



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

Evaluación serológica de péptidos que contienen epítomos B conservados de la proteína
SBP4 de *Babesia bigemina*

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Licenciado en Medicina Veterinaria y Zootecnia

Presenta

Ricardo Márquez Cervantes

Dirigido por:

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Querétaro, Qro. A 11 de Febrero del 2021.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales



Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia

Evaluación serológica de péptidos que contienen epítomos B conservados de la proteína
SBP4 de *Babesia bigemina*

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Licenciado en Medicina Veterinaria y Zootecnia

Presenta

Ricardo Márquez Cervantes

Dirigido por

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Sinodales

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Director

Firma

Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez

Asesora

Firma

Dr. José Guadalupe Gómez Soto

Asesor

Firma

M. en C. Miguel Mercado-Uriostegui

Asesor

Firma

M. en C. Alma Susana Mejía López

Asesora

Firma

RESUMEN

La babesiosis bovina es una enfermedad ocasionada por parásitos protozoarios del género *Babesia* y que pertenecen al phylum Apicomplexa. En el continente americano, esta enfermedad es transmitida por garrapatas del género *Rhipicephalus* y se considera que su impacto en la ganadería es de gran importancia, ya que las pérdidas que provoca son de casi 10 billones de dólares anuales en todo el mundo, asociadas principalmente a la disminución de producción tanto de leche como de carne en ganado que se encuentra en regiones tropicales y subtropicales. En México las especies con mayor importancia veterinaria son *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*, que presentan signos clínicos como fiebre $>40^{\circ}\text{C}$, anemia, disnea, hemoglobinuria, en algunos casos de ictericia y muerte. El método de diagnóstico más fácil para la detección de la babesiosis es por medio de frotis sanguíneo visto por microscopía. Sin embargo, este método funciona únicamente en la etapa aguda de la enfermedad, y carece de especificidad. Por tal motivo, es necesario tener herramientas de diagnóstico, con una mayor especificidad y sensibilidad, así como un uso constante durante y después del proceso de la enfermedad. El objetivo de este trabajo fue la detección serológica de péptidos que contienen epítomos B conservados de la proteína de cuerpo esférico (SBP4) de *Babesia bigemina* por el método de Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA) indirecta, así como el potencial de este método como diagnóstico para la detección de la babesiosis bovina. Para realizar este trabajo, se utilizaron 4 péptidos de la proteína SBP4: péptido A, péptido B, péptido C y péptido D. Se utilizaron 136 sueros de bovinos de diferentes regiones tropicales y subtropicales de México, en donde la babesiosis bovina es una enfermedad endémica. Dichos sueros fueron previamente diagnosticados por el método de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y los resultados obtenidos en este trabajo fueron comparados por medio de una tabla de contingencia de 2x2. Cada suero fue sometido a los cuatro péptidos de SBP4 por lo que se realizó una tabla de contingencia para cada uno de los 4 péptidos. En las ELISAS se lograron identificar los 4 péptidos de la proteína SBP4 con las cepas de diferentes estados de México de *Babesia bigemina*. Sin embargo, los patrones de identificación no fueron iguales en los 4 péptidos. Para el péptido A, B, C y D se obtuvo una sensibilidad de 94.3%, 91.3%, 94.1% y 94.4%, respectivamente; una especificidad de 94.0%, 68.7%, 92.2% y 100%, respectivamente; una concordancia de 94.1%, 80.1%, 93.4% y 96.3%, respectivamente; un valor predictivo positivo de 96.4%, 75.0%, 95.2% y 100.0%, respectivamente, y un valor predictivo negativo de 90.4%, 88.5%, 90.4% y 90.4%, respectivamente, siendo el péptido D, el más conservado en las diferentes cepas de *B. bigemina*. En este trabajo, se concluye que los péptidos A, C y D, son más conservados en los sueros evaluados que el péptido B de SBP4. Además, se concluye que el Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA) indirecta basada en péptidos de SBP4, es una herramienta útil para el diagnóstico de la babesiosis bovina causada por *Babesia bigemina*.

Palabras clave: *Babesia bigemina*, péptido sintético, ELISA indirecta, SBP4, epítomo B.

SUMMARY

Bovine babesiosis is a tick-borne disease caused by protozoan parasites of the genus *Babesia*, which belong to the phylum Apicomplexa. This disease is transmitted by ticks of the genus *Rhipicephalus* and its impact on livestock is considered to be of great importance, given the losses caused by this protozoan are almost 10 billion dollars per year worldwide, mainly associated to the decrease in both milk and meat production in cattle found in tropical and subtropical regions. In Mexico, the species with major veterinary importance are *Babesia bigemina* and *Babesia bovis*, which present clinical signs as fever, $>40^{\circ}\text{C}$, anemia, breathness, haemoglobinuria, and, in some cases jaundice and eventually death. The easiest diagnostic method for the detection of bovine babesiosis is by blood smears seen by microscopy. The objective of this work was the detection of peptides that contains conserved B-cell epitopes of the spherical body protein 4 (SBP4) of *Babesia bigemina*, which it remains in the development of the parasite infection, within the erythrocyte, by the method of indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), as well as the potential of this method as a diagnostic for the detection of bovine babesiosis. To carry out this work, four conserved peptides of the SBP4 protein were used: peptide A, peptide B, peptide C, and peptide D. 136 bovine from different tropical and subtropical regions of Mexico were collected and used, where bovine babesiosis is an endemic disease. This sera were previously diagnosed by Indirect Immunofluorescence Assay method (IFAT) and the results obtained on this work were compared in a 2x2 contingency table. Each sera was submitted to the four peptides of SBP4, therefore, a contingency table was made for each of the four peptides. In the ELISAs, the four peptides of the SBP4 protein were identified with the different strains of *Babesia bigemina* in sera collected from different states of Mexico. However, the identification patterns were not the same between the four peptides. For peptide A, B, C and D, the sensitive obtained were 94.3%, 91.3%, 94.1% and 94.4%, respectively; a specificity of 94.0%, 68.7%, 92.2%, and 100%, respectively; a concordance of 94.1%, 80.1%, 93.4% and 96.3%, respectively; a positive predictive value of 96.4%, 75.0%, 95.2% and 100.0%, respectively, and a negative predictive value of 90.4%, 88.5%, 90.4% and 90.4%, respectively, being peptide D as the most conserved in the different strains of *B. bigemina*. In this work, it is concluded that peptides A, C, and D are strongly conserved, unlike peptide B of SBP4. Furthermore, it is concluded that the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) is a useful tool for the diagnosis of bovine babesiosis caused by *Babesia bigemina*.

DEDICATORIAS

A mi madre, por el amor y el apoyo a manos llenas en todo momento y ser el motor de mis logros, pues sin su valentía y fuerza, llegar hasta aquí sería imposible.

A mi padre, por el apoyo, el cariño, por los valores necesarios para lograr mis metas.

A mis hermanas, por el apoyo, el amor y la comprensión incondicional.

A mi abuela Estela, por todo su amor, su cariño y su apoyo.

A mi abuelo Esteban, que no pudo presenciar este momento, pero lo llevo siempre en el corazón.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Querétaro, por formarme académica y personalmente, y darme las herramientas para llegar hasta este punto y poder lograr esto.

Al doctor Juan Joel Mosqueda, por creer en mí y darme siempre la oportunidad de aprender algo nuevo.

Al MCBM Miguel Ángel Mercado Uriostegui por darme el tiempo y el apoyo necesario para hacer este trabajo.

A Alma Susana Mejía López, por apoyarme durante este proceso.

Al Laboratorio de Inmunología y Vacunas de la Universidad Autónoma de Querétaro, por prestarme sus instalaciones y proporcionarme el material necesario para lograr este trabajo.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

ÍNDICE

RESUMEN.....	i
SUMMARY.....	ii
DEDICATORIAS.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	2
2. 1. 1 Definición.....	2
2. 1. 2 Taxonomía.....	2
2. 1. 3 Patogenia	2
2. 1. 4 Signos clínicos.....	3
2. 1. 5 Distribución.....	4
2. 1. 6 Impacto económico.....	5
2. 1. 7 Tratamiento.....	6
2.2 <i>Babesia bigemina</i>	7
2. 2. 1 Vector.....	7
2. 2. 2 Ciclo de vida.....	7
2. 2. 3 Transmisión.....	9
2. 2. 4 Diagnóstico serológico.....	9
2. 2. 4. 1 Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).....	9
2. 2. 4. 2 Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA).....	9
2. 3 La proteína de los cuerpos esféricos 4 (SBP4).....	10
III. HIPÓTESIS.....	10
IV. OBJETIVOS.....	10
4. 1 Objetivo general.....	10
4. 2 Objetivos específicos.....	10
V. METODOLOGÍA Y RESULTADOS.....	11
5. 1 Metodología.....	11
5. 2 Resultados.....	12
VI. DISCUSIÓN.....	17

VII. CONCLUSIONES.....	19
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	19
IX. APÉNDICES.....	23
9.1 Reactivos.....	23
9.2 Material.....	23
9.3 Equipos.....	24
9.4 Soluciones.....	24

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución mundial de la Babesiosis bovina en el 2015.....	4
Figura 2. Situación actual de la campaña nacional para el control de la garrapata <i>Boophilus spp.</i>	5
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Babesia bigemina</i>	8

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados de sueros con el método de Inmunofluorescencia indirecta.....	13
Tabla 2. Evaluación de sueros de campo por ELISA indirecta con péptido A de SBP4 de <i>B. bigemina</i>	13
Tabla 3. Evaluación de sueros de campo por ELISA indirecta con péptido B de SBP4 de <i>B. bigemina</i>	14
Tabla 4. Evaluación de sueros de campo por ELISA indirecta con péptido C de SBP4 de <i>B. bigemina</i>	15
Tabla 5. Evaluación de sueros de campo por ELISA indirecta con péptido D de SBP4 de <i>B. bigemina</i>	16
Tabla 6. Parámetros a evaluar en la tabla de concordancia.....	16
Tabla 7. Valores de concordancia de 2x2 y contingencia de ELISA indirecta basada en péptidos comparada con IFI.....	17

I. INTRODUCCIÓN

La babesiosis bovina es causada por protozoarios intraeritrocíticos del género *Babesia*, que infecta una gran cantidad de animales tanto domésticos como salvajes y ocasionalmente al humano. Esta enfermedad es transmitida por la garrapata y su distribución es mundial (Bock *et al*, 2004). Existen dos especies de *Babesia* que representan el mayor impacto económico: *Babesia bigemina* y *Babesia bovis* y ambas son endémicas de México. El cuadro clínico que presenta esta enfermedad consta de fiebre, debilidad, ataxia, anemia y hemoglobinuria (Lew *et al*, 2005). En casos agudos de la enfermedad, la signología clínica tarda de 3 a 7 días, presentando principalmente fiebre $>40^{\circ}\text{C}$, seguido de inapetencia, depresión, incremento en la frecuencia respiratoria, debilidad y dificultad para moverse. En hembras gestantes, la fiebre puede ocasionar abortos y en machos se ha demostrado que reduce la fertilidad. En casos prolongados se pueden desarrollar signos como ictericia y anemia (Bock *et al*, 2004).

En México, el vector principal es la garrapata del género *Rhipicephalus microplus*, que se encuentra distribuida en las regiones tropicales y subtropicales, la cual puede transmitir *B. bovis* y *B. bigemina* (Rojas *et al*, 2018). Cuando se incrementa ampliamente la distribución de *R. microplus* en áreas donde no es endémica, ocurrirá en brotes esporádicos o frecuentes, con un grado diverso de morbilidad y mortalidad, esto dependiendo de la inmunidad o resistencia previa a hemoparásitos por parte de la población expuesta al vector (Benavides, 2016).

Esta enfermedad se describe de forma detallada en el listado 2015 de enfermedades de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Clínicamente se expresan en su forma aguda por fiebre y anemia, con efectos complementarios, como bajo consumo de alimentos, baja en producción de leche, pérdida de peso, y riesgo de muerte de animales, entre otros. (Benavides, 2016).

Se estima que las pérdidas económicas por la babesiosis en ganado bovino son aproximadamente de \$13.9 y \$18.7 mil millones de dólares anuales en todo el mundo (de Castro, 1997). El costo de la babesiosis bovina está relacionado con mortalidades, abortos, disminución de la producción de carne y leche, medidas de control (tratamiento de la enfermedad, acaricidas y vacunas), así como pérdida del potencial de producción y restricciones comerciales (Schnittger *et al.*, 2012).

El género *Babesia* pertenece al phylum Apicomplexa, un linaje de ramificación reciente, que se caracteriza por la presencia de un complejo apical (Chauvin *et al*, 2009) compuesto por organelos denominados roptrías, micronemas y gránulos densos que se encuentran involucrados en la invasión de las células huésped y un citoesqueleto único, que lo distingue de otros organismos eucariotas. Las etapas de infección de la mayoría de los protozoarios pertenecientes al phylum ya mencionado, tienen la capacidad de migrar por barreras biológicas del huésped para poder invadir las células (Soldati *et al*, 2004).

El diagnóstico de la babesiosis bovina es una herramienta importante para la prevención y control de la enfermedad. Durante la fase aguda es posible detectar eritrocitos infectados por microscopía, dado que el número de protozoarios aumenta considerablemente, mientras que, en un cuadro crónico, en donde ocurre la forma subclínica de la enfermedad, se necesitan métodos de diagnóstico más precisos y sofisticados (Mosqueda *et al*, 2012).

Los protozoarios apicomplexos utilizan múltiples moléculas durante el proceso de invasión del eritrocito. Durante el proceso, algunas moléculas que revisten los merozoitos actúan como factores de reconocimiento, mientras las roptrías y los micronemas secretan moléculas ordenadamente para crear uniones al eritrocito y finalizar con la invasión de la célula huésped (Yokoyama *et al*, 2006).

El método que se utiliza para la identificación de la babesiosis en animales infectados es mediante el examen microscópico de frotis sanguíneo teñidos con tinción de Giemsa al 10%.

Este método es de gran utilidad para la diferenciación de especies de *Babesia*, basados principalmente en la morfología de *B. bovis* y *B. bigemina* (OIE, 2014).

II. ANTECEDENTES

2.1.1 Definición.

Babesia es un protozooario hemoparásito de importancia económica y veterinaria, además de tener un impacto global. Es considerado como el segundo parásito más encontrado en sangre de mamíferos, después de *Trypanosoma sp.*, y ha sido descrito que puede infectar a aves. En el huésped vertebrado se reproduce asexualmente en los eritrocitos y en la etapa sexual de su ciclo de vida toma lugar en la garrapata, siendo la garrapata del género *Rhipicephalus* como vector principal de la babesiosis bovina (Smith *et al*, 1893; Schnittger *et al*, 2012).

Esta enfermedad también es conocida como piroplasmosis, Fiebre del Ganado por Garrapatas, Fiebre del agua roja o Fiebre de Texas (Onoja *et al*, 2013). *Babesia bigemina* se ha reportado con una mayor prevalencia y causante de la enfermedad con mayor impacto económico (Esmailnejad *et al*, 2018).

2. 1.2 Taxonomía.

El género *Babesia* pertenece al phylum Apicomplexa (Yokoyama *et al*, 2006). Desde el descubrimiento de este género a finales del siglo XIX, se han descrito diferentes especies que afectan tanto a animales domésticos como salvajes. La descripción y clasificación de *Babesia sp.* se basaron principalmente en sus características morfológicas, además de un notable patrón de ensamblaje a los eritrocitos por parte de los merozoitos. Este género fue definido de acuerdo a su sitio de replicación en el huésped vertebrado y su modo de transmisión dentro de la garrapata (Chauvin *et al*, 2009).

La clasificación taxonómica de *Babesia* es:

Dominio: Eucariota

Supergrupo: SAR

Reino: Alveolata

Filo: Apicomplexa

Clase: Aconoidasida

Orden: Piroplasmida

Familia: *Babesiidae*

Género: *Babesia*

Especie: *bigemina, bovis* (Levine, 1982).

2.1.3 Patogenia.

Babesia bigemina genera un cuadro de enfermedad agudo por dos mecanismos: por hemólisis y alteración de la circulación sanguínea, provocando daño endotelial, causando vasodilatación, permeabilidad capilar, desórdenes de coagulación, edema pulmonar y disfunción cerebral. Durante la mordida de la garrapata en el bovino, se inyectan los esporozoitos e infectan a los eritrocitos (Bock *et al*, 2004; Wright *et al*, 1989; Demessie *et*

al, 2015). En la primera etapa de invasión intraeritrocítica, los parásitos de *Babesia* utilizan moléculas de superficie de manera ordenada para ser atraídos hacia el eritrocito. En *B. bovis*, los merozoitos poseen al menos 5 glicoproteínas de superficie que pertenecen a una familia de antígenos variables de superficie del merozoito (VMSA, por sus siglas en inglés) que se encargan de la infección de los eritrocitos (Yokoyama *et al*, 2006). Una vez infectados, se desarrollan piroplasmas dentro del eritrocito, resultando en dos, y en ocasiones hasta cuatro merozoitos que destruyen al eritrocito al salir e infectar a otros, provocando así una hemólisis intravascular y extravascular. Esta replicación masiva del protozoario produce una rápida destrucción de eritrocitos, haciendo presente la hemoglobinuria y fiebre en los animales infectados (Demessie *et al*, 2015).

En casos agudos, la máxima parasitemia en sangre es menor al 1% en *B. bovis*, mientras que en infecciones ocasionadas por *B. bigemina* las parasitemias pueden ser del 10 hasta el 30% (OIE, 2014). Cuando la enfermedad transcurre a casos severos, cuando ocurre el secuestro de eritrocitos infectados por parte de los capilares del cerebro y pulmones, resultan en una parasitemia periférica, babesiosis cerebral y síndrome respiratorio asociado a una infiltración masiva de neutrófilos a los capilares pulmonares provocando permeabilidad vascular y posteriormente edema (Brown *et al*, 1999).

En casos que no presentaron mayor gravedad, los animales logran recuperar su condición por varias semanas. Sin embargo, la recuperación es completa y se consideran asintomáticos por algunos años subsecuentes a la infección (Callow, 1984; Mahoney, 1969). Johnston *et al*, 1978 menciona que los animales infectados con *B. bigemina* en zonas endémicas de la enfermedad, pueden ser portadores asintomáticos por 2 años. Los animales que logran recuperarse tras una infección aguda por *B. bigemina* o *B. bovis*, tanto de forma natural como después de un tratamiento terapéutico, estos permanecen persistentemente infectados y resistentes a una próxima enfermedad por una reinfección con la misma especie (Brown *et al*, 1999).

2.1.4 Signos Clínicos.

Los signos clínicos varían según la edad del animal. La mayoría de los casos con signología se observan en los animales adultos (CFSPH, 2008). El grado de severidad de la infección dependerá de la edad del animal, factores genéticos, estado inmunitario e incluso con infecciones que hayan presentado anteriormente (Schnittger *et al*, 2012). Los animales afectados sufren de un aumento muy elevado de temperatura corporal, pérdida del apetito, cese de rumia, dificultad para respirar, emaciación, diversos niveles de ictericia (dependiendo de la parasitemia que se presente) con las mucosas conjuntival y vaginal amarillenta y en ocasiones presentan coloración blanquecina (Demessie *et al*, 2015).

Generalmente *B. bovis* es más patógeno que *B. bigemina* y *Babesia divergens*. Las infecciones se caracterizan por fiebre alta, ataxia, anorexia, y en ocasiones síntomas nerviosos por el secuestro de eritrocitos infectados en los capilares cerebrales (OIE, 2014). Las infecciones de *Babesia bigemina* son presentadas como infecciones agudas y están relacionadas a la destrucción masiva de eritrocitos. Uno de los signos clínicos más representativos de *B. bigemina* es la hemoglobinuria. En algunos casos en donde la presentación de la enfermedad se vuelve crónica y existe una mayor pérdida de eritrocitos se puede observar fiebre, anemia severa, ictericia y la posterior muerte del animal (Bock *et al*, 2004). En contraste, las infecciones causadas por *B. bovis* resultan en una alta mortalidad entre la población y genera un cuadro con mayor virulencia que incluye fiebre, anemia, anorexia, caquexia y síndrome de choque hipotenso (Brown *et al*, 1999).

2.1.5 Distribución.

La distribución geográfica de la babesiosis causada por *B. bigemina* y *B. bovis* se centra en áreas que proveen condiciones ecológicas favorables para la multiplicación de garrapatas principalmente en áreas tropicales y subtropicales (Benavides, 2012). Aunque la babesiosis bovina es transmitida por varias especies de garrapata, *Rhipicephalus microplus* es la garrapata más ampliamente distribuida.

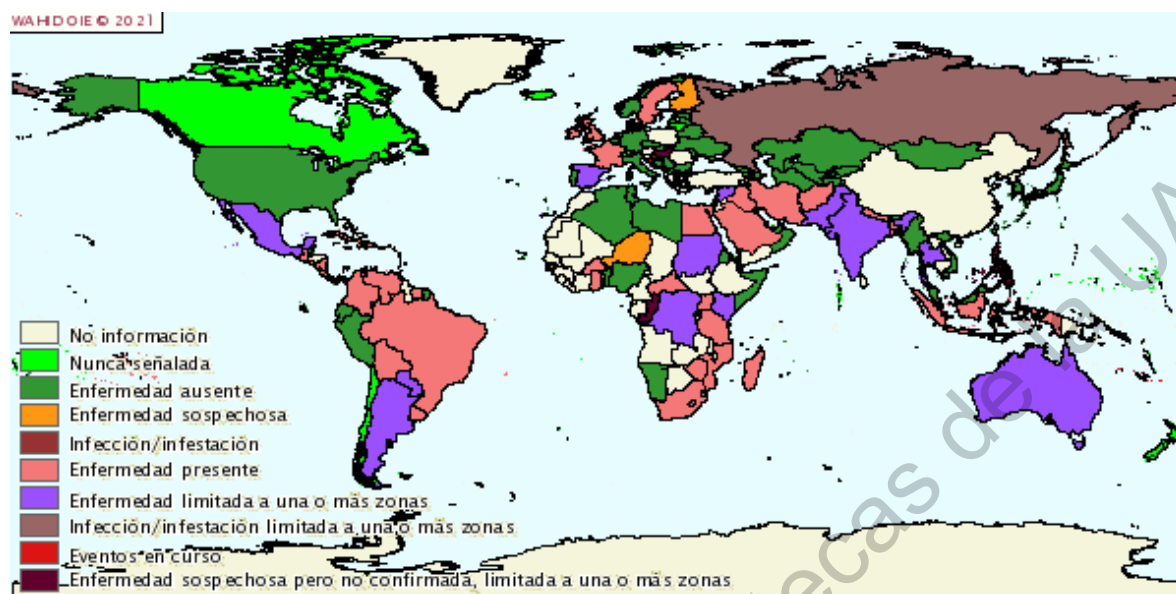


Figura 1. Distribución mundial de la babesiosis bovina en 2019. (OIE, 2019).

B. bovis y *B. bigemina* son particularmente importantes en Asia, África, América Central y del Sur, partes del Sur de Europa y Australia. Aunque *B. bovis* se encuentra con frecuencia en la misma zona geográfica que *B. bigemina*, hay especies de garrapatas levemente diferentes que transmiten estas 2 especies y presentan algunas diferencias en su distribución. Por ejemplo, *B. bigemina* está más distribuida que *B. bovis* en África. *B. bigemina* y *B. bovis* y sus vectores que anteriormente eran enzoóticos en gran parte del sur de EEUU (CFSPH, 2008). De acuerdo con el Sistema Mundial de Información Sanitaria de la OIE (WAHIS 2015), la babesiosis bovina no se encuentra en Chile, y ha estado ausente en Belice, desde el 2013. En Canadá no están presentes las garrapatas consideradas como vectores de este organismo; además, en la región sur de los Estados Unidos, desde 1943 se instituyó una campaña de erradicación de garrapatas (Graham y Hourrigan, 1977), por lo que este país se considera libre de babesiosis con algunas reintroducciones accidentales para las que existe un programa de vigilancia (Lohmeyer *et al*, 2011; Pérez de León *et al*, 2010). Asimismo, se encuentra restringida a ciertas áreas subtropicales y a las regiones tropicales de México (Benavides, 2016).

Según la NOM-019-ZOO-1994 “Campaña Nacional Contra La Garrapata *Boophilus spp.*” los estados de Sonora, Chihuahua, Baja California Norte y Aguascalientes se encuentran en estado libre de la presencia de la garrapata, gracias a las medidas de control y eliminación estipuladas por dicha norma (Almazán *et al*, 2018; SENASICA 2020).



Figura 2. Situación actual de la campaña nacional para el control de la garrapata *Boophilus spp.* Fuente: SENASICA, 2020.

2.1.6 Impacto Económico.

La babesiosis bovina es considerada como la enfermedad transmitida por vectores más importante en la producción bovina en zonas como Australia, África, al centro y sur del continente americano, así como Estados Unidos considerado con un riesgo latente. (Bock *et al.*, 2004). Considerando que el 80% de la población del ganado se encuentra en zonas endémicas de la enfermedad, el costo global de dicha enfermedad oscila entre 13.9 y 18.7 mil millones de dólares al año (FAO/ OIE/ WHO, 1994; Snelson, 1975). El costo de la babesiosis bovina está relacionado con mortalidades, abortos, disminución de la producción de carne y leche, medidas de control (tratamiento de la enfermedad, acaricidas y vacunas), así como pérdida del potencial de producción y restricciones comerciales. Además, es también un obstáculo para el mejoramiento genético del ganado bovino presente en zonas endémicas de la enfermedad, ya que limita la introducción de ganado genéticamente superior que es susceptible a la misma (Schnittger *et al.*, 2012).

El impacto económico está fuertemente ligado a la epidemiología de la enfermedad y se puede distribuir en pérdidas directas e indirectas (Benavides, 2016).

Las pérdidas directas son proporcionales a la ocurrencia de enfermedad, que está asociada con la introducción o incremento de la población de garrapatas y con la proporción de animales parasitados que desarrollen enfermedad; es decir, con el escenario epidemiológico en el cual se ubique la población animal (Benavides, 2016).

Por otro lado, el impacto económico indirecto proviene del costo del tratamiento para casos clínicos, principalmente por los gastos incurridos en el control de las garrapatas y otros vectores, haciendo especial énfasis en acaricidas. Complementariamente, el impacto económico indirecto puede estar asociado con limitaciones para emplear razas de mayor productividad en zonas endémicas, restricciones comerciales de animales entre zonas y países, residuos de acaricidas en productos de origen animal (leche y carne), entre otros (Benavides, 2016).

Al menos 1.3 billones de animales domésticos están en riesgo de ser infectados, y la mayoría de la población mundial bovina estimada está potencialmente expuesta a uno o más especies de *Babesia* sp. *B. bovis* y *B. bigemina* se presentan en áreas tropicales y subtropicales del mundo, y su patrón de distribución está limitado a la presencia de su vector *Boophilus microplus* (Solorio *et al*, 1997).

2.1.7 Tratamiento

En el pasado, el tratamiento de la babesiosis bovina era menos importante que la erradicación de la enfermedad, principalmente en países en donde el objetivo era erradicar al vector *Boophilus microplus*. Sin embargo, la quimioterapia ha tenido gran importancia para el control y prevención de la babesiosis. El éxito del tratamiento depende de un diagnóstico rápido y la pronta administración de los medicamentos. Existe un gran número de medicamentos que han demostrado ser efectivos ante la babesiosis bovina. Adicionalmente, la terapia de soporte como transfusiones sanguíneas, antiinflamatorios, vitaminas del complejo B podrían ser necesarios en casos severos (Mosqueda *et al*, 2012).

Imidocarb es un derivado del carbanilido con actividad antiprotozoa. Usualmente es administrado como dipropionato de sal o dihidroclorido de sal. Su modo de acción de está completamente definido, sin embargo, se han propuesto dos mecanismos: la interferencia con la producción o el uso de poliaminas, o la restricción de entrada de inositol al eritrocito infectado, produciendo inanición del parásito. Es el principal babesiacida administrado en animales, el único medicamento elimina a los parásitos del huésped y ha sido utilizado para el tratamiento y prevención de la babesiosis bovina. Imidocarb es efectivo contra *B. bigemina*, *B. bovis* *B. divergens* y *B. caballi* (Mosqueda *et al*, 2012).

El aceturato de diminazona está indicado para la tripanosomiasis y la babesiosis bovina en animales domésticos únicamente como agente terapéutico, dado que se excreta rápidamente y por consiguiente tiene una actividad profiláctica reducida. Sin embargo, en algunas dosis en específico se ha demostrado que tiene actividad protectora contra *B. bovis* 14 días postratamiento (Peregrine, 1993). Por otro lado, Mosqueda *et al*, 2012 menciona que el aceturato de diminazona es más efectivo contra *B. bigemina* en comparación con *B. bovis* y *B. divergens*. Kuttler *et al*, 1986, a su vez, menciona que el aceturato es inefectivo para el tratamiento de la infección contra *B. bigemina* administrando durante 54 días posinfección.

El aceturato de diminazona se une con la doble cadena de DNA en el surco entre las cadenas complementarias, específicamente tiene predilección por los sitios ricos en pares de bases adenina-timina. El tipo de unión de este compuesto y el DNA tiene una alta afinidad por el DNA kenoplástido, el cual inhiben la replicación y función del kinetoplástido (Mosqueda *et al*, 2012).

El triclosán es un compuesto clorinato aromático que tiene un gran espectro antimicrobiano. Los protozoarios requieren de lípidos del huésped para producir su membrana celular durante la replicación celular. Inhibiendo la habilidad de sintetizar la membrana evita que aumente la superficie del parásito, deteniendo así la proliferación celular y la progresión de la enfermedad. Se ha demostrado que el crecimiento de *B. bovis* y *B. bigemina* fue inhibido a una concentración de 100µl/ml de triclosán. Adicionalmente, el triclosán logra prevenir el recrecimiento en todas las etapas del protozoario. No se ha reportado toxicidad a las células del huésped. Sin embargo, el modo de acción del triclosán contra *Babesia* no se ha descrito aún; el efecto inhibitorio radica en el sistema de ácidos grasos. Estudios de secuencias genéticas indican que en *B. bovis*, la síntesis de ácidos grasos no está en el apicoblasto (Mosqueda *et al*, 2012).

El nerolidol es un sesquiterpeno que se encuentra en aceites esenciales de una gran variedad de plantas. Es un saborizante de alimentos aprobado por FDA (Food and Drug Administration) por sus siglas en inglés. En estudios *in vitro* se ha demostrado que el

nerolidol es capaz de inhibir el crecimiento de *B. bovis* y *B. bigemina* a 10 μm . El crecimiento del protozooario se reduce a 50 μm con *B. bigemina* y a 75 μm con *B. bovis*, aunque aún se desconoce el mecanismo de acción de este fármaco (Mosqueda *et al*, 2012).

La epoxomicina es un inhibidor de proteosomas. Su manera de actuar es inhibiendo la actividad de subunidades proteosomales como la quimotripsina y la tripsina. Este efecto provoca la muerte celular, ya que se acumula una gran cantidad de proteínas ubiquitinadas en el citoplasma (AbouLaila *et al*, 2010). Estudios *in vitro* han demostrado que en tratamientos con dosis de 5 nM de epoxomicina inhibe significativamente el crecimiento de *B. bigemina* y 10 nM para *B. bovis*. AbouLaila *et al*, 2010, menciona que en una combinación de epoxomicina y aceturato de diminazona existe una mejora en la eliminación de *B. bovis* y *B. bigemina*, con una erradicación completa del protozooario a los 4 días postratamiento (AbouLaila *et al*, 2010).

2.2 *Babesia bigemina*

2.2.1. Vector.

El vector principal de *Babesia bigemina* y *Babesia bovis* es *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Esta se alimenta del Ganado bovino y pequeños ruminantes y es considerado como huésped específico o especialista de *Babesia*. También son considerados como vectores otros géneros como *Ixodes Ricinus* (los cuales se alimentan de bovinos y otros ruminantes) son huéspedes específicos. Una minoría incluye a *Ixodes Ricinus*, que es vector de *B. divergens*, es oportunista y poco selectivo, por lo que utiliza una gran variedad de vertebrados como huéspedes (Chauvin *et al*, 2009).

2.2.2. Ciclo de vida.

Los huéspedes vertebrados son infectados al momento de la mordida de la garrapata. En la saliva se encuentran los esporozoitos que penetran a los eritrocitos con la ayuda de un complejo apical especializado (Bock *et al*, 2004). En el eritrocito es donde se llevarán a cabo todas las fases asexuales del parásito. El agente produce dos merozoitos por fisión binaria. Posteriormente a la destrucción del eritrocito, los merozoitos infectan a otros eritrocitos y este proceso es conocido como merogonia (Chauvin *et al*, 2009).

Cuando los eritrocitos infectados son ingeridos por las garrapatas, la mayoría de los pre-gametocitos son destruidos y solo una pequeña proporción sobrevive para dar paso a la siguiente fase en donde se convierten en gametocitos (Chauvin *et al*, 2009). Los cambios que se generan durante el paso por el tracto intestinal de la garrapata dan paso al desarrollo de cuerpos radiados o conocidos como *Strahlenkörper* a partir de los gametocitos. Estos cuerpos radiados sufren una serie de cambios hasta en donde pasan de ser multinucleados a ser haploides (gametos) y se fusionan en pares para dar paso a una célula esférica conocida como cigoto (Bock *et al*, 2004).

Estos cigotos presentan un organelo en la punta con forma de espiga o flecha para facilitar la penetración celular. Una vez dentro, la espiga toca la membrana celular del intestino, la cual invagina alrededor de la espiga al contacto. No se genera ninguna membrana parasitófora, mientras que la membrana celular intestinal aparenta estar lisada una vez que entra la espiga debido a las enzimas que son liberadas por el parásito (Chauvin *et al*, 2009).

Una vez que el cigoto del parásito se encuentra adentro, el organelo con forma de espiga se desintegra y el cigoto pasa a una etapa móvil denominada ooquiste. La meiosis indica el inicio de la esporogonia en el ciclo de vida de los parásitos del género Apicomplexa, y es aquí donde probablemente inicia, ya que en esta etapa el ooquiste es haploide. El ooquiste sale del intestino hacia la hemolinfa y comienza a invadir distintos tejidos de la garrapata, uno de ellos son los ovarios, en donde se infectan los huevos de las garrapatas hembras

denominada como transmisión transovárica. En el posterior desarrollo de *Babesia sp.* se inicia la etapa asexual y la producción de una gran cantidad de esporoquinetos. La esporogonia toma lugar en todos los estadios de la garrapata, desde la eclosión del huevo hasta la etapa adulta y esta misma se transmite a la siguiente generación de la garrapata. Esta transmisión es conocida como transestadial (Chauvin *et al.*, 2009).

Otro de los tejidos que es invadido en la garrapata son las glándulas salivales. Los quinetos entran a etapas multinucleadas conocida como esporogonia y posteriormente se transforman en los esporozoitos, etapa en donde son capaces de infectar a los mamíferos (Bock *et al.*, 2004).

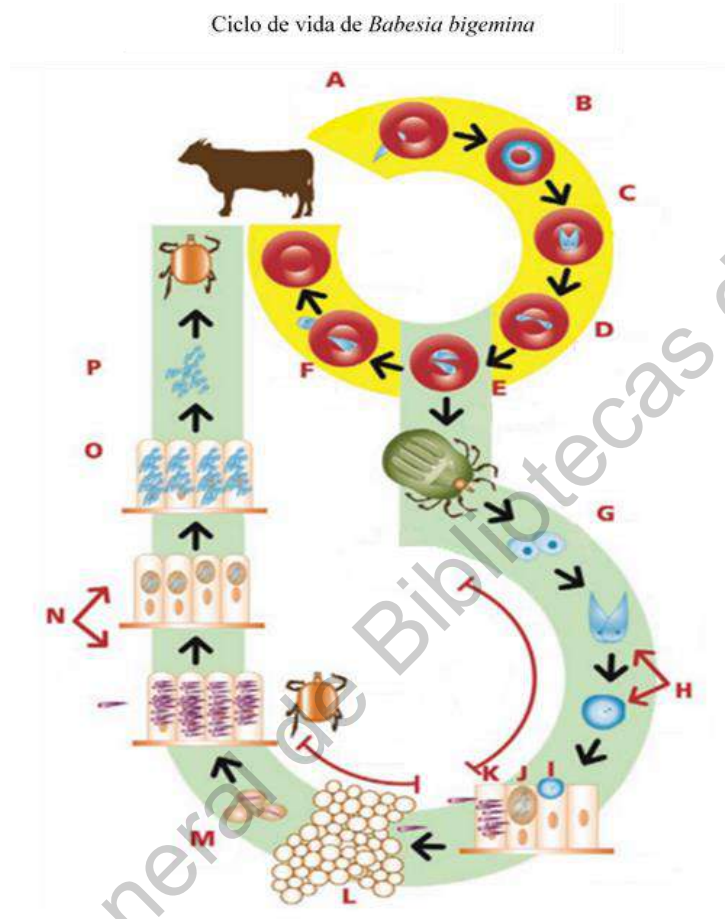


Figura 3. Ciclo de vida de *Babesia bigemina*. A) Esporozoitos invaden un eritrocito y se transforma en un trofozoito. B) Trofozoito en forma de anillo. C) Mediante fisión binaria, de cada trofozoito dos merozoitos son formados. D) Los merozoitos se encuentran inicialmente unidos semejando un par de peras en un ángulo agudo. E) Los merozoitos maduros se separan antes de salir del eritrocito. F) Los merozoitos son liberados del eritrocito. Algunos volverán a infectar eritrocitos para formar nuevos trofozoitos, mientras que otros serán consumidos por una garrapata para continuar con su ciclo de vida en el invertebrado. G) Estadios sexuales son liberados de los eritrocitos y se transforman en gametocitos. H) Los gametocitos se diferencian en gametos hembras y machos que forman un cigoto después de su fusión. I) El cigoto se desarrolla en su forma infectiva para ingresar a las células intestinales de la garrapata. J) Cuerpos de fisión son formados que se transforman después en quinetos móviles. K) Los quinetos destruyen la célula intestinal, escapan a la hemolinfa y se esparcen en diferentes tejidos, incluyendo los ovarios. L) En los ovarios, células embrionarias son infectadas por los quinetos (transmisión transovárica). M) Cuando una garrapata ovoposita, los embriones ya se encuentran infectados. N) Larvas recién eclosionadas se unen a un bovino para alimentarse, los quinetos migran a las glándulas salivales de la garrapata y forman un esporoblasto. O) Miles de esporozoitos se liberan de un solo esporoblasto. P) Larvas de garrapata se alimentan del bovino, liberando esporozoitos al torrente sanguíneo del animal. Traducido y modificado de Mosqueda *et al.*, (2012).

2.2.3 Transmisión.

La prevalencia de *B. bovis* y *B. bigemina* en los países afectados está estrechamente asociada a la presencia de la garrapata *Rhipicephalus microplus*, la cual es la principal vía de transmisión al ganado y otras especies (Chung *et al*, 2017).

2.2.4. Diagnóstico Serológico.

2.2.4.1 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

El método de inmunofluorescencia indirecta (IFI) es la prueba más ampliamente utilizada para la detección de anticuerpos frente a *B. bovis* y *B. divergens* (OIE, 2014). Esta prueba consiste en una combinación de una alta sensibilidad de microscopía fluorescente con la especificidad asociada a los métodos inmunológicos. Existe una gran ventaja en la producción de antígeno *in vitro* a partir de varias cepas de *Babesia sp.*, así como *B. bovis*, *B. bigemina* y *B. divergens*. Sin embargo, la reacción cruzada que existe entre *B. bovis* y *B. bigemina* provoca una desventaja para el diagnóstico específico del agente. Los resultados de esta técnica pueden llegar a ser subjetivos, ya que están ligados al dictamen del operador. La inmunofluorescencia indirecta provee una alta sensibilidad, aunque, por otro lado, su especificidad reducida lo hace poco utilizado en laboratorios (Álvarez *et al*, 2019).

2. 2. 4. 2 Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA)

Este procedimiento es capaz de detectar anticuerpos específicos en animales infectados y se ha utilizado para investigaciones epidemiológicas (Qin *et al*, 2015). Con este método se permite la cuantificación de la reacción antígeno-anticuerpo a través de un cambio de color, demostrando la presencia y la concentración de anticuerpos en los sueros de los animales (Aydin, 2015). La ELISA se divide en diferentes categorías, dependiendo de la manera en que se inmoviliza y se detecta el antígeno (Shah *et al*, 2016).

En las ELISAS indirectas, el antígeno específico a analizar, debe adherir a los pocillos de las placas de microtitulación, seguido de una solución proteica que no reaccione para bloquear cualquier área de los pocillos no recubierta con el antígeno. El anticuerpo primario, el cual se une específicamente al antígeno es agregado, seguido de un anticuerpo secundario conjugado a una enzima. Posteriormente se agrega un sustrato para que la enzima pueda cuantificar el anticuerpo primario a través de un cambio de color. La concentración de un anticuerpo primario presente en el suero se correlaciona directamente con la intensidad del color de la muestra (Gan *et al*, 2013).

Una gran cantidad de análisis serológicos se han realizado exitosamente para la detección de anticuerpos anti-*Babesia* con este método, y es distinguido porque está menos ligado al error del operador y se adapta para el uso en campo. Sin embargo, una desventaja es la presencia de reacciones falsas positivas con sueros negativos (El-Ghaysh *et al*, 1996). Por otro lado, Sivakumar *et al*, 2017 menciona que el método ELISA basado en formas recombinantes para la detección serológica de RAP-1 de *B. bigemina* y *B. bovis* fue útil, aunque de manera simultánea, en el mismo estudio se utilizó la detección de RAP-1 por el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), menciona que de 16 muestras positivas por PCR, 12 muestras fueron positivas a ELISA.

2.3 La Proteína de los cuerpos esféricos 4 SBP4.

Las proteínas de los cuerpos esféricos son proteínas secretadas por los organelos presentes en el complejo apical de *Babesia sp.* denominados cuerpos esféricos. Estas proteínas están asociadas en la internalización, formación y disolución de la vacuola parasitófora, además de la viabilidad del parásito una vez que ha invadido el eritrocito. Se han encontrado únicamente 4 proteínas en *B. bovis*: SBP1, SBP2, SBP3 y SBP4 (Yokoyama *et al.*, 2006; Gohil *et al.*, 2010). Por otro lado, Terkawi *et al.*, 2011, menciona que estas proteínas también tienen funciones en el crecimiento del parásito, llevando a cabo las condiciones favorables para la supervivencia del parásito.

Recientemente, solo se han encontrado de anticuerpos específicos para *B. bovis* y *B. bigemina*, de los cuales muchos se descubrieron a finales de la última década. Entre estos anticuerpos se encuentran aquellos que han detectado las proteínas SBP1, SBP2, SBP3 y más recientemente se han encontrado anticuerpos contra SBP4 (Gohil *et al.*, 2010).

SBP4 es una proteína caracterizada en *B. bovis* y que tiene homología con una proteína identificada en *B. bigemina*. Carece de homología con proteínas de otros protozoarios del género Apicomplexa. Se ha demostrado que la secuencia genética de SBP4 es conservada en países como Estados Unidos, Brasil, Mongolia, Tailandia y Sudáfrica (Terkawi *et al.*, 2011). Considerablemente, hoy en día, las proteínas de los cuerpos esféricos son un gran candidato para el desarrollo de vacunas o como antígenos para el diagnóstico de la babesiosis bovina. En estudios realizados *in vitro* se demostró que SBP4 se encuentra dentro del citoplasma de los eritrocitos, en las etapas de desarrollo y división del protozoario, demostrando que las funciones de esta proteína no están involucradas en la invasión, sino en el crecimiento y desarrollo del protozoario (Terkawi *et al.*, 2011).

III. HIPÓTESIS

SBP4 contiene epítomos B conservados que son reconocidos por sueros de bovinos infectados naturalmente por *Babesia bigemina*.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general.

Evaluar serológicamente péptidos que contienen epítomos B conservados de SBP4 de *Babesia bigemina*.

4.2 Objetivos específicos.

4.2.1 Determinar el reconocimiento de 4 péptidos de SBP4 conteniendo epítomos B conservados por sueros de bovinos infectados naturalmente mediante ELISA indirecta.

4.2.2 Determinar sensibilidad, especificidad analítica y la concordancia con la prueba de oro.

V. METODOLOGÍA Y RESULTADOS

5.1 Metodología

Se utilizaron 4 péptidos sintéticos (A, B, C y D) de SBP4. El péptido A, de 20 aminoácidos (AAS), el péptido B, de 20 AAS, y el péptido D, de 19 AAS, sintetizados en formato lineal, mientras que el péptido C, de 19 AAS fue sintetizado en formato MAP-8 (Multi Antigenic Peptide 8). Se utilizaron también 136 sueros de bovino infectados de *B. bigemina* previamente diagnosticados por Inmunofluorescencia Indirecta. Dichos sueros fueron recolectados en diferentes entidades del país. Las placas marca Greiner, con número de catálogo 89131-676, que fueron utilizadas se sensibilizaron con 100µl de solución de carbonatos 0.1 M por pozo, por cada péptido y se dejaron en refrigeración a 4°C toda la noche.

Las placas fueron lavadas 3 veces con 200µl por pozo con buffer de lavado PBS Tween 0.05%.

Después se agregan 200µl de solución de bloqueo (5% de leche descremada) y se dejaron incubando a 37°C con una agitación a 250 rpm por una hora.

Posterior a la incubación se realizan tres lavados agregando 200µl de buffer de lavado PBS Tween 20 0.05%.

Para la preparación de los sueros se realizaron diluciones a 1:40 en PBS-T 20 0.05%.

Se colocaron 50µl por pozo por triplicado de cada suero 1:40 para los cuatro péptidos, y 50µl de solución buffer PBS-T 20 0.05% y se dejaron en incubación a 37°C por una hora a 250 rpm.

Después de la hora de incubación, se lavaron las placas 3 veces con 200µl solución buffer de lavado PBS-T 20 0.05% y posteriormente se colocó 100µl por pozo de anticuerpo Anti-IgG de bovino hecho en cabra acoplado a peroxidasa, marca Jackson Immuno Research con número de catálogo 101-035-003 a una concentración de 1:2500 y se dejan incubando a 37°C por 45 minutos a 250 rpm.

Transcurrido el tiempo de incubación, las placas se lavaron 3 veces con 200µl solución buffer de lavado PBS-T 20 0.05%.

Posterior a los lavados, se agregaron 100µl por pozo de solución de revelado .1 M (5 ml de ácido cítrico (C₆H₈O₇), 5 ml de citrato de sodio (C₆H₅Na₃O₇) y 4 mg de orto-fenilendiamina (OPD)) por placa y se dejaron incubando por 20 minutos a temperatura ambiente.

Transcurridos los 20 minutos, se agregaron 100 ul de solución de paro (Ácido sulfurico 2N).

Por último, las placas se leyeron con el programa MPM 6.0 de Biorad a una longitud de onda de 490 nanómetros y 3 segundos de agitación.

Los resultados obtenidos por la prueba de ELISA fueron sometidos a tablas de contingencia de 2x2 contra IFI, utilizando las siguientes fórmulas para determinar sensibilidad, especificidad, concordancia, valor predictivo positivo y negativo (Tabla 6), donde el inciso "a" corresponde a valores verdaderos positivos, el inciso "b" para valores falsos positivos, inciso "c" valores falsos negativos e inciso "d" para valores verdaderos negativos:

- Sensibilidad: Es la capacidad de la prueba para detectar verdaderos positivos (a) y se obtiene de la siguiente manera: $=a/(a+c)$.
- Especificidad: Es la capacidad de la prueba para detectar valores verdaderos negativos (d) y se obtiene así: $=d/(b+d)$.

- Valor predictivo positivo: Es la capacidad que tiene una prueba, cuando esta es positiva, de predecir que la muestra es positiva y se estima dividiendo los valores verdaderos positivos (a) entre los verdaderos y falsos positivos: $=a/(a+b)$.
- Valor predictivo negativo: Es la capacidad de una prueba diagnóstica, cuando esta es negativa, de predecir que la muestra es negativa y se estima dividiendo los verdaderos negativos (d) entre los falsos y verdaderos negativos: $=d/(c+d)$.
- Concordancia: Utiliza todos los valores de la tabla de 2x2 y se obtiene dividiendo la suma de los verdaderos positivos (a) con los verdaderos negativos (d), entre la suma de todos los valores: $=(a+d)/(a+b+c+d)$.

5.2 Resultados

Se analizaron sueros bovinos previamente diagnosticados por la prueba de oro para la babesiosis bovina (Tabla 1) de distintas unidades de producción de diferentes estados del país. Se muestran los sueros analizados para el péptido A (Tabla 2), los sueros analizados para el péptido B (Tabla 3), los sueros analizados para el péptido C (Tabla 4), y los sueros analizados para el péptido D (Tabla 5).

Previamente, los sueros de los bovinos utilizados para este estudio, fueron diagnosticados por el método de Inmunofluorescencia Indirecta. En la tabla 1, se muestran los sueros positivos y los sueros negativos con la prueba de oro. La evaluación del péptido A por el método de ELISA indirecta, se realizó con sueros de animales de unidades de producción de diferentes zonas tropicales y subtropicales de México. En la tabla 2 se muestra el número de sueros utilizados y el resultado positivo y negativo de cada suero. En la tabla 2, se puede apreciar que hay 86 sueros positivos y 50 sueros negativos, de los cuales 81 sueros son verdaderos positivos, 47 sueros son verdaderos negativos, 5 falsos positivos y 3 falsos negativos. La evaluación del péptido B por ELISA indirecta, se realizó utilizando sueros de animales de unidades de producción de distintas zonas tropicales y subtropicales de México. De la misma manera, en la tabla 3, se muestra la cantidad de sueros utilizados de las unidades de producción, así como el resultado positivo y negativo de cada uno. En la tabla 3 se puede apreciar la obtención de 69 sueros positivos y 67 sueros negativos, de entre los cuales 63 son sueros verdaderos positivos, 46 sueros fueron verdaderos negativos, 6 sueros fueron falsos positivos y 21 falsos negativos. La evaluación del péptido C por ELISA indirecta, se realizó utilizando sueros de animales de unidades de producción de distintas zonas tropicales y subtropicales de México. Como se puede apreciar en la tabla 3, se obtuvieron En la tabla 4, se muestra la cantidad de sueros utilizados de las unidades de producción, así como el resultado positivo y negativo de cada uno de los sueros. Como se puede apreciar, en la tabla 4, se obtuvieron 85 sueros positivos y 51 sueros negativos, de los cuales 80 sueros fueron verdaderos positivos, 47 sueros verdaderos negativos, 5 sueros falsos positivos y 4 sueros falsos negativos. La evaluación del péptido D por el método de ELISA indirecta, se realizó utilizando sueros de animales de unidades de producción de distintas zonas tropicales y subtropicales de México. A su vez, en la tabla 5, se muestra la cantidad de sueros utilizados de las unidades de producción, así como el resultado positivo y negativo de cada uno de los sueros. De la misma manera, en la tabla 5 se puede apreciar que se obtuvieron 89 sueros positivos y 47 sueros negativos, de los cuales, 84 fueron sueros verdaderos positivos, 47 sueros verdaderos negativos, 5 sueros falsos positivos y no se obtuvo ningún suero falso negativo.

En la tabla 6, se muestra la tabla de contingencia de 2x2 en donde se encuentran los valores de los sueros positivos y negativos, los falsos positivos y falsos negativos, sensibilidad, especificidad, concordancia, así como el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo.

A su vez, en la tabla 6, se observa que el porcentaje de sensibilidad fue de 94.30% para el péptido A, 91.30% para el péptido B, 94.10% para el péptido C y 94.40% para el péptido D. A su vez, se observa que los valores de especificidad fueron de 94.00% para el péptido A,

68.70% para el péptido B, 92.20% para el péptido C y 100.00% para el péptido D. También se observa que las concordancias obtenidas fueron de 94.10% para el péptido A, 80.10% para el péptido B, 93.40% para el péptido C y 96.30% para el péptido D. De la misma, se muestran los valores predictivos positivos, teniendo un resultado de 96.40% para el péptido A, 75% para el péptido B, 95.20% para el péptido C y 100.00% para el péptido D; y se observan los valores predictivos negativos, obteniendo un 90.4% para el péptido A, un 88.50% para el péptido B, un 90.40% para el péptido C y un 90.40% para el péptido D.

Tabla 1. Resultados de sueros con el método de Inmunofluorescencia indirecta. Los sueros positivos pertenecen a unidades de producción en los estados de Aguascalientes, Querétaro, Sinaloa y Veracruz, mientras que los sueros negativos pertenecen a unidades de producción de Querétaro y Durango.

	Positivos IFI	Negativos IFI
n=136	84	52

Tabla 2. Evaluación de sueros de campo por ELISA indirecta con péptido A de SBP4 de *B. bigemina*. Se muestran los nombres de las unidades de producción de donde proceden los sueros evaluados y el estado al que pertenecen, los sueros positivos y negativos por rancho, así como el total de los sueros evaluados.

Péptido A				
Estado	Rancho	Positivo	Negativo	Total
Aguascalientes	Villa Guadalupe	9	1	10
	Las Palomas	24	0	24
	Granja María I	4	0	4
Querétaro	Granja Araceli	1	0	1
Sinaloa	El Torito	7	0	7
	El Moral	10	0	10
	Herradura	1	0	1
	El Barón	2	0	2
Veracruz	La Esperanza	2	0	2
	San Faudila	2	2	4
	Las Torres	1	0	1
	Irineo Murillo	2	0	2
	Playa Vicente	2	0	2
	El Arbolito	2	0	2
	Manuel Antonio	1	0	1
	Buenos Aires	2	0	2
Querétaro	El Orijuelo	9	0	9
	Amazcala	0	7	7
	Los Moreno	3	7	10
Durango	Arroyo Seco	2	33	35
TOTAL		86	50	136

Tabla 3. Evaluación de sueros de campo por ELISA indirecta con péptido B de SBP4 de *B. bigemina*. Se muestran los nombres de las unidades de producción de donde proceden los sueros evaluados y el estado al que pertenecen, los sueros positivos y negativos por rancho, así como el total de los sueros evaluados.

Péptido B				
Estado	Rancho	Positivo	Negativo	Total
Aguascalientes	Villa Guadalupe	7	3	10
	Las Palomas	15	9	24
	Granja María I	2	2	4
Querétaro	Granja Araceli	1	0	1
Sinaloa	El Torito	6	1	7
	El Moral	8	2	10
	Herradura	1	0	1
	El Barón	1	1	2
Veracruz	La Esperanza	2	0	2
	San Faudila	4	0	4
	Las Torres	1	0	1
	Irineo Murillo	2	0	2
	Playa Vicente	1	1	2
	El Arbolito	1	1	2
	Manuel Antonio	1	0	1
	Buenos Aires	1	1	2
	El Orijuelo	9	0	9
	Querétaro	Amazcala	1	6
Los Moreno		4	6	10
Durango	Arroyo Seco	1	34	35
TOTAL		69	67	136

Tabla 4. Evaluación de sueros de campo por ELISA indirecta con péptido C de SBP4 de *B. bigemina*. Se muestran los nombres de las unidades de producción de donde proceden los sueros evaluados y el estado al que pertenecen, los sueros positivos y negativos por rancho, así como el total de los sueros evaluados.

Péptido C				
Estado	Rancho	Positivo	Negativo	Total
Aguascalientes	Villa Guadalupe	10	0	10
	Las Palomas	22	2	24
	Granja María I	3	1	4
Querétaro	Granja Araceli	1	0	1
Sinaloa	El Torito	7	0	7
	El Moral	10	0	10
	Herradura	1	0	1
	El Barón	2	0	2
Veracruz	La Esperanza	2	0	2
	San Faudila	4	0	4
	Las Torres	1	0	1
	Irineo Murillo	2	0	2
	Playa Vicente	2	0	2
	El Arbolito	2	0	2
	Manuel Antonio	1	0	1
	Buenos Aires	2	0	2
	El Orijuelo	8	1	9
	Querétaro	Amazcala	0	7
Los Moreno		3	7	10
Durango	Arroyo Seco	2	33	35
TOTAL		85	51	136

Tabla 5. Evaluación de sueros de campo por ELISA indirecta con péptido D de SBP4 de *B. bigemina*. Se muestran los nombres de las unidades de producción de donde proceden los sueros evaluados y el estado al que pertenecen, los sueros positivos y negativos por rancho, así como el total de los sueros evaluados.

Péptido D				
Estado	Rancho	Positivo	Negativo	Total
Aguascalientes	Villa Guadalupe	10	0	10
	Las Palomas	24	0	24
	Granja María I	4	0	4
Querétaro	Granja Araceli	1	0	1
Sinaloa	El Torito	7	0	7
	El Moral	10	0	10
	Herradura	1	0	1
	El Barón	2	0	2
Veracruz	La Esperanza	2	0	2
	San Faudila	4	0	4
	Las Torres	1	0	1
	Irineo Murillo	2	0	2
	Playa Vicente	2	0	2
	El Arbolito	2	0	2
	Manuel Antonio	1	0	1
	Buenos Aires	2	0	2
	El Orijuelo	9	0	9
	Querétaro	Amazcala	0	7
Los Moreno		3	7	10
Durango	Arroyo Seco	2	33	35
TOTAL		89	47	136

Tabla 6. Parámetros a evaluar en la tabla de concordancia. Se muestran las fórmulas de los parámetros que se evaluaron los resultados para cada péptido.

Parámetro	Fórmula
Sensibilidad	$a/(a+c)*100$
Especificidad	$d/(b+d)*100$
Concordancia	$(a+d)/(a+b+c+d)*100$
Valor predictivo positivo	$a/(a+b)*100$
Valor predictivo negativo	$d/(c+d)*100$

Tabla 7. Valores de concordancia de 2x2 y contingencia de ELISA indirecta basada en péptidos comparada con IFI. Se muestran los sueros verdaderos positivos, los sueros falsos positivos, los sueros verdaderos negativos, los sueros falsos negativos, así como los valores de sensibilidad, especificidad, concordancia, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, y el total de los sueros utilizados.

Parámetro	Péptido A	Péptido B	Péptido C	Péptido D
Total positivos	81	63	80	84
Falsos positivos	5	6	5	5
Falsos negativos	3	21	4	0
Total negativos	47	46	47	47
% Sensibilidad	94.30	91.30	94.10	94.40
% Especificidad	94.00	68.70	92.20	100.00
% Concordancia	94.10	80.10	93.40	96.30
Valor predictivo positivo	96.40	75	95.20	100.00
Valor predictivo negativo	90.4	88.5	90.40	90.40
Total	136	136	136	136

Los resultados de la IFI que se utilizaron para las tablas de contingencia presentes en este trabajo, arrojaron 84 sueros positivos y 52 sueros negativos. En comparación con la prueba de oro para la babesiosis bovina, en los análisis de ELISA indirecta realizados, se obtuvieron 81 sueros fueron positivos y 47 sueros negativos con el péptido A (Tabla 2), 63 sueros positivos y 46 sueros negativos con el péptido B (Tabla 3), 80 sueros positivos y 47 sueros negativos con el péptido C (Tabla 4), y 84 sueros positivos y 47 sueros negativos con el péptido D (Tabla 5).

VI. DISCUSIÓN

Actualmente, la babesiosis bovina es una de las enfermedades más importantes en el mundo debido a las fuertes pérdidas económicas que genera. *Babesia bigemina* y *Babesia bovis* son las principales especies que afectan el ganado en México.

La Organización Mundial de la Salud Animal (OIE), sugiere el uso de la técnica de ELISA indirecta para el diagnóstico de la babesiosis bovina, basado principalmente en antígenos crudos propios del merozoito. Hoy en día, se ha demostrado que una opción para el diagnóstico de esta enfermedad es el uso de péptidos de los mismos antígenos, pudiendo así, lograr un mejor diagnóstico.

Chung *et al*, 2017 menciona que, hasta ahora, no hay ELISAs o algún otro método que haya sido validado para la detección de la enfermedad en los diferentes estadios de la infección de diferentes áreas geográficas. Las ELISAs en donde se utiliza todo el antígeno del protozooario da como resultado una especificidad reducida debido a la reacción cruzada con otras especies propias de *Babesia* e incluso con otros géneros. En contraste, menciona que si se utilizan subunidades o péptidos de la proteína antigénica tienden a tener el problema opuesto, en donde disminuye la sensibilidad de la prueba debido a la variación antigénica entre las mismas cepas de *B. bovis*. Por otro lado, Terkawii *et al*, 2011, menciona que las proteínas recombinantes derivadas de los protozoarios resultan una alternativa efectiva, permitiendo una mejor estandarización de la prueba de ELISA con una sensibilidad y especificidad elevada. En este trabajo, se llevó a cabo el método de ELISA indirecta para cada péptido.

En un estudio realizado por Chung *et al*, 2017, se realizó la prueba de ELISA para la proteína SBP4 en *Babesia bovis*, teniendo como resultado una especificidad del 86.2% y una sensibilidad del 84.5% (no reporta concordancia), en comparación con la prueba de oro. Terkawi *et al*, 2010 reporta en un estudio realizado con la misma proteína, una sensibilidad y especificidad del 96.01% y 96.43%, así como una concordancia de 85.3%. En contraste con este trabajo, únicamente se utilizaron péptidos de la proteína SBP4 (A, B, C y D), teniendo una sensibilidad y una especificidad aún mayor en los péptidos A, C y D (94%-94.2%, 94.1%-92.2% y 94.4%-100%, respectivamente), porcentajes mayores a lo reportado por Chung *et al*, 2017, por lo que, al utilizar fragmentos de la proteína, es posible obtener un porcentaje mayor de especificidad y sensibilidad (Tabla 7).

Con relación a la concordancia del 85.3% que reporta Terkawi *et al*, 2010, con los péptidos A, B, C y D, se obtuvo una concordancia de 94.1%, 80.1%, 93.4% y 96.3% (Tabla 7), respectivamente, teniendo una concordancia mayor en el péptido A, C y D.

Santamaría *et al*, 2020, realizó un estudio de ELISA indirecta, en el cual utilizó una proteína recombinante de RAP-1, obteniendo una sensibilidad y una especificidad de 89.9% y 86.5%, respectivamente. Complementando este trabajo, Figueroa *et al*, 1990, McElwain *et al*, 1987, y McElwain *et al*, 1991, mencionan que la proteína asociada a roprías (RAP-1) es un antígeno inmunodominante y altamente conservado del protozoario de diferentes zonas geográficas. Mosqueda *et al*, 2019 demostró la presencia de la proteína del cuello de la ropría 2 (RON2) en *B. bigemina* por medio de dos péptidos altamente conservados (A y B) de RON2, en donde, por medio de ELISA indirecta logró un 98.26% y 99.13% de reconocimiento de los péptidos A y B, respectivamente en animales infectados por *B. bigemina*. De igual manera, Hidalgo *et al*, 2018, realizó un estudio con RON2 utilizando cuatro péptidos diferentes (péptido 1, péptido 2, péptido 3 y péptido 4) conservados en una cepa virulenta de *B. bovis*, de los cuales, únicamente 2 péptidos (péptido 2 y péptido 3) demostraron un reconocimiento de 83.3% y 87.7%, respectivamente. Adicionalmente, Josimar *et al*, 2018 describe la proteína micronemal 1 (MIC-1) en *B. bigemina*. De la misma manera, realizando el método de ELISA indirecta y utilizando dos péptidos de la proteína MIC-1 (A y B), obtuvo un 97.4% y 83%, respectivamente, de reconocimiento de los péptidos utilizados. En contraste con este trabajo, y considerando los resultados obtenidos, la proteína SBP4 podría ser un candidato para realizar el diagnóstico de la babesiosis bovina causada por *B. bigemina*.

Hasta la fecha, solo existen reportes sobre la expresión de la proteína SBP4 en *B. bovis*, y a su vez, utilizando únicamente proteínas recombinantes. Sin embargo, en este trabajo se reporta un comportamiento similar a la expresión de la proteína SBP4 con *B. bigemina*. Con relación en los resultados obtenidos en este trabajo de cada péptido, el péptido D logró ser el más conservado, alcanzando una sensibilidad del 94% una especificidad del 100% (Tabla 7), seguido del péptido C con una sensibilidad y especificidad 94.1% y 92.2% (Tabla 7) respectivamente, mientras que el péptido A, obtuvo una sensibilidad y especificidad de 94.2% y 94%, respectivamente (Tabla 7). En el caso del péptido B, se obtuvo una sensibilidad del 91.3% y 68.6%, siendo este el menos conservado en las cepas analizadas (Tabla 7).

Es posible que el hecho de que la sensibilidad y especificidad de cada péptido sea variable, es debido a la variación antigénica de las cepas de *B. bigemina*. Curnow, 1973, por medio de aglutinación de eritrocitos infectados de *B. bigemina*, demostró que el protozoario es capaz de cambiar frecuentemente los antígenos superficiales, tal como fue reportado de manera similar en un estudio realizado por Roberts *et al*, 1975 con *Babesia rodhaini* (*Babesia microti*) en caballos.

VII. CONCLUSIONES

En resumen, la proteína de los cuerpos esféricos 4 (SBP4) es una proteína involucrada en el desarrollo intraeritrocítico de *B. bigemina*.

Los péptidos A, C y D poseen epítomos B conservados, que son reconocidos por anticuerpos de animales infectados de manera natural, siendo posibles candidatos para el diagnóstico de la babesiosis bovina provocada por *B. bigemina*.

La información recolectada en este trabajo, señala la importancia de la proteína SBP4 como un candidato vacunal para la prevención de la babesiosis bovina.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- AbouLaila, M., K. Nakamura, Y. Govind, N. Yokoyama, I. Igarashi. 2010. Evaluation of the *in vitro* growth-inhibitory of epoxomicin on *Babesia* parasites. *Vet Parasitol.*, 19-27.
- Almazán, C., Aguilar, G., Rodríguez, S., Mosqueda, J., & Pérez, A. 2018. Immunological control of ticks and tick-borne diseases that impact cattle health and production. *Frontiers in Bioscience*, 1535-1551.
- Álvarez, J. A., C. Rojas, J. V. Figueroa. 2019. Diagnostic tools for the identification of *Babesia sp.* In persistently infected cattle. *Pathogens*. Sep; 8(3): 143.
- Azirwan, G., P. Allamanda, E. S. Mariamah, T. Munkjargal, B. Tuvshintulga, H. Takemae, T. Sivakumar, M. AbouLaila, M. A. Terkawi, M. Ichikawa-Seki, Y. Nishikawa, N. Yokoyama, I. Igarashi. 2017. Evaluation of immunochromatographic test (ICT) strips for the serological detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection in cattle from Western Java, Indonesia. *Veterinary Parasitology* <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.04.010>.
- Babesiosis bovina. Babesiosis bovina. [En línea] 12 de 2008. [Citado el: 05 de 06 de 2012.] http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/babesiosis_bovina.pdf.
- Benavides, E., J. Romero, and L. Villamil. 2016. Las garrapatas del ganado bovino y los agentes de enfermedad que transmiten en escenarios epidemiológicos de cambio climático. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), Costa Rica.
- Bock, R. L. Jackson, A. De Vos, W Jorgensen. 2004. Babesiosis in cattle. *Parasitology*. 129, S247–S269.
- Brown, W. C., and G. H. Palmer. 1999. Designing blood-stage vaccines against *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Parasitol. Today Pers. Ed.* 15:275–281.
- Callow, L. L. 1984. Piroplasms. In *Animal Health in Australia, Protozoal and Rickettsial Diseases*, vol. 5. *Animal Health in Australia*, pp. 121–160. Canberra, Australian Bureau of Animal Health, AGPS.

- Chauvin, A., E. Moreau, S. Bonnet, O. Plantard, and L. Malandrin. 2009. *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Vet. Res.* 40:37.
- Curnow, J. A. 1973. The use of a slide agglutination test to demonstrate antigenic differences between *Babesia bigemina* parasite. *Aust. Vet. J.*, 49: 290-293.
- de Castro, J.J. 1997. Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries. *Veterinary Parasitology* 71: 77-97.
- Demessie, Y., and S. Derso. 2015. Tick Borne Hemoparasitic Diseases of Ruminants: A Review. *Adv. Biol. Res.* 9:210–224.
- El-Ghaysh, A., Sundquist, B., Christensson, D. A., Hilali, M., Nassar A. M. 1996. Observations on the use of ELISA for detection of *Babesia bigemina* specific antibodies. *Veterinary Parasitology* 62: 51-61.
- FAO/OIE/WHO, 1994. *Animal Health Yearbook*, 250 pp.
- Figueroa, J. V., Buening, G. M., Kinden, D. A., & Green, T. J. 1990. Identification of common surface antigens among *Babesia bigemina* isolates by using monoclonal antibodies. *Parasitology*, 100, 161–175.
- Gan, D. S., Patel, R. K. 2013. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Investigative Dermatology*. Volume 133.
- Graham, O. H., and J. L. Hourrigan. 1977. Eradication programs for the arthropod parasites of livestock. *J. Med. Entomol.* 13:629–658.
- Hidalgo, R. M., Suarez C. E., Mercado, U. M. A., Hernandez, O. R., Ramos J. A., Galindo, V. E., León, Á. G., Hernández, J. M., Mosqueda, J. 2018. *Babesia bovis* RON2 contains conserved B-cell epitopes that induce an invasion-blocking humoral immune response in immunized cattle. *Parasites & Vectors* 11, 575.
- Hernández-Silva, D.J.; Valdez-Espinoza, U.M.; Mercado-Uriostegui, M.A.; Aguilar-Tipacamú, G.; Ramos-Aragón, J.A.; Hernández-Ortiz, R.; Ueti, M.; Mosqueda, J. 2018. Immunomolecular Characterization of MIC-1, a Novel Antigen in *Babesia bigemina*, Which Contains Conserved and Immunodominant B-Cell Epitopes that Induce Neutralizing Antibodies. *Vet. Sci.* 5, 32.
- Johnston, L. A., Leatch, G. & Jones, P. N. 1978. The duration of latent infection and functional immunity in droughtmaster and hereford cattle following natural infection with *Babesia argentina* and *Babesia bigemina*. *Australian Veterinary Journal* 54, 14–18.
- Kuttler, K. L., L. W. Johnson. 1986. Chemoprophylactic activity of imidocarb, diminazene and oxytetracycline against *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Vet Parasitol.*, 21:107-118.

- Levine, N. 1982. The genus *atoplasma* (Protozoa, Apicomplexa). *Journal of Parasitology*, 68(4), 719-723.
- Lew, A.; Jorgensen, W. Molecular approaches to detect and study the organisms causing bovine tick borne diseases: babesiosis and anaplasmosis. *Afr. J. Biotechnol.* 2005, 4, 292–302.
- Mahoney, D. F. 1969. Bovine babesiosis: a study of factors concerned in transmission. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 63, 1–14.
- McElwain, T. F., Perryman, L. E., Davis, W. C., & McGuire, T. C. 1987. Antibodies define multiple proteins with epitopes exposed on the surface of live *Babesia bigemina* merozoites. *The Journal of Immunology*, 138, 2298–2304.
- McElwain, T. F., Perryman, L. E., Musoke, A. J., & McGuire, T. C. 1991. Molecular characterization and immunogenicity of neutralization sensitive *Babesia bigemina* merozoite surface proteins. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 47, 213–222.
- Mosqueda, J.; Hidalgo-Ruiz, M.; Calvo-Olvera, D.A.; Hernandez-Silva, D.J.; Ueti, M.W.; Mercado-Uriostegui, M.A.; Rodriguez, A.; Ramos-Aragon, J.A.; Hernandez-Ortiz, R.; Kawazu, S. 2019. RON2, a Novel Gene in *Babesia Bigemina*, Contains Conserved, Immunodominant B-Cell Epitopes That Induce Antibodies That Block Merozoite Invasion. *Parasitology* 2019, 146, 1646–1654.
- Mosqueda, J., Olvera, A., Aguilar, G., & Cantó, G. 2012. Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis. *Current Medicinal Chemistry*, 1504-1518.
- OIE. 2014. Babesiosis bovina. En: *Manual Terrestre de la OIE 2014*. Capítulo 3.4.2. pp. 548-559.
- Onoja, I. I., P. Malachy, W.P. Mshelia, S.O. Okaiyeto, S. Danbirni and G. Kwanashie, 2013. Prevalence of Babesiosis in cattle and goats at Zaria Abattoir, Nigeria. *Journal of Veterinary Advances*, 3: 211-214.
- Organización Mundial de Sanidad Animal. OIE. 2019. Sistema Mundial de Información Zoonositaria. WAHIS-Wild Interface. Available from: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahidwild.php/Index/indexcontent/newlang/es
- Qin, S., J. Wang, H. Ning, Q. Tan, M. Yin, X. Zhang, D. Zhou, X. Zhu. 2015. First report of *Babesia bigemina* infection in white yaks in China. *Acta Tropica* 145: 52–54.
- Roberts, J. A., Tracey-Patte, P. *Babesia rodhaini*. Immuno-induction of antigenic variation. *Int. J. Para.sitol.*, 5: 573-576, 1975.
- Schnittger, L., A. E. Rodriguez, M. Florin-Christensen, and D. A. Morrison. 2012. Babesia: A world emerging. *Infect. Genet. Evol.* 12:1788–1809.
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2020. Situación actual Campaña Nacional para el control de la garrapata *Boophilus* spp. Obtenido de

<https://www.gob.mx/senasica/documentos/situacion-actual-del-control-de-la-garrapata-boophilus-spp>.

- Shah, K., & Maghsoudlou, P. 2016. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *British Journal of Hospital Medicine*, 98-101.
- Sivakumar, T, D. T. B. Lan, P. T. Long, L. Q. Viet, G. Weerasooriya, A. Kume, K. Suganuma, I. Igarashi, N. Yokoyama. 2017. Serological and molecular surveys of *Babesia bovis* and *B. bigemina* among native cattle and cattle imported from Thailand in Hue, Vietnam. National Research Center for 22 Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, 23 Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan.
- Snelson, J.T., 1975. Animal ectoparasites and disease vectors causing major reductions in world food supplies. *FAO Plant Protect. Bull.*, 23: 103-117.
- Soldati, D.; Foth, B.J.; Cowman, A.F. Molecular and functional aspects of parasite invasion. *Trends Parasitol.* 2004, 20, 567–574.
- Suarez, C. E., G. H. Palmer. M. Florin-Christensen, S. A. Hines, I. Hötzel, T. F. McElwain. 2003. Organization, transcription, and expression of rhoptry associated protein genes in the *Babesia bigemina* RAP-1 locus. *Molecular & Biochemical Parasitology* 127: 101–112.
- Terkawi M.A., Huyen N.X., Wibowo P.E., Seuseu F.J., Aboulaila M., Ueno A., Goo Y., Yokoyama N., Xuan X., Igarashi I. 2011. Spherical Body Protein 4 is a new serological antigen for global detection of *Babesia bovis* infection in cattle. *Clinical and Vaccine Immunology*. 18(2): 337–342.
- Terkawi M.A., Seuseu F.J., Eko-Wibowo P., Huyen N.X., Minoda Y., AbouLaila M., Kawai S., Yokoyama N., Xuan X., Igarashi I., 2011. Secretion of a new spherical body protein of *Babesia bovis* into the cytoplasm of infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol.* 178:40-45.
- The Center for Food Security and Public Health. 2008. Bovine Babesiosis.
- Wright, I. G., B. V. Goodger, G. D. Buffington, I. A. Clark, F. Parrodi, and D. J. Waltisbuhl. 1989. Immunopathophysiology of babesial infections. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83 Suppl:11–13.
- Yokoyama N, Okamura M, Igarashi I. Erythrocyte invasion by *Babesia* parasites: Current advances in the elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage. *Veterinary Parasitology*. 2006;138(1-2):22-32.

XI. APÉNDICES

9.1 Reactivos

- Agua destilada. Marca Ecopura.
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1 l. Marca J. T. Baker. Número de catálogo 9681-02.
- Anticuerpo Anti-IgG de bovino hecho en cabra acoplado a peroxidasa. Marca Jackson Immuno Research. Número de catálogo 101-035-003.
- Bicarbonato de sodio (NaHCO_3). Polvo. Marca J.T. Baker. Número de catálogo 3506-01.
- Carbonato de sodio monohidratado ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$), cristal. Marca J. T. Baker. Número de catálogo 3598-01.
- Citrato de sodio dihidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), granular 500g. Marca J. T. Baker. Número de catálogo 3646-01.
- Cloruro de potasio (KCl). Marca Research Organics. Número de catálogo 0714P.
- Cloruro de sodio (NaCl), cristal. Marca J. T. Baker. Número de catálogo 3624-05.
- Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4). Marca Research Organics. Número de catálogo 0712P.
- Fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4). Marca Jalmek. Número de catálogo 7558-79-4.
- Orto-fenilendiamina (OPD). Marca Sigma. Número de catálogo P23938.
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 30%. Marca J. T. Baker. Número de catálogo 7722-84-1.
- Polioxietileno-20 (Tween-20). Marca Biotech. Número de catálogo 9005-64-5.

9.2 Material.

- Micropipeta 0.5-2 μl omniPette. Marca Cleaver Scientific. Número de catálogo CV10.
- Micropipeta 100-1000 μl omniPette. Marca Cleaver Scientific. Número de catálogo CV1000.
- Micropipeta 20-200 μl omniPette. Marca Cleaver Scientific. Número de catálogo CV200.
- Micropipeta 2-20 μl omniPette. Marca Cleaver Scientific. Número de catálogo CV20.
- Micropipeta de 8 canales Finnpipette F1 volumen 10-100 μl . Marca Thermo Scientific. Número de catálogo 46S1020.

- Micropipeta de 8 canales Finnpipette F1 volumen 30-300 μ l. Marca Thermo Scientific. Número de catálogo 4661030.
- Microplaca de 96 pozos sin afinidad de unión. Marca Greiner. Número de catálogo 89131-676.

9.3 Equipo.

- Balanza analítica 0.1 mg- 220 g AX224. Marca Sartorius Mecatronics. Serio M-Pact.
- Incubadora CO2cell 50 standard. Marca Grupo MMM. Número de serie LS 13049.
- Lector de microplacas iMark. Marca Bio-Rad. Número de serie 13600.

9.4 Soluciones.

- Amortiguador de carbonatos pH 9.6 0.1M
 - Carbonato de sodio (Na_2CO_3)
 - Bicarbonato de sodio (NaHCO_3)
 - Agua destilada
- Amortiguador salino de fosfatos (PBS) Tween-20 pH 7.4
 - Cloruro de sodio (NaCl)
 - Cloruro de potasio (KCl)
 - Fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4)
 - Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)
 - Agua destilada
 - Tween 20
- Anticuerpo secundario ELISA 1:2500
 - Anticuerpo de cabra acoplado a peroxidasa anti IgG de bovino
 - PBS-T 20 0.05%
- Solución de revelado
 - Ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)
 - Citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)
 - Orto-fenilendiamina (OPD)
- Solución de paro
 - Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 2N