



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

*Comparación entre las Pruebas de Inmunofluorescencia  
Indirecta y Contrainmunolectroforesis para el  
Diagnóstico de la Babesiosis Bovina.*

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
BIBLIOTECA - UNAM

**T E S I S**

Que para obtener el Título de:  
Médico Veterinario Zootecnista  
**P R E S E N T A :**  
*Octavio de Paz Villafán*

**ASESORES**

Q. B. P., M. en C. Rosario Chapa  
Ruiz

M. V. Z., M. en C., Ph. D.  
Raúl Vargas García.

MEXICO, D. F.

1 9 8 3

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

BIBLIOTECA - UNAM



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNAM  
1983  
P396  
e)-b  
P-t-83-165b



J U R A D O .

M.V.Z. RAYMUNDO MARTINEZ PEÑA.

M.V.Z. RAUL VARGAS GARCIA.

M.V.Z. MA. DE LOS ANGELES ROA RIOL.

M.V.Z. FERNANDO PEREZ-GIL R.

M.V.Z. JORGE ALBAYTERO GARCIA.

CON TODO RESPETO Y AGRADECIMIENTO

DEDICO ESTA TESIS

A TERE

POR SU AMOR, CONFIANZA Y

ABNEGACION DURANTE TODOS

ESTOS AÑOS

A GABY Y EDGAR

PORQUE SON DOS RAZONES QUE

ME IMPULSAN A SEGUIR

A MIS PADRES

JUAN Y MERCEDES

POR SU CARIÑO DESINTERESADO Y EJEMPLAR CONDUCTA

A MIS HERMANOS

FAVIO CESAR

MARCO ANTONIO

MARIA MERCEDES

MARIA CRISTINA

JUAN MANUEL Y

OSCAR

CON CARIÑO DESEANDO QUE LOGREN

TODOS SUS IDEALES

A JOSE MORALES RUIZ  
POR SU AMISTAD Y COMPRENSION  
DURANTE LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO

A ROSA MARIA  
POR SU VITAL COOPERACION



A CHAYO

CON ADMIRACION, RESPETO Y GRATITUD

A RAUL VARGAS G.  
POR SU GENTIL APOYO

A TODAS LAS PERSONAS QUE DIRECTA  
O INDIRECTAMENTE ME AYUDARON A  
LOGRAR ESTE GRADO DE SUPERACION

POR SU VALIOSA AYUDA EN LA REALIZACION  
DE ESTA TESIS AGRADEZCO A

GUADALUPE LOPEZ DE PADILLA  
CECILIA MUÑOZ CANO DE ANAYA  
CONCEPCION URIBE DE MEJIA  
ALFONSO ALVA

## I N D I C E

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
MATERIAL Y METODOS	8
RESULTADOS	17
DISCUSION	22
CONCLUSIONES	23
LITERATURA CITADA	24

## RESUMEN

La babesiosis es una de las enfermedades que causan más pérdidas económicas en la ganadería de México; las cuales son el reflejo de las muertes del ganado y de la disminución total o parcial de la eficiencia productiva del huésped afectado.

Debido a que la presencia de la Babesia en el organismo estimula la formación de anticuerpos en el huésped, se cuenta con diferentes técnicas diagnósticas serológicas, los cuales a pesar de presentar ventajas no pueden ser recomendadas como oficiales, debido a sus limitaciones. Entre estas, la que presenta más ventajas es la inmunofluorescencia indirecta, la cual presenta la desventaja del alto costo del equipo y su poca disponibilidad en el campo. Por esta razón se comparó esta prueba con la de contraimmunoelectroforesis que es más fácil de realizar. Los resultados en este trabajo indican que la sensibilidad de esta última técnica es muy alta, ya que se encontró un 94% de correlación.

## INTRODUCCION

La babesiosis (piroplasmosis, fiebre de Texas, ranilla, sangre en la orina, fiebre del bazo, aguas rojas, etc.), es una de las enfermedades que causan más pérdidas económicas en la ganadería de México; estas pérdidas son el reflejo de las bajas en el ganado y de la disminución total o parcial de la eficiencia productiva del huésped afectado.

El agente causal de estas enfermedades es la Babesia, un hemoprotozoario que pertenece a la familia Babesidae y al sub-orden Piroplasmidea, el cual fue descrito por primera vez en 1888 por Babes (1).

Algunas especies de Babesia que se conocen actualmente son: en equinos B. equi (11), B. caballi (18), en ovinos B. ovis (14), B. motasi (30), en caninos B. canis, B. gibsoni y B. vogeli (7,20), en bovinos. B. bovis - (B. Argentina B. barbera) (14), B. bigemina (27,29), B. divergens (5), - B. Major (24). También se ha informado la presencia de Babesia en cerdos (12) y en humanos (21,23,25).

Una de las características más importantes en las enfermedades por hemoprotozoarios, es la presencia del parásito en el sistema circulatorio del huésped.

Este protozoario es transmitido por vectores artrópodos (27). En los casos de B. bigemina y B. bovis, esta transmisión la efectúan principalmente las garrapatas Boophilus microplus y B. annulatus (22).

La presencia de la Babesia en el organismo estimula la formación de anticuerpos en el huésped, lo cual permite la existencia de diferentes tipos de diagnóstico inmunológico, herramientas para conocer que el huésped ha estado en contacto con el parásito, así como para poder determinar las zonas endémicas. En estudios epizootiológicos, es conveniente no sólo saber

cuándo los animales son portadores sanos o reactores positivos, sino que es necesario determinar qué parte de la población de vectores es está infectada.

En lo que respecta a su diagnóstico

Existen tres tipos de diagnóstico para babesiosis:

#### I. Diagnóstico Directo en el Vector Artrópodo

Entre 5 y 7 días después de que la garrapata se desprendió del huésped, se obtiene linfa, la cual se tiñe por medio del método de Giemsa, con anticuerpos fluorescentes o por cualquier otro método, para detectar la presencia en la garrapata, de organismos babesiales (26).

#### II. Diagnóstico Directo en el Huésped Mamífero

Existen dos tipos de muestras para examinar: Las laminillas con capa delgada o gruesa de sangre periférica, y las laminillas de órganos viscerales. Es recomendable utilizar laminillas con capas delgadas y gruesas de sangre periférica a partir de los animales sospechosos. Esto incrementa las posibilidades de realizar un diagnóstico certero. Cuando los animales han muerto, es recomendable obtener improntas de riñón, corazón, bazo, páncreas, hígado, cerebro y cerebelo para ser teñidas con Giemsa y poder determinar la presencia o ausencia de la Babesia. El cerebro es el órgano en donde se observa un mayor número de organismos, ya que mientras en la sangre periférica puede existir una parasitemia menor del 1%, en el cerebro se pueden encontrar 5,10% o más parásitos, por lo que en algunas ocasiones obstruyen los conductos capilares arteriales y venosos (2).

### III. Diagnóstico Inmunológico

#### 1) Prueba Directa de Inmunofluorescencia (P.D.I.)

Esta prueba consiste en obtener sangre de animales sospechosos y hacerlos reaccionar con un suero (anticuerpos) anti-Babesia fluoresceinado. No es una prueba muy usada puesto que es más sensible la prueba de laminilla de gota gruesa o delgada teñida con Giemsa.

#### 2) Prueba Indirecta de Inmunofluorescencia (I.F.I.)

Con esta prueba (22) se puede titular la presencia de anticuerpos específicos. Es una de las pruebas de mayor sensibilidad dentro del diagnóstico; utiliza antisueros que pueden ser preparados en el laboratorio o bien pueden adquirirse comercialmente. Esta prueba se usa actualmente junto con la prueba Indirecta de Hemoaglutinación para determinar las áreas de infestación y la prevalencia de babesiosis en la República Mexicana.

En el aspecto de Investigación se usa la I.F.I. para determinar la respuesta serológica a varios antígenos babesiales aislados a partir de garrapatas infectadas con Babesia bovis, así como para evaluar la premunición en relación con el título de anticuerpos con cantidad y calidad de antígeno usado.

#### 3) Prueba de Fijación de Complemento (F.C.)

Esta prueba (13) ha sido utilizada por varios grupos de investigadores para detectar anticuerpos en contra de Babesia en diferentes especies. Es una de las pruebas oficiales para detectar a los animales positivos o negativos a esta enfermedad. Tiene algunas ventajas tales como su índice bajo de reacciones de falsos positivos, entre 2 y 3% de los casos estudiados.



Otra ventaja es la poca purificación necesaria para la preparación de antígenos; sin embargo, se debe utilizar sangre infectada que contenga menos del 60% de parasitemia. En los estudios epizootiológicos en México, sin embargo, se prefieren las pruebas ya descritas por considerarse más prácticas y con bajo índice de reactivos falsos positivos.

#### 4) Prueba Indirecta de Hemoaglutinación (P.I.H.) (19)

Esta prueba ha demostrado ser una de las más sensibles, pues tiene un margen mínimo de error. En México se implantó esta prueba a partir de 1970, con la que se determinó la incidencia de babesiosis en diferentes especies animales y el hombre.

Se produce el antígeno de varias formas, siendo el origen común sangre infectada. Se puede preparar con sangre citrada y más tarde lisada por medios físicos, agua destilada, desintegración sónica, agitación violenta, etc. También se puede preparar a partir de coágulos de sangre infectada; en ésta se debe utilizar la desintegración sónica. En ambos casos el antígeno se purifica por medio de centrifugación y en algunas ocasiones por medio de cromatografía en gel. El resultado de las pruebas serológicas (ausencia de reacciones falso-positivas) va a depender de la preparación y el manejo de los antígenos. Es importante indicar el antígeno con parasitemia entre 55 y 65%, y procesar la sangre en un término no mayor de 12 horas después de haberla obtenido.

Con esta técnica, es factible poder titular los sueros positivos a babesiosis; esta es la técnica que se usa para medir respuestas inmunológicas en animales en condiciones de laboratorio y en el campo.

5) Prueba de Hemoaglutinación Pasiva (P.H.P.) (10)

Utiliza antígeno soluble por desintegración sónica de eritrocitos parasitados, el cual se pasa a través de Sephadex G-200. Es una prueba muy sensible ya que detecta más del 95% de animales infectados naturalmente. También detecta anticuerpos en calostro; sin embargo, es muy laboriosa ya que necesita sensibilizar eritrocitos; por otra parte, el complejo antígeno-eritrocito sensibilizado tiene una vida muy corta, por lo cual se tiene que momificar utilizando aldehidos.

6) Prueba de Aglutinación en Tubos y Placa

Los antígenos utilizados en estas pruebas (6, 8 y 28), son los parásitos liberados de los eritrocitos infectados por lisis hipotónica. La diferencia que existe entre ambas pruebas es que en la de placa se agrega un colorante para hacer más visible la reacción. Necesitan un medio ambiente de temperatura controlado y sueros inactivados que en condiciones de campo son difíciles de procesar. Esta prueba tiene serios inconvenientes, entre los más importantes destaca el no poder titular los sueros por examinar; por otra parte, no son suficientemente sensibles para detectar correctamente a los animales, por lo cual, el número de falsos positivos y negativos es superior al que ofrecen las pruebas de I.H.A. e I.F.I., estas limitantes deben ser consideradas antes de iniciar pruebas o estudios epizootológicos a gran escala.

7) Prueba de Aglutinación en Látex (P.A.L.)

En esta prueba (9) se utiliza latex recubierto de antígenos solubles de B. bovis obtenidos por tratamiento ultrasónico de eritrocitos infectados. Esta prueba detecta todos los animales infectados menores de dos años y del 80-90% de los mayores de dos años, aún cuando éstos tengan más de cuatro años de haber sido infectados. No se obtiene más del 3% de falsos positivos.

8) Prueba de Aglutinación en Eritrocitos Parasitados (P.A.E.P)

En esta prueba (4) se utiliza como antígeno una suspensión de eritrocitos infectados (80%). Se encuentran altos títulos de aglutinación cuando se hacen reaccionar los eritrocitos parasitados y los sueros obtenidos de la misma zona geográfica.

9) Contrainmunolectroforesis (C.I.E.)

Esta prueba consiste en someter a un campo eléctrico tanto al antígeno como al anticuerpo, utilizando como soporte un gel de agarosa, esto permite que se encuentre el antígeno con el anticuerpo y precipite.

Debido a que la inmunofluorescencia indirecta es una de las pruebas con mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de Babesia se quiso comparar con la técnica de contrainmunolectroforesis, para ver si ésta ofrece la sensibilidad y especificidad que tiene la primera, ya que la segunda ofrece mayor facilidad en el manejo y equipo, de tal manera que se pudiera establecer la contrainmunolectroforesis como técnica de diagnóstico serológico de babesiosis.

## MATERIAL Y METODOS

### 1. Obtención de Antígeno de Babesia bovis.

A un bovino de raza Holstein previamente esplenectomizado, se le inocularon 20 ml de sangre infectada con B. bovis alcanzando una parasitemia de 2%. De este animal se sacaron 20 ml de sangre infectada y se inocularon a otro bovino con las mismas características que el anterior. Este procedimiento se repitió hasta haber completado cinco pases en becerros esplenectomizados, con la única diferencia de que al último becerro se le administraron además 5 mg de dexametazona /kg de peso. De esta manera se logró un 22% de parasitemia en el último animal.

La sangre se recogió volumen a volumen en una solución amortiguadora de ACD estéril, la cual contiene:

Dextrosa	22.00 g
Citrato de sodio dihidratado	22.52 g
Acido cítrico monohidratado	8.00 g
Agua destilada aforar a	1000 ml

Esta solución se esterilizó en autoclave a 10 lbs. por 10 minutos, o por filtración a través de filtro milipore de 0.22mm de diámetro de poro.

Se obtuvo el paquete de glóbulos rojos y se lavó con dos volúmenes de solución amortiguadora de salina-fosfatos (PBS), - 0.15M y pH 7.2, por centrifugación a 1200 g durante 20 minutos a 4°C cuatro veces.

Solución amortiguadora de salina-fosfatos 0.15 M y pH 7.2

Fosfato monobásico de potasio	15.30	g
Fosfato ácido de sodio	47.88	g
Cloruro de sodio	25.50	g
Agua destilada para aforar a	6	lt

Una vez que los eritrocitos se lavaron, se resuspendieron en dos volúmenes de PBS pH 7.2 y se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas. Después de este tiempo se descongeló y se procedió a congelar y descongelar rápidamente repitiendo el proceso cinco veces, con el fin de lisar los eritrocitos. El congelamiento se efectuó en una mezcla de alcohol etílico y hielo seco ( $\text{CO}_2$ ) y el descongelamiento en baño maría a  $37^{\circ}\text{C}$ . Esta suspensión se centrifugó a 10,000 g durante 30 minutos a  $40^{\circ}\text{C}$ . Se recolectó el sobrenadante y se liofilizó. Un gramo de este liofilizado se resuspendió en 20ml de solución salina al 0.85% y se precipitó con sulfato de amonio saturado a diferentes concentraciones (33, 50 y 60% de saturación). El precipitado formado se obtuvo por centrifugación a 1000 g durante 30 minutos; el sobrenadante se eliminó y el sedimento se resuspendió en 10ml de PBS pH 7.2. Para eliminar el sulfato de amonio se dializó contra PBS durante cinco días cambiando cada doce horas la solución de diálisis.

Una vez dializado se determinó la concentración de proteína por el método de Lowry (15) dando una concentración de 1.6 mg/ml. A esto se le denominó antígeno soluble de Babesia bovis (Ag-S Bb).

Por el mismo procedimiento se obtuvo el antígeno soluble de glóbulos rojos normales (Ag S GRN), el cual fue utilizado como antígeno testigo; con estos antígenos se trabajó el método de con-trainmuno-electroforesis.

2. Obtención de Sueros.

Se colectaron muestras de sangre de 116 bovinos localizados en el Centro Experimental Pecuario "Las Margaritas", en Hueytamalco, Pue., que es una zona infestada de garrapatas (Boophilus annulatus) con el fin de obtener sueros de animales con probable babesiosis activa o crónica. Se extrajeron muestras de sangre de 20 bovinos localizados en el Rancho Experimental "Cuatro Milpas", Tepozotlán, Edo. de México, dependiente de la U.N.A.M. considerado como una zona libre de garrapatas, con el objeto de obtener sueros de animales libres de babesiosis, los cuales se utilizaron como testigos negativos.

3. Obtención de sueros testigos positivos y negativos, a partir de bovinos infectados experimentalmente

- a) Como testigos positivos se tuvieron tres bovinos Holstein de 6 meses de edad y 150 kg de peso, libres de Babesia bovis, (detectados por IFI), los cuales se infectaron con larvas de garrapatas Boophilus annulatus parasitadas con B. bovis.
- b) Como testigo negativo se tuvo un bovino con las mismas características que los anteriores y que se infectó con larvas de B. annulatus libres de B. bovis.

Los animales se mantuvieron en los corrales de la Unidad Central del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias. Las muestras de sangre se tomaron a los 5 y 10 días antes de la infección y a los 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 25, y 82 días después de la infección.

Los sueros fueron congelados a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso en las pruebas de inmunofluorescencia indirecta y contraelectroforesis. Se obtuvo reacción de precipitación por contraelectroforesis con los tres antígenos obtenidos cuando se hacían reacciones con el suero de bovinos portadores del parásito. Se decidió utilizar el antígeno obtenido por precipitación con sulfato de amonio al 60%, puesto que a esa concentración se obtuvieron también los antígenos que precipitaron con sulfato de amonio al 33 y 50% de saturación.

#### 4. Obtención de Antigammaglobulina marcada con Fluoresceína

Primeramente se obtuvo la gammaglobulina bovina a partir de suero bovino normal por precipitación con sulfato de amonio a una concentración final de 33% de saturación (3), se obtuvo el precipitado por centrifugación a 3000 g, durante 30 minutos; éste se resuspendió en solución salina 0.85% pH 7.8 y se precipitó en las mismas condiciones mencionadas, repitiendo este paso una vez más; finalmente, el precipitado que contenía las gammaglobulinas se resuspendió en una solución amortiguadora de salina-boratos - pH 7.8 y se dializó contra esta misma solución durante 3 días con dos cambios diarios. Después se le determinó el contenido de proteína por el método de Lowry et al. (15) y se utilizó para inducir la producción de anticuerpos en conejos. Con la fracción gamma globulina bovina obtenida se inmunizaron conejos de acuerdo a protocolo que se muestra en el cuadro 1.

CUADRO 1

PRODUCCION DE ANTICUERPOS ANTIGAMMAGLOBULINA BOVINA

INOCULACION	DIA		VIA
1	0	50 mg de Ag disuelto en 1 ml de solución salina estéril, emulsificada con 1 ml de adyuvante completo de Freund	Intradérmica o subcutánea en múltiples sitios
2	15	Igual a la primera pero usando adyuvante incompleto de Freund	Subcutánea
3	30	0.25 mg del Ag en solución salina	Intramuscular
4	31	0.500 mg de Ag en solución salina	Intramuscular
5	32	1 mg del Ag en solución salina	Intramuscular
Sangrado	39		

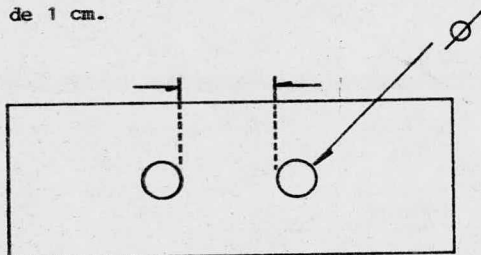


Se obtuvo el suero de conejo antigammaglobulina bovina y se purificaron los anticuerpos nuevamente por precipitación con sulfato de amonio al 33% (método ya descrito).

5. Obtención del Conjugado Antigammaglobulina con Isotiocianato de Fluoresceína

A la fracción gammaglobulina de conejo purificada se le determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (15) y se ajustó a una concentración de 5 mg/ml para acoplarla con isotiocianato de fluoresceína (12.5  $\mu$ g/ml de proteína total). El isotiocianato fue disuelto en 100 ml de una solución de carbonato de sodio 0.1M y se adicionó con agitación suave a la solución de proteína a la cual se le ajustó previamente el pH a 9 con la misma solución. Cuando el pH de la mezcla ya no varió después de 15 minutos, se dejó reaccionar la mezcla con agitación suave y preservándola de la luz durante 18 horas. Todo el procedimiento se efectuó en frío (baño de hielo). Después de que se completó el tiempo de reacción la mezcla se centrifugó a 1500 g para eliminar cualquier precipitado que se hubiera formado y después se pasó a través de una columna de 2.5 cm de diámetro, una longitud de 60 cm y con 4.5 gm de Sephadex g-50 (fine), lavado previamente dos o tres veces con solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M y pH 7.5 eliminando las partículas más finas que quedaban en el sobrenadante. La elución de la muestra se hizo con esta misma solución amortiguadora. Se obtuvieron dos fracciones coloridas (amarillo-verdosa); la primera, representó la inmunoglobulina conjugada, y la segunda era el fluorurocromo que no reaccionó. La fracción que contenía la inmunoglobulina conjugada se congeló a  $-70^{\circ}\text{C}$  en pequeñas alícuotas que se congelaron hasta su uso.

Agregar a la solución A la solución B y ajustar el pH a 8.6  
Se hacen dos horadaciones de 3 mm de diámetro en la placa de agarosa como se ilustra en el esquema, con una separación entre sí de 1 cm.



El antígeno (obtenido de acuerdo a la técnica 1), se coloca en el pozo que corresponde a la región catódica separada un centímetro del pozo que contiene el anticuerpo (el suero proplema) que está situado en la región anódica.

Los sueros de los animales se de complementan previamente calentándolos a 56°C durante 30 minutos y se precorren a una intensidad de corriente de 30 mA en un aparato para CIE durante 15 minutos, inmediatamente después se coloca el antígeno soluble de B. bovis y se corren 75 minutos más. La aparición de una banda de precipitación se considera una prueba positiva (presencia de anticuerpos con el antígeno usado). Es recomendable que estos sueros se prueben también con el antígeno soluble de glóbulos rojos normales para demostrar que la reacción es específica contra B. bovis y no debida a algún componente de los glóbulos rojos normales. Se corren al mismo tiempo testigos de suero y testigos de antígeno contra PBS.

Las placas se dializan tres días con dos cambios diarios de solución salina fisiológica (0.85%) y tres días más con agua destilada. Se secan a 37°C y se tiñen con una solución azul de Comassie al 0.2% en metanol:acético:agua (5:1:5) y se elimina el exceso de colorante con esta misma solución pero sin colorantes.

6) Inmunofluorescencia Indirecta

Esta técnica consiste en incubar durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda, los frotis de sangre infectada con B. bovis; - después de este tiempo, se lavan con PBS, se incuba nuevamente a 37°C durante 30 minutos en cámara húmeda, se lava nuevamente con PBS agitando durante 10 minutos y después con agua destilada también 10 minutos con agitación para eliminar las sales; se seca por aireación; se les adiciona una gota de glicerina fosfatada, se les coloca un portaobjetos encima y se observan al microscopio de fluorescencia.

Los frotis se pueden dividir de la siguiente manera con el fin de probar varios sueros a la vez.


7) Contrainmunolectroforesis

Se prepara un gel de agarosa al 0.75% en una solución amortiguadora de barbiturato HCl 0.065 M a pH 8.6

Solución Amortiguadora de barbituratos HCl

Solución A

Dietilbarbiturato de sodio 6,700 g.

Agua destilada aforar a 500 ml

Solución B

Acido clorhídrico al 37% 1.02 ml

Agua destilada aforar a 500 ml

8) Determinación del Título de Conjugado

La determinación del título conjugado se efectuó por medio de la técnica de inmunofluorescencia indirecta descrita, utilizando un microscopio de fluorescencia marca Leitz Ortholux con filtros BG12 y K-510.

Las diluciones de antigammaglobulina fluoresceinada trabajados fueron 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, y 1:80. Se determinó el título hasta la máxima dilución del conjugado en que se observaba fluorescencia, utilizando éste para los experimentos posteriores. Este título fue 1:10

9) Titulación de los Sueros de Bovinos Infectados Experimentalmente

Para determinar el grado de parasitemia de los bovinos que servirían como controles positivos, se les hizo la prueba de IFI; los sueros que resultaron positivos se diluyeron 1:60, 1:120, 1:240, 1:480, 1:960, 1:1920, 1:3840, 1:7680 con el fin de conocer su título utilizando nuevamente esta prueba. El título se expresó como la máxima dilución del suero en que toda vía se observaba fluorescencia.

10) Comparación de las Técnicas de IFI y CIE en los Sueros de los Animales de los Ranchos Experimentales

Todos los sueros obtenidos de los animales del Centro Experimental Pecuario "Las Margaritas", considerada como zona endémica, y los obtenidos en el Rancho Experimental "Cuatro Milpas" considerado como zona libre, se trabajaron tanto con la técnica de IFI como con la de CIE, a fin de conocer la sensibilidad de la segunda, y tomando como testigos los resultados obtenidos por la primera.

## RESULTADOS

Los tres bovinos infectados experimentalmente presentaron anticuerpos séricos anti - B. bovis demostrable por IFI a partir del 8° día después de la infección con un título máximo de 1:960, en cambio por CIE se detectaron estos anticuerpos hasta el 10° día. En el suero del animal testigo (infestado con garrapatas libres de B. bovis) no se demostró la presencia de anticuerpos anti - B. bovis por ninguno de los dos métodos descritos. Los sueros de los bovinos infectados no reaccionaron en la prueba de IFI con los glóbulos rojos normales ni con los antígenos obtenidos a partir de éstos por el método de CIE.

De las 116 muestras obtenidas en el Centro Experimental Pecuario "Las Margaritas", localizado en Hueytamalco, Puebla, que se considera zona endémica de babesiosis, se obtuvieron un total de 43 sueros positivos a la prueba de inmunofluorescencia indirecta, en tanto que con la prueba de contrainmunolectroforesis sólo fueron 36; siendo 73 negativos para la primera y 80 para la segunda (cuadro 2). El 31% de los sueros trabajados resultaron positivos para ambas pruebas y el 63% negativos en ambas, lo que da una correlación de 94% entre estas pruebas. El 6% restante se debió a falsos negativos, no presentándose en este caso falsos positivos (cuadro 4).

De las 20 muestras obtenidas en el Rancho Experimental "Cuatro Milpas" localizado en Tepozotlán, Edo. de México, que se considera zona libre de babesiosis, se obtuvieron todos negativos para ambas pruebas, lo que indica una correlación de 100% (cuadros 3 y 5).

Es importante señalar que en ninguna de las dos pruebas se encontró reacción entre los sueros y el antígeno obtenido a partir de glóbulos rojos normales.

CUADRO 2

## DATOS DE LOS ANIMALES DEL CENTRO EXPERIMENTAL PECUARIO "LAS MARGARITAS" SAHR

NUM. BOVINO	IFI	CIE	NUM. BOVINO	IFI	CIE	NUM. BOVINO	IFI	CIE	NUM. BOVINO	IFI	CIE
5ZR	+	+	57	-	-	80	+	+	197	-	-
237	+	+	256	+	+	329 ZR	+	+	351	+	+
358	-	-	362	+	+	402	+	+	436	+	+
487	+	+	496	+	-	502	-	-			
509 ARETE	-	-	513	+	+	596 ZR	+	+	627	-	-
668	-	-	711	+	+	752	-	-	1197	+	+
1361	+	+	1420	+	+	1496	+	-	1651	+	+
1729	+	+	1873	+	+	1857	-	-	5047	+	+
2-178	-	-	3-18	-	-	3-48	+	+	3-45	-	-
3-85	+	+	3-190	+	+	3-206	-	-	3-209	-	-
3-232	-	-	3-237	+	-	4-6	+	+	4-7	-	-
4-53	+	+	4-65	-	-	4-94	+	+	4-86	-	-
4-86	-	-	4-95	-	-	4-96	+	-	4-105	-	-
4-11	-	-	4-112	-	-	4-113	-	-	4-116	-	-
4-121	-	-	4-124	-	-	4-129	+	+	4-135	-	-
4-146	-	-	4-145	-	-	4-155	-	-	4-157	-	-
4-161	-	-	4-163	+	+	4-177	+	+	4-182	-	-
4-191	+	+	4-195	+	+	4-197	-	-	4-199	+	+
4-209	-	-	4-213	+	+	4-219	-	-	4-221	+	+
4-225	-	-	4-227	-	-	4-230	+	-	4-232	-	-
4-233	-	-	4-239	-	-	4-240	-	-	4-210	+	+
4-290	+	+	4-294	-	-	4-313	+	+	5-7	-	-
5-14	-	-	5-21	-	-	5-26	-	-	5-29	-	-
5-42	-	-	5-39	-	-	5-94	-	-	5-98	-	-
5-13	-	-	5-130	-	-	5-137	+	+	5-159	-	-
5-165	-	-	5-168	-	-	5-182	-	-	5-188	-	-
5-207	-	-	5-222	-	-	5-261	-	-	5-264	-	-
5-279	-	-	5-292	-	-	5-296	-	-	5-320	-	-
5-357	-	-	5-358	-	-	5-360	-	-	5-367	-	-
5-368	-	-	6-41	-	-						

CUADRO 3

DATOS DE LOS ANIMALES DEL RANCHO EXPERIMENTAL "CUATRO MILPAS" UNAM

---

NUM. BOVINO	IFI	CIE
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-
8	-	-
9	-	-
10	-	-
11	-	-
13	-	-
14	-	-
15	-	-
16	-	-
17	-	-
18	-	-
19	-	-
20	-	-

---

CUADRO 4

CORRELACION DE LOS RESULTADOS DE LA CIE CON LA IFI EN BOVINOS DE UNA ZONA ENDEMICA DE BABESIOSIS: CENTRO EXPERIMENTAL PECUARIO "LAS MARGARITAS" (HUEYTAMALCO, PUE.)

IFI	CIE	NUM. SUEROS	%
+	+	36	31
-	-	73	63
+	-	7	6
-	+	0	0



CUADRO 5

CORRELACION DE LOS RESULTADOS DE LA CIE CON LA IFI EN BOVINOS DE UNA ZONA LIBRE DE BABESIOSIS: RANCHO "CUATRO MILPAS"

IFI	CIE	NUM. SUEROS	%
+	+	0	0
-	-	20	100
+	-	0	0
-	+	0	0

## DISCUSION

De todas las pruebas de diagnóstico para babesiosis que se conocen actualmente, ninguna reúne las características ideales, es decir, -sensibilidad, especificidad, facilidad de realización, de interpretación y de manejo, disponibilidad para trabajarla en el campo; - por ejemplo la prueba de fijación de complemento que a pesar de no necesitar una buena purificación del antígeno da un bajo número de falsos positivos, solo sirve para sangre con más del 60% de parasitemia; con la prueba de aglutinación de eritrocitos parasitados se detectan altos títulos de aglutinación, sin embargo, solo funciona con los sueros de la misma zona geográfica; la prueba de hemoaglutinación pasiva tiene 99% de especificidad en pruebas de campo y - puede detectar anticuerpos en calostro, sin embargo, necesita sensibilizar eritrocitos, y el complejo antígeno-eritrocito sensibilizado tiene una vida muy corta; las pruebas de aglutinación en tubo y en placa son fáciles de realizar, son cualitativas ya que no se puede conocer el título; por otra parte, al utilizar un suero inactivado no es muy fácil de trabajarla en el campo siendo además poco sensible; la prueba de inmunofluorescencia indirecta es cuantitativa ya que permite la titulación de sueros específicos, es muy sensible, es fácil de realizar además de presentar la ventaja de - que se pueden comprar los antisueros, sin embargo, requiere de un microscopio de fluorescencia que no es fácil de tener en muchos laboratorios y menos en el campo, por otra parte, se necesita de personal entrenado; con la prueba de contrainmunolectroforesis se - pueden correr mayor número de sueros a la vez y al no necesitar equipo tan especializado, es posible realizarla en el campo, sin embargo, se sabe muy poco acerca de su sensibilidad.

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo se encontró un alto porcentaje de correlación (94)% entre las pruebas de contrainmunolectroforesis e inmunofluorescencia indirecta (considerada como la mejor por algunos autores como Morilla (17) ). Esta alta correlación, aunada a las ventajas mencionadas para la contrainmunolectroforesis, permite que esta técnica sea recomendada para el diagnóstico de la babesiosis en la república. Sin embargo cuando sea necesaria mucha mayor precisión en los resultados, se recomienda la inmunofluorescencia indirecta ya que es en la única donde es posible visualizar el antígeno, o sea, a la Babesia dentro del glóbulo rojo en forma inequívoca, mientras que en las otras pruebas serológicas existe la posibilidad de que los anticuerpos no solo detecten antígenos de la Babesia sino también antígenos propios del glóbulo rojo y por lo tanto den falsos positivos.

## LITERATURA CITADA

- 1) Babes, V. Sur l'hémoglobinurie bactérienne de boeufs, C.M. Acad. Sci. 107: 692-694 (1888) (cité par López, S.F., en Prevalencia de anaplasmosis y babesiosis en bovinos en el municipio de Villa Comalotlán, Chiapas, Tesis de licenciatura FMVZ. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., 1982.
- 2) Callow, L.L. and Johnston, L.A.Y.: Babesia spp in brains of clinically normal cattle and their detection by a brain smear technique, Aust. vet. J. 39: 25-31, (1963).
- 3) Campbell, D.H., Corvery, J.S., Cremer, N.E. and Sussdorf, P.D.H. Methods in Immunology, 2nd Ed. W.A. Benjamin, Inc., New York - - 1970.
- 4) Curnow, J.A.: In vitro agglutination of bovine erythrocytes infected with Babesia argentina, Nature, 217: 267-268 (1968).
- 5) Faydin, M. 1911 citado por Osorno M.; Babesiosis en México, Veterinaria México 9 (4) 203-218 (1978)
- 6) Fife, E.H.: Current state of serological tests used to detect blood parasite infections, Exp. Parasitol., 31: 136-152 (1972)
- 7) Gaafar, S.M.: Protozoal infections in canine medicine, Am. Vet. Publishing Inc., Sta. Barbara, Cal., 1968.
- 8) Goodger, B.V.: Preparation and preliminary assessment of purified antigens in the passive hemagglutination test for bovine babesiosis, Aust. vet. J., 48: 251-255 (1971).
- 9) Goodger, B.V. and Mahoney, D.F.: A rapid slide agglutination test for the herd diagnosis of Babesia argentina infection, Aust. vet. J., 50: 250-254 (1974).

- 10) Goodger, B.V. and Mahoney, D.F.: Evaluation of the passive - hemoagglutination test for the diagnosis of Babesia argentina infection in cattle, Aust. vet. J. 50: 246-249 (1974).
- 11) Hutcheon, W.: citado por Osorno M. Babesiosis en Mexico, Veterinaria México 9(4) 203-218 (1978).
- 12) Knut, P. und Du Toit, P. J.: Tropen Krankheiten der Haustiere, Messr, 2nd Edition, III Hand Bd. Trop. Krankh Ger, 1921 citado por Osorno M. Babesiosis en México, Veterinaria México 9(4) 203-218 (1978).
- 13) Kuttler, K.L. Adams, L.G. and Todorovic, R.A.: Comparisons of the complement fixation and fluorescent antibody reactions in the detection of bovine babesiosis, Am. J. vet. Res., 38: 153-155 (1977).
- 14) Levine, N.D.: Uniform terminology for the protozoal subphylum apicomplexa, J. Protozoal., 18: 252 (1971)
- 15) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farrm. A.L. and Oltziki, I.: Protein measurement with the folin-fenol reagent, J. Biol. Chem., 193: 265-275 (1951)
- 16) Mahoney, D.F.: Bovine babesiosis preparation and assessment of complement fixing antigens, Exp. Parasitol., 20: 232-241 (1967)
- 17) Morilla, G.A.: Inmunología de la babesiosis, Ciencia Veterinaria 3: 240-268 (1981).
- 18) Nitz, W.O.: Clasificación, transición y biología de piroplasmas de animales domésticos, Ann. N.Y. Acad. Sci., 65: 6-11 (1965).

- 19) Nutal, G.H.F. und Strickland, D.F.: Die parasiten der pferdepiroplasmose, "Billiar Feber" vor laufige Mitterlung Zentra evl. vukt Iant, Orig., 28: 524-525 (1910).
- 20) Osorno, M. y Ristic, M.: Babesia canis en perros en México. Téc. Pec. Méx. 26: 36-40 (1974).
- 21) Osorno, M., Vega, C., Ristic, M., Robles, C. and Ibarra, S.: Isolation of Babesia spp from asintomatic Human Beeings. Vet. Parasitol., 2:111-120 (1976).
- 22) Osorno, M.: Babesiosis en México, Veterinaria México 9(4): 203-218 (1978).
- 23) Ristic, M., Conroy, J. D., Siwe, S., Heady, G.R., Smith, A.R. and Huxsoll, D.L. Babesia species from a woman with chemical babesiosis, Am. J. Trop. Med. Hyg., 20: 14-22 (1971).
- 24) Sergent, E., Donatiers, A., Parrot L. and Lestoguard F Etudes sur les piroplasmoses bovines, Institut Pasteur, Algiers (1945) cité par Osorno. M: Babesiosis en México, Veterinaria México 9(4): - 203-218 (1978).
- 25) Skrabalo, Z and Deanovic, Z.: Piroplasmosis in man Report of a case. Aust. Vet. Bull., 28: 125-130 (1967)
- 26) Smith, R.D.: Ciclo biológico de Babesia en la garrapata, Ciencia Veterinaria 2, (1978).
- 27) Smith, T. and Kilbourne, F.L.: Investigation into the nature, causation and prevention of southern cattle fever of U.S, Bureau of Animal Industry, 1: 177 (1893) citado por Mocsy J. Hutyrá-Marek y Manninger-Mocsy Patología y terapéutica especiales de los animales domésticos V. II, 2a. Ed. Editorial Labor S.A., Barcelona, 1968.

- 28) Todorovic, R.A.: Bovine babesiosis: its diagnosis and control, Am. J. Vet. Res. 35: 1045-1050 (1974)
- 29) Tussaint, M. Piroplasmosis bigeminum en México. Boletín Inst. - Patológico, citado por López V.E. Algunas enfermedades microbia nas y parasitarias, Estación Agrícola Central Bol. 4, 1905.
- 30) Wenyon, C.M., (1926) citado por Weinman, D. and Ristic, M.: en Infection blood diseases of man and animal, Acad. Press. New York 1968.

