

Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales

Desarrollo y estandarización de un inmunoensayo ligado a enzima indirecto  
basado en la proteína CHPV 1.9 para el diagnóstico de *Babesia bovis* y  
*Babesia bigemina*

TESIS

Que como parte de los requisitos para  
obtener el Grado de

Maestro en Salud y Producción Animal Sustentable

Presenta

M.V.Z Sergio Mc Daniel Cárdenas Rodríguez

Dirigido por:

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Querétaro, Qro. A septiembre de 2022



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales  
de Información



Desarrollo y estandarización de un inmunoensayo  
ligado a enzima indirecto basado en la proteína  
CHPV 1.9 para el diagnóstico de Babesia bovis y  
Babesia bigemina

**por**

Sergio Mc Daniel Cárdenas Rodríguez

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons  
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0  
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

**Clave RI:** CNMAC-227811



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable

Desarrollo y estandarización de un inmunoensayo ligado a enzima indirecto  
basado en la proteína CHPV 1.9 para el diagnóstico de *Babesia bovis* y  
*Babesia bigemina*

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Maestro en Salud y Producción Animal Sustentable

**Presenta**

MVZ. Sergio Mc Daniel Cárdenas Rodríguez

**Dirigido por**

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito  
Presidente

Dr. Carlos Agustín Vega y Murguía  
Secretario

Dra. Bertha Isabel Carvajal Gamez  
Vocal

Dr. Israel Alejandro Quijano Hernández  
Suplente

M. en C. Miguel Ángel Mercado Uriostegui  
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro  
Septiembre, 2022  
México

## RESUMEN

La babesiosis bovina es una enfermedad transmitida por garrapatas causada por parásitos del género *Babesia*. El diagnóstico convencional de la enfermedad es mediante frotis sanguíneo e inmunofluorescencia indirecta (IFI). Estos métodos son subjetivos y el número de muestras que pueden procesar es limitado. Los inmunoensayos ligados a enzima (ELISA) permiten procesar un gran número de muestras al mismo tiempo. Además, permiten realizar un diagnóstico objetivo y sensible. El objetivo de este trabajo fue el desarrollo y estandarización de un ELISA indirecto, utilizando una proteína recombinante (CHPV1.9), que contiene péptidos de *Babesia bigemina*. La proteína fue producida en un biorreactor, expresada al inicio de la fase exponencial del cultivo y se colectó la biomasa para su purificación. La purificación de la CHPV1.9 se logró usando cromatografía de afinidad, utilizando urea para solubilizar los cuerpos de inclusión y liberar la proteína. La proteína fue cuantificada por el método de Bradford y acoplada a una microplaca de 96 pozos. Se ajustaron los parámetros de concentración de proteína recombinante, dilución del suero, dilución del anticuerpo secundario y el tiempo de revelado para la estandarización del ELISA. Se determinó la sensibilidad diagnóstica (DSe) y especificidad diagnóstica (DSp) de la prueba utilizando sueros positivos y negativos a la enfermedad colectados de animales de campo. El ELISA fue comparado con respecto a los resultados de esos mismos sueros evaluados por la “prueba de oro”, la IFI. Se obtuvo una alícuota de la proteína purificada con una concentración de 1003 µg/ml. El ELISA estandarizado alcanzó una DSe del 82.26%, una DSp del 91.49% y un valor de kappa (k) de 0.724; esto al utilizar un punto de corte igual a la media de los sueros negativos más dos desviaciones estándar de estos. Se determinó un segundo punto de corte (0.4495) para la técnica utilizando curva receptor operador (ROC), obteniendo una DSe de 88.71%, una DSp de 95.74% y un valor k de 0.834. La técnica estandarizada cumple con lo establecido en el Manual de las Pruebas Diagnósticas y de las Vacunas de los Animales Terrestres de la OIE, el siguiente paso es la validación de la técnica para que pueda ser utilizada para el diagnóstico de la babesiosis bovina.

**Palabras clave:** babesiosis bovina, ELISA, proteína recombinante, diagnóstico, estandarización.

## ABSTRACT

Bovine babesiosis is a tick-borne disease caused by parasites of the genus *Babesia*. Conventional diagnosis of the disease is by blood smear and indirect immunofluorescence (IFI). These methods are subjective and the number of samples that can process is limited. Enzyme-linked immunoassays (ELISA) may allow more samples to be processed at the same time. In addition to its improved sensitivity and objectivity in the diagnosis to be made. The objective of this work was the development and standardization of an indirect ELISA, using a recombinant protein (CHPV1.9), which contains *Babesia bigemina* peptides. The protein was produced in a bioreactor, expressed at the beginning of the exponential phase of the culture and the biomass was collected for future purification. Purification of CHPV1.9 was achieved through affinity chromatography, using urea to solubilize the inclusion bodies and release the protein. The protein was quantified by Bradford's method and coupled to a 96 well microplate. The parameters of recombinant protein concentration, serum dilution, dilution of secondary antibody and revelation time were adjusted for the ELISA standardization. The diagnostic sensitivity (DSe) and diagnostic specificity (DSp) of the test was determined using positive and negative sera to the disease collected from field animals. The ELISA developed in this work was compared to the results of those same sera evaluated with the "gold standard", the IFI. An aliquot of the purified protein was obtained with a concentration of 1003 µg/ml. The standardized ELISA achieved a DSe of 82.26%, a DSp of 91.49% and a kappa value (k) of 0.724; this by using a cut-off point of the mean of the negative sera plus two standard deviations. A second cut-off point (0.4495) was determined for the technique using a receptor-operator curve (ROC), at this cut-off point the ELISA obtained a DSe of 88.71%, a DSp of 95.74% and a kappa value of 0.834. The standardized technique complies with the recommendations of the OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines of Terrestrial Animals, the next step is the validation of the technique so that it can be used for the diagnosis of bovine babesiosis.

**Key words:** bovine babesiosis, ELISA, recombinant protein, diagnosis, standardization.

## **DEDICATORIAS**

A mis padres, por su apoyo incondicional cuando requerí apoyo. Por la paciencia que han tenido conmigo para que pueda lograr lo que me proponga.

Al Dr. Mosqueda, por haberme tenido la confianza de aceptarme en la maestría y haberme guiado en el desarrollo de este proyecto.

## **AGRADECIMIENTOS**

A todos los integrantes del Laboratorio de Inmunología y Vacunas, por su apoyo y disposición para que realizase mis experimentos de forma adecuada.

A la maestra Alma Susana Mejía López por compartir sus conocimientos en bioprocesos y guiarme en aprender un ámbito totalmente nuevo para mí.

A la señora Emilia y toda su familia, por haberme recibido en su hogar como un hijo. Gracias a ello pude terminar satisfactoriamente la última parte de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento de mi beca de posgrado, sin ella, no habría realizado este trabajo.

Al Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA) por su entera disposición en otorgar el material biológico para estandarizar la técnica.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>DEDICATORIAS</b> .....	<b>iii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>iv</b>
<b>ÍNDICE</b> .....	<b>v</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	<b>viii</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>ix</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	<b>3</b>
2.1 Definición de la enfermedad .....	3
2.1.1 Taxonomía.....	4
2.1.2 Morfología .....	5
2.2 Ciclo de vida.....	7
2.3 Importancia y manejo de la enfermedad .....	10
2.3.1 Impacto económico.....	10
2.3.2 Signos clínicos.....	11
2.3.3 Patogenia .....	12
2.3.4 Tratamiento.....	13
2.3.5 Control del vector .....	14
2.4 Epidemiología de la enfermedad.....	15
2.4.1 Distribución .....	16
2.5 Métodos de diagnóstico para la babesiosis bovina.....	17
2.5.1 Frotis sanguíneos .....	17
2.5.2 Inmunofluorescencia indirecta.....	18
2.5.3 Prueba de fijación del complemento.....	18
2.5.4 Inmunoensayo ligado a enzima .....	19
2.6 Proteínas recombinantes.....	22
2.6.1 Métodos de expresión y purificación.....	22
2.6.2 Aplicación en métodos de diagnóstico .....	24

2.7 Desarrollo de pruebas diagnósticas .....	25
2.7.1 Estandarización de la prueba .....	27
<b>III. HIPÓTESIS .....</b>	<b>29</b>
<b>IV. OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
4.1 Objetivo general .....	30
4.2 Objetivos específicos.....	30
<b>V. METODOLOGÍA .....</b>	<b>31</b>
5.1 Análisis bioinformático de la CHPV 1.9 .....	31
5.2 Expresión de la CHPV 1.9.....	31
5.3 Lisis de la biomasa de cultivo .....	32
5.4 Purificación de la CHPV1.9 .....	33
5.5 Caracterización de los sueros positivos y negativos a <i>Babesia</i> spp .....	34
5.5.1 Inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	34
5.6 Estandarización del inmunoensayo ligado a enzima indirecto.....	35
5.6.1 Determinación de la robustez de la prueba .....	36
5.6.2 Análisis estadístico de los datos .....	37
5.7 Determinar sensibilidad y especificidad analítica de los sueros con anticuerpos contra <i>B. bovis</i> y <i>B. bigemina</i> .....	38
<b>VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>39</b>
6.1 Análisis bioinformático de la CHPV1.9 .....	39
6.2 Obtención, purificación y cuantificación de la proteína quimérica recombinante .....	42
6.2.1 Obtención de la CHPV1.9 .....	42
6.2.1 Purificación de la CHPV1.9 .....	47
6.2.1 Cuantificación de la CHPV1.9 .....	51
6.3 Caracterización de los sueros positivos y negativos a <i>Babesia</i> spp .....	52
6.4 Estandarización del inmunoensayo ligado a enzima indirecto.....	53
6.4.1 Robustez del iELISA basada en la CHPV1.9.....	58

6.5 Determinación de la sensibilidad analítica de la técnica .....	62
6.6 Determinación de la sensibilidad, especificidad diagnóstica y punto de corte de la técnica .....	63
6.7 Determinación del punto de corte mediante curva ROC .....	66
<b>VII. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>70</b>
<b>XIII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>72</b>
<b>IX. APÉNDICES .....</b>	<b>91</b>
9.1 Reactivos .....	91
9.2 Material.....	92
9.3 Equipo.....	93
9.4 Soluciones.....	94
9.5 Procedimiento del iELISA basada en la CHPV1.9 .....	96

## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO		PÁGINA
1	Factores que influyen en la idoneidad de pruebas diagnósticas para la detección de anticuerpos.	26
2	Resultado de los alineamientos de los péptidos de la CHPV1.9.	39
3	Aminoácidos idénticos entre la CHPV1.9 y las secuencias reportadas en <i>B. bovis</i> .	41
4	Comparación del iELISA basada en la CHPV1.9 contra la IFI. Repertorio del CENAPA, <i>Babesia bigemina</i> .	63
5	Comparación del iELISA basada en la CHPV1.9 contra la IFI. Repertorio del CENAPA, <i>Babesia bovis</i> .	64
6	Comparación del iELISA basada en la CHPV1.9 contra la IFI. Repertorio del CENAPA, <i>Babesia</i> spp. (animales co-infectados).	64
7	Comparación del iELISA basada en la CHPV1.9 contra la IFI. Repertorio del CENAPA, <i>Babesia</i> spp.	65
8	Cuadro de 2x2 tras establecer el punto de corte de la técnica mediante curva ROC	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Primeros dibujos de <i>Babesia</i> spp publicados por Babes.	4
2	Merozoito de <i>B. bigemina</i> en microscopía electrónica.	5
3	Representación de un eritrocito de bovino infectado con <i>Babesia</i>	6
4	Ciclo de vida de <i>Babesia</i> spp.	9
5	Estructura de la superficie de eritrocitos infectados con <i>B. bovis</i> y <i>B. bigemina</i> .	13
6	Situación actual de la campaña nacional para el control de la garrapata <i>Boophilus</i> spp ( <i>Rhipicephalus</i> spp).	15
7	Tipos de inmunoensayo ligado a enzima (ELISA).	21
8	Fases del desarrollo y validación de una prueba diagnóstica.	27
9	Diagrama del procedimiento de la obtención de la proteína CHPV1.9.	34
10	Diagrama de la estandarización del iELISA.	36
11	Diagrama de flujo de la estandarización del iELISA.	37
12	Corrida 1 de CHPV1.9.	42
13	Corrida 2 de CHPV1.9.	43
14	Corrida 3 de CHPV1.9.	43
15	Corrida 4 de CHPV1.9.	44
16	Gel de acrilamida de la expresión de la CHPV1.9.	46
17	Cromatograma de purificación CHPV1.9.	48
18	Resumen de purificaciones de CHPV1.9.	49
19	Geles de acrilamida con la CHPV1.9 purificada por IMAC.	50
20	Cuantificación de la CHPV1.9.	51
21	Caracterización de sueros contra <i>Babesia</i> spp.	52
22	Determinación del tiempo de revelado de la técnica.	54
23	Determinación de la dilución del anticuerpo primario en la técnica.	54
24	Determinación de la concentración de CHPV1.9 en la técnica.	55
25	Selección de nuevos controles negativos para la técnica.	57

<b>26</b>	Selección de nuevos controles positivos para la técnica.	<b>58</b>
<b>27</b>	Resultados del iELISA a diferentes concentraciones de leche descremada.	<b>59</b>
<b>28</b>	Comparación de anticuerpos secundarios.	<b>60</b>
<b>29</b>	Comparación de tipo de lectura de la técnica.	<b>61</b>
<b>30</b>	Absorbancias obtenidas de los controles utilizados en la iELISA basada en la CHPV1.9.	<b>61</b>
<b>31</b>	Límite de detección de la técnica utilizando sueros de bovino controles.	<b>62</b>
<b>32</b>	Curva para determinar punto de corte basado en la media de los sueros de referencia del CENAPA.	<b>67</b>
<b>33</b>	Absorbancias medias de los sueros analizados.	<b>67</b>

## I INTRODUCCIÓN

La babesiosis bovina es una enfermedad causada por protozoarios del género *Babesia*, afecta a los eritrocitos y es transmitida por garrapatas. Las especies más comunes en México y que afectan al ganado bovino son *B. bovis*, *B. bigemina*. *B. divergens* se distribuye principalmente en el continente europeo (Gohil *et al.*, 2013).

En el país, la población total de bovinos es de 34.8 millones de cabezas de ganado, siendo los estados con más cabezas Veracruz con 4.3 millones, Jalisco con 3.2 millones y Chiapas con 2.5 millones de cabezas de ganado. (SIAP-SADER, 2019).

1,300 millones de bovinos a nivel mundial están en riesgo de padecer la babesiosis bovina (Friedman & Yakubu, 2014) y se estiman pérdidas económicas anuales de hasta 10,000 millones de dólares. En este valor se incluyen las pérdidas ocasionadas por la anaplasmosis bovina (de Castro, 1997; Lew-Tabor & Rodríguez, 2015; Rojas *et al.*, 2018).

La enfermedad ocasiona signos clínicos como fiebre mayor a 40°C, taquicardia, hemoglobinuria, anemia hemolítica, temblores musculares, ictericia, deshidratación, debilidad, postración y, en algunos casos, la muerte del animal. Los signos clínicos ocurren entre los 8 y 18 días después de la infestación por garrapatas (Bock *et al.*, 2004; Suárez & Noh, 2011; Saad & Shuai, 2015; Almazán *et al.*, 2018).

Los animales afectados con *Babesia bovis* pueden desarrollar signos nerviosos; como parálisis, convulsiones, ataxia, hiperestesia, y coma en los momentos antes de la muerte; esto ocurre debido a que los eritrocitos infectados con el parásito se adhieren a los capilares cerebrales (Suárez & Noh, 2011; Almazán *et al.*, 2018).

Los métodos de diagnóstico convencionales para la babesiosis bovina son el frotis sanguíneo que se basa en la identificación de los protozoarios con un microscopio y la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFAT) que detecta la presencia de anticuerpos específicos contra la *Babesia* en el suero de los animales (Mosqueda *et al.*, 2012).

No obstante, estos métodos diagnósticos tienen desventajas, ya sea debido a lo tardado del proceso y su baja sensibilidad; o por su dificultad para analizar un número grande de muestras. Por su parte, los inmunoensayos ligados a enzima (ELISA) permiten analizar

un número grande de muestras al mismo tiempo y son más sensibles que la IFAT (Mosqueda *et al.*, 2012; OIE, 2019).

Las proteínas recombinantes son una estrategia para obtener antígenos de los patógenos sin la necesidad de cultivarlos (Overton, 2014). *Escherichia coli* es el organismo más utilizado a nivel mundial para la obtención de estas proteínas, debido al amplio conocimiento de su genoma y la facilidad que tiene para desarrollarse en cultivo (Gopal & Kumar, 2013; Hayat *et al.*, 2018).

El uso de proteínas recombinantes en el diagnóstico facilita la obtención del material biológico, ya que en la mayoría de los casos es necesario lograr la infección experimental de los animales; además, tiende a disminuir el costo de producción de los métodos de diagnóstico (De la Coletta *et al.*, 2019; Yizmaz *et al.*, 2019).

La proteína quimérica CHPV1.9 fue desarrollada en el Laboratorio de Inmunología y Vacunas de la Universidad Autónoma de Querétaro. Está conformada por péptidos provenientes de proteínas necesarias para el ciclo de vida de *Babesia bigemina* (Hernández-Silva, 2018). Estos péptidos son reconocidos por sueros de bovinos naturalmente expuestos a la babesiosis bovina.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar y estandarizar una prueba de ELISA indirecta (iELISA) basada en la CHPV1.9 (Chimeric Protein Version 19).

## II. ANTECEDENTES

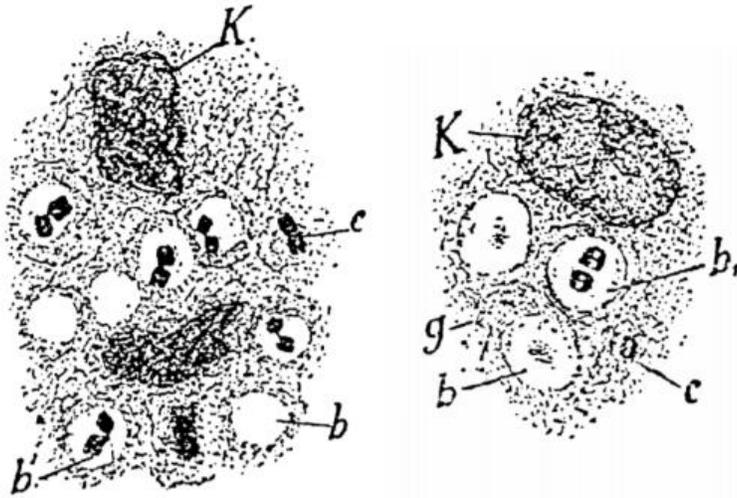
### 2.1 Definición de la enfermedad

La babesiosis es una enfermedad de distribución mundial, es causada por protozoarios apicomplexos del género *Babesia*, y es transmitida por garrapatas de la familia *Ixodidae* a una amplia variedad de hospedantes vertebrados (Vannier *et al.*, 2015; Beugnet & Moreau, 2015; Gohil *et al.*, 2013). De las enfermedades transmitidas por la sangre, la babesiosis es la segunda más común en los animales y en la actualidad ha ganado interés al ser una zoonosis potencial (Gohil *et al.*, 2013).

A nivel mundial, la babesiosis bovina es causada por tres especies de *Babesia*: *B. bovis*, *B. bigemina* y *B. divergens*, la distribución de estas especies es dependiente de la presencia de su vector (Friedman & Yakubu, 2014). *B. bigemina* y *B. bovis* son transmitidas principalmente por garrapatas *Rhipicephalus microplus* y *Rhipicephalus annulatus*, esto en regiones tropicales del mundo, como América, Australia, África y Asia. Por otra parte, *B. divergens* es transmitida casi exclusivamente por *Ixodes ricinus* en el norte de Europa (Almazán *et al.*, 2018; Gohil *et al.*, 2013). Esta enfermedad también es conocida como fiebre de Texas, piroplasmosis, fiebre de garrapata o fiebre de agua roja, esta última debido a la hemoglobinuria que causa en los animales enfermos (Taylor *et al.*, 2015; Vannier *et al.*, 2015).

El agente etiológico fue descrito por primera vez por (Babes, 1888), quien encontró microorganismos redondeados dentro de los eritrocitos de bovino que padecían hemoglobinuria (Figura 1). En ese momento, Babes consideró a este microorganismo como una bacteria, denominándola *Hematococcus bovis*, en un futuro sería redefinida como *Babesia bovis* (Mihalca *et al.*, 2010).

A pesar de su descubrimiento, Babes no pudo ligar el microorganismo a la garrapata y en el año 1893 Smith y Kilborne describieron el agente de la fiebre de Texas, llamándolo *Pyrosoma bigeminum* y además vincularon la enfermedad a la mordedura de garrapatas *Boophilus* spp (Smith & Kilborne, 1893).



**Figura 1.** Primeros dibujos de *Babesia* spp publicados por Babes. Recuperado de Mihalca *et al.*, 2010. K:núcleo, b: células rojas, b1; células rojas con parásitos, e: parásitos libres en división, g: matriz granular.

### 2.1.1 Taxonomía

La *Babesia* pertenece al filo Apicomplexa, que a su vez deriva del dominio eucariota. Estos organismos se diferencian por la presencia de un complejo apical y un citoesqueleto diferente al resto de los eucariotas (Chauvin *et al.*, 2019). Dentro del filo Apicomplexa se encuentran protozoarios como *Theileria*, *Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Isospora* y *Cryptosporidium*.

La clasificación del agente etiológico es la siguiente:

Dominio: Eucariota (Mehlhorn *et al.*, 1994)

Supergrupo: SAR

Reino: Alveolata

Filo: Apicomplexa (Levine, 1982)

Clase: Aconoidasida (Leuckart, 1879)

Orden: Piroplasmida (Homer *et al.*, 2000)

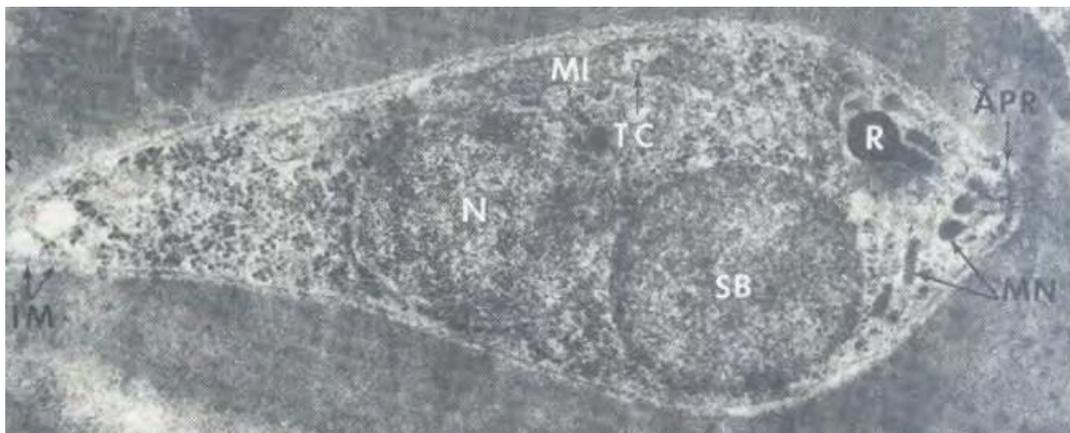
Familia: Babesiidae

Género: *Babesia*

### 2.1.2 Morfología

*B. bovis* y *B. bigemina* son parásitos en forma de pera. *B. bovis* tiene dimensiones de 2.0  $\mu\text{m}$  por 1.5  $\mu\text{m}$ , mientras que *B. bigemina* presenta dimensiones de 4.5  $\mu\text{m}$  por 2.0  $\mu\text{m}$ , cuando el parásito se encuentra en su hospedante vertebrado (Babes, 1888; Smith & Kilborne, 1893).

Los parásitos Apicomplexos como la *Babesia* poseen organelos especializados para invadir y escapar las células del hospedante. De manera general, los estadios infectantes de los parásitos poseen tres estructuras características: las roptrias, los micronemas y los gránulos densos; estos últimos denominados como cuerpos esféricos en *Babesia* spp (Blackman & Bannister, 2001). En la Figura 2 se aprecian estas estructuras en un merozoíto de *Babesia bigemina* (Potgieter *et al.*, 1977).



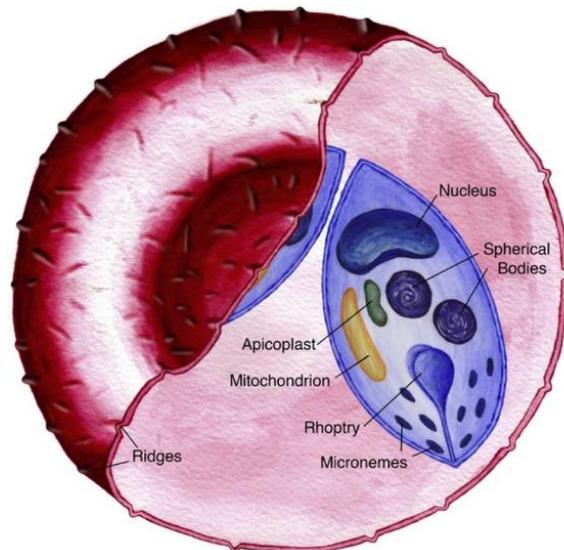
**Figura 2.** Merozoíto de *B. bigemina* en microscopía electrónica. Se aprecian las roptrias (R), un grupo de micronemas (MN), un cuerpo esférico (SB), el núcleo del parásito (N) y la mitocondria (MI) (Potgieter *et al.*, 1977).

Las micronemas (Figura 3) son organelos asociados a la membrana del parásito, tienen una forma fusiforme y se presentan varias copias por cada parásito (Blackman & Bannister, 2001). La proteína AMA-1 (antígeno apical de membrana 1) es secretada por las micronemas y está presente en *B. bovis* y *B. bigemina*. AMA-1 se encarga de la re-orientación de parásito para colocar la región apical en contacto con el eritrocito (Mitchell *et al.*, 2004).

Las roptrias (Figura 3) son fácilmente identificables por microscopía electrónica por su forma de garrote. Generalmente cada parásito posee dos roptrias, las cuales varían de tamaño con respecto al género del que se trate (Blackman & Bannister, 2001). Las roptrias secretan proteínas que participan en los procesos de invasión celular de los parásitos apicomplexos (Yokoyama *et al.*, 2006). La proteína RAP-1 (proteína asociada a roptrias 1) es altamente conservada en *B. bovis* y *B. bigemina*. La proteína se une a los eritrocitos y permite la invasión celular (Mosqueda *et al.*, 2002).

Los cuerpos esféricos (Figura 3) son vesículas asociadas a la membrana de la región apical del parásito, poseen contenidos granulares en su interior y su número varía entre diferentes parásitos (Blackman & Bannister, 2001). Las proteínas de este organelo, conocidas como proteínas de los cuerpos esféricos (SBP-1, SBP-2 y SBP-3) son liberadas en el espacio entre el parásito y la membrana del eritrocito, lo cual permite la invasión del primero (Yokohama *et al.*, 2006).

El apicoplasto (Figura 3) es un organelo en los parásitos apicomplexos, es el homólogo al cloroplasto en las plantas. Este organelo posee su propio genoma y cuenta con su propia maquinaria de expresión de proteínas. Las proteínas codificadas en el cloroplasto intervienen en el metabolismo del parásito. Su origen se cree que deriva de un proceso endosimbiótico con otra célula eucariota (Waller & McFadden, 2005; Brayton *et al.*, 2007).



**Figura 3.** Representación de un eritrocito de bovino parasitado con *Babesia* (Gohil *et al.*, 2010).

## 2.2 Ciclo de vida

El principal vector de *B. bovis* y *B. bigemina* son las garrapatas del género *Rhipicephalus* (*R. microplus* y *R. annulatus*). *B. bigemina* puede ser transmitida por *R. decoloratus* y *R. evertsi*. *R. geigy* y algunas especies de *Haemaphysalis* son capaces de transmitir estas dos especies de *Babesia* spp (OIE, 2018).

El protozoario *Babesia* ha desarrollado mecanismos para garantizar su supervivencia y perpetuación entre sus hospedantes, esto a través de la combinación de una fase sexual (en el vector) y una fase asexual (en el bovino). El ciclo de vida de *Babesia* sigue el desarrollo común del filo Apicomplexa, que incluye tres fases consecutivas: merogonia, gametogonia y esporogonia (Jalovecka *et al.*, 2019).

El ciclo de vida inicia cuando una garrapata infectada con *Babesia* se alimenta de sangre de un bovino sano y a través de la saliva de la garrapata miles de esporozoitos son inyectados al torrente sanguíneo del animal. Los parásitos infectan a los eritrocitos del bovino en la sangre. El esporozoíto se diferencia en una célula redonda llamada trofozoíto, que pierde los organelos del complejo apical, después se reproduce por fisión binaria formando dos células hijas, llamadas merozoítos. Los merozoítos se forman en pares dentro del eritrocito y se produce su salida mediante lisis para invadir a un nuevo eritrocito; terminando la fase de merogonia (Mosqueda *et al.*, 2012; Gohil *et al.*, 2013; Jalovecka *et al.*, 2019).

Dentro del torrente sanguíneo, algunos merozoítos se desarrollan en “pre-gametocitos”, los cuales son necesarios para infectar a la garrapata; este estadio solo puede observarse mediante microscopía electrónica (Chauvin *et al.*, 2009; Jalovecka *et al.*, 2016; Jalovecka *et al.*, 2019). De acuerdo a Chauvin *et al.* (2009), la garrapata se infecta al consumir sangre de un bovino infectado con babesiosis, la sangre se digiere en el intestino del vector y se liberan los parásitos a la luz del intestino medio; únicamente los pre-gametocitos son capaces de sobrevivir y terminar su diferenciación en gametocitos, estos últimos también son conocidos como cuerpos radiados o *Strahlenkörper*.

En la luz del intestino de la garrapata se fusionan dos gametocitos, lo que forma un cigoto. El cigoto desarrolla un organelo semejante a una púa que le permite infectar a las

células intestinales de la garrapata. El cigoto se divide mediante meiosis para formar quinetos poliploides en las células intestinales. Los quinetos lisan las células del intestino y migran por la hemolinfa para diseminarse en los tejidos de la garrapata (Chauvin *et al.*, 2009; Mosqueda *et al.*, 2012; Jalovecka *et al.*, 2019).

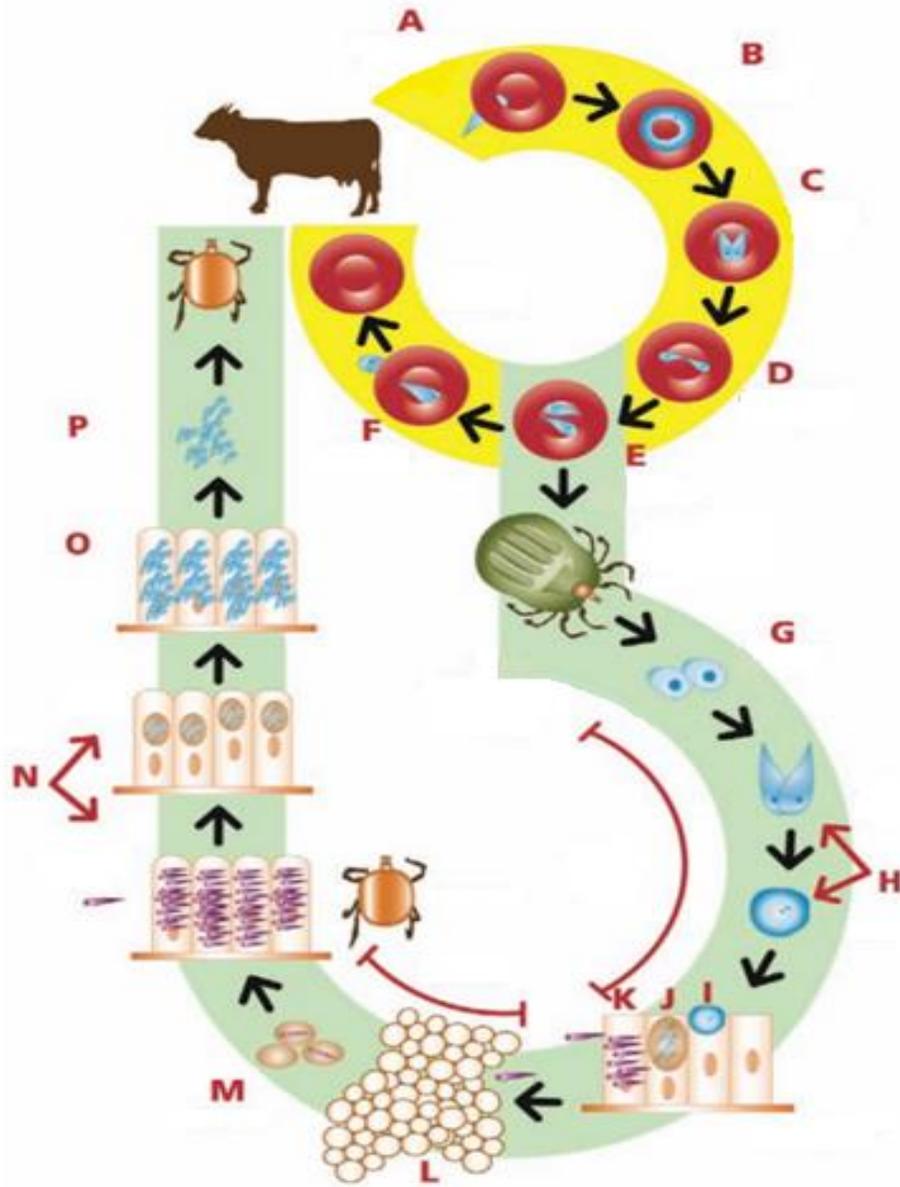
Algunos quinetos migran a los ovarios de las garrapatas hembra, donde infectan los huevos, ocasionando una transmisión transovárica y garantizando la persistencia del parásito en la siguiente generación de garrapatas. Cuando la garrapata ovoposita, las larvas se encuentran infectadas con *Babesia* (Mosqueda *et al.*, 2012; Jalovecka *et al.*, 2019; Suárez *et al.*, 2019). En la Figura 4 se describe el ciclo de vida de *Babesia* spp.

La transmisión en el hospedero vertebrado ocurre tras la mordedura de una garrapata, *B. bovis* es transmitida por las larvas, mientras que *B. bigemina* es transmitida por las ninfas y adultas (Suárez & Noh, 2011). Cuando esto ocurre, los quinetos migran a las glándulas salivales de las garrapatas formando esporoblastos. Cada esporoblasto se diferencia en miles de esporozoítos que serán transmitidos por la saliva de la larva, ninfa o adulta, cerrando así el ciclo de vida de *Babesia* spp (Mosqueda, *et al.*, 2012; Suárez *et al.*, 2019).

El proceso de invasión al eritrocito comienza cuando un parásito libre en el torrente sanguíneo identifica a un eritrocito a través de proteínas de membrana como MSA-1 y MSA-2 en *B. bovis* y GP-45 en *B. bigemina* (Suárez *et al.*, 2019). Además, la interacción del parásito con el eritrocito se ve potenciada por diferencias en el potencial eléctrico de las membranas celulares (Scudiero *et al.*, 2018).

Después de establecer contacto con el eritrocito, el parásito se re-orienta de manera que la región apical entre en contacto directo con la célula roja. La adherencia de ambas membranas celulares con alta afinidad se da a través de las proteínas del complejo apical del parásito (Suárez *et al.*, 2019). Tras lograr la invasión del eritrocito se forma una membrana vacuolar parasitófora, la cual es rápidamente disuelta, lo que deja al parásito en contacto directo con el citosol de la célula del hospedante (Gohil *et al.*, 2010).

### Ciclo de vida de *Babesia* spp



**Figura 4.** Ciclo de vida de *Babesia* spp. Modificado de Mosqueda *et al.*; (2012).

Los autores (Mosqueda *et al.*, 2012) explican la figura de siguiente manera:

A) Esporozoítos invaden un eritrocito y se transforma en un trofozoíto. B) Trofozoíto en forma de anillo. C) Mediante fisión binaria, de cada trofozoíto dos merozoítos son formados.

D) Los merozoítos se encuentran inicialmente unidos semejando un par de peras en un ángulo agudo. E) Los merozoítos maduros se separan antes de salir del eritrocito. F) Los merozoítos son liberados del eritrocito. Algunos volverán a infectar eritrocitos para formar nuevos trofozoítos, mientras que otros serán consumidos por una garrapata para continuar con su ciclo de vida en el invertebrado. G) Estadíos 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, los cuales 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 suben al bovino para alimentarse, los quinetos migran a las glándulas salivales de la garrapata y forman un esporoblasto. O) Miles de esporozoítos se liberan de un solo esporoblasto. P) Larvas de garrapata se alimentan del bovino, liberando esporozoítos al torrente sanguíneo del animal.

## **2.3 Importancia y manejo de la enfermedad**

### **2.3.1 Impacto económico**

La población mundial de ganado bovino era de 1,729 millones de cabezas en el año 2020, se estima que el 77% de estos animales están en peligro de la mordedura de la garrapata. La babesiosis bovina es el segundo hemoparásito con mayor prevalencia a nivel mundial y el cambio climático a favorecido su aparición en nuevos nichos, debido a la movilización de la garrapata. El primer lugar lo ocupa *Trypanosoma* spp (Lohmeyer *et al.*, 2011; FAO, 2022; Jacob *et al.*, 2020).

A finales del 2018, el inventario bovino en México fue de 35 millones de cabezas de ganado, lo que lo ubicó en el octavo lugar mundial en este aspecto. La mayor densidad poblacional de animales se encuentra en los estados de Veracruz y Jalisco (SIAP-SADER, 2019).

De acuerdo con las estimaciones de Rodríguez *et al.* (2017), el 80% de los bovinos en México se encuentran en riesgo de mordedura por garrapatas *Rhipicephalus microplus*. El impacto económico de la mordedura de esta garrapata se estima en 573.6 millones de dólares anuales. Este valor considera los costos de prevención, tratamiento y la pérdida de la producción (Rodríguez *et al.*, 2017).

Australia posee un inventario bovino similar a México, ambos produciendo 2.1 millones de toneladas anuales. En Australia la babesiosis bovina representará pérdidas de 204 millones de dólares en la próxima década; dentro de este número se considera la disminución en la producción de carne y leche, la muerte de los animales, la prevención, el tratamiento, la pérdida de fertilidad y la inducción de abortos (Gohil *et al.*, 2013).

El 62% de las pérdidas económicas atribuidas a la babesiosis son debido efectos directos de la enfermedad, como lo son el descenso de la producción, la muerte de los animales y su tratamiento. El 38% restante corresponden a los costos involucrados en el control de la enfermedad, el diagnóstico, la contratación de Médicos Veterinarios y la administración de fármacos (Guglielmone *et al.*, 1992).

### 2.3.2 Signos clínicos

La babesiosis bovina se manifiesta entre 8 y 14 después de la mordedura de garrapatas. Los signos clínicos son fiebre, , depresión, debilidad, hemoglobinuria, ictericia, anemia hemolítica, temores musculares, taquipnea, abortos en la hembras gestantes y en muchos casos, la muerte. La aparición de estos signos ocurre entre 8 y 14 días después de la mordedura de una garrapata infectada (Saad & Shuai, 2015; Almazán *et al.*, 2018).

*B. bigemina* es la especie más prevalente a nivel mundial, las parasitemias alcanzan entre el 10 y el 30%, y alcanza una mortalidad de 30% si los animales no reciben tratamiento. Las causas de la muerte son choque hipovolémico, y/o falla renal, hepática o pulmonar. Los animales que sobreviven a la enfermedad sin tratamiento sufren un periodo largo de convalecencia (Esmailnejad *et al.*, 2018; Jaimes *et al.*, 2018; OIE, 2018).

*Babesia bovis* puede modificar la estructura de los eritrocitos, lo que permite su adherencia a las células endoteliales en los capilares. Esta característica ocasiona falla en el

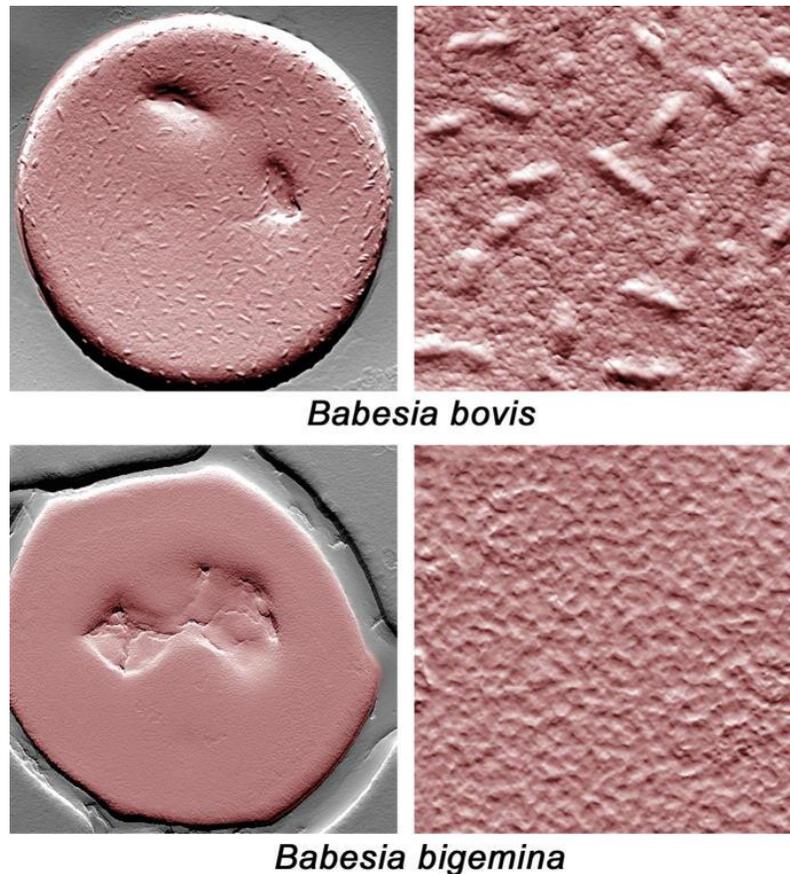
cerebro, hígado y/o pulmón. Las infecciones con *B. bovis* son de curso agudo y usualmente son fatales en el ganado susceptible (Brown *et al.*, 2006; Sondgeroth *et al.*, 2013). Se puede presentar signos nerviosos, como ataxia y coma, junto con los signos normales en las infecciones por *Babesia* spp (Suárez & Noh, 2011; Almazán *et al.*, 2018).

### 2.3.3 Patogenia

El principal daño que ocasionan los parásitos de *Babesia* spp es la destrucción de eritrocitos ya que de cada eritrocito infectado se producen dos merozoítos que infectarán a dos nuevas células rojas (Saleh, 2009). Además existe un efecto indirecto de hemólisis, esto es dado por un aumento en la actividad fagocítica de monocitos periféricos sobre los eritrocitos infectados (Court *et al.*, 2001). Un animal que padece babesiosis produce anticuerpos contra proteínas del parásito presentes en la membrana del eritrocito, lo que induce hemólisis mediada por anticuerpos (Góes *et al.*, 2007).

En un animal susceptible, los parásitos se dividen sin control, lo que ocasiona un descenso rápido en el Volumen Celular Aglomerado de los animales. La disminución del número eritrocitos ocasiona hipoxia en los tejidos de los bovinos. La hemólisis es marcada en infecciones causadas por *B. bigemina*, lo que ocasiona la presencia de hemoglobinuria, daño renal y esplenomegalia (Suárez *et al.*, 2019).

Como se mencionó anteriormente, *B. bovis* altera la estructura de los eritrocitos y promueve su adherencia al endotelio (Gohil *et al.*, 2010), lo que ocasiona una baja parasitemia en sangre periférica y la formación de estructuras semejantes a crestas en la superficie de los eritrocitos infectados (Figura 5). Estas crestas interactúan con las células del endotelio, lo que promueve su citoadherencia (Suárez *et al.*, 2019).



**Figura 5.** Estructura de la superficie de eritrocitos infectados con *B. bovis* y *B. bigemina* (Suárez *et al.*, 2019). Microscopía de fuerza atómica. Los eritrocitos de infectados con *B. bovis* presentan crestas formadas por antígenos VESA1, los cuales promueven la citoadherencia al endotelio vascular.

A la necropsia se observan lesiones asociadas a hemólisis, como mucosas pálidas, esplenomegalia, ictericia y riñones oscuros. Se puede encontrar edema pulmonar y ascitis, junto con petequias en los órganos. En los hallazgos microscópicos se encuentran necrosis hepática, colestasis y hiperplasia de línea eritroide en la médula ósea (Zachary, 2017).

#### 2.3.4 Tratamiento

El dipropionato de imidocarb es capaz de eliminar en su totalidad a los parásitos en la sangre, esto durante la fase aguda de la enfermedad (Brown & Berger, 1970; Callow & McGregor, 1970). El fármaco puede utilizarse de forma profiláctica, confiriendo protección entre 3 y 6 semanas después de su aplicación (Vial & Gorenflot, 2006; Lehner *et al.*, 2011).

Es por esto que el imidocarb es uno de los dos fármacos de elección para el tratamiento de la babesiosis (Lehner *et al.*, 2011; Mosqueda *et al.*, 2012).

El mecanismo de acción del imidocarb no está definido. Se teoriza que interfiere en la producción de proteínas necesarias para el desarrollo del parásito durante su fase dentro del eritrocito (Mosqueda *et al.*, 2012).

Por otro lado, Lehner *et al.* (2011) y Baneth, (2018) estipulan que el imidocarb se une a los ácidos nucleicos de la *Babesia* ocasionando compactación de la cromatina y la subsecuente inhabilidad de reparación y replicación celular.

El otro fármaco usado recurrentemente para el tratamiento de la babesiosis es el aceturato de diminaceno. Se menciona que el fármaco interfiere en la síntesis del ADN del parásito y los procesos de obtención de energía (Baneth, 2018; Tuvshintulga *et al.*, 2019).

#### 2.3.5 Control del vector

El uso de acaricidas en el ganado bovino es la estrategia de elección para disminuir el impacto económico directo ocasionado por las garrapatas y disminuyendo la incidencia de las enfermedades transmitidas por garrapata como la babesiosis (Almazán *et al.*, 2018).

Los acaricidas que fueron más utilizados son los organoclorados, organofosforados, piretroides y el amitraz. Sin embargo, su uso indiscriminado ha ocasionado el surgimiento de subpoblaciones de garrapatas resistentes a estos compuestos. Además los acaricidas afectan a las poblaciones de insectos regionales y tienen un efecto residual en los productos del bovino (carne y leche) (George *et al.*, 2004; Domingos *et al.*, 2013).

En 1981 surgieron en México las primeras subpoblaciones resistentes de garrapatas debido al uso excesivo de organofosforados y organoclorados, estas cepas fueron llamadas “Tempoal” y “Tuxpan” (Aguirre & Santamaría, 1986). En 1985 se aprobó el uso de amidinas y piretroides para el control de garrapatas en México y para el año de 1993 aparecieron cepas resistentes a estos compuestos (“Mora”, “Aldama” y “Coatzacoalcos”) (Ortíz *et al.*, 1995). El Amitraz ha sido utilizado en México desde el año 1994, ocurriendo el primer caso de resistencia a este componente ocho años después, en el año 2002 (Soberanes *et al.*, 2002).

La NOM-019-ZOO-1994 (Figura 6) “Campaña Nacional contra la Garrapata *Boophilus spp*” menciona los lineamientos para el control y eliminación de la garrapata del territorio mexicano; en esta se detalla el uso correcto de acaricidas para la prevención de subpoblaciones resistentes. Los esfuerzos de esta campaña son positivos y el 30% del país se clasifica como zona libre de garrapata (Almazán *et al.*, 2018; SENASICA, 2020).



**Figura 6.** Situación actual de la campaña nacional para el control de la garrapata *Boophilus spp* (*Rhipicephalus spp*). (SENASICA, 2020).

## 2.4 Epidemiología de la enfermedad

La transmisión de la babesiosis bovina requiere del cumplimiento de dos factores: la presencia de larvas infectadas con el parásito, y la presencia de animales susceptibles a la enfermedad. Estos factores pueden ser influenciados por la movilización de animales, la

estacionalidad de la población de garrapatas y características ambientales del lugar en cuestión (Benavides *et al.*, 2016).

Un determinante en la incidencia de la babesiosis bovina es la cantidad de garrapatas presentes en el ambiente, si la mayoría de los animales son infectados con el parásito desde temprana edad, esto permite una estabilidad enzoótica (Benavides, 1985). Esta estabilidad se define como un estado en el que el vector, la enfermedad y el hospedante se encuentran en estrecha relación, en la cual los signos clínicos suelen no ocurrir (Bock *et al.*, 2004).

Los signos clínicos de la enfermedad suelen desarrollarse en animales adultos, los cuales no han tenido contacto con la *Babesia*. Los becerros son resistentes a la enfermedad durante los primeros 9 meses de vida, esto es dado por su sistema inmune innato y los anticuerpos de la madre vía calostro, lo que solo ocurre bajo estabilidad enzoótica (Bock *et al.*, 2004; Zintl *et al.*, 2005).

Los animales que sobreviven al primer contacto con la enfermedad no eliminan por completo los parásitos en la circulación sanguínea, convirtiéndose en animales persistentemente infectados con bajos niveles de parasitemia (Saad *et al.*, 2015). Este mecanismo garantiza la permanencia de la enfermedad, la inmunidad de los animales y aumenta la probabilidad de las *Babesias* para alcanzar al vector invertebrado (Suárez *et al.*, 2019).

La persistencia de *B. bovis* puede presentarse a lo largo de toda la vida del animal (Goff *et al.*, 2008), por el contrario, la persistencia de *B. bigemina* es de hasta 22 meses en el bovino (Mahoney *et al.*, 1973). Estos animales persistentemente enfermos pueden presentar signos clínicos, esto debido al estrés, inmunosupresión y/o por co-infección con otros parásitos (Suárez *et al.*, 2019).

#### 2.4.1 Distribución

La garrapata es necesaria para lograr la transmisión y el establecimiento de la babesiosis bovina en una población susceptible, por lo que la distribución de la enfermedad es dependiente de la presencia o no de *Rhipicephalus* spp (Barré & Uilenberg, 2010).

La enfermedad se disemina en regiones tropicales y subtropicales, las cuales son comunes con su vector. La enfermedad puede diseminarse bajo dos situaciones: la introducción de un animal infectado o persistentemente infectado a un área libre de *Babesia*, pero con presencia del vector, o por la movilización del vector a través de cambios climáticos (Almazán *et al.*, 2018).

El estudio de Romero-Salas *et al.*, (2016) reveló una seroprevalencia de la enfermedad de 98% para *B. bovis* y de 100% para *B. bigemina*. Esto fue en estado de Veracruz, México, la cual es una zona endémica de la garrapata y la *Babesia*.

## **2.5 Métodos de diagnóstico para la babesiosis bovina**

### **2.5.1 Frotis sanguíneo**

Es un método sencillo y económico, consiste en la obtención de sangre bovina junto con un anticoagulante. Se coloca una gota de la sangre obtenida sobre un extremo de una laminilla, después con otra laminilla se desliza hacia atrás la gota, se hace contacto y se dispersa a lo ancho por capilaridad, para después en un movimiento rápido hacia adelante se extiende la sangre (Cowell *et al.*, 2009). El frotis sanguíneo es secado al aire, se fija durante 10-60 segundos en metanol absoluto y por último se tiñe durante 15-30 minutos con colorante Giemsa al 10% (OIE, 2018). La sensibilidad y especificidad de esta técnica dependen de la experiencia del examinador, sobre todo para la diferenciación entre *B. bovis* y *B. bigemina*. El uso de frotis gruesos aumenta la sensibilidad de este método (Lempereur *et al.*, 2017).

De acuerdo con la OIE., (2018) los frotis gruesos para la detección de *Babesia* spp. se realizan colocando una gota de sangre de 50µl y extendiéndola de forma convencional. El frotis se seca al aire y se fija con calor a 80 °C durante 5 minutos, la tinción se realiza con Giemsa al 10%. Con esta técnica se lisan los eritrocitos y aumenta la sensibilidad, aunque dificulta la diferenciación entre especies.

Las fases intraeritrocitarias son observadas bajo el objetivo 100x con aceite de inmersión como solución de montaje. Los merozoítos de *B. bovis* miden 1.5-2 µm de diámetro, mientras que los de *B. bigemina* 2.5-3.5 µm de diámetro (Morzaria *et al.*, 1992; Mosqueda *et al.*, 2012).

### 2.5.2 Inmunofluorescencia indirecta

Esta técnica detecta anticuerpos específicos contra el parásito. La IFI se basa en el reconocimiento de la *Babesia* fija en una laminilla por anticuerpos en el suero de los animales sospechosos; los resultados arrojados por este método son subjetivos y no pueden ser cuantificados (OIE, 2018). Un resultado positivo indica que el animal ya estuvo expuesto previamente a la enfermedad, pero no necesariamente que se encuentre enfermo en ese momento.

Para la IFI, se requiere de antígeno que consiste en eritrocitos infectados con cada una de las especies. Se recomienda una parasitemia entre 2% y 5%, en sangre periférica, la cual después de ser extraída con anticoagulante, es lavada para eliminar las proteínas de la sangre, las células blancas y preservar únicamente los eritrocitos. Con la sangre se realizan frotis sanguíneos delgados, se fijan con acetona fría y después se incuban sueros de animales sospechosos durante 30 minutos. Posteriormente se añade un anticuerpo anti bovino marcado con un fluorocromo. Este fluorocromo emite una señal luminosa al ser excitado con un haz de luz de una determinada longitud de onda. Es necesario el uso de un microscopio de fluorescencia para emitir un resultado (OIE, 2018).

Los anticuerpos de bovino contra *B. bigemina* tienen reacción cruzada con *B. bovis* (Goodger, 1971). La inmunofluorescencia indirecta permite detectar animales persistentemente infectados o portadores de la enfermedad. Es utilizada para estudios epidemiológicos y como herramienta para permitir el flujo de animales a zonas libres de babesiosis (OIE, 2018).

Las desventajas que presenta este método son: la necesidad de obtener antígeno para los frotis, requiere de personal capacitado para leer esta prueba y de un microscopio de fluorescencia (Mosqueda *et al.*, 2012).

### 2.5.3 Fijación del complemento

En esta técnica se identifican anticuerpos específicos contra el antígeno de interés. Los sueros de los animales se calientan a 56 °C, con la finalidad de destruir las proteínas del complemento. Posteriormente a la muestra se le agrega antígeno y proteínas del complemento

cuantificadas. Finalmente se agrega un sistema hemolítico, el cual se compone de eritrocitos de otra especie y anticuerpos específicos contra las proteínas del eritrocito. En los sueros positivos las proteínas del complemento se unen al complejo antígeno-anticuerpo y, por lo tanto, estas proteínas no pueden unirse al complejo eritrocito-anticuerpo. Esto ocasiona la precipitación de los eritrocitos y se aglutinan (Todorovic *et al.*, 1971).

La fijación del complemento es capaz de reconocer anticuerpos específicos contra *Babesia* spp durante los primeros 84 días post-infección. A partir de este momento la detección comienza a disminuir, alcanzando a detectar solamente el 60% de los positivos al día 98 después de la infección (Kuttler *et al.*, 1977).

Esta técnica se usa en algunas regiones para permitir la movilización de animales a otros países. Es probable que la fijación del complemento no identifique a todos los individuos enfermos como tales, esto ocasionado a una baja sensibilidad. La obtención del antígeno para la prueba es a través de la infección experimental de animales, por lo que existen consideraciones éticas para la utilización de la fijación del complemento como método de diagnóstico (OIE, 2018).

#### 2.5.4 Inmunoensayo ligado a enzima (ELISA)

Esta técnica se basa en la reacción antígeno-anticuerpo la cual genera un cambio de color. Esto permite determinar la presencia de anticuerpos específicos en el suero de los animales (Aydin, 2015). La prueba de ELISA fue descrita inicialmente por Engvall y Perlmann en 1971, para la identificación de inmunoglobulinas de conejo. Permite la identificación de proteínas como citocinas, hormonas, fosfoproteínas, moléculas recombinantes y anticuerpos (Hornbeck, 2015).

La técnica se basa en la unión de un antígeno con un anticuerpo específico. El antígeno es inmobilizado en una microplaca, el cual es reconocido con un anticuerpo primario presente en la muestra sospechosa. Finalmente se utiliza un anticuerpo secundario acoplado a una enzima, y se formará un complejo antígeno-anticuerpo si la muestra sospechosa posee anticuerpos específicos. La enzima acoplada al anticuerpo secundario genera un cambio de color en relación a la concentración de anticuerpos específicos en la

muestra, esto al adicionarse un cromógeno específico de la enzima y un catalizador de la reacción química (Shah & Maghsoudlou, 2016).

Es necesario bloquear con proteína inespecífica (como las proteínas de la leche) los espacios vacíos de la placa entre las moléculas de los antígenos para evitar la unión inespecífica de anticuerpos; de igual forma es primordial realizar lavados entre cada uno de los pasos para evitar la interferencia de antígenos y anticuerpos con uniones de baja afinidad (Aydin, 2015).

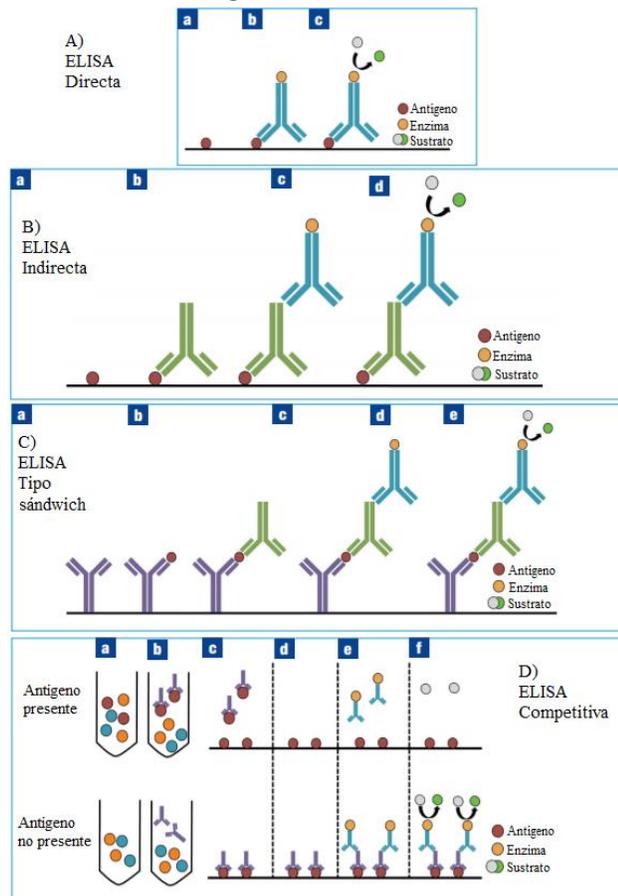
El ELISA directa (Figura 7, panel A) fue desarrollada en 1971 por Engvall & Perlmann. Consiste en cubrir directamente la placa con la muestra, que puede ser un antígeno o un anticuerpo. Después se agrega un anticuerpo acoplado a una enzima, la placa es incubada y lavada para eliminar antígenos o anticuerpos que no se unieron. El último paso consiste en agregar el sustrato de la enzima para producir una señal a través del cambio de color (Aydin, 2015).

En el ELISA indirecta (Figura 7, panel B) un antígeno o anticuerpo es inmovilizado en la placa y se adiciona la muestra, que es un anticuerpo de interés. Después de la incubación y los lavados correspondientes se agrega un anticuerpo secundario, que está acoplado a una enzima. Al igual que en el ELISA directa, se agrega un sustrato para la enzima y se mide el cambio de color (Shah & Maghsoudlou, 2016). Este tipo de ensayo es muy útil para la detección de anticuerpos ya sea en sobrenadantes de cultivo de hibridomas o en el suero (Hornbeck, 2015).

En 1977, Kato *et al.*, desarrollaron una metodología alternativa para la detección de antígenos, la cual fue llamada ELISA tipo sándwich (Figura 7, panel C). En este método se cubre la placa con un anticuerpo de captura. Después se adiciona la muestra, la cual contiene el antígeno de interés, se incuba y se realizan lavados para eliminar los antígenos no unidos. Finalmente se agrega el anticuerpo secundario acoplado a una enzima, se agrega el sustrato específico y se mide el cambio de coloración ocasionado por la unión antígeno-anticuerpo (Hornbeck, 2015). Se considera que este método es 2-5 veces más sensible que otros tipos de

ELISA, debido a que el antígeno se une específicamente a dos anticuerpos en lugar de sólo uno (Aydin, 2015).

En el inmunoensayo ligado a enzimas competitivo (Figura 7, panel D) se utiliza para la detección de antígenos. Tal como su nombre lo indica, utiliza un proceso de unión competitivo. En esta técnica es necesario incubar un anticuerpo primario purificado con la muestra de interés, formándose una unión antígeno anticuerpo. La muestra es incubada en una placa de ELISA, en la cual previamente se sensibilizó con el antígeno. La cantidad de antígeno en la muestra representa el grado de anticuerpos libres que se unirán a la placa de ELISA, de esta manera, un menor cambio de coloración significa una mayor concentración de antígeno en la muestra (Shad & Maghsoudlou, 2016).



En la Figura 7 se describen los distintos formatos de ELISA (Shad & Maghsoudlou, 2016).

**Figura 7.** Tipos de inmunoensayo ligado a enzima (ELISA). Traducido y modificado de: Shad & Maghsoudlou, 2016. Panel A. ELISA directa. Panel B. ELISA indirecta. Panel C. ELISA tipo sándwich. Panel D. ELISA competitiva.

## 2.6 Proteínas recombinantes

### 2.6.1 Métodos de expresión y purificación

Una proteína recombinante es aquella que es sintetizada en una célula diferente a la de su origen, esto dado por la modificación o recombinación del material genético que la codifica. Es necesario el uso de proteínas recombinantes ya que la gran mayoría de estas moléculas no pueden ser sintetizadas de manera química (Overton, 2014).

*Escherichia coli* es el organismo más empleado para la producción de proteínas recombinantes, ya que es fácil de cultivar, tiene un ciclo celular corto y puede ser fácilmente manipulada genéticamente (Gopal & Kumar, 2013; Hayat *et al.*, 2018). La utilización del organismo se debe principalmente al vasto conocimiento de su genoma y de la regulación de expresión de sus genes (Ferrer-Miralles *et al.*, 2015; Rosano *et al.*, 2019).

A pesar de que los modelos procariontes, como lo es *E. coli*, permiten la expresión de muchas proteínas a un bajo costo, estos no pueden realizar modificaciones post-traduccionales y tienden a plegar las proteínas de manera diferente (Ferrer-Miralles *et al.*, 2015). Estas características son vitales cuando la proteína de interés quiere ser utilizada como un homólogo de una estructura presente en otro organismo, como en mamíferos o aves (Overton, 2014).

Cuando se requiere una proteína con función homóloga se recomienda el uso de un modelo eucarionte, como lo son las levaduras, células de insecto o células de mamífero (He *et al.*, 2014). El problema con estos modelos es que requieren medios de cultivos más específicos, tienen ritmos de crecimiento lentos y tienen un menor rendimiento de proteína, esto en comparación con un modelo procarionte (Ferrer-Miralles *et al.*, 2015).

Para obtener una proteína recombinante es necesario utilizar un vector de expresión, el cual poseerá el gen que codifica la proteína de interés. Para lograr agregar ADN extra a la bacteria es necesario desestabilizar la membrana de la célula receptora para que el material genético ingrese a la célula (Aune & Aachmann, 2010).

Hanahan., (1983) describió una metodología para agregar ADN extracromosomal a *E. coli*. El proceso consiste en realizar una disolución de las bacterias receptoras con el

material genético a insertar, después se realizan choques térmicos (42 °C) lo que permite la entrada del ADN a la bacteria. Neumann *et al.*, (1982) desarrollaron un procedimiento para ingresar ADN extracromosomal a las células mediante la aplicación de corrientes eléctricas. Estas corrientes generan poros en las membranas plasmáticas y permiten la entrada del material genético.

El vector de expresión es un plásmido con ADN circular, el cual posee un gen esencial para la supervivencia de la bacteria. Las bacterias no transformadas no poseen este gen y por lo tanto mueren al ser cultivadas. El gen de interés debe poseer un inductor, para que la proteína sea expresada ante un estímulo específico y tener un control de la producción (Overton, 2014).

La purificación de la proteína es necesaria ya que en el medio se encuentran otras proteínas de la bacteria que no son deseadas, agregado a la presencia de los ingredientes de los medios de cultivos. Cada proteína producida debe tener su propia metodología de purificación (Ferrer-Miralles *et al.*, 2014).

Antes de iniciar la purificación debe lisarse la célula que contiene la proteína en su citosol, generalmente suele realizarse mediante choques térmicos que desestabilizan la membrana, o bien mediante sonicación (Wingfield, 2015). Se puede agregar un péptido señal en el extremo amino terminal de la proteína, este péptido dirige a la proteína recién traducida al espacio periplásmico de la bacteria. Esto evita la contaminación con las proteínas en el citoplasma de la bacteria y puede purificarse mediante procesos osmóticos (Overton, 2014).

Algunas proteínas recombinantes son almacenadas en cuerpos de inclusión dentro de la célula, esto representa una ventaja en términos de pureza ya que en estos cuerpos de inclusión se encuentra solamente la proteína de interés. Los cuerpos de inclusión se forman debido a una sobreexpresión de una proteína, la cual no es plegada correctamente y se aglomera en el citoplasma de la célula. Los cuerpos de inclusión no poseen una membrana que los delimite del resto del contenido celular, son precipitados de la proteína de interés (Williams *et al.*, 1982; Kane & Hartley., 1988; Overton, 2014).

La desventaja de la formación de cuerpos de inclusión es que dentro de ellos se encuentran grandes cantidades de proteína de interés plegada de manera incorrecta (Ferrer-Miralles *et al.*, 2014). Es necesario desnaturalizar la proteína después de purificarla, esto suele realizarse con altas concentraciones de urea. Finalmente, la proteína se vuelve a replegar tras reducir las concentraciones de urea (Singh & Panda, 2005).

Se pueden agregar residuos de histidina al extremo amino o carboxilo terminal de la proteína de interés, esto es conocido como marcaje de afinidad. Los residuos de histidina permiten que la proteína interactúe con iones metálicos como el níquel o el cobre, garantizando así su purificación (Cheung *et al.*, 2012).

### 2.6.2 Aplicación en métodos de diagnóstico

La producción de proteínas recombinantes que se derivan de organismos patógenos puede ser útil para el desarrollo de pruebas diagnósticas basadas en serología (Yilmaz *et al.*, 2019). Permite tener una proteína de un patógeno sin la necesidad de cultivar dicho organismo (Yizmaz *et al.*, 2019; Dela Coletta *et al.*, 2019).

Las proteínas recombinantes pueden basarse enteramente en el material genético de una sola proteína de un organismo (Liu *et al.*, 2011), también pueden basarse en múltiples proteínas, tomando los fragmentos antigénicos de cada uno y formar una proteína no existente de manera natural (Ribeiro *et al.*, 2019).

La utilización de una proteína quimérica multiepitópica para el diagnóstico puede aumentar la sensibilidad de la prueba, al aumentar la probabilidad de que un epítipo sea reconocido por el suero del individuo infectado (Dai *et al.*, 2012).

Galdino *et al.* (2016), desarrollaron una proteína recombinante multiepitópica para el diagnóstico del virus de la hepatitis C en humanos. Al adaptar la proteína a una técnica de ELISA discriminó correctamente a todas las pruebas (27 sueros). Gao & Zhao (2019) desarrollaron una proteína recombinante con 11 epítipos de células B provenientes de 6 proteínas diferentes de *Mycobacterium tuberculosis*. Al adaptar la proteína a un inmunoensayo ligado a enzimas indirecto los autores obtuvieron una sensibilidad de 90%,

una especificidad del 93.33%, un valor predictivo positivo de 93.1% y un valor predictivo negativo de 90.32%.

## **2.7 Desarrollo de pruebas diagnósticas**

El primer paso para el desarrollo de una prueba diagnóstica es establecer con claridad el propósito y la aplicación del método. Los propósitos más frecuentes son:

1. Demostrar la ausencia de infección en una población definida.
  - a) Población libre de la enfermedad.
  - b) Restablecimiento de ausencia de la enfermedad tras un brote.
2. Certificar la ausencia de la enfermedad en animales individuales o en productos derivados de los mismos.
3. Apoyar a la erradicación de la enfermedad.
4. Confirmar el diagnóstico de casos clínicos.
5. Estimar la prevalencia de la enfermedad en una población.
6. Determinar el estado inmunitario de animales individuales o poblaciones.

(OIE, 2018)

En el Cuadro 1 se menciona la importancia de estas variables en las pruebas diagnósticas de acuerdo con el propósito que se requiere. Los números en el cuadro corresponden a los propósitos descritos arriba.

**Cuadro 1.** Factores que influyen en la idoneidad de pruebas diagnósticas para la detección de anticuerpos.

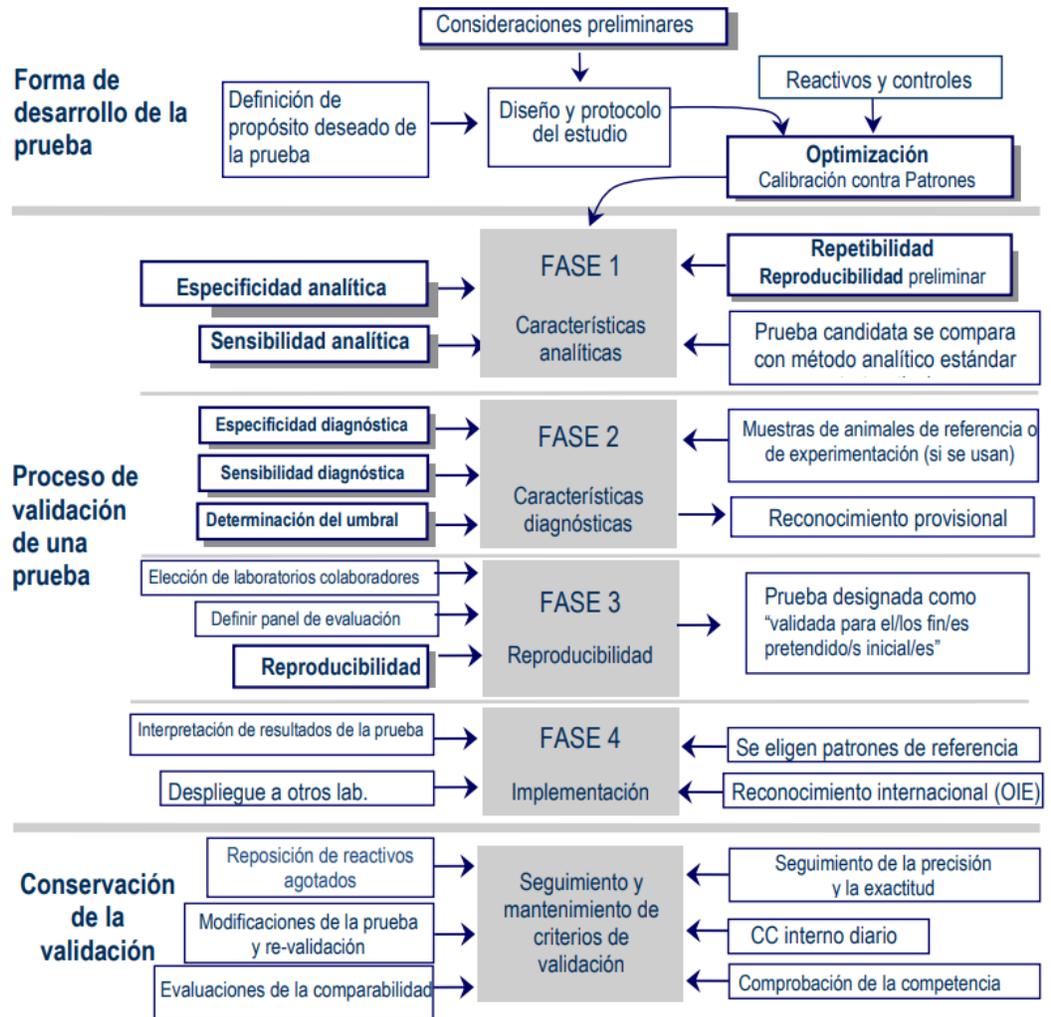
Características de la prueba	Factores que influyen en la idoneidad de la prueba						
	1		2	3	4	5	6
	a	b					
Sensibilidad diagnóstica	+++	+++	+++	+++	+++	+	+
Especificidad diagnóstica	+	+	+	+	+++	+	+++
Valor predictivo positivo	+	+	+	+	+++	+	+++
Valor predictivo negativo	+++	+++	+++	+++	+++	+	+
Capacidad de procesado de muestras por unidad de tiempo	+	+++	++	+	-	++	++
Tiempo necesario para obtener los resultados	+	+	+	+	+++	-	+
Garantía de calidad	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Reproducibilidad	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Repetibilidad	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

**Símbolos:** +++ = esencial; + = menos importante; - = no importante

(OIE, 2018)

Se define como sensibilidad diagnóstica a la capacidad de la prueba para denominar a un individuo enfermo como tal. La especificidad diagnóstica es la proporción de individuos sanos que son clasificados como tal por la prueba diagnóstica. El valor predictivo positivo (VPP) es la probabilidad que tiene un individuo enfermo para ser clasificado como tal por la prueba diagnóstica. El valor predictivo negativo (VPN) es la probabilidad de que un individuo sano sea denotado como tal por la prueba. La reproducibilidad es la capacidad de una técnica diagnóstica para reflejar resultados similares cuando dos diferentes personas aplican el método (Thrusfield & Christley, 2018). La repetibilidad es una característica deseable para las pruebas diagnósticas, es la precisión de resultados cuando la prueba es realizada múltiples veces bajo las mismas condiciones (Everitt, 1995).

En la Figura 8 se describe de manera general las fases necesarias para el desarrollo y validación de una prueba diagnóstica para los animales terrestres.



**Figura 8.** Fases del desarrollo y validación de una prueba diagnóstica (OIE, 2018).

### 2.7.1 Estandarización la prueba.

Es necesario obtener pruebas de control para iniciar la estandarización de pruebas diagnósticas basadas en anticuerpos. De acuerdo con el Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres es necesario obtener sueros de referencia, los cuales son otorgados por laboratorios aprobados por la OIE. En caso de no

existir o no estar disponible dichas muestras, se puede usar una que haya sido clasificada como positiva o negativa mediante al menos dos métodos diagnósticos. Se recomienda utilizar una muestra positiva y una muestra negativa (OIE, 2018).

Los sueros de referencia son para obtener el intervalo de funcionamiento de la prueba diagnóstica, indicando los límites superiores e inferiores. En este intervalo la prueba demuestra precisión y exactitud idóneas. La exactitud es la obtención de un valor analizado próximo al valor real de la muestra. La precisión es el grado de dispersión obtenido en una muestra después de realizar el mismo método múltiples veces (OIE, 2018).

En la estandarización se evalúan cada uno de los parámetros físicos, químicos y biológicos de la prueba, con la finalidad de adaptarse al objetivo deseado. En los parámetros biológicos se considera la matriz en la que se contiene la muestra, incluyendo la presencia de analitos diferentes que pudiesen interferir con el resultado, como lo son las enzimas o las proteínas del suero. Dentro de los parámetros biológicos se incluyen la dilución de la muestra problema y, en el caso de la prueba de ELISA, la dilución del anticuerpo secundario (OIE, 2018).

Los parámetros físicos son relacionados con las características de los tiempos de incubación en la prueba. Finalmente, los parámetros químicos se refieren al ajuste de todos los reactivos utilizados, donde se indique la pureza y el pH de estos (OIE, 2018).

### **III. HIPÓTESIS**

Se puede estandarizar un inmunoensayo ligado a enzima indirecto basado en la proteína CHPV1.9 para el diagnóstico de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*.

## IV. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Desarrollar y estandarizar un Inmunoensayo Ligado a Enzima (ELISA) indirecto basado en la proteína CHPV1.9 para el diagnóstico de la babesiosis bovina causada por *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*.

### 4.2 Objetivos específicos

1. Identificar el porcentaje de identidad de los péptidos de la CHPV 1.9 con respecto a las proteínas de *B. bovis*.
2. Obtener, purificar y cuantificar la proteína quimérica recombinante.
3. Desarrollar la prueba de ELISA indirecta.
4. Estandarizar la prueba de ELISA indirecta.
5. Determinar sensibilidad y especificidad analítica de los sueros positivos a *B. bovis* y *B. bigemina*.

## V. METODOLOGÍA

El proyecto desarrollado en esta tesis fue revisado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro y cuenta con el folio de aprobación 78FCN2020.

### 5.1 Análisis bioinformático de la CHPV 1.9

Se realizó un alineamiento de cada uno de los péptidos de la proteína recombinante en busca de identidad con las proteínas reportadas en *B.bovis*. El análisis fue realizado con la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) del NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) (Altschul, 1990).

En cada uno de los alineamientos se buscó el porcentaje de identidad del péptido de la proteína correspondiente de la CHPV1.9 con esa misma proteína en *B. bovis*, considerando el valor E de cada alineamiento. Finalmente, también se reportó si existe algún porcentaje de identidad con otras Babesias que afecten a los bovinos, así como otros patógenos que afecten a la especie.

A los péptidos alineados en *B. bovis* se les realizó una predicción de epítomos B mediante ABCpred (Saha & Raghava, 2006), Bcepred con sus algoritmos disponibles ((Parker *et al.*, 1986; Karplus & Schulz, 1985; Pellequer *et al.*, 1993; Emini *et al.*, 1985; Kolaskar & Tongaonkar, 1990; Janin & Wodak, 1978; Ponnuswamy *et al.*, 1980) y por Bepipred (Jespersen *et al.*, 2017). Esta predicción se realizó para corroborar que estos péptidos similares a los de la CHPV1.9 son reconocidos por anticuerpos de forma natural.

Por último, las secuencias de *B. bigemina* y de *B. bovis* fueron alineadas para identificar la cantidad máxima de aminoácidos idénticos continuos. Se identificaron los espacios donde el aminoácido es diferente.

### 5.2 Expresión de la CHPV 1.9

La proteína recombinante utilizada en este proyecto, denominada CHPV1.9 fue desarrollada previamente por el Dr. Diego Josimar Hernández Silva como proyecto de doctorado. La proteína se encuentra en espera de patente.

Se descongeló una clona de *Escherichia coli* transformada con el gen *chpv1.9*, se tomaron 25 µl y se incubó en 200 ml de caldo LB adicionado con 100µg/ de ampicilina a 37 °C durante 16 horas, esto para obtener un preinóculo de la bacteria. Al terminar este periodo de tiempo se determinó la densidad óptica (600nm) para garantizar un crecimiento óptimo del preinóculo.

El preinóculo fue adicionado a un biorreactor BIOSTAT-A en un volumen de 4L de caldo LB adicionado con 100µg/ml de ampicilina. Las condiciones del cultivo se mantuvieron constantes a 37°C, pH 6.8 y ua saturación de oxígeno del 40%. Se realizaron lecturas de la densidad óptica del cultivo antes de agregar el preinóculo y cada 30 minutos hasta alcanzar la fase exponencial en el crecimiento. Se tomaron muestras de 15 ml de cultivo las cuales fueron centrifugadas a 15,000g durante 15 minutos con la finalidad de obtener el sedimento y analizarlo por electroforesis en un gel de acrilamida al 12%.

Se indujo la expresión del gen quimérico adicionando L-arabinosa a una concentración final de 0.2%. Se permitió la expresión de la proteína recombinante durante 4 horas y cada 30 minutos se realizó la medición de la densidad óptica del cultivo. De igual forma, se colectaron 15 ml cada 15 minutos para obtener un pellet y analizarlo por un gel de SDS-PAGE.

Al terminar el cultivo bacteriano, el medio de cultivo se centrifugó a 10,000g durante 2 minutos a 4 °C, esto para obtener la biomasa. Se obtuvieron alícuotas de biomasa de 200 ml de medio de cultivo las cuales se congelaron a -20°C para su futura purificación.

### 5.3 Lisis de la biomasa de cultivo

Las alícuotas fueron resuspendidas en tampón de lisis (Tampón lisis: 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-Free, pH 7.5). La lisis de la biomasa fue lograda mediante disrupción por ultrasonido en hielo, esto a 80% de amplitud durante 5 minutos en pulsos de 10 segundos. Posteriormente las muestras se congelaron durante 30 segundos en nitrógeno líquido y se calentaron a 37°C hasta su descongelación. El proceso de disrupción por ultrasonido y congelación se realizó 5 veces.

La muestra lisada fue centrifugada y el sedimento fue lavado tres veces con tampón de lisis con 0.5% de Triton X-100, el sedimento se incubó en agitación durante 30 minutos a 4°C. Después la muestra fue centrifugada y lavada con 3ml de agua inyectable, este proceso se repitió tres veces.

Se resuspendió la muestra en 5ml de agua grado biología molecular con ADNsas (10µg/ml) y se incubó durante 30 minutos a 4°C. Se realizaron 3 ciclos de centrifugación y lavados con agua inyectable.

#### 5.4 Purificación de la CHPV1.9

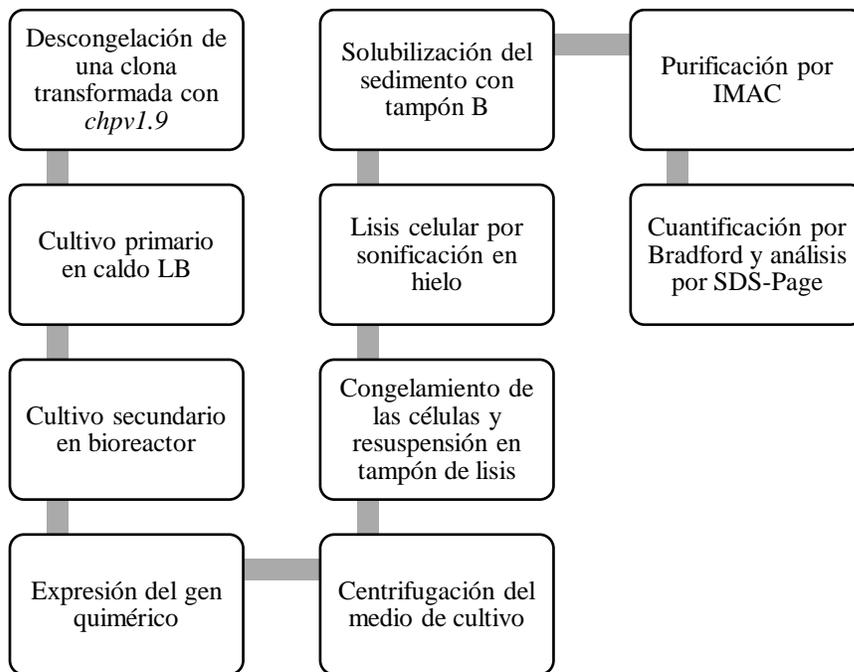
La proteína fue purificada con un equipo de cromatografía líquida (FPLC por sus siglas en inglés). La biomasa lisada fue solubilizada en tampón B (8M urea, 0.5M cloruro de sodio, 20mM tris base, 12mM imidazol, pH 8.3) y filtrada por una membrana de polietersulfona (PES por sus siglas en inglés) de 0.22µm.

La muestra fue cargada al equipo (Äkta pure, Cytiva) y se realizó una cromatografía de afinidad (IMAC por sus siglas en inglés). Se utilizó una columna con afinidad a cola de histidinas (HisTrap<sup>TM</sup> FF 5ml, Cytiva) con volumen total de 5ml. El equilibrio de la columna se realizó con 5 volúmenes de tampón B, después la muestra fue aplicada a la columna.

Se realizó el lavado de la columna para eliminar las proteínas con baja afinidad por la columna de níquel. Esto fue logrado con 5 volúmenes de tampón C (6M urea, 0.5M cloruro de sodio, 20mM tris base, 30mM Imidazol, pH 8.3). Se colectaron 80ml de las proteínas que no se unieron a la columna.

La elusión de la proteína se realizó con 10 volúmenes de tampón D (4M urea, 0.5M cloruro de sodio, 20mM tris base, 150mM imidazol, pH 8.3). Se colectaron 5 fracciones de 5ml de la elusión de la proteína.

Las fracciones obtenidas de la IMAC fueron analizadas en geles de acrilamida al 12% y cuantificadas por el método de Bradford.



**Figura 9.** Diagrama del procedimiento de la obtención de la proteína CHPV1.9

### 5.5 Caracterización de los sueros positivos y negativos a *Babesia* spp

Antes de iniciar el proceso de estandarización del ELISA, se corroboró el estatus positivo/negativo de los sueros a utilizar. Se consideraron animales utilizados en experimentos anteriores en el Laboratorio de Inmunología y Vacunas (LINVAS) de la Universidad Autónoma de Querétaro. Estos animales fueron inmunizados y posteriormente desafiados a *Babesia* spp. Como controles negativos se utilizaron los controles negativos de dichos experimentos y como sueros positivos se usaron los mismos controles 20 días después del desafío con *B. bigemina*.

Se caracterizó un segundo lote de sueros negativos, provenientes de animales de una zona libre de garrapatas, en el estado de Durango.

#### 5.5.1 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Para la prueba de inmunofluorescencia indirecta se tomó como base lo establecido en el Manual de Pruebas de Diagnóstico y Vacunas para los Animales Terrestres (OIE, 2022), capítulo 3.4.2. El antígeno utilizado provino de animales experimentalmente infectados (con

parasitemia del 21%) y tratados para *B. bovis* o *B. bigemina*. La dilución del anticuerpo primario utilizada fue de 1:80 y del anticuerpo secundario en 1:400. Las laminillas se observaron en un microscopio de fluorescencia para emitir el resultado.

#### 5.6 Estandarización del inmunoensayo ligado a enzimas indirecto

Se sensibilizó una microplaca de ELISA (Costar 3590) con dilución decrecientes de proteína recombinante en las columnas de la placa (10, 5 y 2.5 µg/ml, etc.) hasta alcanzar una concentración mínima de 0.009 µg/ml. El antígeno fue preparado en tampón de carbonatos pH 9.6, se adicionaron 100µl por pozo y se dejó incubar a 4 °C durante toda la noche. Se realizaron 3 lavados con tampón de fosfatos Tween-20 al 0.5 % pH 7.4 (PBST).

El bloqueo de la placa se realizó con leche descremada al 5%, adicionando 200µl por pozo e incubando a 37 °C durante una hora. Se realizaron 3 lavados con PBST y se desechó el contenido de los pozos.

Se diluyen los sueros controles a concentraciones decrecientes en las filas de la placa (1:50, 1:100, 1:200, etc), esto hasta alcanzar una dilución de 1:3200. Se agregaron 100 µl por pozo y se incubó a 37 °C durante una hora. Se realizaron 3 lavados con PBST y se desechó el contenido de los pozos.

De anticuerpo secundario se utilizó un anti-IgG de bovino hecho en cabra (Jackson Immunoresearch) a dilución de 1:2000, a razón de 100 µl por pozo. Se incubó a 37 °C durante una hora y se realizaron 3 lavados con PBST.

Para el revelado de la placa se utilizaron 100 µl por pozo de solución reveladora (0.1 M de citrato de sodio, 0.1 M de ácido cítrico, 4 µl de peróxido de hidrógeno). La reacción fue detenida con 100 µl por pozo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1M a distintos tiempos (10, 20, 30 y 40 minutos). La placa fue leída en un lector de placas con una absorbancia de 492 nm.

Se realizaron en total 10 placas con estas condiciones, 5 utilizando el control positivo y las otras 5 utilizando el control negativo, utilizando un esquema tal y como se muestra en la Figura 11.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10µg/ml 1:50	5µg/ml 1:50	2.5µg/ml 1:50	1.25µg/ml 1:50	0.625µg/ml 1:50	0.312µg/ml 1:50	0.156µg/ml 1:50	0.078µg/ml 1:50	0.039µg/ml 1:50	0.019µg/ml 1:50	0.009µg/ml 1:50	0µg/ml 1:50
B	10µg/ml 1:100	5µg/ml 1:100	2.5µg/ml 1:100	1.25µg/ml 1:100	0.625µg/ml 1:100	0.312µg/ml 1:100	0.156µg/ml 1:100	0.078µg/ml 1:100	0.039µg/ml 1:100	0.019µg/ml 1:100	0.009µg/ml 1:100	0µg/ml 1:100
C	10µg/ml 1:200	5µg/ml 1:200	2.5µg/ml 1:200	1.25µg/ml 1:200	0.625µg/ml 1:200	0.312µg/ml 1:200	0.156µg/ml 1:200	0.078µg/ml 1:200	0.039µg/ml 1:200	0.019µg/ml 1:200	0.009µg/ml 1:200	0µg/ml 1:200
D	10µg/ml 1:400	5µg/ml 1:400	2.5µg/ml 1:400	1.25µg/ml 1:400	0.625µg/ml 1:400	0.312µg/ml 1:400	0.156µg/ml 1:400	0.078µg/ml 1:400	0.039µg/ml 1:400	0.019µg/ml 1:400	0.009µg/ml 1:400	0µg/ml 1:400
E	10µg/ml 1:800	5µg/ml 1:800	2.5µg/ml 1:800	1.25µg/ml 1:800	0.625µg/ml 1:800	0.312µg/ml 1:800	0.156µg/ml 1:800	0.078µg/ml 1:800	0.039µg/ml 1:800	0.019µg/ml 1:800	0.009µg/ml 1:800	0µg/ml 1:800
F	10µg/ml 1:1600	5µg/ml 1:1600	2.5µg/ml 1:1600	1.25µg/ml 1:1600	0.625µg/ml 1:1600	0.312µg/ml 1:1600	0.156µg/ml 1:1600	0.078µg/ml 1:1600	0.039µg/ml 1:1600	0.019µg/ml 1:1600	0.009µg/ml 1:1600	0µg/ml 1:1600
G	10µg/ml 1:3200	5µg/ml 1:3200	2.5µg/ml 1:3200	1.25µg/ml 1:3200	0.625µg/ml 1:3200	0.312µg/ml 1:3200	0.156µg/ml 1:3200	0.078µg/ml 1:3200	0.039µg/ml 1:3200	0.019µg/ml 1:3200	0.009µg/ml 1:3200	0µg/ml 1:3200
H	10µg/ml Sin suero	5µg/ml Sin suero	2.5µg/ml Sin suero	1.25µg/ml Sin suero	0.625µg/ml Sin suero	0.312µg/ml Sin suero	0.156µg/ml Sin suero	0.078µg/ml Sin suero	0.039µg/ml Sin suero	0.019µg/ml Sin suero	0.009µg/ml Sin suero	0µg/ml Sin suero

**Figura 10.** Diagrama de la estandarización del iELISA (Concentración de proteína y dilución de anticuerpo primario).

Una vez determinada la concentración de la CHPV1.9, la dilución del anticuerpo primario y el tiempo de revelado se realizó un nuevo experimento, esta vez usando 9 réplicas de cada uno de los sueros por placa.

#### 5.6.1 Determinación de la robustez de la prueba.

Una vez estandarizada la técnica, se modificaron la concentración de leche durante el bloqueo, la utilización de otra marca de microplaca, el lote de anticuerpo secundario y la utilización de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N como solución de paro. Las condiciones de la técnica se mantuvieron constantes durante cada prueba.

Al utilizar H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N como solución de paro, la absorbancia de la placa se leyó a 490nm de longitud de onda.

### 5.6.2 Análisis estadístico de datos.

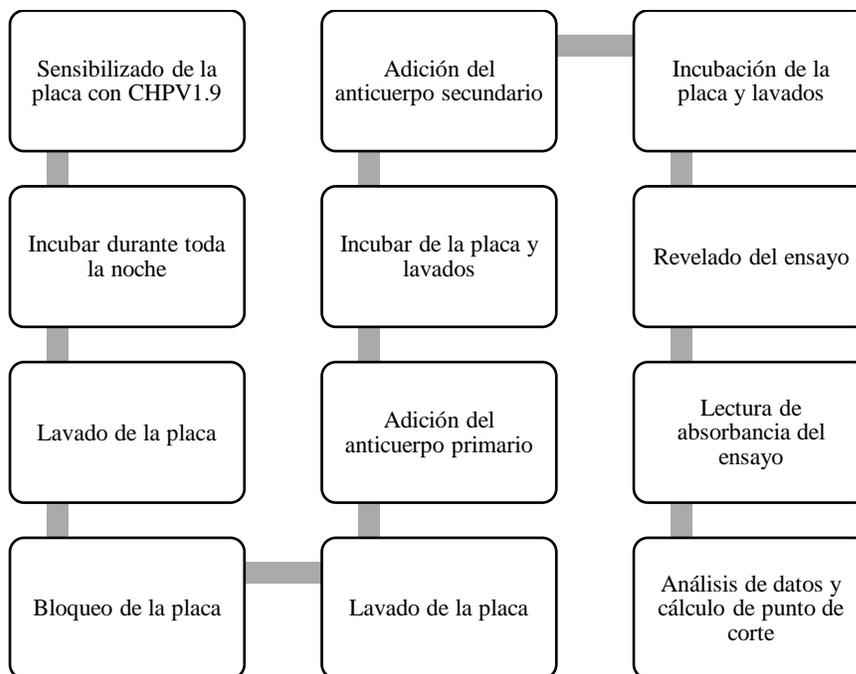
#### Software utilizado

Los datos de las placas fueron leídos a través del programa MPM 6 y los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prism 8.0 y con SPSS. Se calculó el punto de corte de cada placa considerando los controles negativos, el cual se expresó de la siguiente manera:

$$PC = \bar{x} + 3\sigma$$

Donde,  $\bar{x}$  es la media de los valores del control negativo obtenidos en la placa y  $\sigma$  es la desviación estándar del suero del control negativo de referencia.

De esta manera se consideraron a todos los sueros por debajo de este punto de corte como negativos a la presencia de anticuerpos contra *B. bovis* y *B. bigemina*. Se determinó el parámetro como óptimo en donde la diferencia de absorbancias entre los sueros negativos y positivos fue significativa. Como segundo criterio se determinó la magnitud de esta diferencia.



**Figura 11.** Diagrama de flujo de la estandarización del iELISA.

5.7. Determinar sensibilidad y especificidad analítica de los sueros con anticuerpos contra *B. bovis* y *B. bigemina*.

La determinación de la sensibilidad analítica se realizó a través de diluciones seriadas de los sueros controles, hasta determinar el punto en el que los sueros positivos y negativos no tuvieran diferencias significativas.

Tras la estandarización de la técnica se realizaron varios ensayos con sueros de bovino que forman parte del inventario del Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA). Estos sueros fueron previamente evaluados por IFI en el Centro.

Los resultados obtenidos en la iELISA basada en la proteína CHPV1.9 se compararon con los resultados dentro del propio CENAPA realizando un cuadro de 2x2. Con este cuadro se obtuvo la sensibilidad y especificidad diagnóstica, valor predictivo positivo y negativo.

Se determinaron dos tipos de corte: el primero utilizando los controles negativos y la fórmula  $PC = \bar{x} + 3\sigma$ . El segundo punto de corte propuesto se determinó utilizando una curva receptor-operador (ROC, por sus siglas en inglés) y las absorbancias medias obtenidas de cada uno de los sueros problemas analizados.

Los valores de sensibilidad diagnóstica, especificidad diagnóstica, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo fueron calculados utilizando el programa EPIDAT 3.1, de la Organización Panamericana de la Salud.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Análisis bioinformático de la CHPV1.9

Tras el alineamiento de cada uno de los péptidos que conforman a la CHPV1.9 se identifica que 8 de los 21 péptidos poseen un porcentaje de identidad con su respectiva proteína de *B. bigemina*. Los porcentajes de identidad abarcan desde el 65 hasta el 89% de la secuencia (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Resultado de los alineamientos de los péptidos de la CHPV1.9.

Proteína	Péptido	Porcentaje de identidad	Predicción de epítomos B
RAP	1	70.59; 68.75	ABCpred; Bcepred; Bepipred
RAP	2	Sin alineamientos	
RAP	3	Sin alineamientos	
RAP	4	Sin alineamientos	
RAP	5	Sin alineamientos	
HAP	1	65.2	ABCpred; Bcepred; Bepipred
HAP	2	88.9	ABCpred; Bepipred
SBP	1	Sin alineamientos	
SBP	2	Sin alineamientos	
SBP	3	Sin alineamientos	
SBP	4	Sin alineamientos	
RON	1	87.5 *	ABCpred; Bcepred; Bepipred
RON	2	82.61*	ABCpred, Bepipred
MIC	1	Sin alineamientos	
MIC	2	Sin alineamientos	
MIC	3	Sin alineamientos	
AMA	1	68.4 *	ABCpred; Bcepred; Bepipred
AMA	2	Sin alineamiento	
AMA	3	80	ABCpred; Bepipred
AMA	4	Sin alineamiento*	
AMA	5	88.24*	ABCpred; Bcepred; Bepipred

De los péptidos con porcentaje de identidad entre *B. bigemina* y *B. bovis*, solo los péptidos 1 de HAP-2, el péptido 2 de RON-2 y el péptido 3 de AMA-1 fueron predichos como epítomos B por ABCpred y Bepipred. Los otros 5 péptidos con identidad fueron predichos como epítomos B por los tres programas utilizados. Las herramientas de

bioinformática han permitido el desarrollo de nuevos productos, como lo son vacunas y métodos de diagnóstico. En algunos casos, estas herramientas han permitido mejorar algunas características de estos productos, como lo son la sensibilidad y especificidad en el caso de pruebas diagnósticas (Wang *et al.*, 2014; Ranjbar *et al.*, 2019).

Las herramientas bioinformáticas ayudan a la predicción de epítos inmunodominantes, además de la evaluación de la antigenicidad de estos. Con esta información puede generarse una proteína quimérica (Dai *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014).

Se han utilizado proteínas quiméricas para la detección de anticuerpos específicos contra *Toxoplasma gondii*. Los anticuerpos específicos en los sueros fueron capaces de unirse a diferentes antígenos quiméricos utilizados por separado (Ferra *et al.*, 2015; Holec-Gasior *et al.*, 2019).

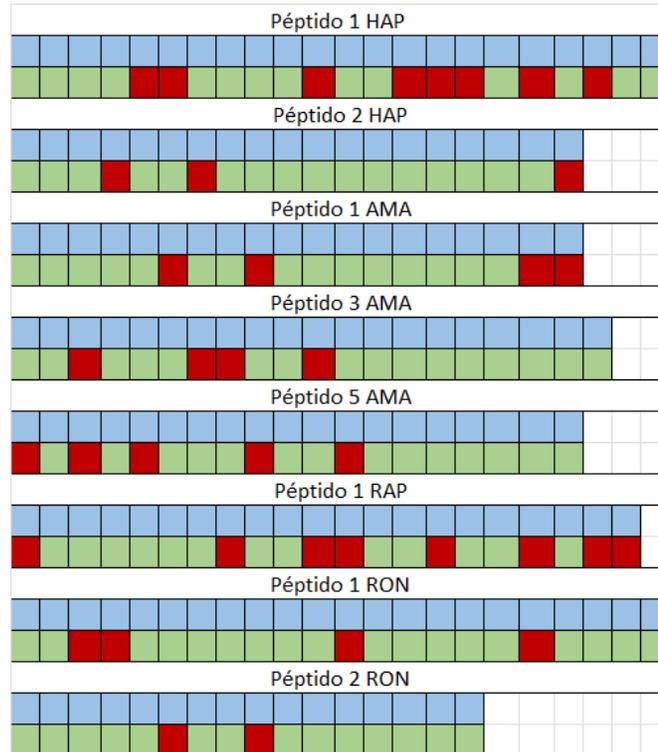
El péptido 1 de RON-2 comparte el 87.5% de identidad con *B. divergens* y *B. orientalis*. El péptido 2 de RON-2 comparte el 91.3% de identidad con *B. orientalis* y el 86.96% con *B. divergens*. El péptido 1 de AMA-1 comparte el 73.68% de identidad con *B. divergens*. El péptido 4 de AMA-1 comparte el 63.16% de identidad con *B. divergens*. El péptido 5 de AMA-1 comparte el 88.24% de identidad con *B. orientalis*.

Realizando análisis filogenéticos usando el gen 18S de RNA ribosomal, se han identificado 6 linajes diferentes de *Babesia* spp. Las babesias que afectan a los bovinos (*B. bovis*, *B. bigemina* y *B. divergens*) fueron clasificadas en el linaje seis. No obstante, *B. bovis* y *B. bigemina* se clasificaron en diferentes clados del árbol filogenético, lo que indica una divergencia entre ambas especies (Criado-Fornelio *et al.*, 2003; Schnittger *et al.*, 2020). Esto explica la baja cantidad de péptidos con identidad entre ambas especies. Los péptidos con identidad pueden tratarse de regiones conservadas de las proteínas, necesarias para su función.

En el cuadro 3 se representan los aminoácidos idénticos continuos al alinear las secuencias de péptidos reportadas en *B. bovis* con su homóloga de la CHPV1.9 proveniente de *B. bigemina*. En color azul se señala la longitud del péptido en la CHPV1.9, en verde la

localización de un aminoácido idéntico en ambas secuencias y en rojo en donde el aminoácido es diferente en ambas secuencias.

**Cuadro 3.** Aminoácidos idénticos entre la CHPV1.9 y las secuencias reportadas en *B. bovis*.



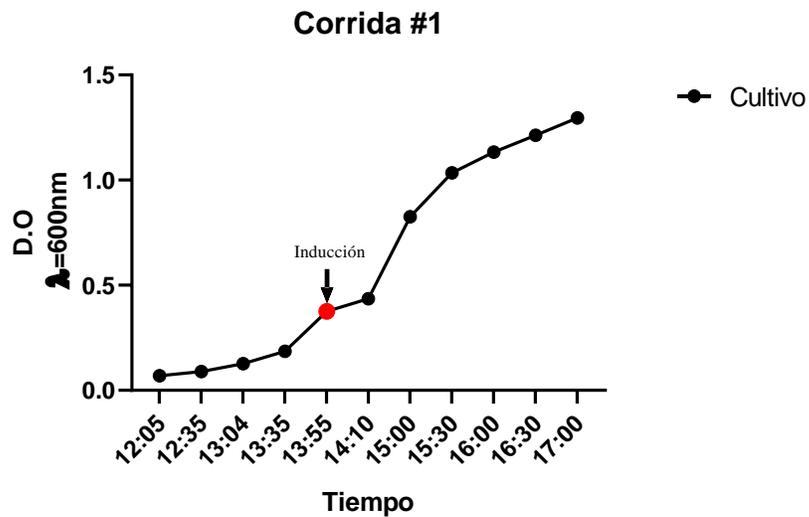
Como se puede apreciar hay diferencias entre el número de identidades continuas entre cada péptido. El máximo de aminoácidos continuos fue de 11 y el mínimo de solo 1.

La región variable de los anticuerpos reconoce entre 15-20 aminoácidos en su sitio de unión a antígeno (Weis & Carnahan, 2017; Punt *et al.*, 2020), no obstante, entre 4-8 residuos son los encargados de establecer una unión entre el antígeno y el anticuerpo (Weis & Carnahan, 2017). Los anticuerpos producidos durante una infección natural con *B. bovis* pueden identificar a la CHPV1.9, ya que los péptidos de la proteína recombinante comparten identidad con las proteínas de *B. bovis*. Además, las proteínas con identidad son inmunogénicas en el bovino.

## 6.2 Obtención, purificación y cuantificación de la proteína quimérica recombinante.

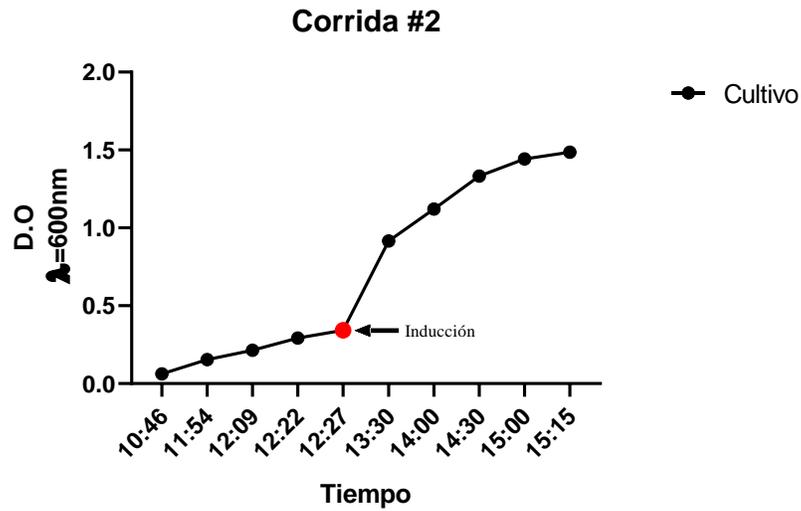
### 6.2.1 Obtención de la CHPV1.9

Se realizaron 3 corridas diferentes en el biorreactor. La primera corrida fue realizada en un volumen total de 2.5L, el preinóculo alcanzó una densidad óptica de 1.74 y se agregaron 30ml del mismo al inicio del cultivo. La inducción se realizó a las 2 horas después del inicio del cultivo y se indujo la producción de la CHPV1.9 durante 3 horas antes de coleccionar la biomasa (Figura 12).



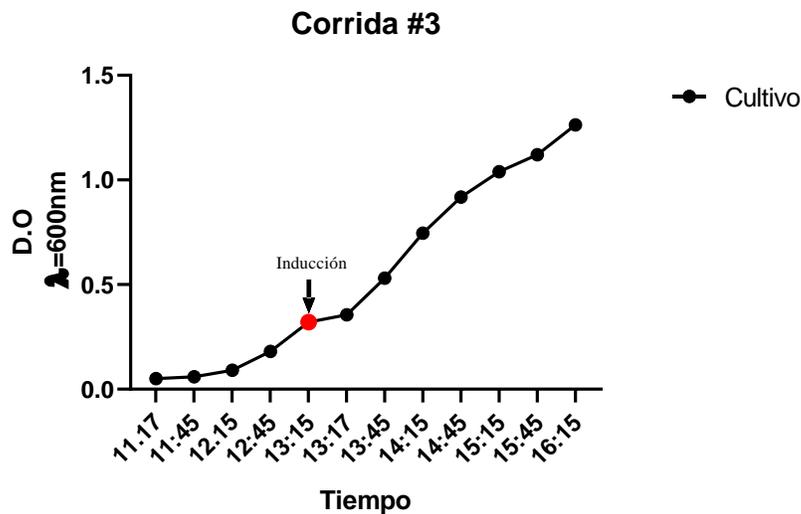
**Figura 12.** Corrida 1 de CHPV1.9.

La segunda corrida se realizó en un volumen de 4.5L, la densidad óptica del preinóculo fue de 1.5 y se agregaron 90ml del mismo al inicio del cultivo. La inducción de la producción de la proteína recombinante ocurrió 2 horas y 20 minutos después del inicio del cultivo, después de esto se dejó fermentar el cultivo por 3 horas y finalmente se recolectó la biomasa (Figura 13).



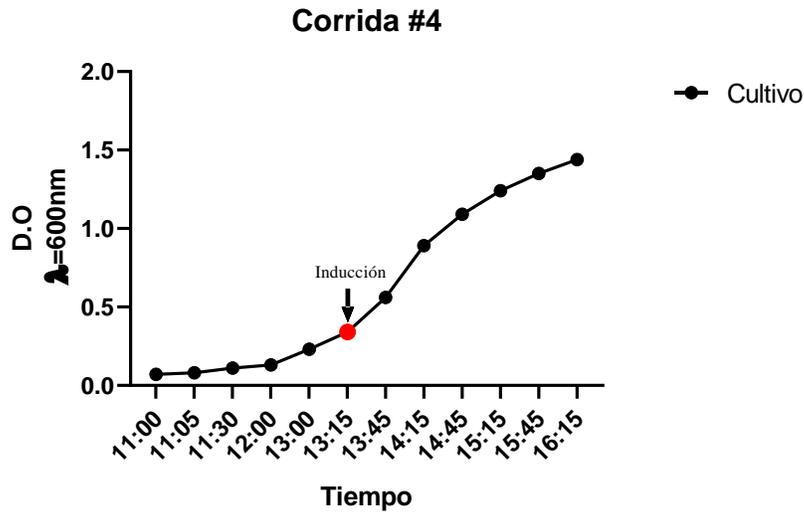
**Figura 13.** Corrida 2 de CHPV1.9.

En la corrida número 3 del biorreactor se utilizaron 4.5L de medio de cultivo. El preinóculo alcanzó una densidad óptica de 1.55, se agregaron 80ml de este al inicio del cultivo. La inducción para la producción de la proteína recombinante ocurrió 2 horas después del inicio del cultivo. Posterior a eso, el cultivo fermentó por 3 horas más antes de recolectar la biomasa (Figura 14).



**Figura 14.** Corrida 3 de CHPV1.9.

La última corrida del biorreactor se realizó en 4.5L de cultivo. La absorbancia del preinóculo alcanzó 1.708 y se agregaron 50ml al tanque del equipo. La inducción con L-arabinosa 0.2% se inició tras 2 horas y 15 minutos de cultivo. Se permitió expresar la CHPV1.9 durante 3 horas antes de colectar la biomasa (Figura15).



**Figura 15.** Corrida 4 de CHPV1.9

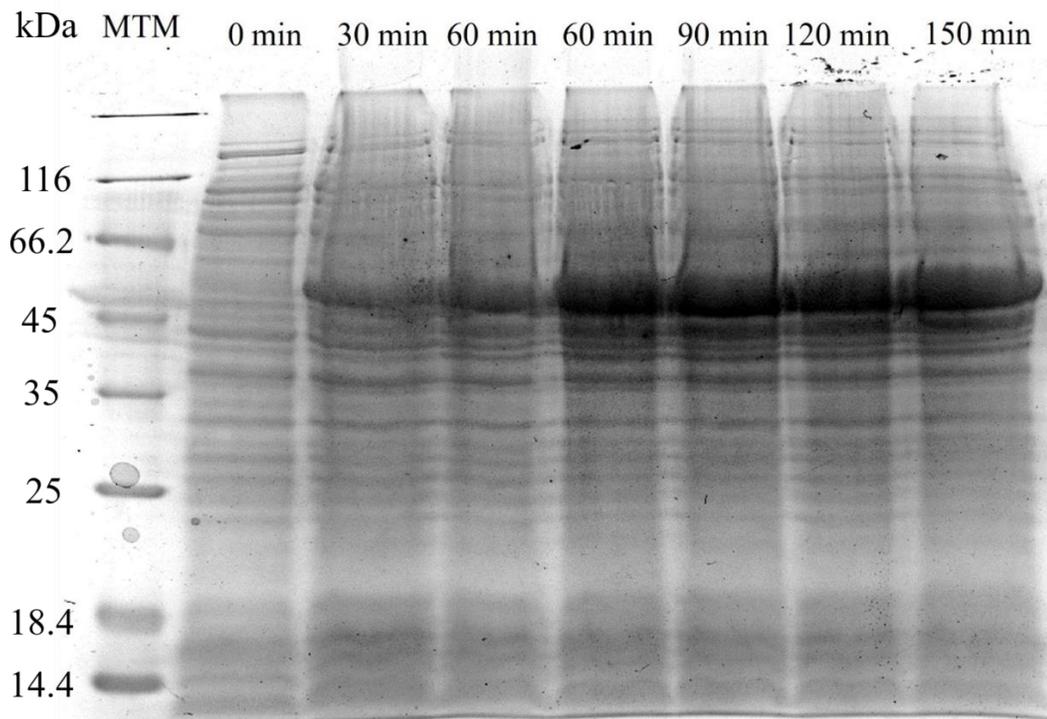
El cultivo de *E. coli* para la producción de proteínas recombinantes es el mayormente utilizado por el alto rendimiento obtenido en cultivos líquidos. Una estrategia común es la obtención de la mayor cantidad de biomasa posible, lo que abarata el costo de producción de proteínas heterólogas (Shiloach & Fass, 2005).

Se han tratado de establecer fórmulas matemáticas para predecir el comportamiento de los cultivos bacterianos (Monod, 1949). No obstante, es complicado mantener los medios de cultivo con una concentración de nutrientes constante, por lo que la aplicación de un modelo matemático no es viable (Ziegler, *et al.*, 2021). Dentro de un cultivo bacteriano, las bacterias se adaptan constantemente a la disminución de nutrientes disponibles y modifican su tasa de crecimiento, la capacidad de adaptación se ve afectada principalmente por el transporte de nutrientes, permeabilidad de la membrana y la concentración de glucosa en el medio (Ferenci, 1999).

A pesar de estos factores, en las corridas del biorreactor se observan curvas de crecimiento similares (Figuras 12-15). Esto se debe a que todas las corridas provienen de un mismo lote de *E. coli* transformada, con características idénticas entre ellas. La diferencia entre las curvas radica en la cantidad de pre-inóculo agregado a cada corrida del biorreactor, la concentración de bacterias entre cada una es diferente y estas consumen los nutrientes a distintas velocidades, derivado de esta concentración.

Como alternativa para mejorar el rendimiento de biomasa de cultivo y estandarizar el crecimiento bacteriano, se han implementado estrategias como la producción en lote y en diálisis (Shiloach & Fass, 2005). La producción en lote consiste en la adición lenta de la glucosa (o el carbohidrato de elección para el medio de cultivo) para mantener una misma concentración durante todo el cultivo, el cual debe ser estandarizado por cada lote de bacterias (Shiloach & Bauer, 1975; Matsui *et al.*, 1989; Korz *et al.*, 1995; Horn *et al.*, 1996). El cultivo en diálisis consiste en la movilización de nutrientes a través de una membrana semi-permeable, lo que ocasiona un equilibrio y mantiene una misma concentración en el medio (Gallup & Gerhardt, 1963; Nakano *et al.*, 1997; Pörtner & Märkl, 1998).

En la figura 16 se aprecian los resultados de la separación de proteínas por electroforesis en gel de acrilamida al 12% de los sedimentos obtenidos durante una corrida del biorreactor. Se aprecia una banda de talla aproximada a los 50kDa a partir de los 30 minutos post-inducción. En el sedimento antes de inducir no se aprecia esta banda, lo que significa que la CHPV1.9 fue expresada en el momento deseado del cultivo.



**Figura 16.** Gel de acrilamida de la expresión de la CHPV1.9. 0 min: cultivo antes de agregar el inductor. 30-150 min: cultivo durante la expresión de la CHPV1.9. Se observa una banda de talla aproximada a los 50 kDa en el cultivo después de agregar el inductor. La banda corresponde a la talla predicha de la CHPV1.9

Cuando una proteína recombinante no se pliega correctamente después de ser expresada se almacena en cuerpos de inclusión, lo que requiere de una futura lisis de la biomasa y la purificación de esta (Singh & Panda, 2005). Para poder purificar la proteína dentro de los cuerpos de inclusión, es necesario desnaturalizar por completo las proteínas. El proceso de repliegamiento es dependiente de la proteína de la que se trate, este paso es de vital importancia si se quiere mantener la función biológica de la proteína recombinante (Singh & Panda; Overton, 2014).

La CHPV1.9 se expresa en cuerpos de inclusión dentro de *E. coli*, es por este motivo de la elección de los tampones para la purificación por afinidad. No se realizó el repliegamiento de la proteína ya que por naturaleza la CHPV1.9 está compuesta por péptidos

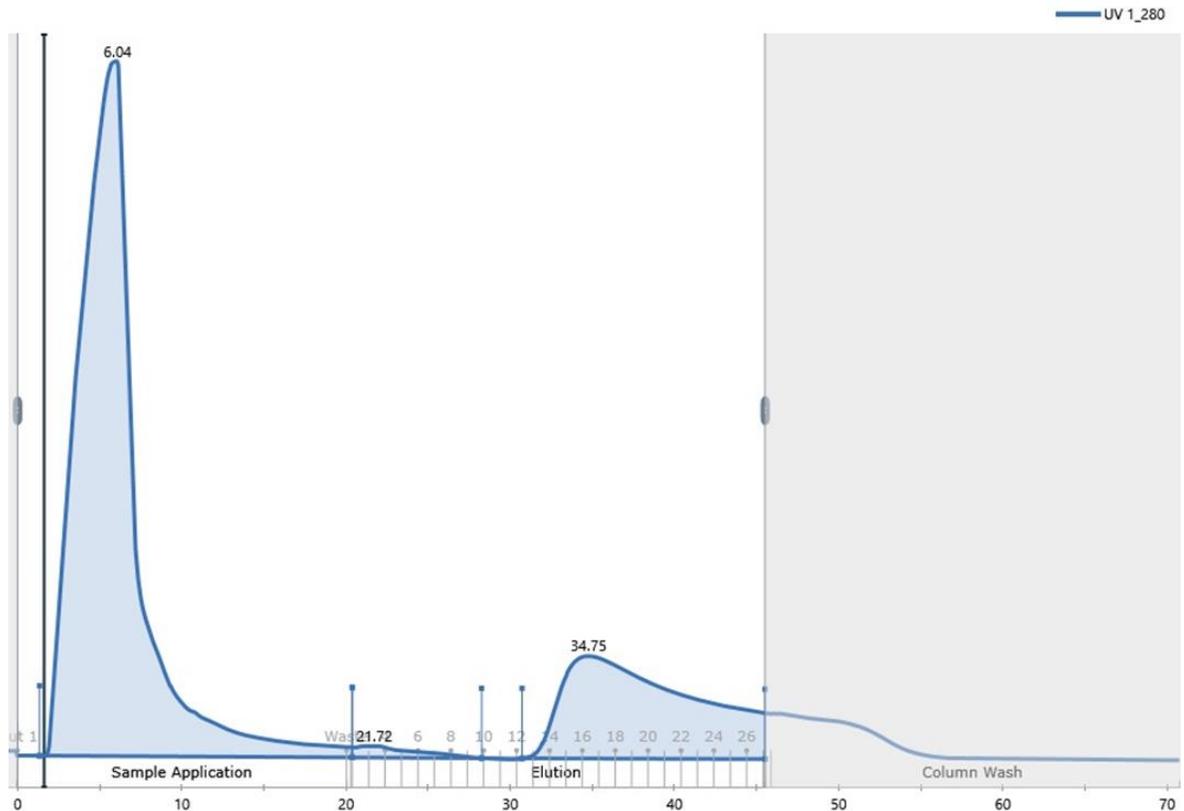
que son identificados de manera individual y una estructura terciaria de la proteína podría ocultar algunos epítomos dentro de la CHPV1.9.

Para evitar la formación de los cuerpos de inclusión se puede optimizar la concentración del inductor que permite la expresión de la proteína recombinante (Baneyx & Mujacic, 2004; Overton, 2014). Otra estrategia es la optimización de la temperatura de cultivo durante la inducción (Sorensen & Mortensen, 2005). Algunos autores (Amrein *et al.*, 1995; Nishihara *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2013) recomiendan la co-expresión de proteínas chaperonas junto a la proteína recombinante, de forma que se mejore el plegamiento de la proteína.

Los parámetros mencionados arriba deben de ser optimizados para el cultivo y expresión de la CHPV1.9, con la finalidad de obtener una proteína soluble y evitar la utilización de urea para solubilizar los cuerpos de inclusión.

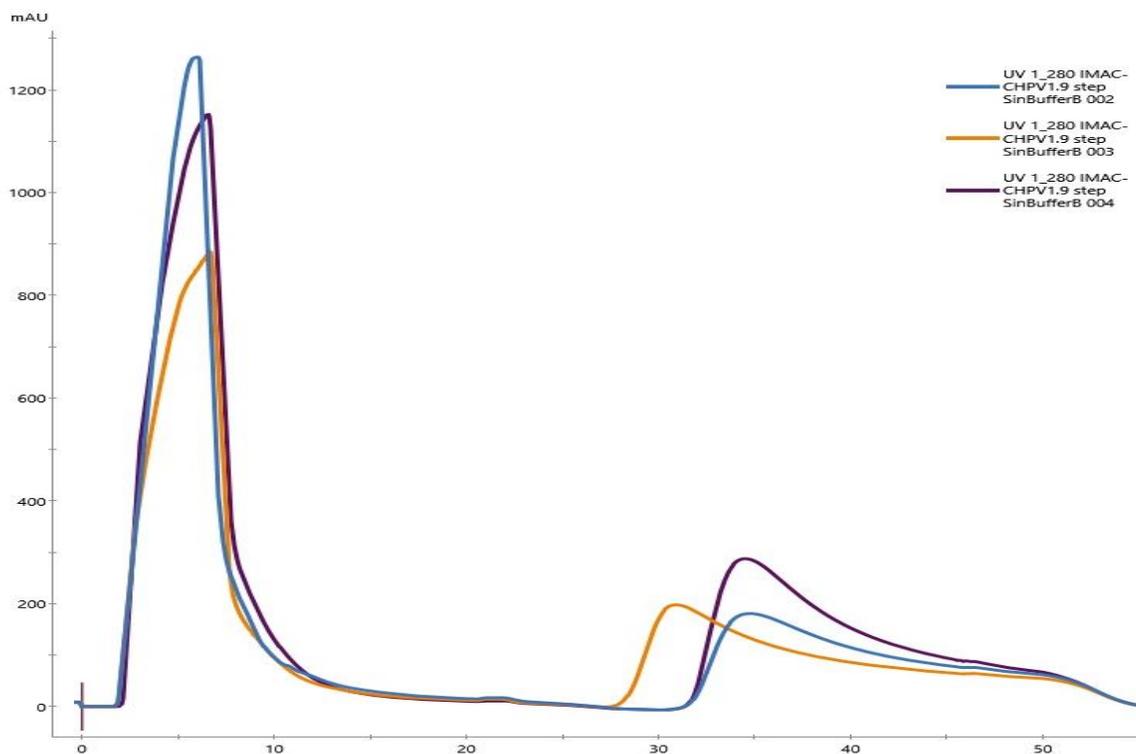
#### 6.2.2 Purificación de la CHPV1.9

Se recuperaron los cromatogramas de las purificaciones en el equipo, con la finalidad de comparar las corridas entre ellas. La Figura 17 muestra la primera purificación de la CHPV1.9. El cromatograma representa la lectura a una densidad óptica de 280nm de longitud de onda en el eje de las ordenadas y los volúmenes de columna (VC=5ml) aplicados durante la purificación en el eje de las abscisas.



**Figura 17.** Cromatograma de purificación de CHPV1.9. Se observa un aumento en la absorbancia a partir de la elusión 13, indicando la liberación de la CHPV1.9 de la columna.

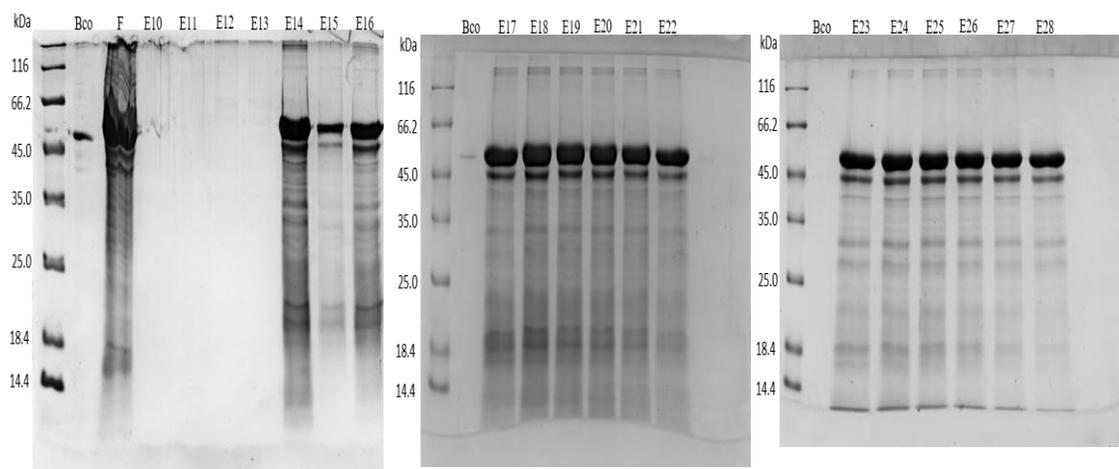
Durante la aplicación de la muestra (2VC) se aprecia un incremento de la absorbancia en el cromatograma, que representa a las proteínas de *E. coli* que no se unieron a la columna de afinidad. Los VC 3 y 4 (10-20ml de flujo en la purificación) corresponden al lavado de la columna para eliminar a las proteínas con baja afinidad a las perlas de níquel. Por último, a partir del VC 5 se observan las absorbancias correspondientes a la elusión de la proteína. Se aprecia que a partir de la Elusión 14 (tras pasar 2 VC de tampón de elusión por la columna) hay un pico en la absorbancia, que corresponde a la elusión de la CHPV1.9 de la columna.



**Figura 18.** Resumen de las purificaciones de la CHPV1.9. Se aprecia un patrón similar en la elusión de la CHPV1.9 en diferentes purificaciones. La curva de elusión es similar, con un pico al inicio que después disminuye.

En la Figura 18 se presentan los cromatogramas de las distintas purificaciones de la CHPV1.9. Se aprecia el mismo patrón en el lavado de la columna. En las eluciones aparece el mismo patrón, con la diferencia en la elusión en la que comienza a aparecer la CHPV1.9.

En los geles de acrilamida (Figura 19) se observa principalmente una banda de talla molecular de 50 kDa, la cual corresponde a la talla predicha de la CHPV1.9. No obstante, algunas proteínas con histidinas provenientes de *E. coli* fueron co-purificadas con la proteína de interés.



**Figura 19.** Geles de acrilamida con la CHPV1.9 purificada por IMAC. Se observa una banda de talla aproximada a los 50 kDa a partir de la elusión 14 durante la purificación de la CHPV1.9. Concuerda con los resultados obtenidos en el cromatograma. Figura A. Bco: sobrenadante de cultivo. F: proteínas de sobrepaso en la columna. E10-11: Elusiones. Figura B. E17-22: elusiones. Figura C. E23-28: Elusiones.

La histidina es el aminoácido con mayor afinidad a iones metálicos, como el cobre, níquel, cobalto o zinc (Janson & Rydén, 1998). En menor grado, los residuos de triptófano y cisteína interaccionan con estos iones metálicos (Porath *et al.*, 1975). Los grupos funcionales con mayor afinidad a los iones de níquel son el imidazol y el indol (Arnold, 1991).

Las co-purificaciones obtenidas durante la cromatografía de afinidad pudieran deberse a proteínas de *E. coli* con residuos de histidina, triptófano y/o cisteína, las cuales interaccionan con los iones de níquel de la columna. Estas interacciones no deseadas son de menor afinidad que las de la CHPV1.9 con su cola de histidinas.

Las proteínas en una cromatografía de afinidad son eluidas con imidazol. La concentración de imidazol requerida para liberar una proteína de la columna es dependiente de la interacción de la proteína con los iones de la columna (Terpe, 2003).

Las co-purificaciones de la cromatografía pueden ser eliminadas utilizando una mayor concentración de imidazol en el tampón de equilibrio, para evitar la interacción de

proteínas de baja afinidad con la columna. De igual forma, se pueden eliminar optimizando la concentración de imidazol a la cual la CHPV1.9 es eluída de la columna.

La adición de una cola de histidina puede provocar la expresión de las proteínas recombinantes de forma insoluble, promoviendo la formación de cuerpos de inclusión (Bird *et al.*, 2002; Woestenenk *et al.*, 2004). La cola de histidinas presente en la CHPV1.9 podría ser uno de los factores que promueven la formación de cuerpos de inclusión durante la expresión de la proteína recombinante.

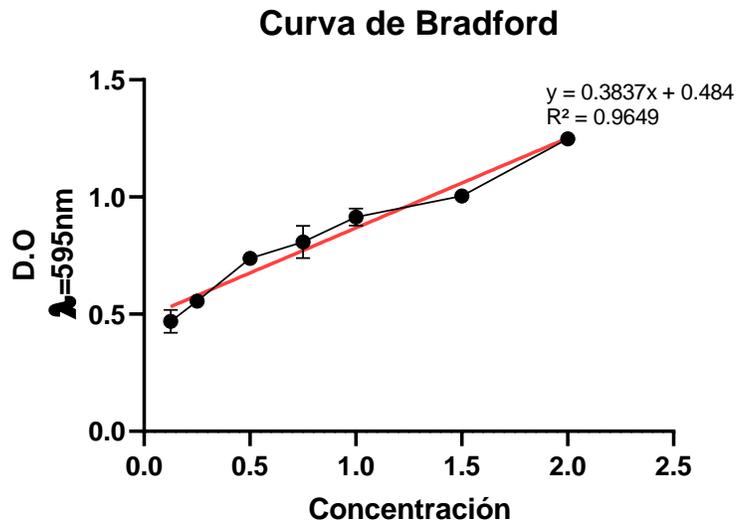
### 6.2.3 Cuantificación de la CHPV1.9.

El coeficiente de correlación de la curva estándar fue de 96.4%, por lo que el resultado es fiable (Bradford, 1976) (Figura 20).

La muestra tuvo una absorbancia de 0.8688, al sustituir en la fórmula se obtuvo una concentración 1003  $\mu\text{g/ml}$ .

$$\text{Concentración} = \frac{0.8688 - 0.484}{0.3837}$$

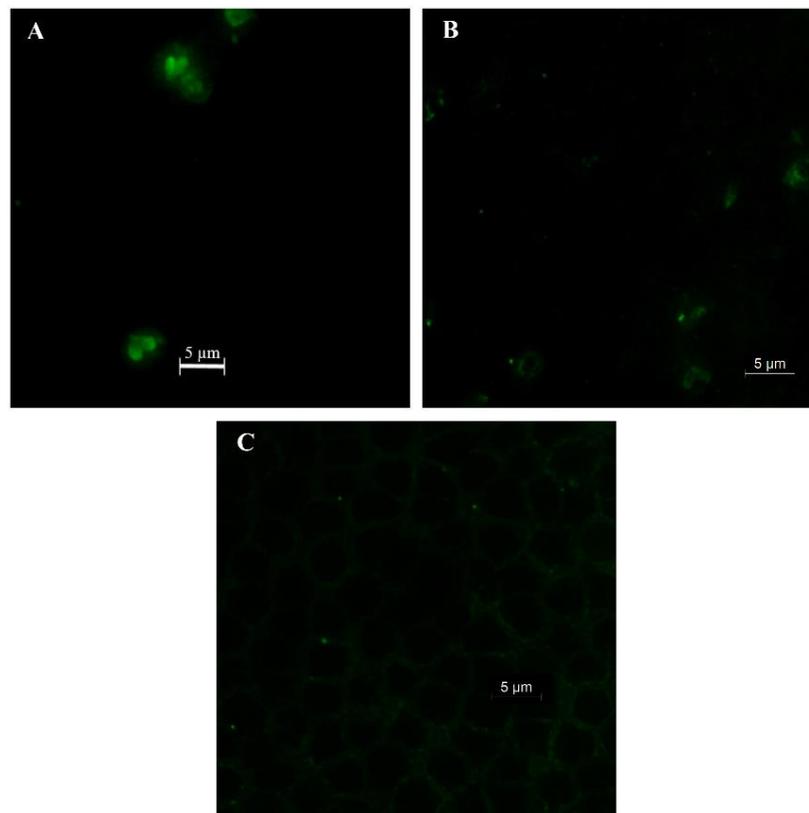
$$\text{Concentración} = 1003 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$$



**Figura 20.** Cuantificación de la CHPV1.9.

### 6.3 Caracterización de los sueros positivos y negativos a *Babesia* spp.

Se evaluaron distintos sueros de bovinos por inmunofluorescencia indirecta (IFI). Dichos sueros corresponden al repertorio de muestras del Laboratorio de Inmunología y Vacunas (LINVAS). De estos sueros, se utilizaron en la estandarización de la técnica muestras del mismo animal, con número de identificación 8028. Este animal perteneció a un experimento para evaluar la proteína CHPV1.9 como candidato vacunal. El animal 8028 pertenece al grupo control de tal experimento. Se utilizó el suero preinmune de este animal como control negativo y el suero post-desafío con *B. bigemina* como control positivo. Se seleccionó este animal tras realizarse el diagnóstico del parásito a través de IFI. También se seleccionó como control negativo a un animal proveniente de una zona libre de garrapatas, del estado de Durango, el cual resultó negativo por IFI (Figura 21).



**Figura 21. Caracterización de sueros contra *Babesia* spp.** Panel A. Animal 8028, suero post-desafío. Panel B. Animal 8028 suero pre-inmune. Panel C. Animal 0560, Durango. Aumento 100x.

También se utilizaron en la estandarización sueros positivos a *B. bigemina* y *B. bovis* (sueros separados) derivados de infecciones experimentales. Los sueros fueron donados por el Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA).

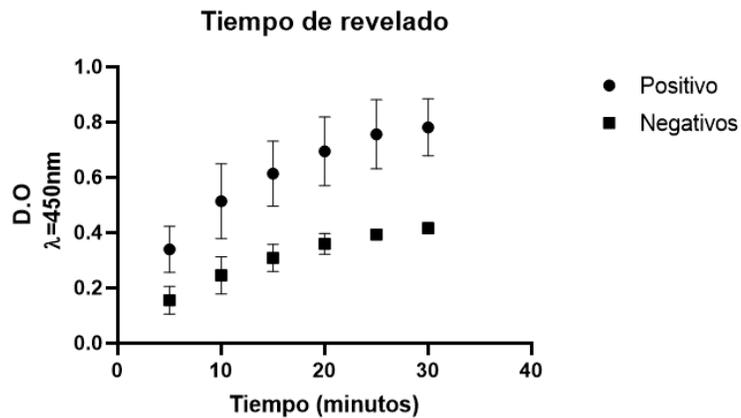
La inmunofluorescencia indirecta (IFI) es el método de diagnóstico serológico más común para la babesiosis bovina y es el recomendado por la OIE (Beugnet & Moreau, 2015; Vannier *et al.*, 2015; OIE, 2018).

#### 6.4 Estandarización del inmunoensayo ligado a enzima indirecto

Se compararon los resultados de las placas de acuerdo con la Figura 10 (página 36) para determinar el tiempo óptimo de revelado, concentración de la CHPV1.9 y la dilución del anticuerpo primario.

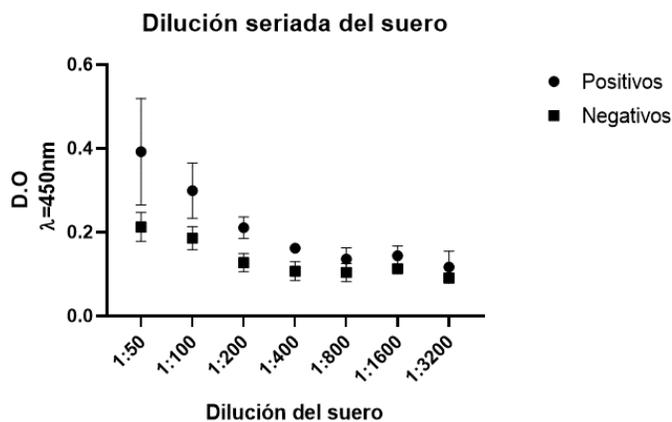
En la figura 22 se observan los resultados obtenidos a diferentes tiempos de revelado de la placa. El tiempo óptimo de revelado fue a los 30 minutos, ya que la absorbancia sigue aumentando hasta este tiempo.

El desarrollo de color en un análisis colorimétrico es dependiente de la prueba, por lo que no existe un valor estándar para todas los ELISA's (Crowther, 2004; Hnasko, 2015). Jaramillo-Ortíz *et al.*, (2018) establecieron una lectura de 20-30 minutos para su iELISA con proteína recombinante, mientras que Praud *et al.*, (2012) establecieron la lectura después de 15 minutos. El-Sayed *et al.*, (2019) realizaron la lectura de su iELISA a los 60 minutos de desarrollo de color, esto al usar ABTS como sustrato de la técnica.



**Figura 22.** Determinación del tiempo de revelado de la técnica.

En la figura 23 se presentan los resultados de comparar las diferentes diluciones de suero a los 30 minutos de revelado. La diferencia entre positivos y negativos al usar una dilución 1:50 no fue significativa ( $p=0.0767$ ). La diferencia al usar la dilución 1:100 tampoco fue significativa ( $p=0.0515$ ). La diferencia al utilizar una dilución de 1:200 no fue significativa ( $p=0.0122$ ). Al usar una dilución de 1:400 no hay diferencias significativas entre positivos y negativos ( $p=0.0133$ ). A partir de la dilución 1:1600 aumenta el valor de  $p$  ( $p=0.1814$ ), por lo que no se analiza el resto de las diluciones. Se selecciona la dilución de suero de 1:400 al ser la que presenta menos variabilidad y el valor de  $p$  es muy cercano al 0.01. La dilución 1:100 es sugerente a ser utilizada en la técnica.



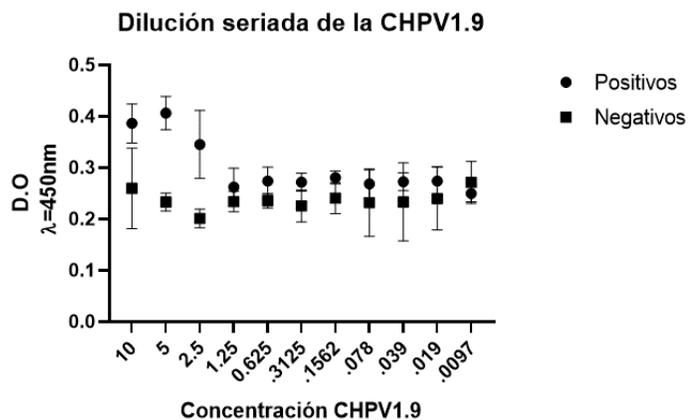
**Figura 23.** Determinación de la dilución del anticuerpo primario en la técnica.

La iELISA desarrollada por Vijaykumar *et al.*, (2021) para el diagnóstico de *Babesia gibsoni* en perros utiliza una dilución del suero de 1:200, punto en donde los controles obtuvieron diferencias mayores. Jaramillo-Ortíz *et al.*, (2018) determinó una dilución del suero de 1:50, esto después de pre-adsorber las muestras con lisado de *E. coli*.

Al utilizar proteínas recombinantes de *Brucella canis* para el diagnóstico de brucelosis en humanos y perros se utiliza una dilución del suero de 1:500. La dilución de los sueros problema fue realizada con tampón de bloqueo (Sánchez-Jiménez *et al.*, 2020).

Otras ELISA's desarrolladas para la identificación de animales expuestos a *B. bigemina* y *B. bovis* utilizan una dilución del suero de 1:100 (El-Sayed *et al.*, 2019; Santamaría *et al.*, 2020).

En la figura 24 se representan los resultados de la comparación entre concentraciones de la CHPV1.9 en la placa. Esto utilizando el anticuerpo primario 1:400 y un tiempo de revelado de 30 minutos. La diferencia entre medias del control positivo y negativo utilizando la CHPV1.9 en 10µg/ml no fue significativa ( $p=0.0656$ ). Al utilizar una concentración de 5µg/ml existen diferencias significativas entre las medias ( $p=0.0012$ ). Al comparar una concentración de 2.5µg/ml no hay diferencias significativas entre el control positivo y el negativo ( $p=0.0219$ ). A partir de 1.25µg/ml de CHPV1.9 el valor de  $p$  ya no es significativo ( $p=0.3036$ ), por lo que no son evaluadas el resto de las concentraciones.



**Figura 24.** Determinación de la concentración de CHPV1.9 en la técnica.

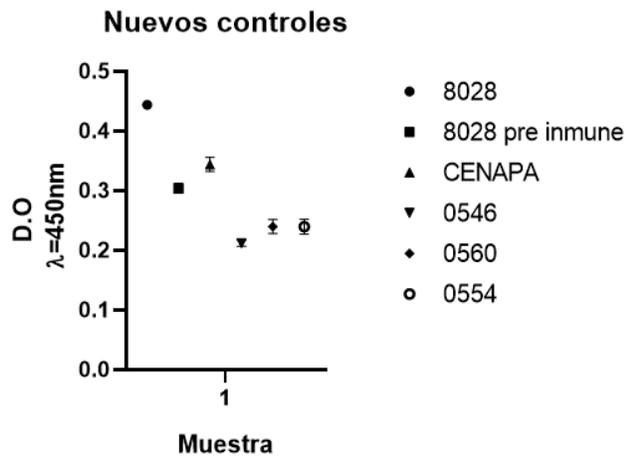
Durante el proceso de estandarización de una técnica de ELISA, se recomienda una dilución inicial del antígeno de 100µg/ml para los antígenos parcialmente purificados. Esta dilución inicial se modifica a 10µg/ml cuando se utilizan muestras mejor purificadas (Hnasko, 2015).

La concentración de proteína varía entre diversos autores, desde 2mg/ml hasta los 0.2µg/ml (Samartino *et al.*, 1999; Jaramillo-Ortíz *et al.*, 2018; El-Sayed *et al.*, 2019; Santamaría *et al.*, 2020; Vijaykumar *et al.*, 2021).

Los parámetros fundamentales de la técnica se establecieron en una concentración de CHPV1.9 de 5µg/ml, una dilución del anticuerpo primario de 1:400 y el tiempo de revelado a 30 minutos. Bajo estas condiciones, la diferencia de medias entre el control positivo y negativo es significativa ( $p=0.0001$ ).

Se realizó un iELISA utilizando los sueros de animales provenientes de zonas libres de garrapata (0560, 0546 y 0554), el control positivo a *B. bigemina* donado por el CENAPA, el resto de los sueros post-desafío del proyecto de C. Figueroa de los 2019 y dos sueros hiperinmunes a *B. bovis* de un experimento del LINVAS en el 2019 (Cepa Veracruz y Cepa Chiapas).

En la figura 25 se presentan los resultados obtenidos al evaluar los animales de la zona libre de garrapatas y el suero positivo a *B. bigemina* otorgado por el CENAPA. Las absorbancias medias de los sueros provenientes de zona libre de garrapatas son significativamente diferentes ( $p=0.0001$ ) al control negativo obtenido del animal 8028 pre-inmunización. Al comparar el control negativo con el suero de referencia del CENAPA, hay diferencia significativa ( $p=0.002$ ) entre los valores de las medias.

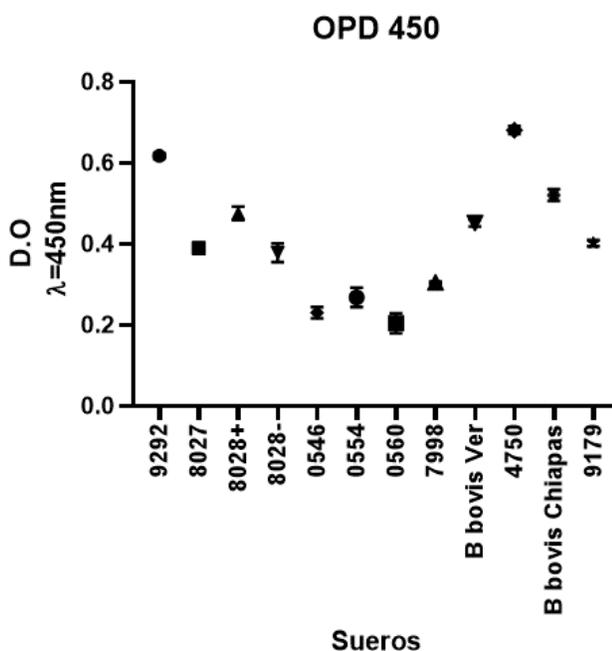


**Figura 25.** Selección de nuevos controles negativos para la técnica.

Con base a los resultados obtenidos y a ligera señal positiva obtenida en el suero del animal 8028 pre-inmunización (Figura 20) se decide cambiar los controles negativos. Se seleccionaron los sueros 0560 y 0546 como nuevos controles negativos.

Las muestras de referencia son los reactivos que se utilizan durante la fase de desarrollo de una prueba diagnóstica, estas son utilizadas como controles dentro de los experimentos. Se debe seleccionar correctamente estas muestras de referencia, ya que lo recomendable es que sean utilizadas durante el proceso de estandarización, validación y cuando la técnica inicie su fase comercial (OIE, 2018).

En la figura 26 se muestran los resultados obtenidos en la iELISA tras utilizar los sueros del experimento de C. Figueroa y de los sueros hiperinmunes a *B. bovis*, ambos con fecha del 2019.



**Figura 26.** Selección de nuevos controles positivos para la técnica.

Se observa que los sueros 9292 y 4750 sobrepasan los valores del control positivo (8028+), con valores de  $p$  iguales a  $<0.001$ . Los sueros hiperinmunes a *B. bovis* son significativamente diferentes a los controles negativos (0560 y 0546), el suero identificado como Cepa Veracruz tuvo un valor de  $p < 0.0001$  y el suero Cepa Chiapas tuvo un valor de  $p < 0.001$ . Con base a estos resultados, se seleccionó al suero 9292 como control positivo y al suero 8028 post-desafío como control medianamente positivo.

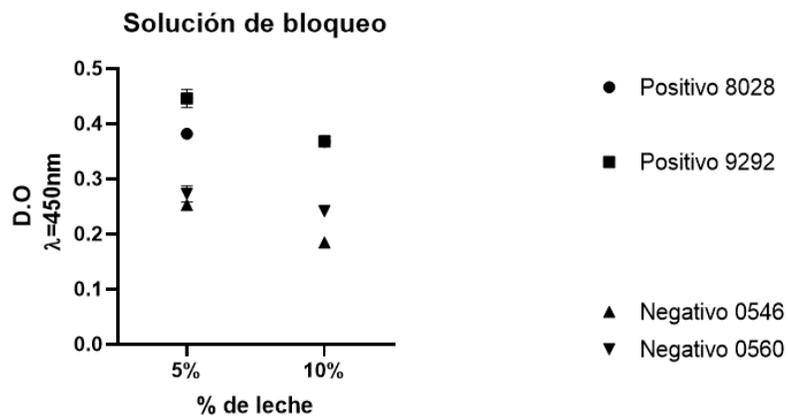
Cuando no se puede obtener una muestra de referencia bien caracterizada, se recomienda utilizar un conjunto de muestras que se encuentren dentro del funcionamiento de la técnica. Estas muestras deben estar compuestas por una altamente positiva, una medianamente positiva y una muestra negativa (OIE, 2018).

#### 6.4.1 Robustez del iELISA basada en la CHPV1.9

En la figura 27 se presentan los resultados de una iELISA al utilizar leche descremada al 5 y 10% como soluciones de bloqueo. Hay diferencias significativas entre las medias de los controles negativos para 5 y 10% de leche descremada ( $p=0.009$ ). Existen diferencias significativas entre los controles negativos al utilizar 5 y 10% de leche descremada

( $p=0.0017$ ). A pesar de las diferencias significativas entre grupos, ambas concentraciones de leche permiten clasificar correctamente a los controles, el valor de  $p$  para 5 y 10% fue de  $<0.001$  para ambos grupos. Una mayor concentración de leche descremada en la solución de bloqueo no afecta a los resultados del iELISA.

La concentración de leche descremada para el bloqueo de la placa es un parámetro con menor variabilidad entre publicaciones. Se ha reportado la utilización de leche al 5% como solución de bloqueo (Sánchez-Jiménez *et al.*, 2020; Vijaykumar *et al.*, 2021). Otros autores han utilizado leche descremada al 3% como solución de bloqueo (El-Sayed *et al.*, 2019; Santamaría *et al.*, 2020).

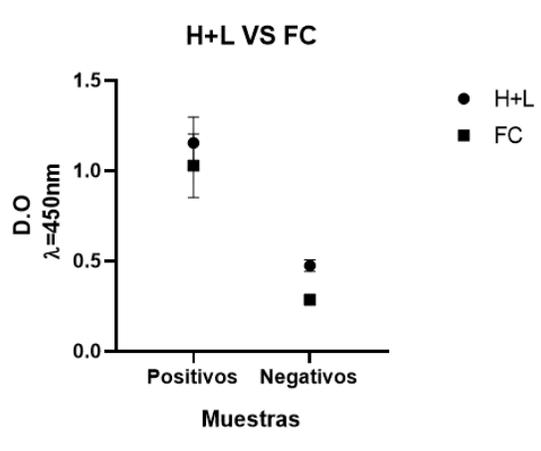


**Figura 27.** Resultados del iELISA a diferentes concentraciones de leche descremada.

Para la comparación de anticuerpos secundarios, se utilizaron dos anticuerpos antibovino acoplados a peroxidasa de rábano de la marca Jackson Immunoresearch. El primero fue un anti-IgG H+L y el segundo un anti-IgG FC, ambos anticuerpos se usaron en dilución 1:2000.

De acuerdo con la OIE (2018) se debe evaluar la utilización de diferentes lotes de anticuerpos secundarios, para determinar si la técnica acepta la utilización de diversos reactivos o solamente una clase de estos.

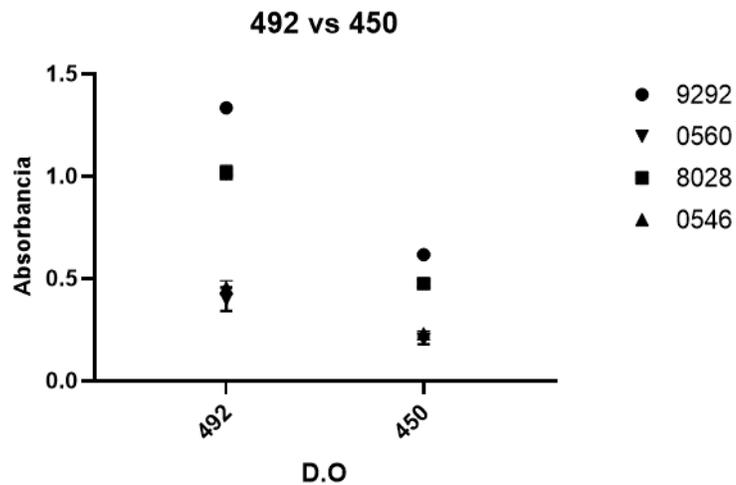
En la figura 28 se representan los resultados de la comparación entre ambos anticuerpos. Para los controles positivos, no existe una diferencia significativa entre los valores medios ( $p=0.2047$ ). Para los controles negativos si existe una diferencia significativa entre los valores medios ( $p<0.0001$ ), los valores medios obtenidos con el anticuerpo anti-IgG FC son menores a los del H+L. Por lo tanto, se recomienda el uso del anticuerpo FC, por tener absorbancias menores.



**Figura 28.** Comparación de anticuerpos secundarios.

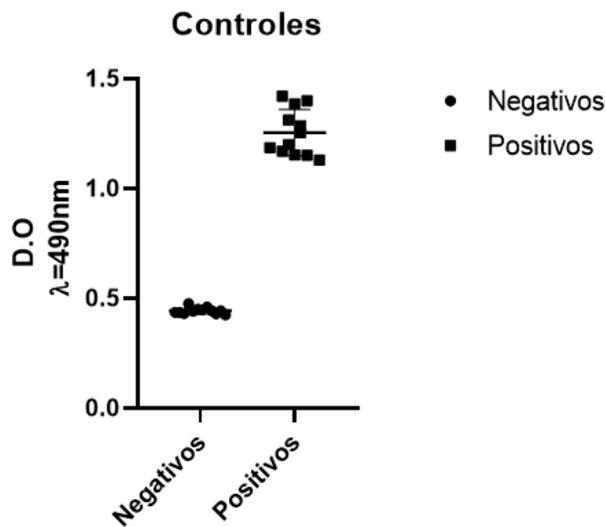
Se compararon los tiempos de revelado a 30 minutos, se detuvo la reacción con ácido sulfúrico 2N y se leyó un ELISA indirecta a 492nm de longitud de onda. El otro ELISA indirecta fue leída a 450nm de longitud de onda después de 30 minutos de reacción (Figura 29). Al leer a 492nm se obtienen absorbancias mayores en comparación a leer a 450nm. La diferencia de medias entre los controles negativos y positivos es significativa, con un valor de  $p<0.001$  para ambas absorbancias. Por motivos prácticos de la técnica, se detuvo la reacción en cada placa posterior.

Debido a que los ELISA son ensayos enzimáticos, es recomendable agregar una solución de paro para estandarizar el tiempo de reacción y los resultados. La solución de paro a elegir debe ser de acuerdo con la enzima con la que trabaje el ensayo. De forma general, suelen utilizarse soluciones ácidas que además de detener la reacción, permiten la estabilidad del color, lo que facilita las lecturas. En el caso del OPD, al agregar solución de paro las absorbancias netas suelen duplicarse (Hosseini *et al.*, 2018).



**Figura 29.** Comparación de tipo de lectura de la técnica.

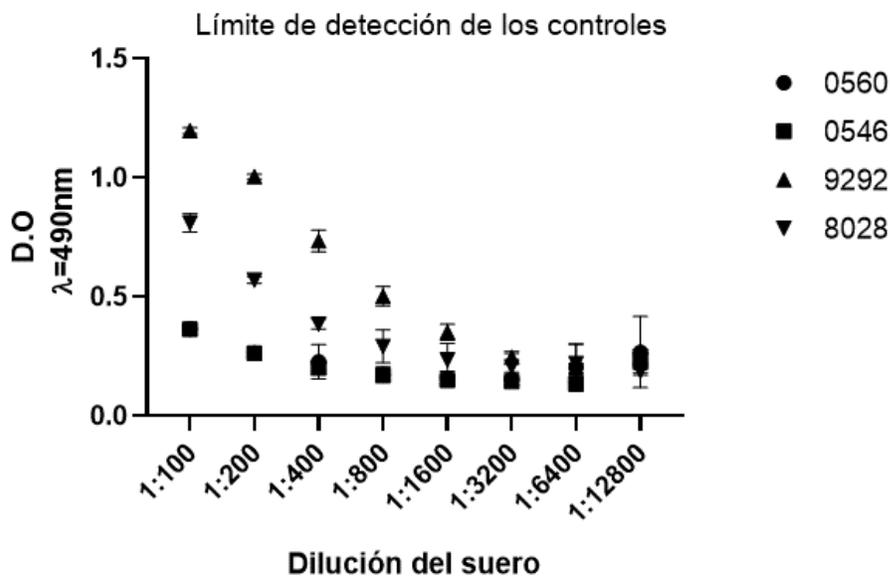
Para terminar la estandarización de la técnica, se realizó un experimento con todas las condiciones establecidas (5µg/ml de CHPV1.9, dilución del suero 1:400, anticuerpo secundario anti-IgG H+L en dilución 1:2000, tiempo de revelado de 30 minutos y adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N como solución de paro) usando solamente los sueros controles en 6 réplicas. En la figura 30 se observan los resultados obtenidos en este ensayo. Las absorbancias obtenidas del suero control positivo 9292 y 8028 son significativamente diferentes a las absorbancias de los sueros control negativo 0546 y 0560 (p<0.0001).



**Figura 30.** Absorbancias obtenidas de los controles utilizados en la iELISA basada en la CHPV1.9.

## 6.5 Determinación de la sensibilidad analítica de la técnica.

La figura 31 muestra los resultados obtenidos en la dilución seriada de los sueros controles positivos y negativos a *Babesia* spp. A partir de la dilución del suero 1:6400 no hay diferencias significativas entre los controles positivos y negativos ( $p=0.2877$ ). Los valores de  $p$  para la diferencia entre medias fueron de  $p<0.0001$  para la dilución 1:100,  $p=0.0003$  para 1:200,  $p=0.017$  para 1:400,  $p=0.0016$  para 1:800,  $p=0.0022$  para 1:1600,  $p=0.0033$  para 1:3200 y  $p=0.4275$  para la dilución del suero de 1:128000.



**Figura 31.** Límite de detección de la técnica utilizando sueros de bovino controles.

Se observa que el mejor valor de  $p$  y mayor diferencia entre los sueros se encontró en la dilución del suero 1:100, por lo que se decide realizar un ajuste en la técnica y se usa el suero en esta dilución a partir de ese momento.

La sensibilidad analítica suele definirse mediante la dilución seriada de las muestras controles en la técnica, hasta la extinción de la señal de una muestra fuertemente positiva. A la sensibilidad analítica también se le conoce como límite inferior de detección (OIE, 2018). Las pruebas de detección de anticuerpos tienen diferentes límites de detección, esto es inherente de la metodología utilizada y el fundamento de la técnica (Nielsen *et al.*, 1996).

El intervalo de funcionamiento de la técnica es otro parámetro que determina el rango de concentraciones (o diluciones) del analito en las cuales el analito refleja una exactitud y precisión aceptables, además de determinar los límites superiores e inferiores de detección de la técnica. El intervalo de funcionamiento de la técnica se calcula realizando diluciones seriadas de los controles hasta que no existan diferencias entre una muestra positiva y una muestra negativa (OIE, 2018).

#### 6.5.1 Determinación de la sensibilidad, especificidad diagnóstica y punto de corte de la técnica.

Se analizaron un total de 109 sueros de bovinos previamente caracterizados por IFI en el Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA). De estos sueros 17 animales fueron positivos a *B. bigemina*, 12 positivos a *B. bovis*, 33 animales positivos a ambas especies y 47 sueros negativos a *Babesia* spp.

En los cuadros 4-7 se observan los resultados obtenidos en los inmunoensayos de diagnóstico con los sueros. Se determinó el punto de corte como el promedio de los sueros negativos más 2 desviaciones estándar. Además, para ser clasificado como positivo o negativo por la iELISA, el mismo suero debió arrojar el mismo resultado dos veces de tres experimentos que se realizaron. En cada uno de los cuadros mostrados se presentan los mismos resultados de los sueros negativos.

**Cuadro 4.** Comparación del iELISA basada en la CHPV1.9 contra la IFI. Repertorio del CENAPA, *Babesia bigemina*.

		Inmunofluorescencia indirecta		
		Positivo	Negativo	TOTAL
iELISA	Positivo	11	4	15
	Negativo	6	43	49
TOTAL		17	47	64

Sensibilidad diagnóstica	0.64
Especificidad diagnóstica	0.91
Valor predictivo positivo	0.73
Valor predictivo negativo	0.87
Prevalencia	0.26

**Cuadro 5.** Comparación del iELISA basada en la CHPV1.9 contra la IFI. Repertorio del CENAPA, *Babesia bovis*.

		Inmunofluorescencia indirecta		
iELISA		Positivo	Negativo	TOTAL
	Positivo	10	4	14
	Negativo	2	43	45
TOTAL		12	47	59

Sensibilidad diagnóstica	0.83
Especificidad diagnóstica	0.91
Valor predictivo positivo	0.71
Valor predictivo negativo	0.96
Prevalencia	0.20

**Cuadro 6.** Comparación del iELISA basada en la CHPV1.9 contra la IFI. Repertorio del CENAPA, *Babesia* spp. (animales co-infectados).

		Inmunofluorescencia indirecta		
iELISA		Positivo	Negativo	TOTAL
	Positivo	30	4	34
	Negativo	3	43	46
TOTAL		33	47	80

Sensibilidad diagnóstica	0.90
Especificidad diagnóstica	0.91
Valor predictivo positivo	0.88
Valor predictivo negativo	0.93
Prevalencia	0.41

Al comparar todos los sueros positivos y negativos a *Babesia* spp que fueron analizados previamente por IFI en el CENAPA, se obtuvo una sensibilidad diagnóstica de 82.26%, una especificidad diagnóstica de 91.49%. La iELISA arrojó 11 falsos negativos (de los 62 sueros positivos

evaluados) y solamente 4 falsos positivos (de los 47 sueros negativos evaluados). En el cuadro 7 se representan los resultados finales del compendio de sueros del CENAPA.

**Cuadro 7.** Comparación del iELISA basada en la CHPV1.9 contra la IFI. Repertorio del CENAPA, *Babesia* spp. (totales).

		Inmunofluorescencia indirecta		
iELISA		Positivo	Negativo	TOTAL
	Positivo	51	4	55
	Negativo	11	43	54
TOTAL		62	47	109

Sensibilidad diagnóstica	0.82
Especificidad diagnóstica	0.91
Valor predictivo positivo	0.93
Valor predictivo negativo	0.80
Prevalencia	0.57

Al realizar el análisis kappa de Cohen a los resultados obtenidos se obtuvo un valor de  $k=0.724$ . De acuerdo con lo establecido por Landis & Koch (1977), es una prueba con un grado de concordancia bueno.

El Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres., (2018) recomienda la utilización de un intervalo de confianza del 95% para la determinación del punto de corte (también conocido como valor umbral). El punto de corte se utiliza cuando las técnicas arrojan valores continuos y es necesario dicotomizar un resultado (positivo/negativo).

La iELISA basada en una proteína recombinantes de Jaramillo *et al.*, (2018) tuvo una sensibilidad diagnóstica de 95.9%, una especificidad diagnóstica de 94.3% y un valor de kappa de 0.76. Estos valores se obtuvieron al analizar 375 muestras, de las cuales hubo 2 falsos negativos y 18 falsos positivos. Los resultados de su técnica los reflejan en porcentaje de positividad, donde su punto de corte fue  $\geq 35\%$ .

Sánchez-Jiménez *et al.*, (2020) obtuvieron una sensibilidad diagnóstica de 98%, una especificidad diagnóstica de 73% y un valor de kappa de 0.696, esto al utilizar sueros de humano. Los resultados se obtuvieron de una iELISA utilizando una combinación de proteína recombinantes, analizaron 91 muestras humanas.

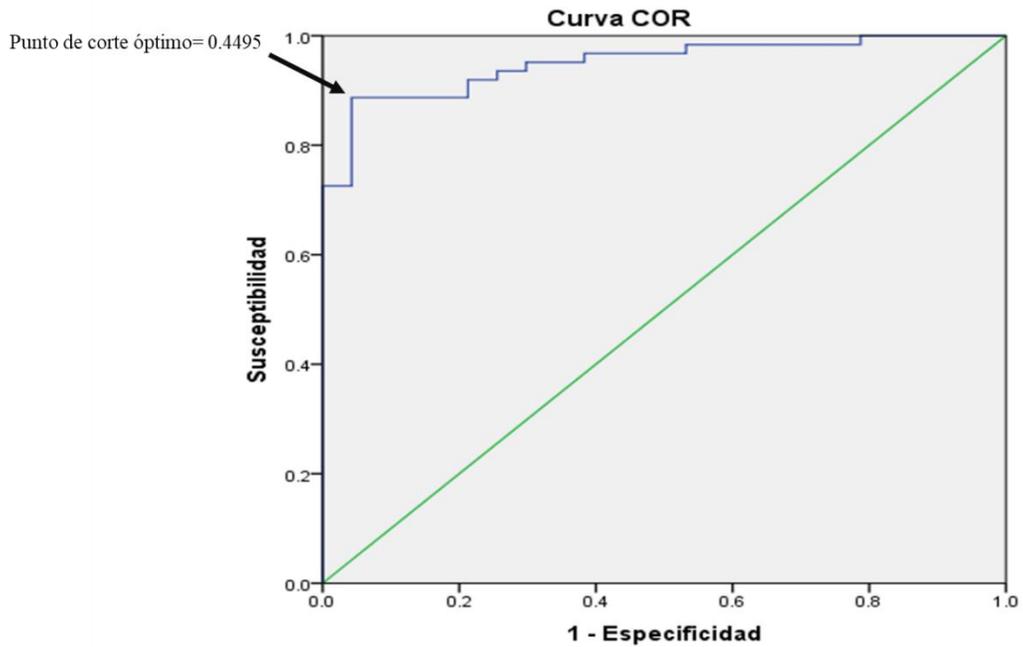
Al evaluar la misma técnica utilizando sueros de caninos contra la enfermedad, obtuvieron una sensibilidad diagnóstica de 75% y una especificidad diagnóstica de 64%, esto al analizar 237 muestras (Sánchez-Jiménez *et al.*, 2020).

Se obtuvo una sensibilidad diagnóstica de 91.7% y una especificidad diagnóstica de 95.2% en una iELISA para el diagnóstico de *Brucella ovis*. Se determinó un punto de corte en 45%, al analizar una población de 4,599 animales (Praud *et al.*, 2012).

La iELISA de diagnóstico de El-Sayed *et al.*, (2019) basada en un cóctel de antígenos recombinantes de *Babesia* spp mostró una sensibilidad diagnóstica de 96.19%, una especificidad diagnóstica de 96.82% y un valor de kappa de 0.73 al compararlo con el estándar de oro, la IFI.

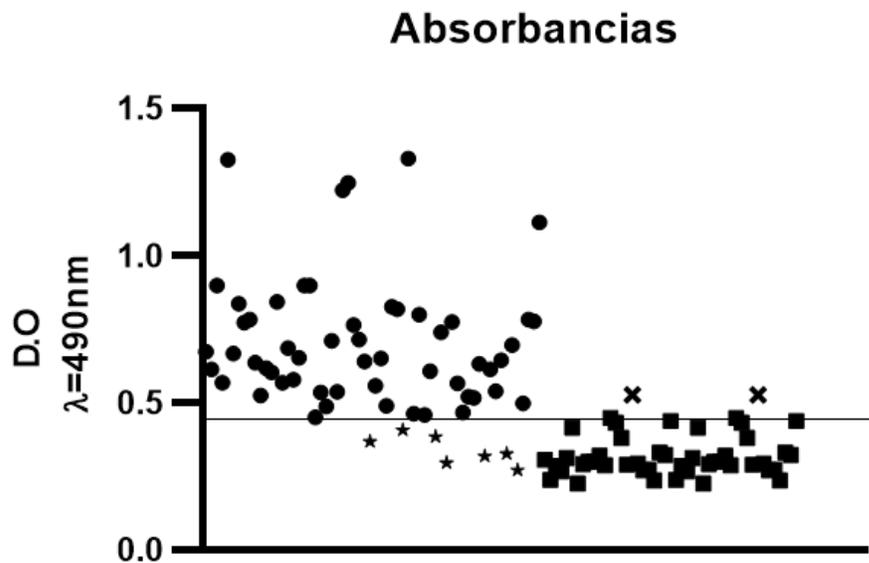
#### 6.5.2 Determinación del punto de corte mediante curva ROC.

Al realizar una curva ROC con el promedio de las absorbancias obtenidas de los sueros del CENAPA, se determinó un punto de corte a 0.4495. Este punto fue seleccionado ya que fue donde hubo un mejor balance entre los falsos positivos y falsos negativos. En la figura 35 se observan los resultados de la curva ROC, donde la flecha indica el punto de corte propuesto.



**Figura 32.** Curva para determinar punto de corte basado en la media de los sueros de referencia del CENAPA.

El área bajo la curva obtenido fue de 0.95, lo que rechaza la hipótesis nula de que la iELISA basada en la CHPV1.9 clasifica a los animales al azar. En la figura 36 se aprecian los valores individuales de cada uno de los sueros analizados.



**Figura 33.** Absorbancias medias de los sueros analizados.

Las curvas receptor-operador (ROC, por sus siglas en inglés) es una estimación independiente al cálculo de la sensibilidad y especificidad diagnóstica. Evalúa la exactitud de la técnica cuando se obtienen resultados continuos, los valores que arroja una curva ROC, o bien, denominada área bajo la curva (AUC por sus siglas en inglés). Estos valores van desde el 0.5 (prueba inútil o estimación al azar) y del 1.0 (prueba perfecta, concordancia perfecta) (OIE, 2018).

La línea en la figura 36 indica el punto de corte (0.4495) de la técnica. En este punto, la iELISA basada en la CHPV1.9 arrojó 7 falsos negativos (de los 62 sueros positivos analizados) y únicamente 2 falsos positivos (de los 47 sueros negativos evaluados). Los sueros que fueron clasificados como falsos negativos se indican con una estrella negra en la figura 36, mientras que los falsos positivos se indican como una cruz negra en la misma figura.

Utilizando un punto de corte de 0.4495 en la iELISA basada en la CHPV1.9 se obtuvo una sensibilidad diagnóstica de 88.71%, una especificidad diagnóstica de 95.74%, un valor predictivo positivo de 96.49% y un valor predictivo negativo del 86.54%. En el cuadro 8 se representan los resultados del cuadro 2x2 utilizando un punto de corte fijo (0.4495).

**Cuadro 8.** Cuadro de 2x2 tras establecer el punto de corte de la técnica mediante curva ROC.

		Inmunofluorescencia indirecta		
iELISA		Positivo	Negativo	TOTAL
	Positivo	55	2	57
	Negativo	7	45	52
TOTAL		62	47	109

Sensibilidad diagnóstica	0.89
Especificidad diagnóstica	0.96
Valor predictivo positivo	0.96
Valor predictivo negativo	0.87
Prevalencia	0.57

La prueba de kappa de Cohen para este cuadro arrojó un valor de  $k=0.834$ , de acuerdo con Landis & Koch (1977) la técnica tiene una concordancia con la prueba de oro en el rango de muy bueno, el más alto de su clasificación.

La iELISA desarrollada por Vijaykumar *et al.*, (2021) determinó un punto de corte de 0.296, esto al utilizar una curva ROC. En este punto la sensibilidad diagnóstica de la técnica alcanzó un 86.4%, una especificidad diagnóstica de 93.1% y un área bajo la curva de 0.932. Estos valores los obtuvieron tras analizar 287 muestras por la iELISA.

Santamaría *et al.*, (2020) desarrollaron una iELISA para identificar animales expuestos a *Babesia bigemina* utilizando proteínas recombinantes. Determinaron el punto de corte (0.183) a través de una curva ROC y en ese punto obtuvieron una sensibilidad diagnóstica de 89.9%, una especificidad diagnóstica de 86.5%, un área bajo la curva de 0.932 y un valor de kappa de 0.52.

Se ha utilizado la curva ROC para determinar el punto de corte para una iELISA para la detección de animales expuestos a brucelosis bovina. En el trabajo de Samartino *et al.*, (1999) se obtuvo una sensibilidad diagnóstica de 94.4%, una especificidad diagnóstica de 98.6% y un área bajo la curva de 0.980.

## VII. CONCLUSIÓN

Las enfermedades transmitidas por garrapatas son un tema de actualidad que impacta económicamente a las zonas tropicales del mundo. En México no hay reportes a nivel nacional de la situación de la enfermedad, lo que conlleva un riesgo para las zonas sin brotes, debido a la movilización de la garrapata.

El cambio climático ha promovido el cambio de nicho ecológico de las garrapatas, aumentando la probabilidad de que se establezca una población en nuevas zonas. Esto representa un riesgo importante, ya que un brote de la enfermedad desencadenaría una gran cantidad de signos clínicos en los animales y la muerte de estos.

La proteína CHPV1.9 tiene un porcentaje de identidad del 38.09% con respecto a los péptidos homólogos en *B. bovis*. Los porcentajes de identidad individuales de cada péptido abarcan desde el 65% hasta el 89%, con un máximo de 11 aminoácidos consecutivos idénticos.

La CHPV1.9 pudo ser acoplada a un ELISA indirecto, a pesar de ser desarrollada originalmente como un candidato vacunal. Es capaz de ser reconocida por sueros de animales infectados experimentalmente con babesiosis bovina.

La técnica desarrollada se ajusta a los objetivos 2 (certificar la ausencia de la enfermedad en animales individuales antes de su movilización), 3 (apoyar a la erradicación de la enfermedad) y al objetivo 5 (estimar la prevalencia de la enfermedad en una población. Esto basándose en el Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres de la OIE.

Se lograron ajustar los parámetros fundamentales de la técnica (dilución de la proteína, dilución del suero, dilución del anticuerpo secundario y el tiempo de revelado) para diferenciar entre un animal con anticuerpos específicos contra *Babesia* spp. y uno sin estos anticuerpos.

Se determinó el límite inferior de detección (sensibilidad analítica) cuando la dilución del suero fue de 1:6400. En este punto, la técnica no clasifica correctamente a los sueros utilizados como controles. No se logró establecer la especificidad analítica por falta de sueros

de referencia positivos a otras enfermedades transmitidas por garrapatas que afectan a bovinos.

El iELISA basado en la proteína CHPV1.9 obtuvo una sensibilidad diagnóstica del 89%, una especificidad diagnóstica del 96% y un valor de kappa de 0.83. Esto significa que la técnica es capaz de identificar correctamente animales con anticuerpos contra *Babesia* spp. No obstante, no hay diferencias entre los animales infectados solamente a una especie de *Babesia* spp. la técnica es incapaz de diferenciar animales con anticuerpos contra *B. bovis* de animales con anticuerpos contra *B. bigemina*.

La CHPV1.9 puede ser producida a gran escala y el rendimiento de la proteína es alto, en promedio un lote de 4L de cultivo bacteriano es suficiente para realizar 1000 placas de ELISA en promedio.

La purificación de la proteína es un área de oportunidad para mejorar, una proteína mejor purificada podría significar un menor ruido de fondo y una mejor especificidad de la técnica.

Las técnicas basadas en la detección de anticuerpos permiten identificar animales que han entrado en contacto con una enfermedad. De esta manera se puede controlar la dispersión de esta, siempre y cuando los animales puedan fungir como reservorios.

Es necesario la búsqueda de tecnologías para mantener la CHPV1.9 fuera de su fase líquida, con la finalidad de aumentar su vida de anaquel y que no sea indispensable la cadena fría.

El siguiente paso es la validación de la técnica, que requiere la implementación de la técnica mediante terceros. Esto con la finalidad de que esta técnica pueda ser usada para el diagnóstico de la babesiosis bovina de manera oficial en el país.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

Aguirre, J., & Santamaría, V. (1986). Purificación y caracterización toxicológica de garrapatas *B. microplus* resistentes a ixodicidas organofosforados y organoclorados. En: VII Reunión Anual Asoc. Mex. De Parasitología Veterinaria A.C. Cd. Victoria, Tamps. México.

Almazan, C., Tipacamu, G. A., Rodriguez, S., Mosqueda, J., & Perez de Leon, A. (2018). Immunological control of ticks and tick-borne diseases that impact cattle health and production. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 23, 1535–1551. <https://doi.org/10.2741/4659>.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403– 410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).

Alvarez, J. A., Rojas, C., & Figueroa, J. V. (2019). Diagnostic Tools for the Identification of *Babesia* sp. in Persistently Infected Cattle. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 8(3), 143. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030143>.

Amrein, K. E., Takacs, B., Stieger, M., Molnos, J., Flint, N. A., & Burn, P. (1995). Purification and characterization of recombinant human p50<sup>csk</sup> protein-tyrosine kinase from an *Escherichia coli* expression system overproducing the bacterial chaperones GroES and GroEL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(4), 1048–1052. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.4.1048>.

Archibald R.A. (1898). Texas fever – Its history, cause and treatment. *Butchers' and Stockgrowers' Journal*, San Francisco, 8 pp.

Arnold F. H. (1991). Metal-affinity separations: a new dimension in protein processing. *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, 9(2), 151–156. <https://doi.org/10.1038/nbt0291-151>.

Aune, T. E., & Aachmann, F. L. (2010). Methodologies to increase the transformation efficiencies and the range of bacteria that can be transformed. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(5), 1301–1313. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2349-1>.

Aydin S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>.

Babes, V. (1888). Sur l'hémoglobinurie bactérienne du bœuf. *C. R. Acad. Sci.*, 692-694.

Baneyx, F., & Mujacic, M. (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature biotechnology*, 22(11), 1399–1408. <https://doi.org/10.1038/nbt1029>.

Barré, N., & Uilenberg, G. (2010). Spread of parasites transported with their hosts: case study of two species of cattle tick. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 29(1), 149–160.

Benavides O., E. (1985). Consideraciones con relación a la epizootiología de Anaplasmosis y Babesiosis en los bovinos. *Revista ACOVEZ* 8(31), 4-11.

Benavides, E., Romero, J., Villamil, L. (2016). Las garrapatas del ganado bovino y los agentes de enfermedad que transmiten en escenarios epidemiológicos de cambio climático 1era Edición. IICA., San José. Costa Rica.

Beugnet, F., & Moreau, Y. (2015). Babesiosis. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 34(2), 627–639. <https://doi.org/10.20506/rst.34.2.2385>.

Bird, G. H., Lajmi, A. R., & Shin, J. A. (2002). Manipulation of temperature to improve solubility of hydrophobic proteins and cocrystallization with matrix for analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 74(1), 219–225. <https://doi.org/10.1021/ac010683g>.

Blackman, M. J., & Bannister, L. H. (2001). Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. *Molecular and biochemical parasitology*, 117(1), 11–25. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(01\)00328-0](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(01)00328-0).

Bock, R., Jackson, L., de Vos, A., & Jorgensen, W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology*, 129 Suppl, S247–S269. <https://doi.org/10.1017/s0031182004005190>.

Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.

Brayton, K. A., Lau, A. O., Herndon, D. R., Hannick, L., Kappmeyer, L. S., Berens, S. J., Bidwell, S. L., Brown, W. C., Crabtree, J., Fadrosch, D., Feldblum, T., Forberger, H. A., Haas, B. J., Howell, J. M., Khouri, H., Koo, H., Mann, D. J., Norimine, J., Paulsen, I. T., Radune, D., ... Nene, V. M. (2007). Genome sequence of *Babesia bovis* and comparative analysis of apicomplexan hemoprotozoa. *PLoS pathogens*, 3(10), 1401–1413. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030148>.

Brown, C.G.D., Berger, J. (1970) Chemotherapy of experimental *Babesia bigemina* infections with imidocarb dihydrochloride. *Trop Anim Health Prod* 2, 196–203. <https://doi.org/10.1007/BF02356439>.

Brown, W. C., Norimine, J., Knowles, D. P., & Goff, W. L. (2006). Immune control of *Babesia bovis* infection. *Veterinary parasitology*, 138(1-2), 75–87. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.041>.

Callow, L. L., & McGregor, W. (1970). The effect of imidocarb against *Babesia argentina* and *Babesia bigemina* infections of cattle. *Australian veterinary journal*, 46(5), 195–200. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1970.tb02001.x>.

Chauvin, A., Moreau, E., Bonnet, S., Plantard, O., & Malandrin, L. (2009). *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Veterinary research*, 40(2), 37. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009020>.

Cheung, R. C., Wong, J. H., & Ng, T. B. (2012). Immobilized metal ion affinity chromatography: a review on its applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 96(6), 1411–1420. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4507-0>.

Court, R. A., Jackson, L. A., & Lee, R. P. (2001). Elevated anti-parasitic activity in peripheral blood monocytes and neutrophils of cattle infected with *Babesia bovis*. *International journal for parasitology*, 31(1), 29–37. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(00\)00144-2](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(00)00144-2).

Cowell, R., Tyler, R., Meinkoth, J., & DeNicola, D. (2009). *Diagnóstico citológico y hematológico del perro y el gato*. Madrid: Elsevier.

Criado-Fornelio, A., Martínez-Marcos, A., Buling-Saraña, A., & Barba-Carretero, J. C. (2003). Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history. *Veterinary parasitology*, 114(3), 173–194. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(03\)00141-9](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(03)00141-9).

Crowther J. R. (2000). The ELISA guidebook. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 149, III–413. <https://doi.org/10.1385/1592590497>.

Dai, J., Jiang, M., Wang, Y., Qu, L., Gong, R., & Si, J. (2012). Evaluation of a recombinant multiepitope peptide for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 19(3), 338–342. <https://doi.org/10.1128/CVI.05553-11>.

de Castro J. J. (1997). Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries. *Veterinary parasitology*, 71(2-3), 77–97. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(97\)00033-2](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(97)00033-2).

Dela Coletta Troiano Araújo, L., Wibrantz, M., Rodríguez-Fernández, D. E., Karp, S. G., Talevi, A. C., Maltempi de Souza, E., Soccol, C. R., & Thomaz-Soccol, V. (2019). Process parameters optimization to produce the recombinant protein CFP10 for the diagnosis of tuberculosis. *Protein expression and purification*, 154, 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2018.09.016>.

Domingos, A., Antunes, S., Borges, L., & Rosário, V. E. (2013). Approaches towards tick and tick-borne diseases control. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 46(3), 265–269. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0014-2012>.

El-Sayed, S., Rizk, M. A., Terkawi, M., & Igarashi, I. (2019). Cocktail *Babesia bovis* antigens for global detection of *Babesia bovis* infection in cattle. *Experimental parasitology*, 206, 107758. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107758>.

Emini, E.A., Hughes, J.V., Perlow, D.S. and Boger, J. (1985) Induction of Hepatitis A Virus-Neutralizing Antibody by a Virus-Specific Synthetic Peptide. *Journal of Virology*, 55, 836-839.

Engvall, E., & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), 871–874. [https://doi.org/10.1016/0019-2791\(71\)90454-x](https://doi.org/10.1016/0019-2791(71)90454-x).

Everitt, B.S. (1995). *The Cambridge Dictionary of Statistics in Medical Sciences*. Cambridge University Press, Cambridge.

Ferenci T. (1999). 'Growth of bacterial cultures' 50 years on: towards an uncertainty principle instead of constants in bacterial growth kinetics. *Research in microbiology*, 150(7), 431–438. [https://doi.org/10.1016/s0923-2508\(99\)00114-x](https://doi.org/10.1016/s0923-2508(99)00114-x).

Ferra, B., Holec-Gąsior, L., & Kur, J. (2015). Serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in farm animals (horses, swine, and sheep) by enzyme-linked immunosorbent assay using chimeric antigens. *Parasitology international*, 64(5), 288–294. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2015.03.004>.

Ferrer-Miralles, N., Saccardo, P., Corchero, J. L., Xu, Z., & García-Fruitós, E. (2015). General introduction: recombinant protein production and purification of insoluble proteins. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1258, 1–24. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2205-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2205-5_1).

Friedman, A., & Yakubu, A. A. (2014). A bovine babesiosis model with dispersion. *Bulletin of mathematical biology*, 76(1), 98–135. <https://doi.org/10.1007/s11538-013-9912-8>.

Galdino, A. S., Santos, J. C., Souza, M. Q., Nóbrega, Y. K., Xavier, M. A., Felipe, M. S., Freitas, S. M., & Torres, F. A. (2016). A Novel Structurally Stable Multiepitope Protein for Detection of HCV. *Hepatitis research and treatment*, 2016, 6592143. <https://doi.org/10.1155/2016/6592143>.

Gallup, D. M., & Gerhardt, P. (1963). Dialysis Fermentor Systems for Concentrated Culture of Microorganisms. *Applied microbiology*, 11(6), 506–512. <https://doi.org/10.1128/am.11.6.506-512.1963>.

Gao, J., & Zhao, D. (2019). Preparation of multi-epitope recombinant diagnostic antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Chinese journal of biotechnology*, 35(4), 718–725. <https://doi.org/10.13345/j.cjb.180392>.

George, J. E., Pound, J. M., & Davey, R. B. (2004). Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology*, 129 Suppl, S353–S366. <https://doi.org/10.1017/s0031182003004682>.

Góes, T. S., Góes, V. S., Ribeiro, M. F., & Gontijo, C. M. (2007). Bovine babesiosis: anti-erythrocyte antibodies purification from the sera of naturally infected cattle. *Veterinary immunology and immunopathology*, 116(3-4), 215–218. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.12.011>.

Goff, W. L., Johnson, W. C., Molloy, J. B., Jorgensen, W. K., Waldron, S. J., Figueroa, J. V., Matthee, O., Adams, D. S., McGuire, T. C., Pino, I., Mosqueda, J., Palmer, G. H., Suarez, C. E., Knowles, D. P., & McElwain, T. F. (2008). Validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Babesia bigemina* antibodies in cattle. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 15(9), 1316–1321. <https://doi.org/10.1128/CVI.00150-08>.

Gohil, S., Herrmann, S., Günther, S., & Cooke, B. M. (2013). Bovine babesiosis in the 21st century: advances in biology and functional genomics. *International journal for parasitology*, 43(2), 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.09.008>.

Goodger, B.V. (1971). Preparation and preliminary assessment of purified antigens in the passive haemagglutination test for bovine babesiosis. *Australian veterinary journal*, 47, (6), 251-256.

Gopal, G. J., & Kumar, A. (2013). Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. *The protein journal*, 32(6), 419–425. <https://doi.org/10.1007/s10930-013-9502-5>.

Guglielmone, A. A., Aguirre, D. H., Späth, E. J., Gaido, A. B., Mangold, A. J., de Rios, L. G. (1992). Long-term study of incidence and financial loss due to cattle babesiosis in an Argentinian dairy farm. *Preventive Veterinary Medicine*, 12 (3-4), 307-312. [https://doi.org/10.1016/0167-5877\(92\)90058-N](https://doi.org/10.1016/0167-5877(92)90058-N).

Hanahan D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology*, 166(4), 557–580. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(83)80284-8).

Hartley, D. L., & Kane, J. F. (1988). Properties of inclusion bodies from recombinant *Escherichia coli*. *Biochemical Society transactions*, 16(2), 101–102. <https://doi.org/10.1042/bst0160101>.

Hayat, S., Farahani, N., Golichenari, B., & Sahebkar, A. (2018). Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli* (*E. coli*): What We Need to Know. *Current pharmaceutical design*, 24(6), 718–725. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180131121940>.

He, Y., Wang, K., & Yan, N. (2014). The recombinant expression systems for structure determination of eukaryotic membrane proteins. *Protein & cell*, 5(9), 658–672. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0086-4>.

Hernández-Silva, D (2019). *Generación de una proteína quimérica con actividad inmunogénica contra Babesia bigemina* [Tesis de doctorado, Universidad Autónoma de Querétaro]. Repositorio Institucional de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Hnasko, R. (2015). *ELISA: Methods and Protocols*. *ELISA: Methods and Protocols* (pp. 1–216). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2742-5>

Holec-Gąsior, L., Ferra, B., & Grażlewska, W. (2019). *Toxoplasma gondii* Tetravalent Chimeric Proteins as Novel Antigens for Detection of Specific Immunoglobulin G in Sera of Small Ruminants. *Animals : an open access journal from MDPI*, 9(12), 1146. <https://doi.org/10.3390/ani9121146>.

Homer, M. J., Aguilar-Delfin, I., Telford, S. R., 3rd, Krause, P. J., & Persing, D. H. (2000). Babesiosis. *Clinical microbiology reviews*, 13(3), 451–469. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.3.451>.

Horn, U., Strittmatter, W., Krebber, A., Knüpfer, U., Kujau, M., Wenderoth, R., Müller, K., Matzku, S., Plückthun, A., & Riesenberg, D. (1996). High volumetric yields of functional dimeric miniantibodies in *Escherichia coli*, using an optimized expression vector and high-cell-density fermentation under non-limited growth conditions. *Applied microbiology and biotechnology*, 46(5-6), 524–532. <https://doi.org/10.1007/s002530050855>.

Hornbeck P. V. (2015). Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Current protocols in immunology*, 110, 2.1.1–2.1.23. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0201s110>.

Hosseini, S., Vázquez-Villegas, P., Rito-Palomares, M., & Martínez-Chapa, S. (2018). *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) From A to Z* (1st ed.). Springer. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-981-10-6766-2>.

Jacob, S. S., Sengupta, P. P., Paramanandham, K., Suresh, K. P., Chamuah, J. K., Rudramurthy, G. R., & Roy, P. (2020). Bovine babesiosis: An insight into the global perspective on the disease distribution by systematic review and meta-analysis. *Veterinary parasitology*, 283, 109136. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109136>.

Jalovecka, M., Bonsergent, C., Hajdusek, O., Kopacek, P., & Malandrin, L. (2016). Stimulation and quantification of *Babesia divergens* gametocytogenesis. *Parasites & vectors*, 9(1), 439. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1731-y>.

Jalovecka, M., Sojka, D., Ascencio, M., & Schnittger, L. (2019). Babesia Life Cycle - When Phylogeny Meets Biology. *Trends in parasitology*, 35(5), 356–368. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.01.007>.

Janin, J., & Wodak, S. (1978). Conformation of Amino Acid Side-Chain in Proteins. *Journal of Molecular Biology*, 125(3), 357-386.

Janson, J., & Rydén, L. (1998). *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications* (2nd ed ed.). New York: Wiley.

Jaramillo Ortiz, J. M., Montenegro, V. N., de la Fournière, S., Sarmiento, N. F., Farber, M. D., & 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*, 5(1), 13. <https://doi.org/10.3390/vetsci5010013>.

Karplus, P.A., & Schulz, G.E. (1985). Prediction of chain flexibility in proteins. *Naturwissenschaften* 72, 212–213. <https://doi.org/10.1007/BF01195768>

Kim, Y. E., Hipp, M. S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., & Hartl, F. U. (2013). Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annual review of biochemistry*, 82, 323–355. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060208-092442>.

Kolaskar, A. S., & Tongaonkar, P. C. (1990). A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS letters*, 276(1-2), 172–174. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80535-q](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80535-q)

Korz, D. J., Rinas, U., Hellmuth, K., Sanders, E. A., & Deckwer, W. D. (1995). Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Journal of biotechnology*, 39(1), 59–65. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(94\)00143-z](https://doi.org/10.1016/0168-1656(94)00143-z).

Kuttler, K. L., Adams, L. G., & Todorovic, R. A. (1977). Comparisons of the complement-fixation and indirect fluorescent antibody reactions in the detection of bovine babesiasis. *American journal of veterinary research*, 38(2), 153–156.

Laha, R., Das, M., & Sen, A. (2015). Morphology, epidemiology, and phylogeny of Babesia: An overview. *Tropical parasitology*, 5(2), 94–100. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.162490>.

Lehner, A. F., Hitron, J. A., May, J., Hughes, C., Eisenberg, R., Schwint, N., Knowles, D. P., Timoney, P., & Tobin, T. (2011). Evaluation of mass spectrometric methods for detection of the anti-protozoal drug imidocarb. *Journal of analytical toxicology*, 35(4), 199–204. <https://doi.org/10.1093/anatox/35.4.199>.

Lempereur, L., Beck, R., Fonseca, I., Marques, C., Duarte, A., Santos, M., Zúquete, S., Gomes, J., Walder, G., Domingos, A., Antunes, S., Baneth, G., Silaghi, C., Holman, P., & Zintl, A. (2017). Guidelines for the Detection of *Babesia* and *Theileria* Parasites. *Vector borne and zoonotic diseases* (Larchmont, N.Y.), 17(1), 51–65. <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.1955>.

Levine N. D. (1982). The genus atoxoplasma (Protozoa, Apicomplexa). *The Journal of parasitology*, 68(4), 719–723.

Lew-Tabor, A. E., & Rodriguez Valle, M. (2016). A review of reverse vaccinology approaches for the development of vaccines against ticks and tick borne diseases. *Ticks and tick-borne diseases*, 7(4), 573–585. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.12.012>.

Liu, W. X., Hu, S., Qiao, Z. J., Chen, W. Y., Liu, L. T., Wang, F. K., Hua, R. H., Bu, Z. G., & Li, X. R. (2011). Expression, purification, and improved antigenic specificity of a truncated recombinant bp26 protein of *Brucella melitensis* M5-90: a potential antigen for differential serodiagnosis of brucellosis in sheep and goats. *Biotechnology and applied biochemistry*, 58(1), 32–38. <https://doi.org/10.1002/bab.11>.

Lohmeyer, K. H., Pound, J. M., May, M. A., Kammlah, D. M., & Davey, R. B. (2011). Distribution of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* and *Rhipicephalus* (*Boophilus*)

*annulatus* (Acari: Ixodidae) infestations detected in the United States along the Texas/Mexico border. *Journal of medical entomology*, 48(4), 770–774. <https://doi.org/10.1603/me10209>.

Mahoney, D. F., Wright, I. G., & Mirre, G. B. (1973). Bovine babesiosis: the persistence of immunity to *Babesia argentina* and *B. bigemina* in calves (*Bos taurus*) after naturally acquired infection. *Annals of tropical medicine and parasitology*, 67(2), 197–203. <https://doi.org/10.1080/00034983.1973.11686877>.

Mehlhorn, H., Schein, E., Ahmed, J.S. (1994). *Theileria*. Parasitic protozoa, vol. 7. pp. 217–304.

Mihalca, A. D., Cozma, V., Suteu, E., Marinculic, A., Boireau, P. (2010). The quest for piroplasms: from Babeş and Smith to molecules. *Sci Parasitol*. 11 (1), 14-19.

Mitchell, G. H., Thomas, A. W., Margos, G., Dluzewski, A. R., & Bannister, L. H. (2004). Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. *Infection and immunity*, 72(1), 154–158. <https://doi.org/10.1128/iai.72.1.154-158.2004>.

Monod J. (1949). The growth of bacterial cultures, *Ann. Rev. Microbiol*. 3, 371–394.

Morzaria, S., Katende, J., Kairo, A., Nene, V., & Musoke, A. (1992). New methods for the diagnosis of *Babesia bigemina* infection. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87 *Suppl* 3, 201–205. <https://doi.org/10.1590/s0074-02761992000700033>.

Mosqueda, J., McElwain, T. F., Stiller, D., & Palmer, G. H. (2002). *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 and rhoptry-associated protein 1 are expressed in sporozoites, and specific antibodies inhibit sporozoite attachment to erythrocytes. *Infection and immunity*, 70(3), 1599–1603. <https://doi.org/10.1128/iai.70.3.1599-1603.2002>.

Mosqueda, J., Olvera-Ramirez, A., Aguilar-Tipacamu, G., & Canto, G. J. (2012). Current advances in detection and treatment of babesiosis. *Current medicinal chemistry*, 19(10), 1504–1518. <https://doi.org/10.2174/092986712799828355>.

Nakano, K., Rischke, M., Sato, S., & Märkl, H. (1997). Influence of acetic acid on the growth of *Escherichia coli* K12 during high-cell-density cultivation in a dialysis reactor. *Applied microbiology and biotechnology*, 48(5), 597–601. <https://doi.org/10.1007/s002530051101>.

Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., & Hofschneider, P. H. (1982). Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *The EMBO journal*, 1(7), 841–845. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1982.tb01257.x>.

Nielsen K., Gall D., Kelly W., Vigliocco A., Henning D., & García M. (1996). Immunoassay Development: Application to Enzyme Immunoassay for the Diagnosis of Brucellosis. *Agriculture and Agri-Food Canada*.

Nishihara, K., Kanemori, M., Kitagawa, M., Yanagi, H., & Yura, T. (1998). Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles of ADNK-ADNJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 64(5), 1694–1699. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.5.1694-1699.1998>.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (noviembre de 2022). FAOSTAT. Recuperado el abril de 2022, de <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL>.

Organización Mundial de Sanidad Animal. (2018). Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres (8va ed., Vol. 2). París.

Ortíz, E., Santamaría, V., Ortíz, N., Soberanes, C., Osorio, M., Franco, B., . . . Fragoso, S. (1995). Characterization of *Boophilus microplus* resistance to ixodicides in México. Seminario Internacional de Parasitología Animal, (págs. 58-66). Acapulco.

Overton T. W. (2014). Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug discovery today*, 19(5), 590–601. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.11.008>.

Parker, J. M., Guo, D., & Hodges, R. S. (1986). New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues

with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry*, 25(19), 5425–5432. <https://doi.org/10.1021/bi00367a013>

Pellequer, J. L., Westhof, E., & Van Regenmortel, M. H. (1993). Correlation between the location of antigenic sites and the prediction of turns in proteins. *Immunology letters*, 36(1), 83–99. [https://doi.org/10.1016/0165-2478\(93\)90072-a](https://doi.org/10.1016/0165-2478(93)90072-a)

Ponnuswamy, P. K., Prabhakaran, M., & Manavalan, P. (1980). Hydrophobic packing and spatial arrangement of amino acid residues in globular proteins. *Biochimica et biophysica acta*, 623(2), 301–316. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(80\)90258-5](https://doi.org/10.1016/0005-2795(80)90258-5).

Potgieter, F. T., & Els, H. J. (1977). The fine structure of intra-erythrocytic stages of *Babesia bigemina*. *The Onderstepoort journal of veterinary research*, 44(3), 157–168.

Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., & Belfrage, G. (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, 258(5536), 598–599. <https://doi.org/10.1038/258598a0>.

Pörtner, R., & Märkl, H. (1998). Dialysis cultures. *Applied microbiology and biotechnology*, 50(4), 403–414. <https://doi.org/10.1007/s002530051312>.

Praud, A., Champion, J. L., Corde, Y., Drapeau, A., Meyer, L., & Garin-Bastuji, B. (2012). Assessment of the diagnostic sensitivity and specificity of an indirect ELISA kit for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *BMC veterinary research*, 8, 68. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-68>.

Pupin, R. C., Guizelini, C. C., Lemos, R., Martins, T. B., Borges, F. A., Borges, D., & Gomes, D. C. (2019). Retrospective study of epidemiological, clinical and pathological findings of bovine babesiosis in Mato Grosso do Sul, Brazil (1995 -2017). Ticks and tick-borne diseases, 10(1), 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.08.015>.

Ranjbar, M. M., Ebrahimi, M. M., Shahsavandi, S., Farhadi, T., Mirjalili, A., Tebianian, M., & Motedayen, M. H. (2019). Novel Applications of Immuno-bioinformatics in Vaccine and Bio-product Developments at Research Institutes. *Archives of Razi Institute*, 74(3), 219–233. <https://doi.org/10.22092/ari.2018.122523.1224>.

Ribeiro, P., Souza, M. Q., Dias, D. S., Álvares, A., Nogueira, L. M., Machado, J. M., Dos Santos, J. C., Godoi, R. R., Nobrega, Y., Campos-da-Paz, M., de Freitas, S. M., Felipe, M., Torres, F., & Galdino, A. S. (2019). A Custom-Designed Recombinant Multiepitope Protein for Human Cytomegalovirus Diagnosis. *Recent patents on biotechnology*, 13(4), 316–328. <https://doi.org/10.2174/1872208313666190716093911>.

Rodríguez, R., Grisi, L., Pérez, A., Silva, H., Torres, J., Fragoso, H., & García, D. (2017). Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review. *Rev Mex Cienc Pecu*, 8 (1), 61-74. <http://dx.doi.org/10.22319/rmcp.v8i1.4305>.

Rojas-Martínez, C., Rodríguez-Vivas, R. I., Millán, J., Bautista-Garfias, C. R., Castañeda-Arriola, R. O., Lira-Amaya, J. J., Urióstegui, P. V., Carrasco, J., & Martínez, J. (2018). Bovine babesiosis: Cattle protected in the field with a frozen vaccine containing *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* cultured in vitro with a serum-free medium. *Parasitology international*, 67(2), 190–195. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2017.11.004>.

Romero-Salas, D., Mira, A., Mosqueda, J., García-Vázquez, Z., Hidalgo-Ruiz, M., Vela, N. A., de León, A. A., Florin-Christensen, M., & Schnittger, L. (2016). Molecular and serological detection of *Babesia bovis*- and *Babesia bigemina*-infection in bovines and water buffaloes raised jointly in an endemic field. *Veterinary parasitology*, 217, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.12.030>.

Rosano, G. L., Morales, E. S., & Ceccarelli, E. A. (2019). New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 28(8), 1412–1422. <https://doi.org/10.1002/pro.3668>.

Saad-Roy, C. M., Shuai, Z., & van den Driessche, P. (2015). Models of bovine babesiosis including juvenile cattle. *Bulletin of mathematical biology*, 77(3), 514–547. <https://doi.org/10.1007/s11538-015-0068-6>.

Saha, S., & Raghava, G. P. (2006). Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Proteins*, 65(1), 40–48. <https://doi.org/10.1002/prot.21078>

Saleh M. A. (2009). Erythrocytic oxidative damage in crossbred cattle naturally infected with *Babesia bigemina*. *Research in veterinary science*, 86(1), 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.05.005>.

Samartino, L., Gall, D., Gregoret, R., & Nielsen, K. (1999). Validation of enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of bovine brucellosis. *Veterinary microbiology*, 70(3-4), 193–200. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(99\)00122-4](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(99)00122-4).

Sánchez-Jiménez, M. M., de la Cuesta Zuluaga, J. J., Garcia-Montoya, G. M., Dabral, N., Alzate, J. F., Vemulapalli, R., & Olivera-Angel, M. (2020). Diagnosis of human and canine *Brucella canis* infection: development and evaluation of indirect enzyme-linked immunosorbent assays using recombinant *Brucella* proteins. *Heliyon*, 6(7), e04393. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04393>.

Schnittger, L., Rodriguez, A. E., Florin-Christensen, M., & Morrison, D. A. (2012). Babesia: a world emerging. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 12(8), 1788–1809. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.07.004>.

Scudiero, L., Mercado-Rojano, W. J., Rudolph, A., Wang, J., Laughery, J. M., & Suarez, C. E. (2018). Comparisons of the topographic characteristics and electrical charge distributions among Babesia-infected erythrocytes and extraerythrocytic merozoites using AFM. *Journal of microscopy*, 271(1), 84–97. <https://doi.org/10.1111/jmi.12697>.

Shah, K., & Maghsoudlou, P. (2016). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *British journal of hospital medicine (London, England: 2005)*, 77(7), C98–C101. <https://doi.org/10.12968/hmed.2016.77.7.C98>.

Shiloach, J. and Bauer, S. (1975), High-yield growth of *E. coli* at different temperatures in a bench scale fermentor. *Biotechnol. Bioeng.*, 17: 227-239. <https://doi.org/10.1002/bit.260170208>.

Shiloach, J., & Fass, R. (2005). Growing *E. coli* to high cell density--a historical perspective on method development. *Biotechnology advances*, 23(5), 345–357. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.04.004>.

SIAP-SADER. (2019). Población ganadera. Recuperado el septiembre de 2020, de <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-pecuaria?idiom=es>.

Singh, S. M., & Panda, A. K. (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of bioscience and bioengineering*, 99(4), 303–310. <https://doi.org/10.1263/jbb.99.303>.

Smith, T., & Kilborne, F. (1893). Investigations into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever. *Bur. Anim. Indust.*, 177-304.

Soberanes, C., Santamaría, V., Fragoso, S., & Garcia, V. (2002). Primer caso de resistencia al amitraz en la garrapata del ganado *Boophilus microplus* en México. *Tec Pecu Méx* 40: 81-92.

Sondgeroth, K. S., McElwain, T. F., Allen, A. J., Chen, A. V., & Lau, A. O. (2013). Loss of neurovirulence is associated with reduction of cerebral capillary sequestration during acute *Babesia bovis* infection. *Parasites & vectors*, 6(1), 181. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-181>.

Sørensen, H. P., & Mortensen, K. K. (2005). Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microbial cell factories*, 4(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-1>.

Suarez, C. E., & Noh, S. (2011). Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. *Veterinary parasitology*, 180(1-2), 109–125. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.032>.

Suarez, C. E., Alzan, H. F., Silva, M. G., Rathinasamy, V., Poole, W. A., & Cooke, B. M. (2019). Unravelling the cellular and molecular pathogenesis of bovine babesiosis: is the sky the limit?. *International journal for parasitology*, 49(2), 183–197. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.11.002>.

Taylor, M., Coop, R., & Wall, R. (2015). *Veterinary Parasitology*. Willey-Blackwell. Oxford.

Terpe K. (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology*, 60(5), 523–533. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1158-6>.

Thrusfield, M., Christley, R. (2018). *Veterinary Epidemiology* 4<sup>th</sup> Edition. Wiley Blackwell. Oxford.

Todorovic, R., Adams, L., & Vizcaíno, O. (1971). Determinación de anticuerpos de *Babesia* por la técnica de fijación del complemento. Instituto Colombiano Agropecuario. Recuperado de: <https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/23168?locale-attribute=es>.

Toru Matsui, Haruto Yokota, Seigo Sato, Sukekuni Mukataka, Joji Takahashi, Pressurized Culture of *Escherichia coli* for a High Concentration, *Agricultural and Biological Chemistry*, Volume 53, Issue 8, 1 August 1989, Pages 2115–2120, <https://doi.org/10.1080/00021369.1989.10869644>.

USDA. (abril de 2020). International Baseline Data. Recuperado el septiembre de 2020, de <https://www.ers.usda.gov/data-products/international-baseline-data/international-baseline-data/#2019%20International%20Long-Term%20Projections%20to%202028>.

Vannier, E. G., Diuk-Wasser, M. A., Ben Mamoun, C., & Krause, P. J. (2015). Babesiosis. *Infectious disease clinics of North America*, 29(2), 357–370. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.02.008>.

Vial, H. J., & Gorenflot, A. (2006). Chemotherapy against babesiosis. *Veterinary parasitology*, 138(1-2), 147–160. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.048>.

Vijaykumar, L. K., Chikkachowdappa, P. G., Venkatappa, M. H., Rizvan, A., Yogisharadhya, R., Shivachandra, S. B., & Bayyappa, M. (2021). Evaluation of recombinant BgSA3 protein based indirect-ELISA for sero-diagnosis and sero-surveillance of *Babesia*

*gibsoni* in dogs. *Veterinary parasitology*, 289, 109338.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109338>.

Waller, R. F., & McFadden, G. I. (2005). The apicoplast: a review of the derived plastid of apicomplexan parasites. *Current issues in molecular biology*, 7(1), 57–79.

Wang, Y., Wang, G., Ou, J., Yin, H., & Zhang, D. (2014). Analyzing and identifying novel B cell epitopes within *Toxoplasma gondii* GRA4. *Parasites & vectors*, 7, 474.  
<https://doi.org/10.1186/s13071-014-0474-x>.

Weis-Garcia, F., & Carnahan, R. H. (2017). Characterizing Antibodies. *Cold Spring Harbor protocols*, 2017(11), pdb.top093823. <https://doi.org/10.1101/pdb.top093823>.

Williams, D. C., Van Frank, R. M., Muth, W. L., & Burnett, J. P. (1982). Cytoplasmic inclusion bodies in *Escherichia coli* producing biosynthetic human insulin proteins. *Science (New York, N.Y.)*, 215(4533), 687–689. <https://doi.org/10.1126/science.7036343>.

Wingfield P. T. (2015). Overview of the purification of recombinant proteins. *Current protocols in protein science*, 80, 6.1.1–6.1.35.  
<https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0601s80>.

Woestenenk, E. A., Hammarström, M., van den Berg, S., Härd, T., & Berglund, H. (2004). His tag effect on solubility of human proteins produced in *Escherichia coli*: a comparison between four expression vectors. *Journal of structural and functional genomics*, 5(3), 217–229. <https://doi.org/10.1023/b:jsfg.0000031965.37625.0e>.

Yilmaz, H., Faburay, B., Turan, N., Cotton-Caballero, M., Cetinkaya, B., Gurel, A., Yilmaz, A., Cizmecigil, U. Y., Aydin, O., Tarakci, E. A., Bayraktar, E., & Richt, J. A. (2019). Production of Recombinant N Protein of Infectious Bronchitis Virus Using the Baculovirus Expression System and Its Assessment as a Diagnostic Antigen. *Applied biochemistry and biotechnology*, 187(2), 506–517. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2815-2>.

Yokoyama, N., Okamura, M., & Igarashi, I. (2006). 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*, 138(1-2), 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.037>.

Ziegler, M., Zieringer, J., Döring, C. L., Paul, L., Schaal, C., & Takors, R. (2021). Engineering of a robust *Escherichia coli* chassis and exploitation for large-scale production processes. *Metabolic engineering*, 67, 75–87. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2021.05.011>.

Zintl, A., Gray, J. S., Skerrett, H. E., & Mulcahy, G. (2005). Possible mechanisms underlying age-related resistance to bovine babesiosis. *Parasite immunology*, 27(4), 115–120. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2005.00748.x>.

## IX. APÉNDICES

### 9.1 Reactivos

- Acetona 4 l. Marca Jalmek. Número de catálogo 67-64-1.
- Ácido cítrico ( $C_6H_8O_7$ ) anhidro 500g. Marca Meyer. Número de catálogo 72-92-9.
- Ácido sulfúrico 1 l. Marca J. T. Baker. Número de catálogo 9681-02.
- Agua destilada 20 l. Marca Ecopura.
- Agua estéril para uso inyectable 1000mL. Marca PISA Farmacéutica.
- Alcohol etílico 20 l. Marca Ecopura. Número de catálogo 64-17-15.
- Anticuerpo de cabra acoplado a Alexa flúor 488 anti IgG (H+L) de bovino. Marca Jackson Immunoresearch. Código 101-545-003.
- Anticuerpo de cabra acoplado a peroxidasa de rábano anti IgG H+L de bovino. Marca Jackson Immunoresearch- Código 101-035-003.
- Bicarbonato de sodio ( $NaHCO_3$ ) 500 g. Polvo. Marca J.T. Baker. Número de catálogo 3506-01.
- Carbonato de sodio monohidratado ( $Na_2CO_3 \cdot H_2O$ ), cristal 500g. Marca J. T. Baker. Número de catálogo 3598-01.
- Citrato de sodio dihidrato, granular 500g. Marca J. T. Baker. Número de catálogo 3646-01.
- Cloruro de potasio (KCl) 500g. Marca Research Organics. Número de catálogo 0714P.
- Cloruro de sodio (NaCl), cristal 2.5kg. Marca J. T. Baker. Número de catálogo 3624-05.
- Curva estándar de albúmina sérica bovina. Marca BioRad. Número de catálogo 500-0207.
- DAPI 50 mg. Marca Sigma-Aldrich. Número de catálogo 28718-90-3.
- Fosfato de potasio monobásico ( $KH_2PO_4$ ) 500g. Marca Research Organics. Número de catálogo 0712P.

- Fosfato de sodio dibásico anhidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 500g. Marca Jalmek. Número de catálogo 7558-79-4.
- Glicerina 1l. Marca Jalmek. Número de catálogo G0925-13.
- Inhibidor de proteasas, tabletas. Marca Roche. Número de catálogo 11836170001.
- Leche descremada 500g. Marca Difco. Número de referencia 232100.
- Orto-fenilendiamina (OPD) 5 g. Marca Sigma. Número de catálogo P23938.
- Peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 30% 1l. Marca J. T. Baker. Número de catálogo 7722-84-1.
- Polioxietileno-20 (Tween-20) 500ml. Marca Biotech. Número de catálogo 9005-64-5.
- Reactivo de Bradford 500ml. Marca Sigma. Número de catálogo B6916.

## 9.2 Material

- Filtros para jeringa de 28 mm con membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ . Marca Corning. Número de producto 431219.
- Jeringa de 50 ml sin aguja. Marca Terumo. Número de producto SS\*50.
- Microplaca de 96 pozos de alta unión 3590. Marca Costar. Número de producto COR-3590.
- Microplaca de 96 pozos sin afinidad de unión. Marca Greiner. Número de catálogo 89131-676.
- Pipeta 0.5-2  $\mu\text{l}$  omniPette. Marca Cleaver Scientific. Número de catálogo CV10.
- Pipeta 100-1000  $\mu\text{l}$  omniPette. Marca Cleaver Scientific. Número de catálogo CV1000.
- Pipeta 20-200  $\mu\text{l}$  omniPette. Marca Cleaver Scientific. Número de catálogo CV200.
- Pipeta 2-20  $\mu\text{l}$  omniPette. Marca Cleaver Scientific. Número de catálogo CV20.
- Pipeta de 8 canales Finnpipette F1 volumen 10-100  $\mu\text{l}$ . Marca Thermo Scientific. Número de catálogo 46S1020.
- Pipeta de 8 canales Finnpipette F1 volumen 30-300  $\mu\text{l}$ . Marca Thermo Scientific. Número de catálogo 4661030.

- Pipeta serológica estéril. Paquete individual. Marca NEST. Número de catálogo 327001.
- Pipeta serológica estéril. Paquete individual. Marca NEST. Número de catálogo 328001.
- Pipeteador automático MaxPette. Marca Tomos.
- Tubos cónicos para centrífuga 15 ml. Bolsa. Número de catálogo 601052.
- Tubos cónicos para centrífuga 50 ml. Bolsa. Número de catálogo 602052.

### 9.3 Equipo

- Agitador orbital de sobremesa MaxQ4450. Marca Thermo Scientific. Modelo SHKA4450.
- Balanza analítica 0.1 mg- 220 g AX224. Marca Sartorius Mecatronics. Serio M-Pact.
- Baño María. Marca Anova Inc. Modelo 6W.
- Campana de flujo laminar. Marca ESCO Global. Modelo AC2-3S9.
- Centrifuga multifunción refrigerada CR3i. Marca Thermo Electron Corporation. Número de catálogo 11175774.
- Lector de microplacas iMark. Marca Bio-Rad. Número de serie 13600.
- Mezclador VX-200. Marca Labnet. Número de catálogo S0200.
- Microcentrífuga de alta velocidad LSE. Marca Corning. Número de catálogo 6765-HS.
- Microscopio de fluorescencia DM2500. Marca Leica. Número de serie 123456-062011
- Potenciómetro. Marca Hanna Instruments. Modelo HI 2211.
- Ultra congelador -70 °C Revco. Marca Thermo Scientific.

#### 9.4 Soluciones

Amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 9.6 100 ml	
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.318 g
NaHCO <sub>3</sub>	0.586 g
Agua destilada	Cbp 1000 ml
*Almacenar a 4 °C	

Amortiguador salino de fosfatos (PBS) pH 7.4 1000 mL	
NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g
Agua destilada	Cbp 1000 ml

Amortiguador salino de fosfatos Tween 20 (PBS-Tween) pH 7.4 1000 ml	
NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g
Tween 20	0.5 ml
Agua destilada	Cbp 1000 ml

Anticuerpo secundario ELISA 1:2000 10mL	
Anti IgG (FC) bovino	5 µl
PBS-Tween 20	9.995 µl

Solución reveladora ELISA 10 mL	
Ácido cítrico 0.1 M	5 ml
Citrato de sodio 0.1 M	5 ml
Peróxido de hidrógeno	4 $\mu$ l
OPD	4 mg

Anticuerpo secundario IFI 1:400 1mL	
Anticuerpo de cabra Alexa 488	2.5 $\mu$ l
DAPI 100 $\mu$ g/mL	10 $\mu$ l
PBS-Tween 20	987.5 $\mu$ l

Glicerina fosfatada 10 mL	
Glicerina	5 ml
PBS pH 7.4	5 ml

## 9.5 Procedimiento del iELISA basada en la CHPV1.9

1. Diluir la CHPV1.9 a concentración de 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  usando tampón de carbonatos.
2. Preparar 500  $\mu\text{l}$  de suero de bovino en dilución 1:500 con tampón de carbonatos, este es el control del conjugado.
3. Sensibilizar una placa de ELISA con 100  $\mu\text{l}$ /pozo de la dilución de la CHPV1.9. Agregar 100  $\mu\text{l}$  del control de conjugado en el pozo H12.
4. Incubar la placa a 4  $^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche.
5. Desechar el contenido de la placa en la tarja. Agregar 200  $\mu\text{l}$ /pozo de PBS-Tween y agitar durante 2 minutos.
6. Desechar el contenido y retirar el exceso de líquido sobre una gasa.
7. Realizar los pasos 5 y 6 tres veces para lavar la placa.
8. Agregar 200  $\mu\text{l}$ /pozo de leche descremada al 5% en PBS-Tween.
9. Incubar a 37  $^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora.
10. Repetir los pasos 5-7 para lavar la placa.
11. Diluir los sueros controles y problema en 1:100 utilizando leche descremada al 1% en PBS-Tween.
12. Agregar 100  $\mu\text{l}$ /pozo de los sueros por triplicado. Los cuatro controles se agregan en la fila G y H por triplicado.
13. Incubar la placa a 37  $^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora.
14. Realizar 3 lavados a la placa como se describe en los pasos 5-7.
15. Preparar el anticuerpo secundario a dilución 1:2000 en PBS-Tween (la dilución del anticuerpo secundario depende del lote).
16. Agregar 100  $\mu\text{l}$ /pozo del anticuerpo secundario a toda la placa.
17. Incubar a 37  $^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora.
18. Realizar el lavado de la placa de acuerdo con los pasos 5-7.
19. Preparar la solución de revelado como se describe en la sección de soluciones (se prepara al momento).

20. Agregar 100  $\mu$ l/pozo de la solución de revelado a toda la placa. Comenzar a tomar el tiempo de revelado al momento de agregar la solución en la primera columna de la placa.
21. Revelar la placa durante 30 minutos en la oscuridad.
22. Agregar 100  $\mu$ l/pozo de solución de paro para detener la reacción.
23. Leer la absorbancia a 490 nm de longitud de onda en un lector de placas de ELISA.
24. Determinar el punto de corte de la técnica como el promedio de los sueros negativos más 3 desviaciones estándar del mismo. Todos los sueros con absorbancias mayores a este valor se les considera como sueros positivos.
25. Desechar el contenido de la placa en un frasco ámbar.