamma in response to IL-12-containing supernatants from *Babesia bovis*-exposed monocyte cultures. *Parasite Immunol.* 28:221–228.
- Gohil, S., Kats, L., Sturm, A. y Cooke, B. (2010). Recent insights into alteration of red blood cells by *Babesia bovis*: moovin´ forward. *Trens Parasitol.* 26(12): 591-599.
- Gray, J.S., Langley, R.J. y Murphy, T.M. (1985). Morphological comparisons of the bovine piroplasm, *Babesia divergens*, in cattle and jird (*Meriones unguiculatus*) erythrocytes. *J. Parasitol.* 71:799–802.
- Gratzer W. y Dluzewski A. (1993). The Red Blood Cell and Malaria Parasite Invasion. *Semin Hematol* 30, 232-247.
- Gravelly, S.M., y Kreir, J. P. (1974). *Babesia microti* (Gray strain): removal from infected hamster erythrocytes by continuous-flow ultrasonication. *Tropénmed. Parasitology.* 25,198-206.
- Grinspan, S. (1985). El Estudio del Frotis de Sangre Periférica. *REVISTA MÉDICA HONDUR.* VOL. 53.
- Guevara, N. M., Rivas, L. M. y Ríos, L. A. (2011). Utilidad de las técnicas moleculares aplicadas al diagnóstico de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en Ganado Bovino: Revisión Sistemática. *Hechos Microbiol.* 2(2); 65-78.
- Guglielmone, A. (1995). Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Vet. Parasitol.* 57: 109-119.
- Guzmán, M. y Bernal, M. (1999). Las pruebas serológicas en el diagnóstico de la enfermedad infecciosa. *Revista de la Facultad de Medicina Universidad Nacional de Colombia* 1999 - Vol. 47 N°2 Págs. (89 - 97).

- Hernández, O. R., Falcón, N. A., García, O. M., Palacios, F. A., M. G. J., Preciado, T. J., Mejía, E. F., Ramos, A. J., Rosas, P. J., Cantú, C. A., Rojas, R. E., Alpírez, M. F., Vega, M. C, Solís, C. J. y Rodríguez C. S. (2010). Control integrado de garrapatas y enfermedades que transmiten en ganado bovino. Babesiosis y Anaplasmosis. Folleto técnico No. 10. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria. INIFAP.
- Hettmann, C., Herm, A., Geiter, A., Frank, B., Schward, E., Soldati, T. y Soldati, D. (2000). A Dibasic Motif In The Tail Of Class Xiv Apicomplexan Myosin Is An Essential Determinant Of Plasma Membrane Location. *Mol Biol Cell* 11, 1385-1400.
- Hines, S.A., Palmer, G.H., Jasmer, D.P., McGuire, T.C. y McElwain, T.F. (1992). Neutralization-sensitive merozoite surface antigens of *Babesia bovis* encoded by members of a polymorphic gene family. 55, 85–94.
- Hodgson, J.L. (1992). Biology and Transmission of *Babesia bigemina* in *Boophilus microplus*. *Trop. Vet. Med.* 653: 42-51.
- Hodgson, J.L., Stiller, D., Jasmer, D.P., Buening, G.M., Wagner, G.G. y McGuire, T.C. (1992). *Babesia bigemina*: quantitation of infection in nymphal and adult *Boophilus microplus* using a DNA probe. *Exp Parasitol* 74: 117-126.
- Homer, M., Aguilar-delfin, I., Telford, S., Krause, P. y Persing, D. (2000). Babesiosis. *Clinical Microbiology Reviews.*13(3), 451-469.
- Howell, J.M., Ueti, M., Palmer, G. Scoles, G. y Knowles, D. (2007). Transovarial Transmission Efficiency of *Babesia bovis* Tick Stages Acquired by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* during Acute Infection. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY.* p. 426–431.
- Ishizuka, M., Angelino, J. y Souza, J. (1986). Toxoplasmosis suína II. Estudo comparativo das provas de imunofluorescência indireta e hemaglutinação para avaliação de anticorpos anti-toxoplasma em soros suínos. *Bol Oficina Sanit Panam.* 100:524-30.

- Jaramillo, J.M. (2016). Desarrollo de candidatos vacunales contra *Babesia bovis* basados en vectores virales y proteínas recombinantes. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires.
- Jonsson, N., Bock, R. y Jorgensen, W. (2008). Productivity and health effects of anaplasmosis and babesiosis on *Bos indicus* cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia. *Vet. Parasitol.* 155: 1-9.
- Krause, P. J., Daily, J., Telford, S.R., Vannier, E., Lantos, P. y Spielman, A. (2007). Shared features in the pathobiology of Babesiosis and Malaria. *TRENDS in Parasitology* 23(12):605-610.
- Landis, J.R. y Koch, G.G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 33: 159-174.
- Lejona, S., Benetti, M., Fay, F. y Fay, O. (2006). Avances en el diagnóstico molecular: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Anuario Fundación Dr. J.R. Villavicencio. p. 033-037.
- Leroith, T., Brayton, K., Molloy, J., Bock, R., Hines, S., Lew, A. y McElwain, T. (2005). Sequence variation and immunologic cross-reactivity among *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 proteins from vaccine strains and vaccine breakthrough isolates. *Infect Immun.* 73(9):5388- 5394.
- Levine, N. D. (1971) Uniform Terminology for the Protozoan *Subphylum Apicomplexa*. *J Protozool.* 18, 2:352-355.
- Lew, A. y Jorgensen, W. (2005). Molecular approaches to detect and study the organisms causing bovine tick borne diseases: babesiosis and anaplasmosis. *Afr J Biotechnol.* 4(4), 292-302.
- Lira, J.J., Vargas, U.P., Cantú, C.A., Castañeda, A.R.O., Álvarez, J.A., Rojas, M.C., Bautista, C.R. y Figueroa, J.V. (2015). Prevalencia de babesiosis bovina en dos explotaciones del país utilizando prueba serológica con antígenos recombinantes.

Memorias de XXVII Reunión Científica Tecnológica, Forestal y Agropecuaria, Tabasco, p: 217-220.

Lunn, J.A., Lee, R., Smaller, J., MacKay, B.M., King, T.A., Hunt, G.B., Martin, P.A., Krockenberger, M.B., Spielman, D.S., y Malik, R. (2012). Twenty two cases of canine neural angiostrongylosis in eastern Australia (2002-2005) and a review of the literature. *Parasites & Vectors*.

Mackenstedt, U.; Gauer, M.; Fuchs, P.; Zapf, F.; Schein, E. y Mehlhorn, H. (1995) DNA measurements reveal differences in the life cycles of *Babesia bigemina* and *Babesia canis*, two typical members of the genus *Babesia*. *Parasitol. Res.* 81: 595–604.

Mahoney, D. (1962). Bovine babesiosis: Diagnosis of infection by a complement fixation test. *The Australian Veterinary Journal*.

Mahoney, D. (1977). *Babesia* of Domestic Animals. En *Parasitic protozoa*. Editado por J.P. Krier, Academic press, New York, USA. Vol. IV, pp.1-52.

Mallick, K.P., Dwivedi, S.K., Srivastana, N.K. y Kumar, S.A. (1987). Report on the occurrence of haemoprotozoan infections in rural livestock. *Ind J Parasitol*; 11:25-26.

Martins, T., Neves, L., Pedro, O., Fafetine, J., Do Rosario, V. y Domingos, A. (2010). Molecular detection of *Babesia* spp. and other haemoparasitic infections of cattle in Maputo Province, Mozambique. *Parasitology*. p. 939-946.

Matsuo, T., Yokoyama, N., Suthisak, B., Fujisaki, K. e Igarashi, I. (2005). Cellular localization of *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 in the merozoite stage with immuno-electron microscopy. *J Protozool. Res.* 15:1-6.

McCormick, C.C., Wai Ping, L.I. y Calero, M. (2000). Oxygen tension limits nitric oxide synthesis by activated macrophages. *Biochem. J.* 350:709-16.

McCosker, P.J. (1981). The global importance of babesiosis. In: Ristic M, Kreier J, ed. *Babesiosis*. New York: Academic Press. 1-24.

- Medellín, L. J. A. (1998). Anaplasmosis y babesiosis en Tamaulipas. Clínica de grandes Especies, Laboratorio de diagnóstico. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UAT.
- Mehlhor, H. *et al.* (1993). Manual de Parasitología Veterinaria, Edición segunda, Editorial GRASS-IATRS.
- Meléndez, R. (1998). Revisión Integral de los Factores Epidemiológicos que inciden en la Relación *Boophilus microplus*-Bovino-*Babesia* spp. Revista Científica FCV-LUZ/Vol. VIII, Nº 1, 2534.
- Miller, L., Baruch, D., Marsh, K. y Doumbo, O. (2002). The Pathogenic Basis of Malaria. *Nature*, 415: 673-679.
- Morilla, A. (1981). Inmunología de la babesiosis. Departamento de Inmunología. *Ciencia Veterinaria*, 3, 240-275.
- Morrisette, N. y Sibley L. (2002). Cytoskeleton Of Apicomplexan Parasites. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66(1): 21-38.
- Mosqueda, J. J., Falcón, A., Ramos, J. A., Canto, A., Germinal, J. y Camacho-Nuez, M. (2012). Estrategias genómicas y moleculares para el control de la babesiosis bovina. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 3 (1), 51-59.
- Nari, A. (1995). Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. *Vet. Parasitol.* 57: 153-165.
- Navarrete, I., Serrano, F. y Reina, D. (1999). Parasitosis hemáticas: Babesiosis. En Cordero del Campillo, M. y Rojo, F. *Parasitología veterinaria*. (p. 283-293). España: McGraw-Hill Interamericana.
- Norimine, J., Suarez, C.M.E., McElwain, T.F., Florin-Christensen, M., y Brown, W. C. (2002). Immunodominant Epitopes in *Babesia bovis* Rhoptry Associated Protein 1 That Elicit Memory CD4₊-T-Lymphocyte Responses in *B. bovis*-Immune Individuals Are Located in the Amino-Terminal Domain. *Infection and Immunity*, 70(4):2039–2048.

- Ogden, N.; Swai, E.; Beauchamp, G.; Karimuribo, E.; Fitzpatrick, J.; Bryant, M.; Kambarage, D.; French, N. (2005). Risk factors for tick attachment to smallholder dairy cattle in Tanzania. *Prev. Vet. Med.* 67: 157-170.
- Ogo, N., Fernández, I., Galindo, R., Okubanjo, O., Inuwa, H., Agbede, R., Torina, A., Alongi, A., Vicente, J., Gortázar, C. y de la Fuente, J. (2012). Molecular identification of tickborne pathogens in Nigerian ticks. *Vet Parasitol.* 187, 572-577.
- OIE. (2014). Babesiosis bovina. En Manual terrestre de la OIE. Versión adoptada por la Asamblea Mundial de Delegados de la OIE. (p. 1-18). Mayo 2014.
- Ojeda, J.J., Orozco, L., Flores, R., Rojas, C., Figueroa, J.V. y Álvarez, J.A. (2010). Validation of an Attenuated Live Vaccine Against Babesiosis in Native Cattle in an Endemic Area. *Transboundary and Emerging Diseases.*
- Oliveira-Sequeira, T., Oliveira, M., Araujo, J. y Amarante, A. (2005). PCR-based of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. *Int J Parasitol.* 35:105-111.
- Oliveira M., Oliveira-Sequeira, T., Regitano, L., Alencar, M., Néo, T., Silva, A. y Oliveira, H. (2008). Detection of *Babesia bigemina* in cattle of different genetic groups and in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick. *Vet Parasitol.* 155:281-286.
- Ortiz, J.M., Montenegro, V. N., De la Fournière, S.A.M., Sarmiento, N.F., Farber, M.D. y Wilkowsky, S.E. (2018). Development of an Indirect ELISA Based on a Recombinant Chimeric Protein for the Detection of Antibodies against Bovine Babesiosis. *Veterinary Sciences.*
- Osorno, M. (1978). Babesiosis en México. *Vet Mex.* 9:203-218.
- Petrigh, R. (2010). Identificación y Caracterización de Antígenos de *Babesia bigemina* (Tesis Doctoral). Universidad de Buenos Aires. Argentina.
- Pinder, J., Fowler, R., Bannister, L., Dluzewski, A. y Mitchell, G. (2000). Motile Systems In Malaria Merozoites: How Is The Red Blood Cell Invaded? *Parasitology Today* 16,240-245.

- Quijano, B.O. (1996). Prevalencia de anticuerpos contra *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en bovinos de hatos del municipio de Barbosa (Antioquia). Universidad de Antioquia. Medellín (Colombia). Trabajo de Grado. 1-44pp.
- Quintao-Silva, M., Melo, M. y Ribeiro, M. (2007). Comparison of duplex PCR and microscopic techniques for the identification of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* in engorged female ticks of *Boophilus microplus*. *Zoonoses Public Health*. 54, 147-151.
- Ramírez, C. (1993). Epidemiology of bovine babesiosis in the State of Yucatan, Mexico. MPhil Theses, Centre for Tropical Veterinary Medicine, University of Edinburgh, Scotland.
- REDLAB/ Programa de Hemoparásitos. (1994). Protocolo para evaluar la seguridad y eficacia de los inmunógenos contra la anaplasmosis y babesiosis bovina. FAO, Oficina Regional para América Latina y el Caribe. Santiago de Chile. P.7-10.
- Reed, M., Caruana, S., Batchelor, A., Thompson, J., Crabb, B. y Cowman, A. (2000). Targeted Disruption of an Erythrocyte Binding Antigen in *Plasmodium falciparum* Is Associated With A Switch Toward A Sialic Acid-Independent Pathway of Invasion. *Proc Natl Acad Sci Usa* 97, 7509-7514.
- Regassa, A., Penzhorn, B. y Bryson, N. (2003). Attainment of endemic stability to *Babesia bigemina* in cattle on a South African ranch where non-intensive tick control was applied. *Vet. Parasitol.* 116: 267-274.
- Ristic, M. (1981). Babesiosis. In: Ristic M, McIntyre I, ed. Diseases of cattle in the tropics. Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers. 443-468.
- Rodríguez, R., Rosado, A., Basto, G., García, Z., Rosario, R. y Fragoso, H. (2006). MANUAL TÉCNICO PARA EL CONTROL DE GARRAPATAS EN EL GANADO BOVINO. Publicación Técnica No. 4. México.
- Rodríguez, S.D., Buennig, G.M., Green, T.J. y Carson, C.A. (1983). Cloning of *Babesia bovis* by *in vitro* cultivation. *Infect. Immun.* 42:15-19.

- Rodríguez, S.S., García, M.A., Cantó, G.J., Hernández, S.G., Santos, C.N. y Aboytes, R. (1999). Ensayo de un inmunógeno experimental inactivado contra *Anaplasma marginale*. *Técnica Pecuaria México*, 37(1): 1-12.
- Rogers, J., Dimmock, CK., De vos AJ. y Rodwen, BJ. (1988). Bovine leucosis virus contamination of vaccine produced *in vivo* against bovine babesiosis and anaplasmosis. *Aust Vet J.* 65,285-290.
- Rojas, R.E., Domínguez, P., García, M., Cruz, V.C., Figueroa, J.V. y Ramos, A.J. (2004). Prevalencia e incidencia de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en un hato bovino en Axochiapan, Morelos, *Avances en Investigación Agropecuaria*, 8(2): 1-8.
- Ross, J. y Lohr, K. (1968). Serologic diagnosis of *Babesia bigemina* infection in cattle by the Indirect fluorescent antibody test. *Res. Vet. Sci.* 9:557-562.
- Sam-Yellow T. (1996). Rhoptry Organelles of the Apicomplexa: Their Role in Host Cell Invasion and Intracellular Survival. *Parasitol. Today.* 12: 28-32.
- SENASICA (2018) Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Campañas zoonositarias: Garrapata *Boophilus* spp. Disponible en: <https://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/campana-nacional-para-el-control-de-la-garrapata-boophilus-spp>
- Smith, T. y Kilborne, F. (1893). Letter of transmittal. En investigations into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever. (p. 7 y 8). Washington, U. S.
- Solís, S. (1991). Epidemiología de garrapatas *Boophilus* y *Amblyomma* en México. En: Memorias del II Seminario Internacional de Parasitología Animal. Garrapatas y enfermedades que transmiten. Morelos, México. 19-30.
- Shoda, L.K., Palmer, G.H., Florin-Christensen, J., Florin-Christensen, M., Godson, D.L. y Brown, W.C. (2000). *Babesia bovis*-stimulated macrophages express interleukin-1beta, interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide and inhibit parasite replication *in vitro*. *Infect. Immun.* 68:5139-5145.

- Shompole, S., McElwain, T.F., Jasmer, D.P., Hines, S.A., Katende, J., Musoke, A.J., Rurangirwa, F.R. y McGuire, T.C. (1993). Identification of infected erythrocyte surface antigens with epitopes conserved among geographic strains of *Babesia bigemina*. *Parasite Immunol. (Oxford)* 16:119–127.
- Tamay, L. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*, Vol. 2. Medigraphic. México.
- Tananyutthawongese, C., Saengsombut, K., Sukhumsirichat, W., Uthaisang, W., Sarataphan, N. y Chansiri, K. (1999). Detection of bovine hemoparasite infection using multiplex polymerase chain reaction. *Science Asia*. 25:85-90.
- Terkawi, M.A., Huyen, N.X., Shinuo, C., Inpankaew, T., Maklon, K., Aboulaila, M., Ueno, A., Goo, Y.K., Yokoyama, N., Jittapalapong, S., Xuan, X. e Igarashi, I. (2011). Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes in the northeast region of Thailand. *Vet. Parasitol.*, 178, pp.201-207.
- Timms, P., Stewart, T.N.P. y De Vos, A.J. (1990). Study of Virulence and Vector Transmission of *Babesia bovis* by Use of Cloned Parasite Lines. *Infection and Immunity* p. 2171-2176.
- Vasco, A. (2013). Estandarización de la técnica de análisis de fusión de alta resolución para la detección de *Babesia* en garrapatas utilizando polimorfismos de nucleótidos. Tesis, Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador. pp.98.
- Vázquez, Z. (2010). Garrapatas que afectan al ganado bovino y enfermedades que transmiten en México. En 1 er. Simposium de salud y Producción de Bovinos de Carne en la Zona Norte-Centro de México. Aguascalientes, Ags.
- Vega, C.A., Buening, G.M., Green, T.J. y Carson, C.A. (1985). *In vitro* cultivation of *Babesia bigemina*. *Am. J. Vet. Res.* 1985; 46:416-420.

- Vega, C.A. (1989). Métodos serológicos para el Diagnóstico y la Investigación de Infecciones por Hemoparásitos. Memorias conferencia: Seminario Internacional CICADEP, Palmira, Valle; Colombia.
- Vieira, M. y Sastre, A. (2007). Differential *Bos taurus* cattle response to *Babesia bovis* infection. *Vet. Parasitol.* 150: 54-64.
- Vizcaíno, O. (1983). La hemoparasitosis: Diagnóstico, epidemiología y control. *Rev. ICA Informa (Colombia)*. 17(2): 12-22.
- Wright, I. y Mahoney, D. (1974). The activation of kallikrein acute *Babesia argentina* infections of splenectomised calves. *Z. Parasitenk*, 43:271-278.
- Young, A.S. y Morzaria, S.P. (1986) Biology of *Babesia*. *Parasitol Today*. 2: 211-219.
- Yokoyama, N., Okamura, M., e Igarashi, I. (2006). Erythrocyte invasion by *Babesia* parasites: current advances in elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage. *Vet. Parasitol.* 138 (1-2): 22-32.
- Zintl, A., Gray, J.S., Skerrett, H.E. y Mulcahy, G. (2005). Possible mechanisms underlying age-related resistance to bovine babesiosis. *Parasite Immunol.* 27: 115–120.
- Zwart, D. y Van den Ende, M.C. (1968). The difference between *B. bigemina* and Dutch strain of *B. major*. *Tijdschr, Diergeneeskd.* 93:126-140.

XIII. ANEXOS

13.1 Anexo 1

Preparación de Solución Amortiguada por Fosfatos (PBS 10x)

Reactivos

Fosfato de sodio monobásico monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$)

Fosfato de sodio difásico anhidrido (Na_2HPO_4)

1. Disolver en 200 ml de agua destilada:

2.62 gramos de $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$

11.5 gramos de Na_2HPO_4
2. Una vez disueltos los reactivos aforar en un matraz a 1,000 ml con agua destilada.
3. Ajustar pH a 7.2

Utilizar Hidróxido de sodio (NaOH) para alcalinizar

Utilizar Ácido clorhídrico (HCL) para acidificar

Preparación de Solución Amortiguada por Fosfatos (PBS 1x)

1. Tomar 100 ml de Solución PBS 10x en un matraz aforado
2. Aforar con agua destilada a 1,000 ml

13.2 Anexo 2

Ensayo Inmunoenzimático Indirecto (iELISA) ovinos y bovinos.

1. Se elaboran diluciones de la proteína recombinante MSA-1 (60ng/pozo) en buffer de carbonatos, para posteriormente colocar 100µl en cada pozo de la placa de ELISA.
2. Colocar una tapa plástica sobre la placa, envolver en papel aluminio y colocar a sensibilizar para permitir la adsorción de la proteína recombinante MSA-1 durante toda la noche a una temperatura de 4°C.
3. Realizar un lavado rápido con solución PBS (pH 7.2) y dos lavados con solución PBS-Tween durante 5 minutos a 150 R.P.M. (Secar vigorosamente después de cada lavado).
4. Bloquear con leche descremada al 3% en solución PBS-Tween e incubar a 37°C, durante 30 minutos. (Repetir paso 3).
5. Realizar diluciones dobles seriadas (1:200) con suero de ovinos, para posteriormente colocar 50µl de cada dilución en los pozos delimitados a su correspondiente dilución y colocar en incubación durante 1 hora a 37°C. (Repetir paso 3).
6. Colocar 50µl de conjugado (anti-IgG de ovino) en cada pozo de la placa, en una dilución 1: 10,000 y colocar la placa en incubación por 30 minutos a temperatura de 37°C. (repetir paso 3). Agregar 50µl de sustrato TMB e incubar a 37°C.
7. Finalmente, la lectura de la placa en un espectrofotómetro (30 y 45 minutos de incubación a 655 nm).

(Se llevó a cabo el procedimiento de la técnica descrita empleando sueros de bovino y conjugado anti-IgG de bovino)

13.3 Anexo 3

Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) ovinos y bovinos.

1. Se emplean laminillas como antígeno congelado el cual se coloca en perlas de sílice para realizar desecación durante 30 minutos a una temperatura de 37°C.
2. Se procede a fijar la laminilla con el antígeno en acetona durante 15 minutos.
3. Se realizan diluciones dobles seriadas (partiendo de una dilución 1:80 continuando hasta obtener una dilución 1:10,240) con los sueros control y problema en solución PBS (Solución Salina Amortiguada por Fosfatos) en pH 7.2.
4. Retirar la laminilla con el antígeno de la acetona y secar para poder delimitar áreas con lápiz graso donde serán colocados los sueros.
5. Colocar 5 µl de las diluciones realizadas con los sueros en las áreas marcadas con lápiz graso en la laminilla y en la penúltima marca solo colocar solución PBS.
6. Colocar la laminilla en cámara húmeda (incubación) durante 30 minutos a una temperatura de 37°C.
7. Al ser retirada la laminilla con el antígeno de la incubación se procede a realizar 3 lavados de la siguiente manera:
 - a) lavado con solución PBS durante 5 minutos.
 - b) lavado con solución PBS durante 5 minutos.
 - c) lavado con agua destilada durante 5 minutos.
8. Se realiza la preparación del conjugado (segundo anticuerpo anti-IgG de ovino y un fluorocromo) a utilizar en una dilución 1:250.
9. Colocar 5 µl de conjugado en cada área delimitada y en la cual se colocaron los sueros problema, al igual en el área donde se coloca solución PBS y última área sin utilizar.

10. Colocar la laminilla nuevamente en incubación (cámara húmeda) por 30 minutos a una temperatura de 37°C.
11. Realizar 3 lavados nuevamente (repetir paso 7).
12. Realizar la lectura en un microscopio de epifluorescencia utilizando glicerina fosfatada con el objetivo 100X.

(Se llevó a cabo el procedimiento de la técnica descrita empleando sueros de bovino y conjugado Alexa fluor 488 anti-IgG de bovino)

13.4 Anexo 4

Tabla 3. Resultados positivos de acuerdo al punto de corte

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.11	0.181	0.13	0.065	0.059	0.081	0.181	0.136	0.178	0.066	0.069	0.063
B	0.415	0.675	0.522	0.099	0.076	0.111	0.609	0.467	0.457	0.078	0.08	0.083
C	0.564	0.55	0.617	0.137	0.07	0.082	0.502	0.495	0.5	0.09	0.078	0.081
D	0.523	0.529	0.603	0.067	0.069	0.083	0.649	0.644	0.501	0.093	0.074	0.082
E	0.51	0.603	0.642	0.115	0.062	0.077	0.527	0.38	0.409	0.086	0.096	0.091
F	0.65	0.653	0.765	0.129	0.103	0.185	0.485	0.435	0.436	0.067	0.087	0.094
G	0.494	0.419	0.459	0.096	0.087	0.101	0.094	0.118	0.079	0.07	0.075	0.079
E	0.124	0.089	0.109	0.077	0.107	0.107	0.088	0.083	0.069	0.067	0.12	0.102
Ovino 199							Ovino 200					

13.4 Anexo 5

Tabla 4. Resultados en técnica de IFI Ovino 199

Ovino 199	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	+	+	+	+	+	-	-
3	+	+	+	+	+	+	-	-
4	+	+	+	+	+	+	+	-
5	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	-

Tabla 5. Resultados en técnica de IFI Ovino 200

Ovino 200	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+	-	-	-
4	+	+	+	+	+	+	-	-
5	+	+	+	+	-	-	-	-
6	+	+	+	+	+	+	-	-