



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS PRUEBAS PARA EL DIAGNÓSTICO
SEROLÓGICO DE BABESIOSIS BOVINA CAUSADA POR *Babesia bovis***

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

P R E S E N T A

JOSÉ JUAN LIRA AMAYA

**TUTOR PRINCIPAL:
DR. JULIO VICENTE FIGUEROA MILLÁN
CENID-SAI, INIFAP**

**COMITÉ TUTOR:
DRA. IRENE CRUZ MENDOZA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM
DRA. GUILLERMINA AVILA RAMÍREZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. DE MÉXICO, DICIEMBRE 2020



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.

DEDICATORIAS

A mi esposa Adriana Salgado Torres, por todo su apoyo y comprensión, y quien con su amor y paciencia ha sido mi guía y mi mayor motivación para alcanzar esta nueva meta. ¡Te amo!

A mis padres, María Guadalupe y Claudio, por ser un gran ejemplo en mi vida.

A mis hermanas y sobrinos, por estar presentes en cada momento y brindarme siempre su apoyo.

A la memoria de mis abuelos (Manuel, Concepción y Herminia) y de mi tía Concepción, quienes se convirtieron en una estrella que guía mis pasos y sé que donde quiera que estén, comparten conmigo esta alegría.

A mi familia, porque todos mis éxitos también son de ustedes.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme culminar con éxito esta etapa en mi vida, brindarme la sabiduría, fortaleza y perseverancia a lo largo de mi carrera, sin el esto no sería posible.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) por el apoyo y las facilidades brindadas para realizar mis estudios de posgrado a nivel de maestría.

Al programa de Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal de la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por aceptarme en el posgrado y brindarme el apoyo necesario para mi desarrollo académico.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico otorgado durante mis estudios de posgrado a nivel de maestría, con número de apoyo 703681.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento parcial de este trabajo de tesis de maestría, a través de los proyectos: Problemas Nacionales 2015-1336 y SEP-CONACYT CB2017-2018 No. A1-S-43508.

Un agradecimiento muy especial al Dr. Julio V. Figueroa Millán, tutor de mis tesis, por compartir sus conocimientos, por su compromiso, por su apoyo brindado, por su disposición y por todas sus enseñanzas durante mi formación académica. ¡Gracias Dr. Figueroa por confiar en mí para realizar este proyecto!

A los integrantes de mi comité, la Dra. Irene Cruz Mendoza y la Dra. Guillermina Avila Ramírez, por sus valiosas aportaciones, por su disposición y apoyo brindado durante el desarrollo del proyecto.

A mis amigos de la Unidad de Babesiosis, Diego, Montse, Grecia, por su gran amistad y por todos los momentos que hemos compartido en el laboratorio.

A mis amigos y compañeros de la maestría, Luzlady, Paulo, José, por los agradables momentos que compartimos juntos y de quienes siempre tendré gratos recuerdos.

A mi esposa y mi familia, por su apoyo incondicional y por estar a mi lado en cada momento importante de mi vida. A todos y cada uno de ustedes, simplemente ¡Gracias!

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Babesiosis bovina.....	3
2.1.1. Etiología	4
2.1.2. Vector y transmisión.....	5
2.1.3. Respuesta inmune	7
2.1.4. Pruebas de diagnóstico convencionales	8
2.1.5. Pruebas rápidas de diagnóstico	9
2.1.6. Antígenos relevantes de <i>Babesia</i> spp. con potencial diagnóstico	10
2.1.7. Antígeno de superficie del merozoito (MSA-1).....	11
3. JUSTIFICACIÓN	13
4. OBJETIVOS	14
4.1. Objetivo general.....	14
4.2. Objetivos específicos.....	14
5. HIPÓTESIS	14
6. MATERIAL Y MÉTODOS	15
6.1. Localización	15
6.2. Tamaño de muestra.....	15
6.3. Muestras de suero	16
6.3.1 Sueros de referencia	16
6.3.2 Sueros obtenidos en el Sitio Experimental Pichucalco.....	16
6.4. Obtención del antígeno recombinante MSA-1 de <i>B. bovis</i>	16
6.5. Purificación de anticuerpos policlonales IgG anti-MSA-1.....	18

6.6.	Pre-adsorción de sueros.....	18
6.7.	Inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	19
6.8.	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).....	20
6.9	Prueba rápida inmunocromatográfica (ICT).....	21
6.9.1.	Bioconjugación del antígeno MSA-1 con nanopartículas de oro	21
6.9.2.	Preparación de tiras reactivas	22
6.10.	Análisis estadístico	24
6.10.1.	Evaluación del desempeño de las pruebas	24
6.10.2.	Estimación de la tasa de seroprevalencia para <i>B. bovis</i>	25
6.10.3.	Determinación de la concordancia	25
7.	RESULTADOS	26
7.1.	Obtención del antígeno recombinante MSA-1 de <i>B. bovis</i>	26
7.2.	Purificación de anticuerpos policlonales IgG anti-MSA-1.....	27
7.3.	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).....	28
7.3.1.	Evaluación del desempeño con sueros de referencia	28
7.4.	Prueba rápida inmunocromatográfica (ICT).....	30
7.4.1.	Evaluación del desempeño con sueros de referencia	30
7.5.	Inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	32
7.5.1.	Evaluación del desempeño con sueros de referencia	32
7.6.	Estimación de la tasa de seroprevalencia para <i>B. bovis</i> en el módulo de bovinos del Sitio Experimental Pichucalco	33
7.7.	Determinación de la concordancia entre las pruebas ICT y ELISA para la detección de anticuerpos contra <i>B. bovis</i> con respecto a la prueba estándar IFI.....	35
8.	DISCUSIÓN	37
9.	CONCLUSIONES	41
10.	PERSPECTIVAS	42
11.	ABREVIATURAS.....	43

12. REFERENCIAS	44
13. ANEXOS.....	57
Anexo 1. Preparación de solución amortiguadora de fosfatos (PBS 1X).....	57
Anexo 2. Preparación de solución de lisis para solubilización de proteínas.....	57
Anexo 3. Purificación del antígeno recombinante con el protocolo ProBond™ Purification System.....	58
Anexo 4. Preparación de solución amortiguadora de recubrimiento	59
Anexo 5. Preparación de solución de lavado (PBS-Tween 20 0.1%).....	59
Anexo 6. Preparación de solución bloqueo	60
Anexo 7. Preparación de solución de corrimiento	60
Anexo 8. Resultados obtenidos de las pruebas ELISA, IFI e ICT para la detección de anticuerpos contra <i>B. bovis</i> en sueros negativos de referencia	61
Anexo 9. Resultados obtenidos de las pruebas ELISA, IFI e ICT para la detección de anticuerpos contra <i>B. bovis</i> en sueros positivos de referencia.....	62
Anexo 10. Resultados obtenidos de las pruebas ELISA, IFI e ICT para la detección de anticuerpos contra <i>B. bovis</i> en sueros de bovinos del Sitio Experimental Pichucalco	63
Anexo 11. Informe impreso de las muestras observadas para IFI con el programa de computación estadística disponible en línea VassarStats (http://vassarstats.net/)	66
Anexo 12. Informe impreso de las muestras observadas para la ICT con el programa de computación estadística disponible en línea VassarStats (http://vassarstats.net/)	67
Anexo 13. Informe impreso de las muestras observadas para el ELISA con el programa de computación estadística disponible en línea VassarStats (http://vassarstats.net/)	68

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1. Tabla de contingencia 2X2 para la evaluación del desempeño de las pruebas.....	24
Cuadro 2. Tabla de contingencia 2X2 para la evaluación del desempeño del ELISA.....	28
Cuadro 3. Tabla de contingencia 2X2 para la evaluación del desempeño de la ICT.....	30
Cuadro 4. Tabla de contingencia 2X2 para la evaluación del desempeño de la IFI.....	32
Cuadro 5. Comparación de los resultados obtenidos de las pruebas IFI, ELISA, ICT para el diagnóstico serológico de babesiosis en sueros de bovinos del Sitio Experimental Pichucalco.....	33
Cuadro 6. Comparación de los resultados de los sueros de bovinos del Sitio Experimental Pichucalco analizados por IFI, ELISA e ICT.....	36
Cuadro 7. Sensibilidad y especificidad de la IFI para la detección de anticuerpos contra <i>B. bovis</i> en sueros de bovinos del Sitio Experimental Pichucalco en comparación con los resultados de ICT y ELISA.....	36

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Frotis de sangre con eritrocitos de bovino parasitados.....	5
Figura 2. Situación actual del control y distribución de la garrapata <i>Rhipicephalus microplus</i> en México.....	6
Figura 3. Mecanismos propuestos de la respuesta inmune innata y adaptativa frente a <i>Babesia bovis</i>	8
Figura 4. Tira reactiva inmunocromatográfica y sus componentes.....	10
Figura 5. Diversidad de antígenos de <i>B. bovis</i> y su participación durante el proceso de invasión de los eritrocitos	12
Figura 6. Bioconjugación del antígeno recombinante MSA-1 con nanopartículas de oro.....	23
Figura 7. Inyección de los reactivos en la membrana de nitrocelulosa con la plataforma de impresión XYZ3210 (Bio-Dot, Inc).....	23
Figura 8. Análisis de las fracciones purificadas del antígeno recombinante MSA-1 por SDS-PAGE al 12%.....	26
Figura 9. Análisis de las fracciones purificadas de los anticuerpos policlonales IgG anti-MSA-1 por SDS-PAGE al 12%.....	27
Figura 10. Resultados del ELISA en sueros negativos de referencia	29
Figura 11. Resultados del ELISA en sueros positivos de referencia.....	29
Figura 12. Tiras reactivas de ICT para la detección de anticuerpos contra <i>B. bovis</i>	31
Figura 13. Detección de anticuerpos contra <i>B. bovis</i> en los sueros positivos y negativos de referencia utilizando tiras reactivas de ICT.....	31
Figura 14. Resultados del ELISA en sueros de bovinos del Sitio Experimental Pichucalco.....	34
Figura 15. Resultados representativos de la detección de anticuerpos contra <i>B. bovis</i> en sueros de bovinos del Sitio Experimental Pichucalco.....	34

RESUMEN

La babesiosis bovina es considerada una limitante para el desarrollo de la ganadería en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. En México, se estima que el 70% de la población total de bovinos existente se encuentra distribuida en regiones de alta endemicidad donde la prevalencia y seroprevalencia de babesiosis son altas (>80%). La prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) es la más utilizada en estudios seroepidemiológicos y hasta ahora es considerada la prueba “estándar de oro” para el diagnóstico serológico de la babesiosis bovina. El presente estudio tuvo como objetivo comparar una prueba rápida inmunocromatográfica (ICT, por sus siglas en inglés) y el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para el diagnóstico serológico en bovinos expuestos a *Babesia bovis*. La evaluación del desempeño de las pruebas se realizó empleando 30 sueros positivos de referencia y 30 negativos. Un total de 72 sueros de bovinos colectados en campo fueron analizados por ICT y ELISA, y los resultados fueron comparados con los de IFI. Además, se calculó el índice kappa (k) para determinar la concordancia entre las pruebas. La sensibilidad y especificidad de la ICT para la detección de anticuerpos contra *B. bovis* fue del 90% (27/30) y 83.3% (25/30), respectivamente. La sensibilidad y especificidad del ELISA para la detección de anticuerpos contra *B. bovis* fue del 86.6% (26/30) y 80% (24/30), respectivamente. La concordancia general determinada de la ICT y ELISA fue del 98.6% (71/72) y 94.4% (68/72) cuando los resultados se compararon con los de la IFI, respectivamente. La ICT fue la prueba que tuvo mayor sensibilidad y especificidad en el presente estudio comparativo, mostrando una fuerza de concordancia buena ($k=0.79$) con respecto a la IFI. En conclusión, la ICT combina un sistema de análisis basado en tiras reactivas que es rápido, práctico y sensible para la detección de anticuerpos contra *B. bovis*, el cual se sugiere puede ser aplicado en campo sin requerir equipo de laboratorio altamente sofisticado para su ejecución.

Palabras clave: Babesiosis bovina, diagnóstico serológico, ICT, ELISA

ABSTRACT

Bovine babesiosis is considered a limiting factor for the development of cattle farming in tropical and subtropical regions of the world. In Mexico, it is estimated that about 70% of the cattle population is distributed in endemic regions where babesiosis prevalence and seroprevalence are high (> 80%). The Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) is the most frequently used test in seroepidemiological studies and so far is regarded as the "gold standard" test for the serological diagnosis of bovine babesiosis. The aim of the present study was to compare a rapid immunochromatographic test (ICT) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis in cattle exposed to *Babesia bovis*. The evaluation of the tests performance was carried out with 30 positive and 30 negative reference sera. A total of 72 field bovine sera collected from cattle were analyzed by ICT and ELISA, and the results compared with those of IFAT. Kappa index (k) was also calculated to determine the agreement between the tests. The sensitivity and specificity of the ICT for detecting antibodies to *B. bovis* were 90% (27/30) and 83.3% (25/30), respectively. The sensitivity and specificity of the ELISA for detecting antibodies to *B. bovis* were 87% (26/30) and 80% (24/30), respectively. The overall concordances determined for the ICT and ELISA were 98.6% (71/72) and 94.4% (68/72) when the results were compared with those of the IFAT, respectively. The ICT was more sensitive and specific in this comparative study, showing a good strength of agreement (k = 0.79) with respect to the IFAT. In conclusion, the ICT combines a strip-based assay system that is fast, practical and sensitive for detection of antibodies to *B. bovis* which suggests that it could be applied in the field without the need for any modern laboratory equipment for its use.

Key words: Bovine babesiosis, serological diagnosis, ICT, ELISA

1. INTRODUCCIÓN

La ganadería bovina es considerada una de las principales actividades del sector primario agroalimentario, ocupa el segundo lugar del sector solo por debajo de la agricultura y en términos económicos representa el 1% del PIB del país. Esta actividad se desarrolla bajo distintos sistemas, siendo el sistema extensivo en pastoreo el predominante para la producción de carne y leche en las regiones tropicales (Urdaneta, 2009). Actualmente, de acuerdo con los registros del SIAP, la población nacional de ganado bovino en México asciende a 33.5 millones de cabezas, lo que contribuye a la producción aproximada de 1.92 millones de toneladas de carne y casi 12 mil millones de litros de leche por año (SIAP, 2018).

La aparición de ciertas enfermedades infecciosas incluyendo las enfermedades transmitidas por vectores, representan un obstáculo para los sistemas de producción en las zonas ganaderas (Jongejan y Uilenberg, 2004). La babesiosis bovina es considerada una limitante para el desarrollo de la ganadería en las regiones tropicales del mundo (Gohil et al., 2013). En México, se estima que el 70% de la población total de bovinos existente se encuentra distribuida en regiones de alta endemicidad para babesiosis donde la prevalencia y seroprevalencia son altas (> 80%) (Romero et al., 2016), lo que representa un problema grave para la ganadería debido al riesgo para la ocurrencia de brotes severos de la enfermedad en estas regiones. Las pérdidas económicas a causa de la babesiosis bovina a pesar de que no han podido ser estimadas con exactitud se asocian de manera directa a la disminución en la producción de leche y ganancia diaria de peso en los animales infectados, incluyendo además los altos costos para el tratamiento de animales enfermos y por el uso de productos ixodicidas para el control de la garrapata vector (Rodríguez et al., 2017). De manera indirecta la producción en los hatos bovinos también puede verse afectada por la pérdida de la continuidad en la gestación de las hembras y la disminución temporal de la fertilidad en los machos infectados.

La babesiosis bovina es causada en México por *Babesia bovis*, una especie de elevada virulencia, o *Babesia bigemina*, una especie de alta prevalencia, pero menos virulenta (Bock et al., 2004). El método tradicional para el diagnóstico es el examen microscópico, el cual, consiste en la identificación de las formas clásicas de *Babesia* sp. a partir de extendidos sanguíneos teñidos con colorante Giemsa. El diagnóstico serológico está basado en la detección de anticuerpos contra *B. bovis* y/o *B. bigemina* mediante las pruebas convencionales que se encuentran disponibles tales como, la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (Reyes et al., 2016; Jaramillo et al., 2018), no obstante, la IFI es la más utilizada y es considerada hasta ahora la prueba “estándar de oro” para el diagnóstico serológico de la babesiosis bovina (Solorio y Rodríguez, 1997; OIE, 2004). En un estudio realizado, la sensibilidad y especificidad que se reportó con IFI (66% y 76%, respectivamente) fue baja cuando se comparó con los resultados del ELISA (80% y 97%, respectivamente) instrumentado en México para el diagnóstico de *B. bovis* (Castañeda et al., 2013). Recientemente se han desarrollado nuevos métodos para la evaluación de la respuesta inmune después de la exposición de bovinos a *Babesia* spp., la prueba rápida inmunocromatográfica (ICT) descrita para la detección de anticuerpos contra *B. bovis* mostró una sensibilidad y especificidad del 96.7% y 93.8%, respectivamente (Kim et al., 2008).

El presente estudio tuvo como objetivo comparar una prueba rápida inmunocromatográfica (ICT) y el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para el diagnóstico serológico en bovinos expuestos a *B. bovis*. Estos métodos diagnósticos desarrollados en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), surgen de la necesidad de contar con una prueba de uso práctico en México que sea segura y específica para su implementación en el diagnóstico serológico de la babesiosis causada por *B. bovis*.

2. ANTECEDENTES

2.1. Babesiosis bovina

La babesiosis bovina fue reportada por primera vez en Rumania por Victor Babes, quien describió la presencia de piroplasmas en eritrocitos de bovinos infectados (Babes, 1888). Posteriormente, Theobald Smith y Frederick Kilborne realizaron investigaciones relacionadas con la enfermedad y demostraron que *Pyrosoma bigeminum* (parásito que hoy conocemos como *B. bigemina*) era el agente causal de la fiebre de Texas (Smith y Kilborne, 1893). La piroplasmosis o ranilla como también se le conoce a esta enfermedad, fue descrita en 1906 por primera vez en México (Toussaint, 1906). La babesiosis bovina es transmitida de un animal portador de la infección a otro susceptible por la garrapata vector *Rhipicephalus microplus*. La enfermedad se caracteriza por la alta morbilidad y mortalidad, los bovinos infectados clínicamente presentan fiebre $\geq 41^{\circ}\text{C}$, postración, anemia, anorexia, temores musculares, hemoglobinuria, y en algunos casos también llegan a presentar signología nerviosa (Figueroa y Álvarez, 2003). En México, la prevalencia de babesiosis bovina en lugares considerados de alta endemicidad puede llegar a ser $\geq 50\%$. La presentación de babesiosis en hatos de bovinos está influenciada entre otros factores por la raza, edad, resistencia natural (estado inmunológico) de los hospederos, estado nutricional, la época del año, y en los últimos años por el cambio climático (Solorio y Rodríguez, 1997; Santamaria et al., 2018). La importancia económica de la babesiosis bovina radica en su amplia distribución en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. En México, la garrapata *R. microplus* se encuentra distribuida en la mayor parte del país, de acuerdo con un estudio realizado, la estimación de pérdidas económicas únicamente por garrapatas de esta especie rondaría los 575 millones de dólares americanos por año, dichas pérdidas se asocian principalmente a la disminución en la producción de leche y en la ganancia diaria de peso en los animales (Gallardo y Morales, 1999; Rodríguez et al., 2017).

2.1.1. Etiología

La babesiosis bovina es causada por protozoarios intraeritrocíticos del género *Babesia*, actualmente se han descrito más de 70 especies diferentes que se encuentran distribuidas alrededor del mundo y que afectan tanto a mamíferos domésticos como silvestres (Lira et al., 2017; Jacob et al., 2020). Entre las especies que afectan al ganado bovino se encuentran *Babesia major*, *B. divergens*, *B. yakimovi*, *B. occultans*, *B. ovata*, *B. bovis* y *B. bigemina* (Levine et al., 1980). Dada su amplia distribución, *B. bovis* y *B. bigemina* son las especies de mayor prevalencia e importancia económica para la ganadería tropical a nivel mundial (Toussaint, 1906; McCosker, 1981). Estos protozoarios son organismos unicelulares que presentan una estructura denominada complejo apical, el cual, resulta fundamental para la adherencia e invasión de las células del hospedero. Dicho complejo apical está conformado por organelos como, los anillos polares, el conjunto de microtúbulos, un conoide y las roptrias (Ristic, 1981).

Clasificación taxonómica de *Babesia* spp. (Levine et al., 1980)

Reino: Protista

Subreino: Protozoa

Phylum: Apicomplexa

Subclase: Sporozoa

Orden: Piroplasmida

Familia: *Babesidae*

Género: *Babesia*

La morfología de *B. bovis* y *B. bigemina* puede variar de acuerdo con el estadio evolutivo dentro de los eritrocitos de los hospederos. Las formas clásicas que se pueden observar son corpúsculos piriformes únicos (trofozoitos) o en pares unidos por la región apical (merozoitos). El tamaño varía de acuerdo con la especie, *B.*

bigemina es la especie más grande y mide en promedio 4.5 x 2 µm, mientras que *B. bovis* mide aproximadamente 1.8 x 1.2 µm (Figura 1) (Marcelino et al., 2012).

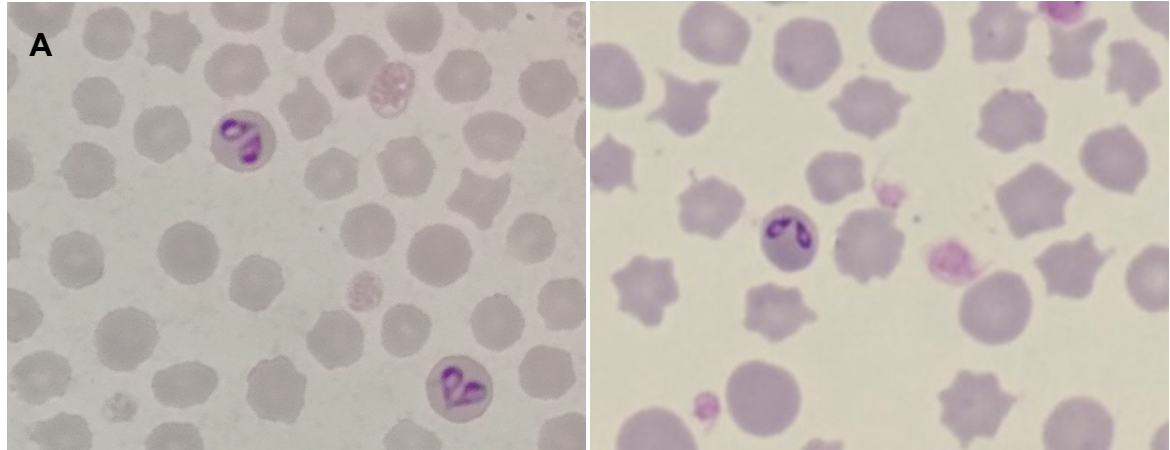


Figura 1. Frotis de sangre con eritrocitos de bovino parasitados, A) *B. bigemina*; B) *B. bovis*, tinción Giemsa, 100X.

2.1.2. Vector y transmisión

La garrapata *Rhipicephalus microplus* anteriormente conocida como *Boophilus microplus* es un ectoparásito de un solo hospedero que pertenece a la familia *Ixodidae* (Domínguez et al., 2010). Con base en los estudios moleculares del genoma y los análisis filogenéticos realizados, se ha propuesto la reclasificación de esta especie de garrapata dentro del género *Rhipicephalus* (subgénero *Boophilus*) (Barker y Murrell, 2004). Las condiciones ambientales como temperatura y humedad son factores que resultan ser fundamentales para el desarrollo y distribución de la garrapata *R. microplus* en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (incluyendo México) (Figura 2), su ciclo de vida tiene dos fases (no parasítica y parasítica) y cuatro estadios evolutivos que son: huevo, larva, ninfa y adulta. La fase no parasítica o también llamada de vida libre tiene una duración de aproximadamente 240 días (Delabra et al., 1996), en esta, las hembras adultas repletas se desprenden del hospedero bovino para dar paso a la

oviposición y posterior eclosión de los huevos (las larvas emergen). Por otro lado, en la fase parasítica (18-21 días) las larvas infestan un hospedero bovino susceptible y posteriormente ocurre el cambio o muda a los siguientes estadios de ninfa y adulta, para completar el ciclo. La transmisión es un proceso complejo donde el agente etiológico, el hospedero y el vector están estrechamente relacionados. Los estadios de larvas transmiten *B. bovis*, mientras que *B. bigemina* es transmitida por ninfas y adultas (Smith, 1978; Mahoney y Mirre, 1971). El grado de infección en los bovinos dependerá del número de larvas y la intensidad de la infección que estas mismas presenten al momento de la infestación (Mahoney et al., 1981). La infección en un bovino susceptible ocurre cuando una larva infectada de *R. microplus* inocula en la sangre, a través de la saliva esporozoitos (estadio infectante) de *Babesia*, los esporozoitos invaden los eritrocitos dando origen a los trofozoitos. Dentro de los eritrocitos los trofozoitos se dividen por fisión binaria longitudinal para dar origen por lo regular a dos merozoitos, los cuales se liberan causando lisis celular para invadir a otros eritrocitos (Smith, 1978).



Figura 2. Situación actual del control y distribución de la garrapata *Rhipicephalus microplus* en México. Fuente: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/situacion-actual-del-control-de-la-garrapata-boophilus-spp>

2.1.3. Respuesta inmune

Debido a los diferentes estadios que conforman el ciclo de vida, los protozoarios como *B. bovis* y *B. bigemina* presentan gran diversidad de antígenos que pueden ser reconocidos por el sistema inmunológico (Jaramillo et al., 2018). Durante la infección aguda en bovinos susceptibles se activan, en respuesta, una serie de mecanismos donde participan células fagocíticas, entre ellas principalmente macrófagos, estas células inician la producción de citocinas y radicales libres como el factor de necrosis tumoral (TNF- α) y óxido nítrico (NO), cuya acción es inhibir a nivel intraeritrocítico la multiplicación de los protozoarios (Bautista et al., 2016). Otras citocinas como las interleucinas (IL's) 12 (IL-12) e IL-18 sintetizadas también por los macrófagos, favorecen la estimulación de linfocitos T cooperadores (Th), induciendo a través del interferón gamma (INF- γ) e IL-4 la secreción de anticuerpos de alta afinidad de la clase IgG (IgG1 e IgG2), de los cuales, los anticuerpos IgG2 son los de mayor relevancia por su gran capacidad para opsonizar y neutralizar antígenos de *Babesia* spp. (Brown et al., 1999; Brown, 2001). Esta interrelación entre la respuesta inmune innata y adaptativa resulta ser fundamental para la inmunidad frente a la babesiosis bovina (Figura 3) (Brown y Palmer, 1999; Bautista et al., 2013). Por otro lado, algunos factores como la raza y la edad de los hospederos también juegan un papel determinante para la inmunidad. Los animales jóvenes a través de la transferencia pasiva de anticuerpos maternos tienen mayor resistencia a las manifestaciones clínicas de la enfermedad (Morilla, 1981).

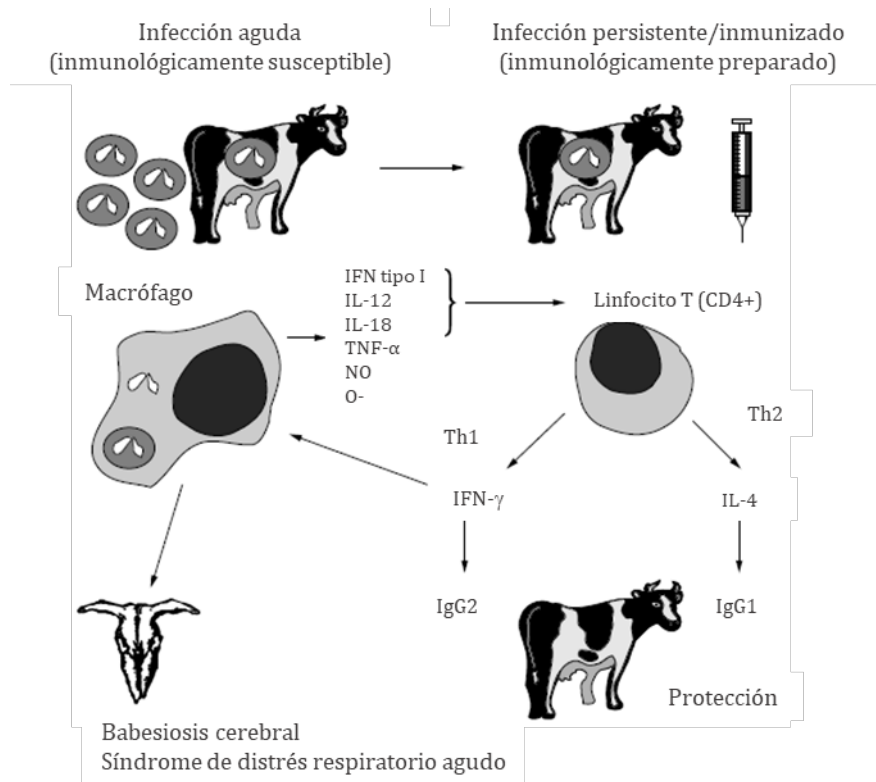


Figura 3. Mecanismos propuestos de la respuesta inmune innata y adaptativa frente a *Babesia bovis* (Adaptada de Brown y Palmer, 1999).

2.1.4. Pruebas de diagnóstico convencionales

El método tradicional para el diagnóstico directo es el examen microscópico de extendidos sanguíneos teñidos con colorante Giemsa, el uso de este método permite identificar las formas clásicas de los parásitos durante la fase aguda de la enfermedad, además de que es útil para la diferenciación entre especies con base en el tamaño y características morfológicas de los parásitos (Figuroa y Álvarez, 2003). Otra alternativa para el diagnóstico es la prueba molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), este método se caracteriza por su capacidad para la detección y amplificación de moléculas de ADN de *B. bovis* y/o *B. bigemina* a partir de muestras de sangre de bovinos infectados (Figuroa et al., 1993). Las pruebas serológicas o pruebas indirectas

son una herramienta para la detección de anticuerpos específicos en el suero de bovinos que han sido expuestos a *Babesia* spp., el empleo de estas pruebas es favorable para establecer la distribución de la babesiosis bovina en estudios seroepidemiológicos que se han realizado, la más utilizada hasta ahora en los estudios seroepidemiológicos es la prueba inmunofluorescencia indirecta (IFI). Por otro lado, el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) al igual que la IFI, resulta ser un método útil con gran sensibilidad y especificidad que permite detectar anticuerpos específicos contra *B. bovis* y *B. bigemina* (Bautista et al., 2012; Guswanto et al., 2017).

2.1.5. Pruebas rápidas de diagnóstico

Las pruebas rápidas son métodos nuevos e innovadores que fueron desarrollados a partir de la biotecnología moderna para el diagnóstico de enfermedades tanto en humanos como en animales (Martínez et al., 2011; Cartagena et al., 2015). Este tipo de pruebas está basado en un sistema de flujo lateral en tiras reactivas inmunocromatograficas (ICT) (Figura 4) que permite la detección rápida de anticuerpos o antígenos solubles (Smits et al., 2001; Richardson et al., 2002; Huang et al., 2006). El uso de las pruebas rápidas ofrece resultados específicos y de manera oportuna, también reduce sustancialmente el tiempo de ejecución en comparación con las pruebas convencionales debido a que los resultados se proporcionan en poco tiempo, además de que pueden aplicarse en clínicas o directamente en campo sin la necesidad de ningún instrumento (Koczula y Gallota, 2016). Una prueba rápida inmunocromatográfica ha sido descrita para la detección simultanea de anticuerpos específicos contra *B. bovis* y *B. bigemina* (Kim et al., 2007; Kim et al., 2008), su aplicación ha demostrado ser de gran utilidad en estudios seroepidemiológicos de la babesiosis bovina (Guswanto et al., 2017).

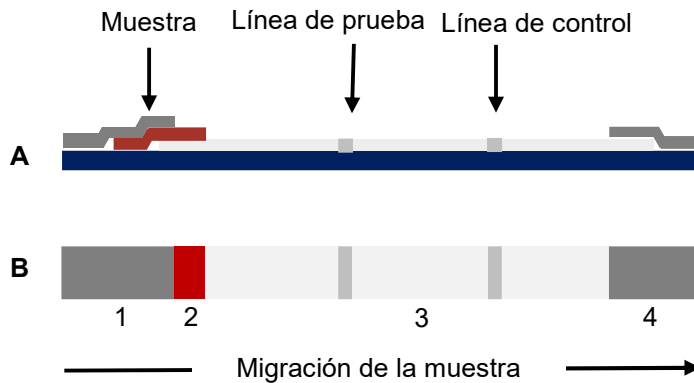


Figura 4. Tira reactiva inmunocromatográfica y sus componentes. A) vista lateral, B) vista frontal. Los componentes son: 1) almohadilla para muestra, 2) almohadilla para bioconjugado, 3) membrana de nitrocelulosa, 4) almohadilla absorbente.

2.1.6. Antígenos relevantes de *Babesia* spp. con potencial diagnóstico

Se ha profundizado la investigación en búsqueda de antígenos señalados como blanco del sistema inmunológico y que tengan algún tipo de participación en funciones que resulten esenciales para la supervivencia de *Babesia* spp. (Figura 5), con la finalidad de desarrollar nuevos métodos que brinden mayor seguridad para el diagnóstico y control de la babesiosis bovina. Múltiples antígenos recombinantes han sido probados como candidatos potenciales vacunales sin que hasta ahora se haya demostrado su eficacia inmunoprotectora contra la babesiosis bovina (Álvarez et al., 2010; Florin-Christensen et al., 2014; Reyes et al., 2016). Sin embargo, a pesar de esta situación se ha demostrado que algunos de los antígenos presentan elevada antigenicidad, lo que ha permitido su inclusión y validación en diferentes métodos para el diagnóstico serológico (Santamaria et al., 2020). Entre los antígenos probados se encuentran los que forman parte del complejo apical como el antígeno asociado a las roptrias (RAP-1) plenamente identificado en *B. bovis* (Boonchit et al., 2004) y cuyo reconocimiento por anticuerpos también se ha evaluado en la respuesta inmune frente a *B. bigemina*

(Brown et al., 1999). Otros antígenos relevantes son los derivados de los cuerpos esféricos (SBP-1, SBP-2 y SBP-3) cuya actividad está ligada al proceso de invasión y de multiplicación durante la fase intraeritrocítica de *B. bigemina* (Cruz et al., 2016). Los antígenos de excreción 12D3 que han sido incluidos en el desarrollo de una vacuna recombinante logran conferir protección en bovinos ante el desafío con *B. bovis* (Wright et al., 1992). Otros estudios realizados, también han revelado el alto grado de conservación en las secuencias de nucleótidos del gen *12d3* en aislados mexicanos de *B. bovis* (Pérez et al., 2010). Estudios realizados de la secuencia de nucleótidos de los antígenos MSA-1 y MSA-2 de *B. bovis* mostraron la existencia de polimorfismos, no obstante, la región de reconocimiento por anticuerpos se encuentra altamente conservada en ambos casos (Florin-Christensen et al., 2002; Borgonio et al., 2008, Ríos y Ríos, 2011). Los anticuerpos contra el antígeno recombinante MSA-1 tiene la capacidad para neutralizar la infectividad de los merozoitos *in vitro*, lo que sugiere su importancia en el momento de la invasión de los eritrocitos (Hines et al., 1991; Suarez et al., 2000).

2.1.7. Antígeno de superficie del merozoito (MSA-1)

El antígeno MSA-1 es una glicoproteína de 42 kDa codificada por el gen de copia única *msa-1* (Reyes et al., 2016), este antígeno reagrupado dentro de la multifamilia de los antígenos variables de la superficie (VMSA) se distribuye de manera uniforme sobre la membrana localizada en la superficie de los merozoitos de *B. bovis*. El antígeno MSA-1 se considera altamente antigénico con carácter inmunodominante, y es capaz de inducir una respuesta inmune después de la breve exposición al sistema inmunológico durante la fase extracelular previo a la invasión de los eritrocitos por los merozoitos (Hines et al., 1995). El uso de anticuerpos monoclonales ha permitido la caracterización inmunoquímica del antígeno MSA-1 tanto en la superficie de merozoitos como en la fase soluble del

sobrenadante de parásitos cultivados *in vitro* (Figuroa et al., 1998). Otros estudios realizados *in vitro* han demostrado que los anticuerpos dirigidos contra el antígeno MSA-1 tienen la capacidad de neutralizar la infección de los eritrocitos, lo que comprueba que la participación del antígeno MSA-1 es fundamental durante el proceso de invasión de los merozoitos (Hines et al., 1991, Yokoyama et al., 2006). En México, debido al interés que surgió para la búsqueda de antígenos candidatos vacunales se realizó un análisis bioinformático detallado de las secuencias del gen *msa-1*, los resultados no solo pusieron en evidencia la variación genética que existe entre los distintos aislados geográficos de *B. bovis*, sino que, también se logró la identificación de secuencias en el antígeno MSA-1 con alto grado de conservación de epítopes B para unión con anticuerpos (Borgonio et al., 2008).

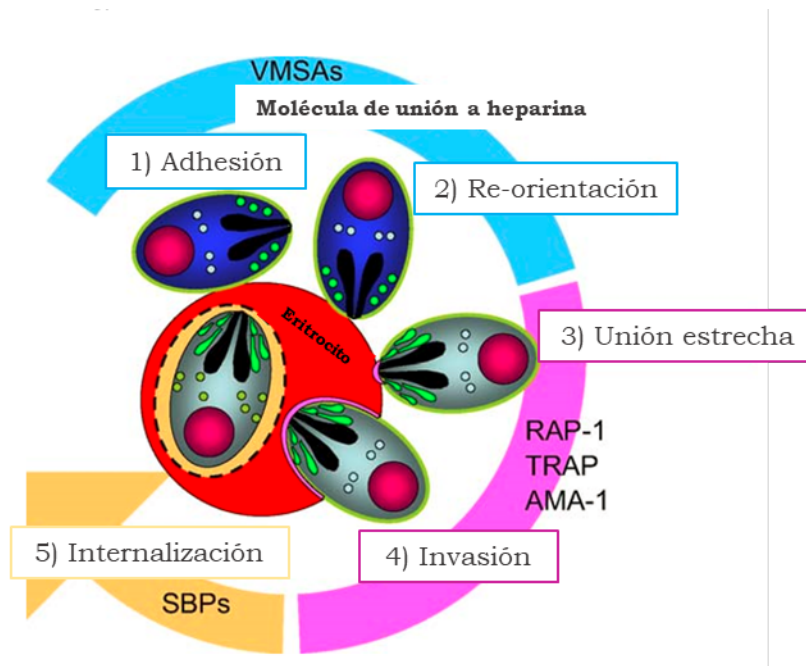


Figura 5. Diversidad de antígenos de *B. bovis* y su participación durante el proceso de invasión de los eritrocitos (Adaptada de Yokoyama et al., 2006).

3. JUSTIFICACIÓN

La inmunofluorescencia indirecta (IFI) es considerada la prueba “estándar de oro” para el diagnóstico serológico de la babesiosis bovina. No obstante, a pesar de que sigue siendo utilizada en la realización de estudios seroepidemiológicos para la detección de anticuerpos en bovinos expuestos a *Babesia* spp. (Rojas et al., 2004; Rojas et al., 2018), esta prueba presenta una serie de desventajas, por ejemplo, baja especificidad dado que existe reactividad cruzada entre especies, elevada subjetividad y bajo rendimiento. En los últimos años se han desarrollado nuevos métodos como una alternativa para el diagnóstico serológico de *Babesia* spp., entre ellos, el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y de manera más reciente las pruebas rápidas inmunocromatográficas (ICT), estos métodos a diferencia de la IFI no utilizan organismos completos como antígenos, se basan en antígenos recombinantes de origen proteico con gran capacidad de reconocimiento por anticuerpos que resultan ser más sensibles y específicos (Kim et al., 2008; Jaramillo et al., 2018). El ELISA es un método semiautomatizado que permite procesar un gran número de muestras al día, cuando se ha utilizado el antígeno recombinante MSA-1 de *B. bovis* la sensibilidad y especificidad han sido del 80% y 97%, respectivamente (Castañeda et al., 2013). Por otro lado, la ICT basada en el antígeno recombinante MSA-2c que se desarrolló para el diagnóstico serológico de *B. bovis* mostró valores de sensibilidad y especificidad del 96.7% y 91.3%, respectivamente (Kim et al., 2008). Ante la falta de una prueba eficaz y segura que pueda emplearse en estudios seroepidemiológicos como una alternativa de la IFI para determinar la exposición a *B. bovis* en México, es necesario evaluar y comparar nuevos métodos que permitan la detección de anticuerpos para el diagnóstico serológico de babesiosis bovina. La disponibilidad de una prueba más sensible y específica que la IFI no solo podría ser de gran utilidad para el establecimiento de estrategias más adecuadas para el control y prevención de babesiosis bovina, sino que también contribuiría para mejorar e impulsar la producción de ganado bovino en el país.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

- Comparar una prueba rápida inmunocromatográfica (ICT) y el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para el diagnóstico serológico en bovinos expuestos a *Babesia bovis*.

4.2. Objetivos específicos

- Evaluar el desempeño de las pruebas ICT, ELISA e IFI con sueros de referencia.
- Estimar la tasa de seroprevalencia para *B. bovis* en el módulo de bovinos del Sitio Experimental Pichucalco empleando las pruebas ICT, ELISA e IFI.
- Determinar la concordancia entre la ICT e IFI para el diagnóstico serológico basado en la detección de anticuerpos contra *B. bovis*.
- Determinar la concordancia entre el ELISA e IFI para el diagnóstico serológico basado en la detección de anticuerpos contra *B. bovis*.

5. HIPÓTESIS

Las pruebas ICT y ELISA muestran una fuerza de concordancia buena ($k = 0.61-0.80$) para la detección de anticuerpos contra *B. bovis* con respecto a IFI.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Localización

El presente estudio constó de dos fases; una fase de campo y una fase de laboratorio. La fase de campo que incluyó la recolección de muestras sanguíneas se llevó a cabo en el módulo de bovinos del Sitio Experimental Pichucalco propiedad del INIFAP, el cual se encuentra situado en el municipio de Pichucalco, Chiapas entre los paralelos 17° 30' norte y 93° 07' oeste, el clima en esta región es cálido húmedo y hay presencia de lluvias abundantes durante todo el año. De acuerdo con estudios epidemiológicos la tasa de seroprevalencia estimada para babesiosis bovina en esta zona ha sido del 80% (Ojeda et al., 2010).

La fase de laboratorio se realizó en las instalaciones de la Unidad de Babesiosis en el CENID-SAI, INIFAP. Este se encuentra ubicado en la Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla No. 8534, Col. Progreso, C.P. 62550, municipio de Jiutepec, Morelos.

6.2. Tamaño de muestra

Para determinar el tamaño de muestra en el módulo bovinos del Campo Experimental Pichucalco se utilizó el programa disponible en línea Raosoft® (<http://www.raosoft.com/samplesize.html>) con base en el modelo matemático establecido para estudios en poblaciones finitas (Aguilar, 2005), se consideró una seroprevalencia de 80%, un nivel de confianza de 95% y una probabilidad de error de 5%.

6.3. Muestras de suero

6.3.1 Sueros de referencia

Las muestras de referencia que se analizaron para la evaluación de las pruebas en este estudio pertenecen al banco de sueros de la Unidad de Babesiosis del CENID-SAI, INIFAP, los sueros fueron clasificados previamente por IFI como negativos a *Babesia* spp. (n=30) obtenidos de bovinos en una zona libre de garrapatas, y como positivos (n=30) obtenidos a partir de bovinos expuestos a *B. bovis*.

6.3.2 Sueros obtenidos en el Sitio Experimental Pichucalco

Durante la recolección de las muestras (n=72) de sangre los bovinos fueron inmovilizados (< 5 minutos) en una manga de compresión. Las muestras se recolectaron antisépticamente por punción de la vena caudal con agujas estériles (21G x 1.5") y utilizando tubos al vacío de 6 mL sin anticoagulante (BD Vacutainer®). Para la separación de los componentes las muestras se centrifugaron a 1410 x g durante 10 minutos en una centrifuga clínica con refrigeración (Hermle Z400K), los sueros obtenidos se depositaron en microtubos con tapón a presión de 1.5 mL y posteriormente fueron almacenados a -20°C hasta ser evaluados.

6.4. Obtención del antígeno recombinante MSA-1 de *B. bovis*

El antígeno recombinante se obtuvo de la reactivación de células TOP 10 de *Escherichia coli* transformadas con el vector de expresión pBAD/TOPO ThioFusion (Invitrogen, USA), donde previamente se clonó la secuencia codificante del gen *msa-1* de *B. bovis* (Sánchez et al., 2008). Las células transformadas se sembraron en medio LB-agar con ampicilina (50 µg/mL) y se dejaron incubar 18 horas a 37°C.

Posteriormente, se realizó un precultivo en 10 mL de medio LB líquido con ampicilina (50 µg/mL), tomando una colonia aislada con un asa de siembra y dejándose en agitación (190 rpm) durante 18 horas a 37°C en la incubadora (Lab Companion SI-300R). Se inocularon 300 mL de medio LB líquido con ampicilina (50 µg/mL) con 7.5 mL del precultivo, se incubó en agitación (220 rpm) hasta alcanzar una absorbancia de 0.6 a una longitud de onda de 600 nm. La inducción de expresión del antígeno recombinante se realizó agregando arabinosa al 0.2% y dejando incubar el cultivo de nueva cuenta en agitación (190 rpm) durante 18 horas a 37°C. Finalmente, el cultivo fue centrifugado a 1840 x *g* durante 20 minutos en una centrifuga clínica con refrigeración (Hermle Z32HK), las pastillas recuperadas se almacenaron en ultracongelación a -80°C. Para la obtención del antígeno recombinante MSA-1, las pastillas de las células de *E. coli* transformadas fueron resuspendidas en 5 mL de solución de lisis (Anexo 2) y se dejaron incubar en agitación suave (90 rpm) durante 3 horas a temperatura ambiente. La purificación se realizó por cromatografía de afinidad a partir del sobrenadante obtenido después de la lisis, para ello, se emplearon columnas con resina acoplada a níquel Ni-NTA (Pro-Bond Purification System ThermoFisher Scientific) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Anexo 3). El análisis de las fracciones solubles del antígeno recombinante colectadas después de cada elución se realizó por SDS-PAGE al 12% utilizando tinción con azul de Coomassie. Las fracciones que contenían el antígeno recombinante MSA-1 fueron sometidas a diálisis contra PBS (1X, pH 7.4) (Anexo 1) empleando membranas de celulosa con punto de corte de 12 kDa (Dialysis tubing cellulose membrane 12 kDa, SIGMA), la solución se dejó 24 horas en refrigeración (4-8°C) agitándose suavemente. Por último, las fracciones fueron concentradas empleando filtros Amicon (Spin-X UF6 50K MWCO PES, CORNING) y cuantificadas por espectrofotometría con el equipo NP80 (NanoPhotometer® IMPLEN).

6.5. Purificación de anticuerpos policlonales IgG anti-MSA-1

Los anticuerpos policlonales (IgG) anti-MSA-1 se obtuvieron a partir del suero de 4 ovinos de la raza Pelibuey (>12 meses) que fueron previamente inmunizados en cinco ocasiones con 500 µg del antígeno recombinante MSA-1, las inmunizaciones se realizaron vía subcutánea con intervalos de 14 días utilizando adyuvante de Montanide ISA 70VG (1:1; v/v). La purificación se realizó por cromatografía de afinidad con proteína G acoplada a resina de sepharose, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Protein G Sepharose® Fast Flow, P3296 SIGMA). Las fracciones que se obtuvieron después de la elución se analizaron por SDS-PAGE al 12% utilizando tinción con azul de Coomassie. Finalmente, las fracciones que contenían los anticuerpos policlonales IgG anti-MSA-1 fueron sometidas a diálisis contra PBS (1X, pH 7.4) empleando membranas de celulosa con punto de corte de 12 kDa (Dialysis tubing cellulose membrane 12 kDa, SIGMA), la solución se dejó 24 horas en refrigeración (4-8°C) agitándose suavemente. La concentración de las fracciones dializadas se determinó por espectrofotometría con el equipo NP80, las cuales se almacenaron en alícuotas a -20°C.

6.6. Pre-adsorción de sueros

Para evitar la unión inespecífica de anticuerpos, todas las muestras de suero (n=132) que se analizaron en este estudio fueron pre-adsorbidas con el antígeno obtenido del lisado de células TOP 10 de *E. coli* de acuerdo con el método descrito, con algunas modificaciones (Nguyen et al., 2014; Jaramillo et al., 2018). Las microplacas de 96 pozos de fondo plano (3590, Corning) utilizadas fueron sensibilizadas con 50 µL (100 µg/mL) del lisado de *E. coli* diluido con solución amortiguadora de recubrimiento (C3041, Sigma-Aldrich) (Anexo 4), se dejaron incubar las microplacas durante 16 horas en refrigeración (4-8°C). Después de este tiempo el antígeno no adherido a las microplacas se descartó y enseguida se

realizaron tres lavados con 50 μ L de solución de lavado (PBS-Tween 20 al 0.1%, v/v) (Anexo 5) durante 5 minutos en agitación moderada (150 rpm). Las microplacas se bloquearon agregando 50 μ L de la solución de bloqueo (PBS-Tween 20 al 0.1%, 5% leche evaporada, w/v) (Anexo 6) y se dejaron incubar durante 30 minutos a 37°C. Seguido a esto, se realizaron tres lavados con 50 μ L de solución de lavado durante 5 minutos en agitación moderada (150 rpm). Las muestras de suero se agregaron a las microplacas y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Después de la incubación, se recuperaron los sueros y se almacenaron en alícuotas a -20°C hasta la evaluación de las pruebas ICT, ELISA e IFI. El antígeno utilizado para la pre-adsorción de los sueros derivó de la lisis de células transformadas TOP 10 de *E. coli* sin inducir. Se tomaron 200 μ L de las pastillas de células que se encontraban almacenadas en ultracongelación a -80°C y se resuspendieron en 1 mL de PBS (1X, pH 7.2) que contenía 500 μ L de perlas de vidrio lavadas con ácido (G8772, Sigma-Aldrich), la suspensión se homogenizó a velocidad máxima con un agitador vórtex durante 30 segundos e inmediatamente se incubó en hielo durante 30 segundos, se repitieron los pasos hasta alcanzar ocho ciclos. Posteriormente, la suspensión se centrifugó a 18620 x g durante 8 minutos a temperatura ambiente para la obtención del sobrenadante, el cual se cuantificó por espectrofotometría con el equipo NP80 (NanoPhotometer® IMPLEN) y se almacenó en alícuotas a -20°C.

6.7. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Laminillas de eritrocitos parasitados con *B. bovis* que derivaron del cultivo *in vitro* (Rojas et al., 2018) se utilizaron como antígeno. Las laminillas se desecaron con perlas de sílice durante 30 minutos a 37°C y posteriormente se fijaron dentro de un vaso de Coplin con acetona durante 10 minutos. Se colocaron 10 μ L de la dilución (1:80 en PBS) de los sueros pre-adsorbidos sobre las laminillas y se incubaron dentro de una cámara húmeda durante 30 minutos a 37°C, terminada la

incubación a cada laminilla se le realizaron tres lavados durante 10 minutos en agitación suave (100 rpm), dos con PBS (1X, pH 7.2) y uno más con agua destilada. Después de los lavados las laminillas se dejaron secar a temperatura ambiente, se agregaron 10 μ L de la dilución (1:1600 en PBS) del suero de cabra anti-IgG de bovino conjugado con Alexa 488 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA) y nuevamente se incubaron las laminillas dentro de una cámara húmeda como lo descrito antes. Por último, a cada laminilla se le realizaron tres lavados durante 10 minutos en agitación suave (100 rpm), dos con PBS (1X, pH 7.2) y uno más con agua destilada (Bautista et al., 2012). Para determinar la presencia de anticuerpos en los sueros se utilizó un microscopio de epifluorescencia (Leica DMLB), como criterio de positividad en los sueros, se consideró la visualización indirecta de las formas clásicas (trofozoitos o merozoitos) de *B. bovis* marcadas con el fluorocromo. Como sueros controles negativos y positivos, se utilizaron sueros de bovinos colectados antes y después de la inoculación con *B. bovis*, respectivamente.

6.8. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

El ensayo se realizó como lo descrito anteriormente con algunas modificaciones (Castañeda et al., 2013). Las microplacas de 96 pozos de fondo plano (3590, Corning) fueron sensibilizadas con 50 μ L del antígeno recombinante MSA-1 diluido (1.8 μ g/mL) en solución amortiguadora de recubrimiento (C3041, Sigma-Aldrich). Después de la incubación durante 16 horas en refrigeración (4-8°C), el antígeno no adherido a las microplacas se descartó y enseguida se realizaron tres lavados con 50 μ L de solución de lavado (PBS-Tween 20 al 0.1%, v/v) durante 5 minutos en agitación moderada (150 rpm). Las microplacas se bloquearon agregando 50 μ L de la solución de bloqueo (PBS-Tween 20 al 0.1%, 5% leche evaporada, w/v) y se dejaron incubar durante 30 minutos a 37°C. Seguido a esto, se realizaron tres lavados con 50 μ L de solución de lavado durante 5 minutos en agitación moderada

(150 rpm). Los sueros pre-adsorbidos fueron preparados por triplicado, se agregaron 50 μ L de la dilución (1:200 en PBS) a las microplacas y se dejaron incubar durante 1 hora a 37°C. Una vez que finalizó el tiempo de la incubación se realizaron tres lavados con 50 μ L de la solución de lavado durante 5 minutos en agitación moderada (150 rpm). Posteriormente, se agregaron a cada uno de los pozos 50 μ L de la dilución (1:10000 en PBS) del suero de conejo anti-IgG de bovino conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés) (A5295, Sigma-Aldrich), dejando incubar las microplacas durante 30 minutos a 37°C, enseguida se realizaron tres lavados con 50 μ L de la solución de lavado durante 5 minutos en agitación moderada (150 rpm). Finalmente, el revelado de la reacción ocurrió después de que se agregaron 50 μ L del sustrato Tetrametil-Bencidina (T0440, Sigma-Aldrich) en cada pozo y se dejaron incubar las microplacas durante 30 minutos a 37°C. Para medir la absorbancia se utilizó un lector de microplacas (iMark™ Bio-Rad) con un filtro de 650 nm. Para la interpretación, los resultados obtenidos en densidad óptica (DO) de cada suero se expresaron como índice de positividad (IP) de acuerdo con la fórmula (IP= promedio de DO suero/promedio de DO suero control negativo +3 desviaciones estándar), los sueros cuyo valor de IP fueron ≥ 1 se consideraron sueros positivos y < 1 como sueros negativos para anticuerpos contra *B. bovis*. Como sueros controles negativos y positivos, se utilizaron sueros de bovinos colectados antes y después de la inoculación con *B. bovis*, respectivamente.

6.9 Prueba rápida inmunocromatográfica (ICT)

6.9.1. Bioconjugación del antígeno MSA-1 con nanopartículas de oro

Para la bioconjugación se mezclaron ~100 μ L (0.090 mg/mL) del antígeno recombinante MSA-1 con 1 mL de la suspensión (4.5×10^{10} /mL) de nanopartículas de oro de 50 nm de diámetro (15708-5, Ted Pella), la suspensión se dejó incubar durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación suave (100 rpm),

posteriormente para estabilizar y bloquear las nanopartículas del bioconjugado se agregó 1 mL de solución de borato 20 mM (pH 7.4, 1% BSA, w/v), se mezcló suavemente y se dejó incubar nuevamente durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación suave (100 rpm) (Figura 6). Enseguida, el bioconjugado fue centrifugado a 18620 x *g* (Hermle Z32HK) durante 30 minutos, se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1 mL de solución de borato 20 m (pH 7.4, 1% BSA w/v). La mezcla fue centrifugada nuevamente a 18620 x *g* durante 30 minutos. Finalmente, la pastilla fue resuspendida en 200 μ L de solución diluyente para bioconjugado (Hermanson, 2008).

6.9.2. Preparación de tiras reactivas

La ICT estaba compuesta por tiras reactivas ensambladas con una almohadilla de nitrocelulosa para la muestra (CFSP173000, Millipore), una almohadilla de fibra de vidrio para bioconjugado (GFDX103000, Millipore), una membrana de nitrocelulosa de alto flujo con respaldo plástico (HF180MC100, Millipore) y una almohadilla de nitrocelulosa absorbente (CFSP173000, Millipore). El ensamble de las tiras se realizó como lo descrito previamente (Huang et al., 2004; Díaz et al., 2015). Los reactivos fueron inyectados linealmente (3 μ L/cm) sobre membranas de nitrocelulosa utilizando la plataforma de impresión (XYZ3210 Bio-Dot), en la línea de prueba se inyectó el antígeno recombinante MSA-1 (1.1 mg/mL) y en la línea control los anticuerpos policlonales IgG anti-MSA-1 (8.7 mg/mL) (Figura 7). Después de la inyección de los reactivos, las membranas de nitrocelulosa fueron desecadas durante 30 minutos a 45°C y posteriormente cortadas en tiras de 4 mm de ancho con un módulo de corte de guillotina (CM5000 Bio-Dot). El bioconjugado se impregnó manualmente (4 μ L) sobre las almohadillas de fibra de vidrio que fueron activadas previamente y se desecaron durante 30 minutos a 42°C. La prueba se ejecutó al aplicar 10 μ L de los sueros pre-adsorbidos directamente sobre las almohadillas para las muestras activadas previamente, enseguida se

agregaron 100 μ L de la solución de corrimiento (Anexo 7) (Díaz *et al.*, 2015). Los resultados obtenidos con la prueba para la detección de anticuerpos contra *B. bovis* se interpretaron de manera visual 10 minutos después de la aplicación de los sueros utilizando los siguientes criterios, se interpretó como resultado positivo la aparición de reacción (color rojo) en las dos líneas (prueba y control) de las tiras, y como negativo únicamente la aparición de reacción en la línea de control. Cualquier otro resultado diferente se consideró inválido (Huang *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2009).



Figura 6. Bioconjugación del antígeno recombinante MSA-1 con nanopartículas de oro.

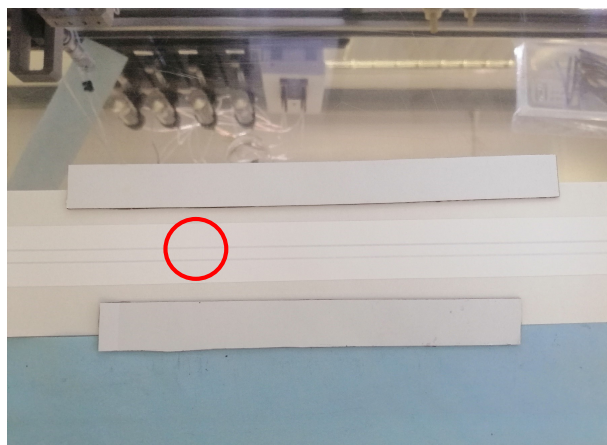


Figura 7. Inyección de los reactivos sobre la membrana de nitrocelulosa (círculo rojo) con la plataforma de impresión (XYZ3210, Bio-Dot).

6.10. Análisis estadístico

6.10.1. Evaluación del desempeño de las pruebas

La evaluación del desempeño de cada una de las prueba se realizó mediante una tabla de contingencia 2x2 a partir de los resultados obtenidos después de analizar los sueros de referencia, para ello (Cuadro 1), se determinaron las características propias de las pruebas ICT, ELISA e IFI como sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN), razón de verosimilitud positiva (RVP) y razón de verosimilitud negativa (RVN) con un intervalo de confianza (IC) al 95% utilizando el programa de computación estadística disponible en línea VassarStats (<http://vassarstats.net/>)

Cuadro 1. Tabla de contingencia 2X2 para evaluar el desempeño de las pruebas.

		SUEROS DE REFERENCIA		
		+	-	
ICT ELISA IFI	+	a	b	Donde: a = verdaderos positivos b = falsos positivos c = falsos negativos d = verdaderos negativos
	-	c	d	
Sensibilidad		$a/a+c$		
Especificidad		$d/b+d$		
Valor predictivo positivo		$a/a+b$		
Valor predictivo negativo		$d/c+d$		
Razón de verosimilitud positiva		$(a/a+b)/1-(d/b+d)$		
Razón de verosimilitud negativa		$1-(a/a+c)/(d/b+d)$		

6.10.2. Estimación de la tasa de seroprevalencia para *B. bovis*

La tasa de seroprevalencia para *B. bovis* en el módulo de bovinos del Sitio Experimental Pichucalco, INIFAP se estimó con los resultados obtenidos con las pruebas ICT, ELISA e IFI empleando la fórmula descrita.

$$\text{Tasa de seroprevalencia} = \frac{\text{Número total de casos existentes}}{\text{Total de la población bajo riesgo}} \times 100$$

6.10.3. Determinación de la concordancia

La concordancia entre las pruebas ICT y ELISA con relación a la prueba estándar IFI se determinó calculando el valor del índice kappa con un IC al 95% utilizando el programa de computación estadística disponible en línea VassarStats (<http://vassarstats.net/>). La fuerza de concordancia con base al índice kappa se calificó como pobre (< 0.20), aceptable (0.21-0.40), moderada (0.41-0.60), buena (0.61-0.80) y casi perfecta (0.81-1.00) (Guswanto et al., 2017).

7. RESULTADOS

7.1. Obtención del antígeno recombinante MSA-1 de *B. bovis*

El antígeno recombinante MSA-1 se expresó con éxito en las células transformadas de *E. coli*. El patrón electroforético del análisis de las fracciones purificadas por SDS-PAGE mostró compatibilidad con el peso molecular para el antígeno recombinante MSA-1 de *B. bovis* (55 kDa) de acuerdo con lo descrito (Figura 8) (Sánchez et al., 2008; Reyes et al., 2016). La concentración final que se obtuvo por espectrofotometría después de la diálisis del antígeno fue de ± 1.5 mg/mL.

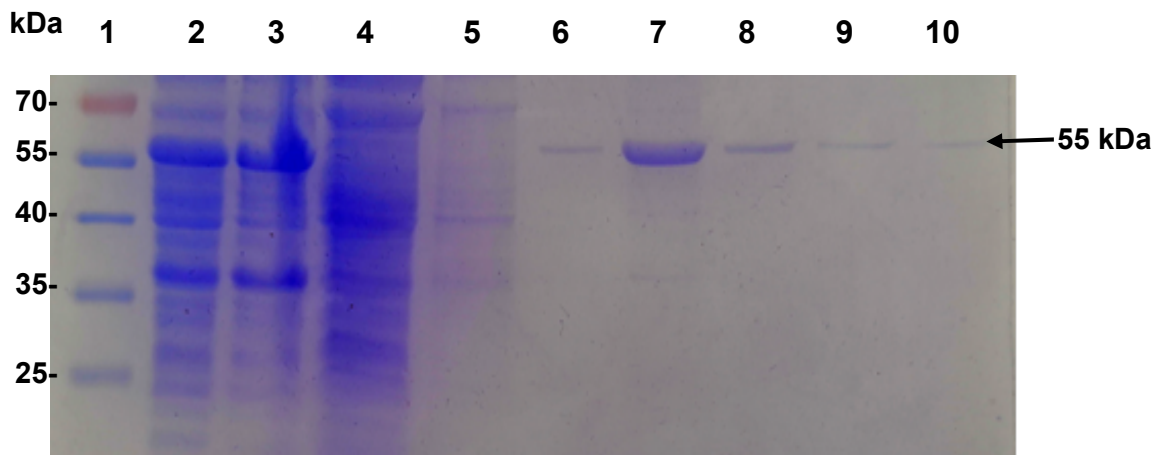


Figura 8. Análisis de las fracciones purificadas del antígeno recombinante MSA-1 de *B. bovis* por SDS-PAGE al 12%. Identificación de las líneas: 1) marcador molecular; 2) pastilla de células de *E. coli* previo a la suspensión en solución de lisis; 3) pastilla de células de *E. coli* después de la suspensión en solución de lisis; 4) sobrenadante del extracto después de la suspensión en solución de lisis; 5) fracción del primer lavado, 6-10) fracciones purificadas del antígeno recombinante MSA-1.

7.2. Purificación de anticuerpos policlonales IgG anti-MSA-1

El resultado después del análisis de las fracciones purificadas de los anticuerpos policlonales anti-MSA-1 por SDS-PAGE mostró una abundante concentración de anticuerpos en cada una de las fracciones. El peso molecular de las bandas que se observaron coincide con lo esperado para las cadenas pesadas (50 kDa) y ligeras (25 kDa) de los anticuerpos clase IgG (Figura 9). Cabe mencionar que el suero ovino que fue utilizado para la purificación, cuando fue evaluado con el antígeno nativo MSA-1 de *B. bovis* por IFI mostró un título de 1:10240 para anticuerpos policlonales IgG (resultado no mostrado). La concentración final que se obtuvo por espectrofotometría después de la diálisis fue de ± 15 mg/mL.

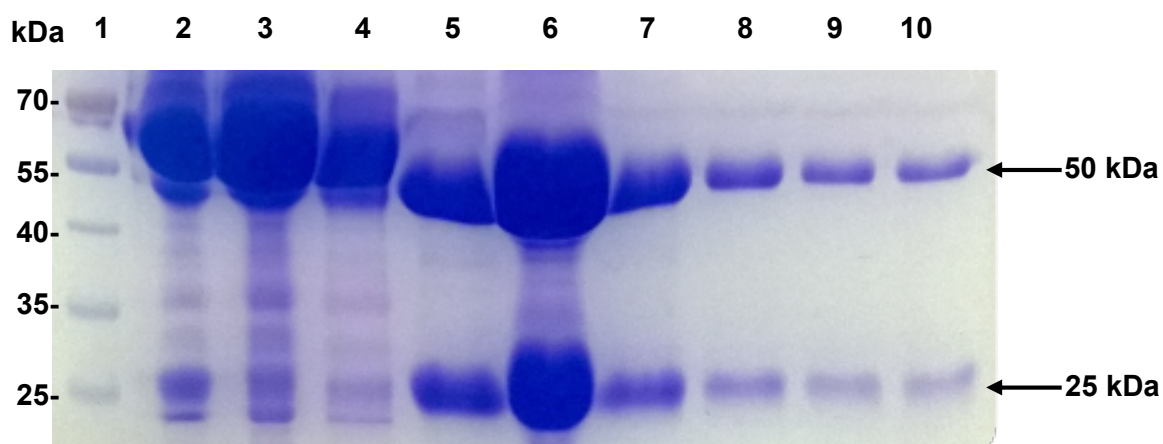


Figura 9. Análisis de las fracciones purificadas de los anticuerpos policlonales IgG anti-MSA-1 por SDS-PAGE al 12%. Identificación de las líneas: 1) marcador molecular; 2) suero de ovino sin filtrar; 3) suero de ovino microfiltrado; 4) fracción del primer lavado; 5-10) fracciones purificadas de anticuerpos IgG anti-MSA-1.

7.3. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

7.3.1. Evaluación del desempeño con sueros de referencia

Los sueros que presentaron valores de IP ≥ 1 se consideraron como positivos y con valores de IP < 1 negativos (Figuras 10 y 11). Los resultados de la evaluación del desempeño del ELISA utilizando el antígeno recombinante MSA-1 para el diagnóstico serológico de babesiosis bovina detectó anticuerpos en 6 sueros negativos de referencia y en 26 de los positivos para *B. bovis* (Anexos 8 y 9). El ELISA mostró una sensibilidad del 86.6% (26/30) con límites para un IC (95%) entre 68.3% y 95.6%. La especificidad fue del 80% (24/30) con un IC (95%) entre 60.8% y 91.5%. Se obtuvieron un 20% de resultados falsos positivos y 13.3% de resultados falsos negativos. La probabilidad de obtener un resultado positivo (VPP) y negativo (VPN) con ELISA fue de 81.2% y 85.7%, respectivamente (Cuadro 2). El valor de la RVP fue de 4.3, mientras que la RVN mostró un valor de 0.16 (Anexo 13).

Cuadro 2. Tabla de contingencia 2X2 para la evaluación del desempeño del ELISA.

		SUEROS DE REFERENCIA		
		+	-	
ELISA	+	26 a	6 b	32
	-	4 c	24 d	28
		30	30	60

28

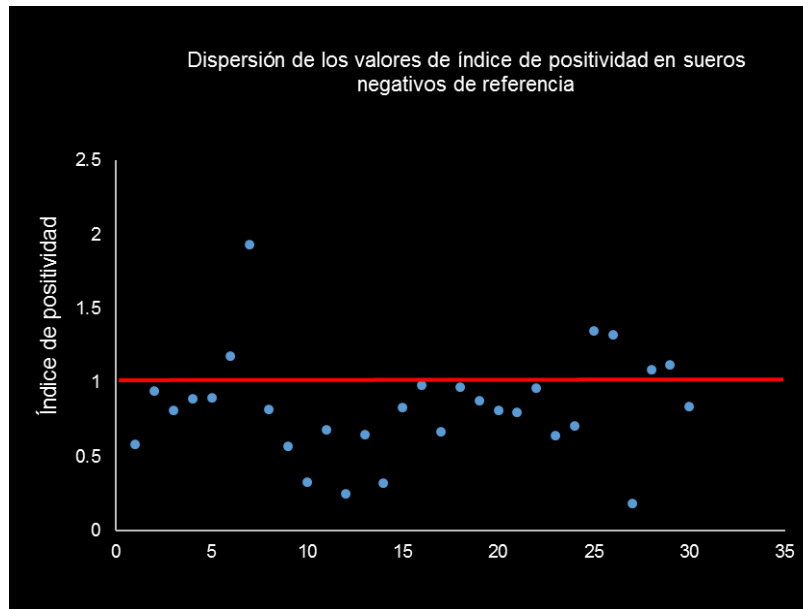


Figura 10. Resultados del ELISA en sueros negativos de referencia. Se graficó el índice de positividad de cada muestra (puntos azules), la línea roja corresponde al punto de corte.

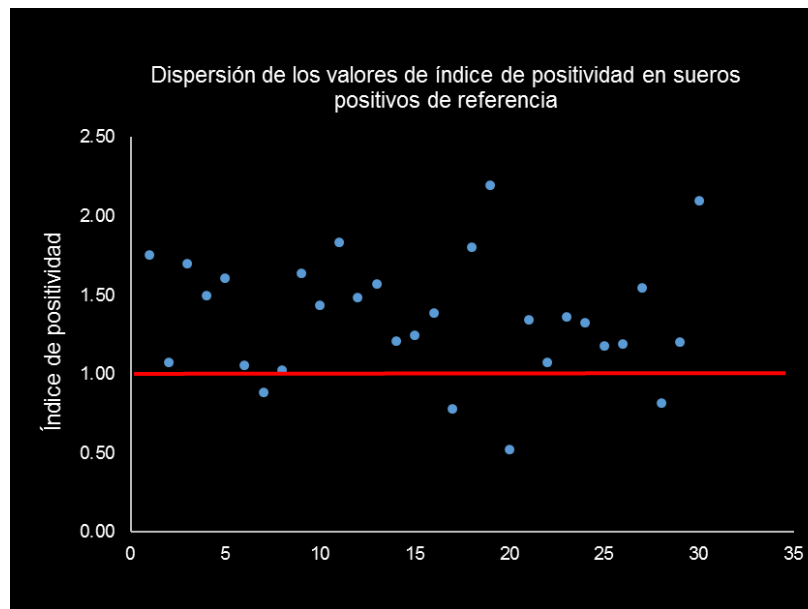


Figura 11. Resultados del ELISA en sueros positivos de referencia. Se graficó el índice de positividad de cada muestra (puntos azules), la línea roja corresponde al punto de corte.

7.4. Prueba rápida inmunocromatográfica (ICT)

7.4.1. Evaluación del desempeño con sueros de referencia

La aparición de reacción en las dos líneas de las tiras reactivas se interpretó como un resultado positivo para la detección de anticuerpos contra *B. bovis* (Figura 12). La ICT detectó anticuerpos en 5 de los sueros negativos de referencia y en 27 de los positivos para *B. bovis* (Anexos 8 y 9), los resultados se interpretaron de manera visual 10 minutos después de la aplicación de los sueros (Figura 13). La sensibilidad obtenida después de la evaluación de la prueba fue del 90% (27/30) con límites para un IC (95%) entre 72.3% y 97.3%. La especificidad mostrada fue del 83.3% (25/30) con un IC (95%) entre 64.5% y 93.6%. Se obtuvieron 16.6% de resultados falsos positivos y 10% de resultados falsos negativos. La probabilidad de obtener un resultado positivo (VPP) y negativo (VPN) con la ICT fue de 84.3% y 89.2%, respectivamente (Cuadro 3). El valor de la RVP fue de 5.4, mientras que la RVN mostró un valor de 0.12 (Anexo 12).

Cuadro 3. Tabla de contingencia 2X2 para la evaluación del desempeño de la ICT.

		SUEROS DE REFERENCIA		
		+	-	
ICT	+	27 a	5 b	32
	-	3 c	25 d	28
		30	30	60

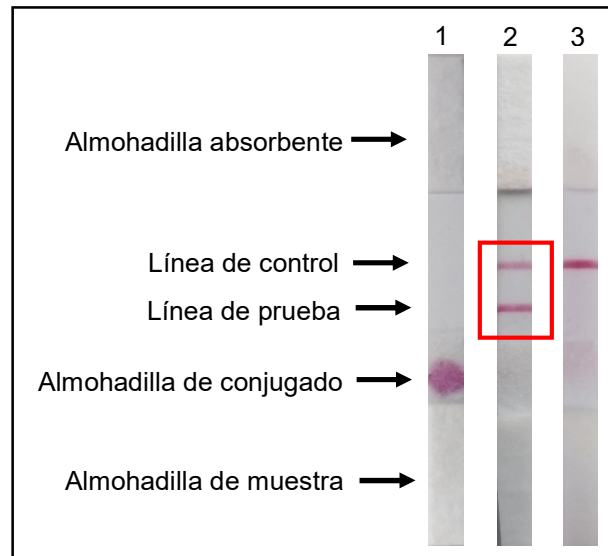


Figura 12. Tiras reactivas de ICT para la detección de anticuerpos contra *B. bovis*. Identificación de las líneas: 1) tira reactiva antes de la aplicación del suero; 2) resultado positivo para anticuerpos contra *B. bovis* (recuadro rojo), 3) resultado negativo para anticuerpos contra *B. bovis*.

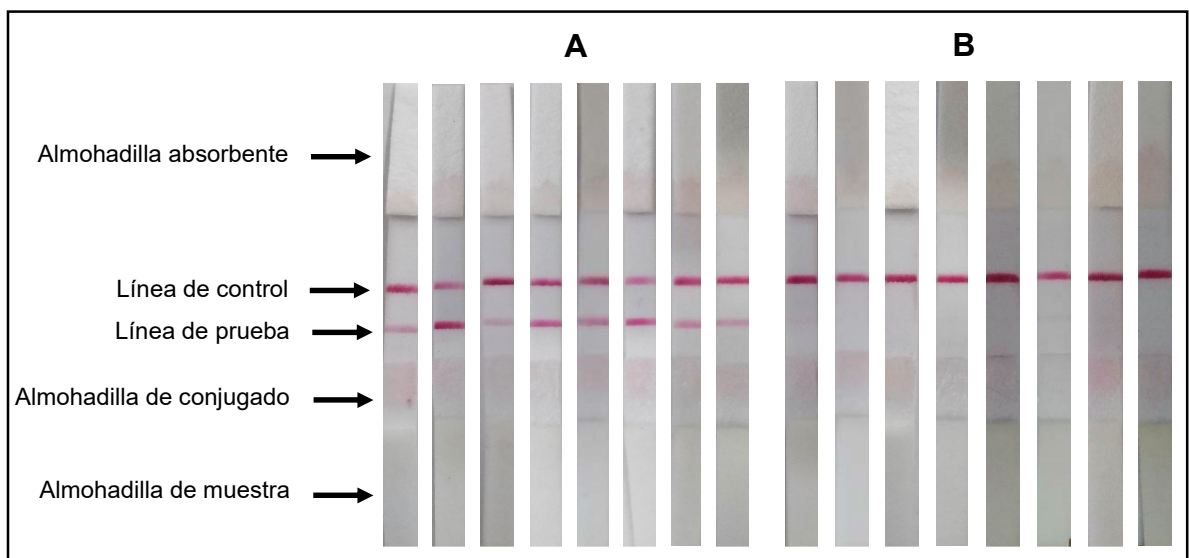


Figura 13. Detección de anticuerpos contra *B. bovis* en los sueros positivos (A) y negativos (B) de referencia utilizando tiras reactivas de ICT.

7.5. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

7.5.1. Evaluación del desempeño con sueros de referencia

La IFI detectó anticuerpos en 8 de los sueros negativos de referencia y en 27 de los positivos para *B. bovis* (Anexos 8 y 9). La sensibilidad obtenida después de la evaluación de la prueba fue del 90% (27/30) con límites para un IC (95%) entre 72.3% y 97.3%. La especificidad mostrada fue del 73.3% (22/30) con un IC (95%) entre 53.8% y 87%. Se obtuvieron un 26.6% de resultados falsos positivos y 10% de resultados falsos negativos. La probabilidad de obtener un resultado positivo (VPP) y negativo (VPN) con IFI fue de 77.1% y 88%, respectivamente (Cuadro 4). El valor de la RVP fue de 3.3, mientras que la RVN mostró un valor de 0.13 (Anexo 11).

Cuadro 4. Tabla de contingencia 2X2 para la evaluación del desempeño de la IFI.

		SUEROS DE REFERENCIA		
		+	-	
IFI	+	27 a	8 b	35
	-	3 c	22 d	25
		30	30	60

7.6. Estimación de la tasa de seroprevalencia para *B. bovis* en el módulo de bovinos del Sitio Experimental Pichucalco

La tasa de seroprevalencia para *B. bovis* en el módulo de bovinos del Sitio Experimental Pichucalco fue estimada para este estudio con las pruebas ICT, ELISA e IFI (Cuadro 5). La tasa de seroprevalencia que se estimó con la ICT fue del 97.2% con un total de 70/72 sueros positivos para anticuerpos contra *B. bovis*. La tasa de seroprevalencia estimada con ELISA fue del 90.3% (65/72), se interpretaron como positivos aquellos sueros con valor de IP ≥ 1 (Figura 14). La tasa de seroprevalencia que se estimó con IFI fue del 95.8% con un total de 69/72 sueros positivos para la presencia de anticuerpos IgG contra *B. bovis* (Anexo 10), los cuales durante el análisis mostraron evidencia del reconocimiento para los antígenos presentes en los trofozoitos y merozoitos de *B. bovis* (Figura 15).

Cuadro 5. Comparación de los resultados obtenidos de las pruebas IFI, ELISA, ICT para el diagnóstico serológico de babesiosis en sueros de bovinos del Sitio Experimental Pichucalco.

Resultado	IFI ^a		ICT ^b		ELISA ^c	
	n ^d	% ^e	n ^d	% ^e	n ^d	% ^e
Positivo	69	95.8	70	97.2	65	90.3
Negativo	3	4.2	2	2.8	7	9.7
Total	72	100	72	100	72	100

^a Inmunofluorescencia indirecta

^b Prueba rápida inmunocromatográfica

^c Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

^d Número de sueros analizados

^e Porcentaje del número total de sueros analizados

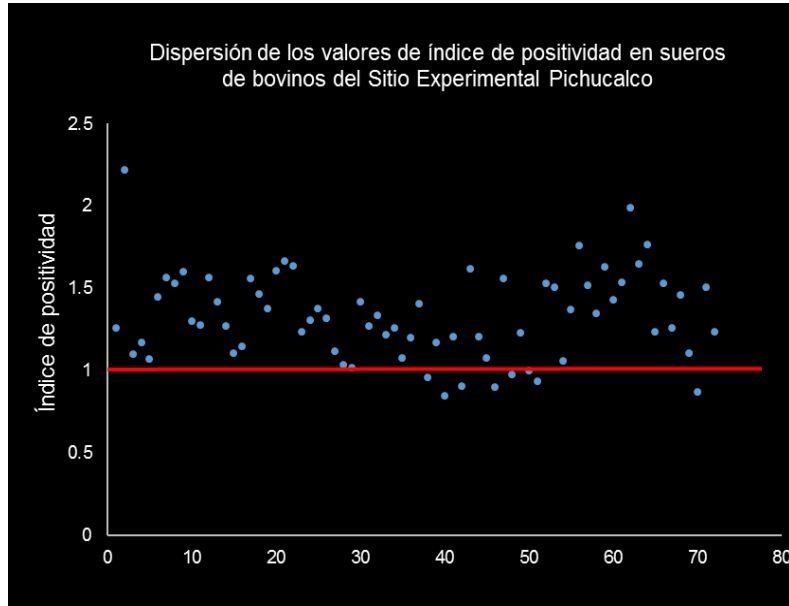


Figura 14. Resultados del ELISA en sueros de bovinos del Sitio Experimental Pichucalco. Se graficó el índice de positividad de cada muestra (puntos azules), la línea roja corresponde al punto de corte.

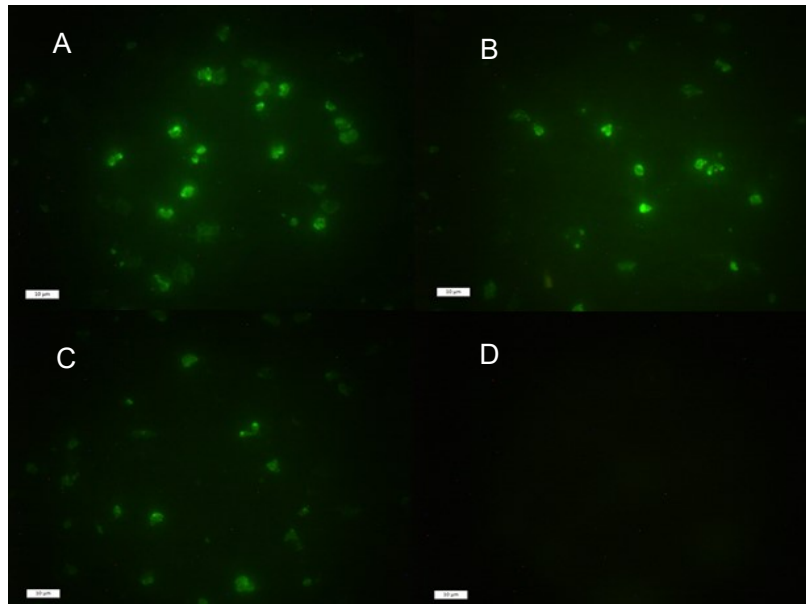


Figura 15. Resultados representativos de la detección de anticuerpos contra *B. bovis* por IFI en sueros de bovinos del Sitio Experimental Pichucalco. A-C) sueros positivos para anticuerpos contra *B. bovis*; D) suero negativo para anticuerpos contra *B. bovis*.

7.7. Determinación de la concordancia entre las pruebas ICT y ELISA para la detección de anticuerpos contra *B. bovis* con respecto a la prueba estándar IFI

Los resultados de la ICT se compararon con los de IFI como prueba estándar (Cuadro 6). De los 72 sueros colectados en el Sitio Experimental Pichucalco, 69 sueros fueron positivos por IFI y 70 fueron positivos por ICT. Con dicha comparación, la sensibilidad y especificidad mostrada fue del 100% (69/69) y 66% (2/3), respectivamente. El índice kappa (k) calculado mostró un valor de 0.79, lo cual indicó una fuerza de concordancia buena entre las dos pruebas, y una concordancia general del 98.6% (71/72) (Cuadro 7). De acuerdo con esto, la fuerza de concordancia observada está compuesta por un 79% de la concordancia máxima y un 21% de la esperada por azar.

Los resultados del ELISA se compararon con los de IFI como prueba estándar (Cuadro 6). De los 72 sueros colectados en el Sitio Experimental Pichucalco, 69 sueros fueron positivos por IFI y 65 fueron positivos por ELISA. Con dicha comparación, la sensibilidad y especificidad mostrada fue del 94.2% (65/69) y 100% (3/3), respectivamente (Cuadro 6). El índice kappa calculado mostró un valor de 0.57, lo cual indicó una fuerza de concordancia moderada entre las dos pruebas, y una concordancia general del 94.4% (68/72) (Cuadro 7). De acuerdo con esto, la fuerza de concordancia observada está compuesta por un 57% de la concordancia máxima y un 43% de la esperada por azar.

Cuadro 6. Comparación de los resultados de los sueros de bovinos del Sitio Experimental Pichucalco analizados por IFI, ELISA e ICT.

IFI	ELISA		ICT		Total
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
Positivo	65	4	69	0	69
Negativo	0	3	1	2	3
Total	65	7	70	2	72

Cuadro 7. Sensibilidad y especificidad de la IFI para la detección de anticuerpos contra *B. bovis* en sueros de bovinos del Sitio Experimental Pichucalco en comparación con los resultados de ICT y ELISA.

Características	Características de la prueba IFI comparadas con:	
	ELISA	ICT
Sensibilidad (%)	94.2	100
Especificidad (%)	100	66.6
Concordancia (%)	94.4	98.6
Valor índice kappa	0.57	0.79

8. DISCUSIÓN

Diferentes pruebas han sido descritas para el diagnóstico serológico de la babesiosis bovina, estas pruebas están basadas principalmente en la detección de anticuerpos específicos en bovinos después de la exposición a *Babesia* spp. (Ojeda et al., 2010; Terkawi et al., 2012; Guswanto et al., 2017; Jaramillo et al., 2018). La IFI se ha utilizado ampliamente en estudios seroepidemiológicos (Bautista et al., 2012; Romero et al., 2016) y ofrece una sensibilidad adecuada; sin embargo, presenta una serie de desventajas que limitan su empleo en algunos laboratorios, incluyendo reducida especificidad, bajo rendimiento para el análisis de las muestras y elevada subjetividad debido a que la interpretación de los resultados está influenciada por el juicio del analista (Bose et al., 1995; Alvarez et al., 2019).

En el presente estudio fueron comparadas la ICT y ELISA con relación a la IFI para el diagnóstico serológico en bovinos expuestos a *B. bovis*. Cuando fue evaluada la prueba ICT para la detección de anticuerpos con los sueros de referencia, los resultados indicaron que la sensibilidad y especificidad fue del 90% y 83.3%, respectivamente. Los resultados obtenidos con la ICT son relativamente bajos comparados con los descritos anteriormente cuando se empleó la BoICT con el antígeno recombinante de la superficie del merozoito (MSA-2c), donde la sensibilidad y especificidad mostrada fue del 96.7% y 93.8% (Kim et al., 2008). Sin embargo, a pesar de que la especificidad resulta ser reducida (83.3% vs 93.8%) como se mencionó anteriormente, la ICT muestra una alta sensibilidad (90%) de acuerdo a lo descrito con otras ICT's desarrolladas para el diagnóstico serológico a partir de antígenos recombinantes derivados de protozoarios, por ejemplo, *Toxoplasma gondii* (100%), *Babesia caballi* (83.3%), *Babesia equi* (94.1%), *Neospora caninum* (94.7%) y *Theileria uilenbergi* (93.1%) (Huang et al., 2004; Liao et al., 2005; Huang et al., 2006; Lu et al., 2015).

La ICT fue la prueba que tuvo mayor éxito para la detección de anticuerpos contra *B. bovis* en sueros de bovinos del Sitio Experimental Pichucalco, mostrando una concordancia general del 98.6% (71/72) comparada con los resultados que se obtuvieron con la prueba estándar de oro IFI. En un estudio similar la ICT basada en la porción C-terminal del antígeno asociado a las roptrias (RAP-1/CT) que fue desarrollada y evaluada para la detección de anticuerpos contra *B. bovis* mostró una concordancia general del 90.3% y 92.5% cuando se comparó con IFI y ELISA utilizadas como estándares de referencia, respectivamente (Kim et al., 2007).

Cuando fue evaluado el ELISA para la detección de anticuerpos con los sueros de referencia, los resultados indicaron que la sensibilidad y especificidad fue del 86.6% y 80%, respectivamente. No obstante, un ELISA que fue instrumentado anteriormente con el antígeno recombinante MSA-1 para el diagnóstico de *B. bovis* mostró sensibilidad y especificidad del 80% y 97%, respectivamente (Castañeda et al., 2013). El ELISA empleado en este estudio se realizó como lo descrito anteriormente (Castañeda et al., 2013); sin embargo, se practicaron algunas modificaciones, entre ellas, la sustitución del suero de cabra comercial (anti-IgG de bovino) conjugado con fosfatasa alcalina (ALP, por sus siglas en inglés) por suero de conejo comercial (anti-IgG de bovino) conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés). En general, el ELISA presenta diversas ventajas con respecto a la IFI para el diagnóstico serológico, como, la objetividad para la interpretación de los resultados, la capacidad de automatización para analizar un elevado número de muestras de manera simultánea, además de que también permite diferenciar con gran sensibilidad entre especies de *Babesia* spp. utilizando antígenos recombinantes específicos (Kim et al., 2008; Terkawi et al., 2012; Jaramillo et al., 2018).

Los resultados en este estudio sugieren que la ICT es más sensible (90% vs 86.6%) y muestra mayor especificidad (83.3% vs 80%) que el ELISA para el diagnóstico serológico de babesiosis bovina causada por *B. bovis*. Una posible

explicación de la baja especificidad por falsos positivos en la ICT y el ELISA (83.3% y 80%, respectivamente) comparada con la mostrada en la BoICT y BoELISA (93.8% y 95%, respectivamente) (Kim et al., 2008), podría sugerir que el antígeno MSA-1 no es tan específico como el antígeno MSA-2c para la detección de anticuerpos contra *B. bovis* (Borgonio et al., 2008). El antígeno recombinante MSA-1 que fue utilizado tanto en la ICT, como en el ELISA presenta características inmunodominantes con gran capacidad para inducir una respuesta inmunológica humoral en bovinos inmunizados (Hines et al., 1995, Reyes et al., 2016). Estudios realizados *in vitro* mostraron que el uso de anticuerpos específicos contra el antígeno MSA-1 de *B. bovis* neutralizan significativamente la infectividad de los merozoitos de cepas de México y Texas (Hines et al., 1991). Los resultados de un inmunoensayo mostraron reactividad cruzada de anticuerpos monoclonales anti-MSA-1 con extractos proteicos de aislados de *B. bovis* de distinto origen geográfico en México (Borgonio et al., 2008). Hasta ahora no se han realizado reportes sobre la identificación del antígeno MSA-1 en otras especies de protozoarios, que no sea *B. bovis*. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de una posible reactividad cruzada por anticuerpos presentes contra antígenos de otros parásitos Apicomplexa (por ejemplo, *N. caninum* y *T. gondii*) en los sueros bovinos de referencia procedentes de zonas libres de garrapatas (Yokoyama et al., 2006; Kemp et al., 2013; Ojeda et al., 2016). Un análisis bioinformático realizado a partir de cDNA de *B. bigemina* permitió identificar etiquetas de secuencias expresadas (ETS, por sus siglas en inglés) con alto grado de similitud correspondientes a genes hipotéticos y homólogos que han sido identificados en *B. bovis*, *Plasmodium* spp., *T. gondii*, *Theileria* spp. y *Cryptosporidium* spp. (Pérez et al., 2012).

La seroprevalencia para *B. bovis* por ICT y ELISA en este estudio fue del 97.2% y 90.3%, respectivamente. La seroprevalencia que se obtuvo fue alta en comparación con lo documentado en otros estudios seroepidemiológicos, donde se reportó del 4.3% y 6.2% en Uganda, respectivamente (Stuart et al., 2020); y del

65.1% y 69.8% en Indonesia, respectivamente (Guswanto et al., 2017). Esta discrepancia podría deberse al hecho de que, en los estudios antes mencionados, se usó un número mayor de muestras que fueron colectadas en diferentes regiones (401 y 487, respectivamente) en comparación con las 72 muestras colectadas en una sola región y que se evaluaron en el presente estudio, además de que en esos estudios se utilizó como antígeno en ambas pruebas (ICT y ELISA) el antígeno recombinante de los cuerpos esféricos 4 (SBP-4) de *B. bovis*.

De acuerdo con los valores del índice kappa (k) que fueron calculados para determinar la concordancia de la ICT y ELISA, el valor de k más alto lo tuvo la ICT (0.79), lo que significa que tuvo una fuerza de concordancia buena con respecto a la prueba estándar de oro (IFI) para el diagnóstico serológico. En otro estudio, la prueba *bovICT* empleada para la detección de anticuerpos contra *B. bovis* en muestras de suero obtenidas en campo mostró un valor de k similar (0.74) (Guswanto et al., 2017; Alvarez et al., 2019).

El uso de la razón de verosimilitud (RV) constituye una herramienta de gran utilidad para la toma de decisiones en la evaluación del desempeño de las pruebas diagnósticas. En el presente estudio la interpretación del valor de la RV indicó que la utilidad de las pruebas para el diagnóstico serológico de babesiosis bovina fue buena en el caso de la ICT y regular para el ELISA e IFI según la escala propuesta (Silva y Molina, 2016). La ICT mostró mejores valores en cuanto a la RVP y RPN (5.4 y 0.12, respectivamente) comparándolos con el ELISA (4.3 y 0.16, respectivamente), donde RVP (>1) y RVN (<0.1) indican un cambio relevante en la utilidad diagnóstica de las pruebas (Silva y Molina, 2016).

9. CONCLUSIONES

- La prueba rápida ICT basada en el antígeno recombinante MSA-1 combina un sistema de análisis en tiras reactivas que es sensible para la detección de anticuerpos contra *B. bovis*.
- Los resultados del presente estudio indicaron que la ICT fue la prueba que tuvo mayor sensibilidad y especificidad, además de una mayor concordancia general en comparación con el ELISA para la detección de anticuerpos contra *B. bovis*.
- La ICT mostró una fuerza de concordancia buena ($k= 0.79$) con respecto a los resultados de la prueba estándar de oro (IFI) para la detección de anticuerpos contra *B. bovis* en sueros obtenidos en campo.
- Este sería el primer estudio utilizando una prueba ICT para la detección de anticuerpos contra *B. bovis* y donde además se realiza una estimación de la seroprevalencia de babesiosis bovina en México.

10. PERSPECTIVAS

Los resultados satisfactorios que se obtuvieron en la evaluación del desempeño de las pruebas que fueron comparadas en el presente estudio, siguieron el empleo de la ICT para la detección de anticuerpos contra *B. bovis*. La ICT es un método rápido, práctico y sensible que ofrece grandes ventajas sobre las pruebas convencionales (IFI y ELISA) para el diagnóstico serológico, esta prueba dada su simplicidad no requiere equipo de laboratorio altamente sofisticado para su ejecución, análisis e interpretación y podría ser aplicable por Médicos Veterinarios en cualquier lugar, incluso en el campo. Su implementación en futuros estudios seroepidemiológicos sería de gran utilidad y podría contribuir en el establecimiento de nuevas medidas para la prevención y control de la babesiosis bovina en el país. No obstante, se recomienda una mayor optimización para mejorar la especificidad de la ICT. También se recomienda evaluar su desempeño para la detección de anticuerpos utilizando sangre completa y plasma de bovinos.

11. ABREVIATURAS

mL: Mililitro

μ L: Microlitro

g: Gramo

mg: Miligramo

μ g: Microgramo

rpm: Revoluciones por minuto

ICT: Prueba rápida inmunocromatográfica

SDS-PAGE: Gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

PBS: Solución buffer de fosfatos

N: Tamaño de la población

n: Tamaño de la muestra

VMSA: Antígenos variables de la superficie del merozoito

MSA-1: Antígeno de la superficie del merozoito

$^{\circ}$ C: Grados centígrados

nm: Nanómetro

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

M: Molar

mM: Milimolar

BSA: Albumina sérica bovina

PIB: Producto interno bruto

SIAP: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera

DO: Densidad óptica

g: Fuerza centrífuga relativa

kDa: Kilodalton

vs: Contra

k: Índice kappa

12. REFERENCIAS

Aguilar, B.S. (2005). Fórmulas para el cálculo de la muestra en investigaciones de salud. *Salud en Tabasco*, 11, 333-338.

Álvarez, J.A.; López, U.; Rojas, C.; Borgonio, V.M.; Sanchez, V.; Castañeda, R.; Vargas, P. y Figueroa, J.V. (2010). Immunization of *Bos taurus* steers with *Babesia bovis* recombinant antigens MSA-1, MSA-2c and 12D3. *Transboundary and Emerging Diseases*, 57, 87-90.

Alvarez, J.A.; Rojas, C. y Figueroa, J.V. (2019). Diagnostic tools for the identification of *Babesia* sp. in persistently infected cattle. *Pathogens*, 8, 143; doi:10.3390/pathogens8030143.

Babes, V. (1888). Sur l'haemoglobinurie bacterienne du boeuf. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences*, 107, 692-694.

Barker, S.C. y Murrell, A. (2004). Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitology*, 129, 15-36.

Bautista, G.C.R.; Castañeda, A.R.; Álvarez, M.J.A.; Rojas, M.C.; Figueroa, M.J.V. y Rodríguez, L.A. (2012). La vacunación simultánea de bovinos con *Lactobacillus casei* y la vacuna bivalente contra babesiosis bovina genera una mejor protección contra *Babesia bovis* y *B. bigemina* transmitidas por garrapatas en condiciones extremas de campo. *Veterinaria México*, 43, 189-200.

Bautista, G.C.R.; Rojas, M.C.; Álvarez, M.J.A.; Figueroa, J.V.; Vargas, U.P.; Lira, J. y Jasso, V.C. (2013). Aumento de IgG en anti-*Babesia* en bovinos Aberdeen Angus vacunados con lactobacilos y la vacuna bivalente vs babesiosis, *Memorias*

del XXXVII Congreso Nacional de Buiatría. Acapulco, Gro. México, agosto 1-3, 2013, pp. 594-598.

Bautista, G.C.R.; Lozano, R.A.; Álvarez, M.J.A.; Rojas, M.C.; Figueroa, J.V.; Díaz, L.M. y García, R.V.G. (2016). Activación *in vitro* de monocitos de bovino con *Lactobacillus casei*: producción de óxido nítrico. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 3, 237-242.

Bock, R.; Jackson, J.; de vos, A. y Jorgensen, W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology*, 129, 247-269.

Boonchit, S.; Xuan, X.; Yokoyama, N.; Goff, W.L.; Waghela, S.D.; Wagner, G. y Igarashi, I. (2004). Improved enzyme-linked immunosorbent assay using C-terminal truncated recombinant antigens of *Babesia bovis* rhoptry-associated protein-1 for detection of specific antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 1601-1604.

Borgonio, V.M.; Mosqueda, J.J.; Genis, A.D.; Falcón, A.; Álvarez, J.A.; Camacho, M. y Figueroa, J.V. (2008). *msa-1* and *msa-2c* gene analysis and common epitopes assessment in Mexican *B. bovis* isolates. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1149, 145-148.

Bose, R.; Jorgensen, W.K.; Dalgliesh, R.J.; Friedhoff, K.T. y de Vos, A.J. (1995). Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Veterinary Parasitology*, 57, 61-74.

Brown, W.C.; McElwain, T.F.; Palmer, G.H.; Chantler, S.L. y Mark, E.D. (1999). Bovine CD41 T-lymphocyte clones specific for rhoptry-associated protein 1 of *Babesia bigemina* stimulate enhanced immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2 synthesis. *Infection and Immunity*, 67, 155-164.

Brown, W.C. y Palmer, G.H. (1999). Designing blood-stage vaccines against *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Parasitology Today*, 15, 275-281.

Brown, W.C. (2001). Molecular approaches to elucidating innate and acquired immune responses to *Babesia bovis*, a protozoan parasite that causes persistent infection. *Veterinary Parasitology*, 101, 233–248.

Cartagena, Y.L.M.; Ríos, O.L.A. y Cardona, A.J.A. (2015). Seroprevalencia de *Ehrlichia canis* en perros con sospecha de infección por patógenos transmitidos por garrapatas en Medellín, 2012-2014. *Revista de Medicina Veterinaria*, 29, 51-62.

Castañeda, A.R.O.; Rojas, M.C.; Figueroa, M.J.V. y Álvarez, M.J.A. (2013). Ensayo inmunoenzimático con antígeno recombinante MSA-1 para el diagnóstico de *Babesia bovis*, Memorias VIII Congreso Internacional de Epidemiología, León, Gto. México, septiembre 25-28, 2013, pp. 275-279.

Cruz, R.A.; Aguilar, T.G.; Alpírez, F.; Valdiviezo, L.B.; Mendoza, N.P.; Ruiz, S.B.; Olvera, R.A.; Cantó, A.G.J. y Mosqueda, G.J. (2016). Expresión recombinante de la proteína de los cuerpos esféricos 4 (SBP-4) de *Babesia bigemina*. *Quehacer Científico en Chiapas*, 11, 27-35.

Delabra, G.; Fragoso, H.; Bello, F.; Martínez, F.; Ortiz, M.; Ortiz, A.; Osorio, J.; Santamaría, M. y Soberanes, N. (1996). Manual de identificación de las especies de garrapatas de importancia en México. SAGAR-IICA. México. 89.

Díaz, H.D.F.; Cruz, S.Y.; Cruz, S.O.; Martín, A.D.; González, M.J.A.; Ortiz, L.E.; Fragas, Q.A.; Montano, T.L. y Silva, C.E. (2015). Desarrollo y evaluación del desempeño de una prueba rápida inmunocromatográfica para el diagnóstico de la brucelosis. *Revista de salud animal*, 37, 105-111.

Domínguez, G.D.; Rosario, C.R.; Almazán, G.C.; Saltijeral, O.J.A. y de la Fuente, J. (2010). *Boophilus microplus*: Aspectos biológicos y moleculares de la resistencia a los acaricidas y su impacto en la salud animal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12, 181-192.

Figuroa, J.V.; Chieves, L.P.; Johson, G.S. y Buening, G.M. (1993). Polymerase chain reaction-based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Veterinary Parasitology*, 50, 69-81.

Figuroa, J.V.; Kinden, D.A y Buening, G.M. (1998). Use of monoclonal antibodies for the identification of a common surface antigen of *Babesia bovis*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 849, 433-437.

Figuroa, M.J.V. y Álvarez, J.A. (2003). Investigaciones sobre la aplicación de técnicas moleculares en el diagnóstico y control de la babesiosis bovina. *Ciencia Veterinaria*, 9, 75-103.

Florin-Christensen, M.; Suarez, C.E.; Hines, S.A.; Palmer, G.H.; Brown, W.C. y McElwain T.F. (2002). The *Babesia bovis* merozoite surface antigen 2 locus contains four tandemly arranged and expressed genes encoding immunologically distinct proteins. *Infection and Immunity*, 70, 3566–3575.

Florin-Christensen, M.; Suarez, C.E.; Rodriguez, A.E.; Flores, D. y Schnittger, L. (2014). Vaccines against bovine babesiosis: where we are now and possible roads ahead. *Parasitology*, 141, 1563-1592.

Gallardo, V.J.S. y Morales, S.J. (1999). *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae): Preoviposición, oviposición, incubación de los huevos y geotropismo. *Biaogro*, 11, 77-87.

Gohil, S.; Herrmann, S.; Gunther, S. y Cooke, B.M. (2013). Bovine babesiosis in the 21st century: Advances in biology and functional genomics. *International Journal for Parasitology*, 43, 125-132.

Guswanto, A.; Allamanda, P.; Mariamah, E.S.; Sodikun, S.; Wibowo, P.E.; Indrayani, L.; Nugroho, R.S.; Wirata, I.K.; Jannah, N.; Dias, L.P.; Wirawan, H.P.; Yanto, R.; Tuvshintulga, B.; Sivakumar, T.; Yokoyama, N. y Igarashi, I. (2017). Molecular and serological detection of bovine babesiosis in Indonesia. *Parasites and Vectors*, 10, 550; doi10.1186/s13071-017-2502-0.

Hermanson, G.T. (2008). *Bioconjugate techniques*. USA. Edit. Academic Press, pp. 924-937.

Hines, S.A.; Palmer, G.H.; Jasmer, D.P.; McGuire, T.C. y McElwain, T.F. (1991). Neutralization- sensitive merozoite surface antigens of *Babesia bovis* encoded by members of a polymorphic gene family. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 55, 85-94.

Hines, S.A.; Palmer, G.H.; Jasmer, D.P.; Goff, W.L, y McElwain, T.F. (1995). Immunization of cattle with recombinant *Babesia bovis* merozoite surface antigen-1. *Infection and Immunity*, 63(1), 349-352.

Huang, X.; Xuan, X.; Hirata, H.; Yokoyama, N.; Xu, L.; Susuki, N. y Igarashi, I. (2004). Rapid immunochromatographic test using recombinant SAG-2 for detection of antibodies against *Toxoplasma gondii* in cats. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(1), 351-353.

Huang, X.; Xuan, X.; Verdida, R.A.; Zhang, S.; Yokoyama, N.; Xu, L. y Igarashi, I. (2006). Immunochromatographic test for simultaneous serodiagnosis of *Babesia*

caballi and *Babesia equi* infection in horses. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13, 553-555.

Jacob, S.S.; Prasad, S.P.; Paramanandham, K.; Puttahonnappa, S.K.; Kumar, C.J.; Renukaiah, R.G. y 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; doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109136.

Jaramillo, O.J.M.; Montenegro, V.N.; de la Fournière, S.A.; Sarmiento, N.F.; Farber, M.D. y Wilkowsky, S.E. (2018). Development of an indirect ELISA based on a recombinant chimeric protein for the detection of antibodies against bovine babesiosis. *Veterinary Sciences*, 5, 13; doi:10.3390/vetsci5010013.

Jongejan, F. y Uilenberg, G. (2004). The global importance of ticks. *Parasitology*, 129 (Suppl): S3-S14; doi:10.1017/S0031182004005967.

Kemp, L.E.; Yamamoto, Y. y Soldati, F.D. (2013). Subversion of host cellular functions by the apicomplexan parasites. *Microbiology Reviews*, 37, 607-631.

Kim, C.M.; Alhassan, A.; Verdida, R.A.; Yokoyama, N.; Xuan, Fujisaki; K., Kawasu S. y Igarashi, I. (2007). Development of two immunochromatographic tests for the serodiagnosis of bovine babesiosis. *Veterinary Parasitology*, 148, 137-143.

Kim, C.M.; Conza, B.L.B.; Alhassan, A.; Iseki, H.; Yokoyama, N.; Xuan, X. y Igarashi, I. (2008). Development of a rapid immunochromatographic test for simultaneous serodiagnosis of bovine babesiosis caused by *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 78(1), 117-121.

Koczula, K.M. y Gallotta, A. (2016). Lateral flow assays. *Essays in Biochemistry*, 60, 111-120.

Levine, N.D.; Corliss, F.E.; Cox, G.; Deroux, J.; Grain, B.M.; Honigberg, G.F.; Leedale, A.R.; Loeblich, J.; Lom, D.; Lynn, E.G.; Merinfeld, F.C.G.; Poljansky, V.; Sprague, J. y Wallace, F.G. (1980). A newly revised classification of the protozoa. *The Journal of Protozoology*, 27, 37-58.

Liao, M.; Zhang, S.; Xuan, X.; Zhang, G.; Huang, X.; Igarashi, I. y Fujusaki, K. (2005). Development of rapid immunochromatographic test with recombinant NcSAG1 for detection of antibodies to *Neospora caninum* in cattle. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(7), 885-887.

Lira, A.J.J.; Rojas, M.C.; Alvarez, M.A.; Pelaez, F.A.; Martinez, I.F.; Perez, R.D. y Figueroa, M.J. (2017). First molecular detection of *Babesia canis vogeli* in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* from Mexico. *Archives of Palliative Care*, 2(2), 1013.

Lu, Y.; Guan, G.; Jiang, T.; Li, Y.; Yang, J.; Liu, G.; Luo, J.; Yin, H. y Liu, Z. (2015). Development of an immunochromatographic strip for the serodiagnosis of *Theileria* infection in sheep. *Parasites and vectors*, 8, 621; doi:10.1186/s13071-015-1234-2.

Mahoney, D.F. y Mirre, G.B. (1971). Bovine babesiasis: estimation of infection rates in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 65(3), 309-317.

Mahoney, D.; Wright, I.; Goodger, B.; Mirre, C.; Sutherst, R. y Utech, K. (1981). Transmission of *Babesia bovis* in herds of European and Zebu x European cattle infested with the tick, *Boophilus microplus*. *Australian Veterinary Journal*, 57, 461-469.

Marcelino, I.; de Almeida, A.M.; Ventosa, M.; Pruneau, L.; Meyer, D.F.; Martinez, D.; Lefrançois, T.; Vachiéry, N. y Varela, C.A. (2012). Tick-borne diseases in cattle: Applications of proteomics to develop new generation vaccines. *Journal of Proteomics*, 75, 4232-4250.

Martínez, S.V.; Muiño, L.; Perteguer, M.J.; Gárate, T.; Mezo, M.; González, W.M., Muro, A.; Correia da Costa, J. M.; Romarís, F. y Ubeira, F. M. (2011). Development and evaluation of a new lateral flow immunoassay for serodiagnosis of human fasciolosis. *Neglected Tropical Diseases* 5(11): e1376; doi:10.1371/journal.pntd.0001376.

McCosker, P.J. (1981). Global importance of babesiosis. En: Ristic, M., Kreier, J.P. (eds). *Babesiosis*. Academic Press, New York, pp. 1-24.

Morilla, G.A. (1981). Inmunología de la babesiosis. *Ciencia Veterinaria*, 3, 240-275.

Nguyen, T.T.; Zhou, M.; Ruttayaporn, N.; Nguyen, Q.D.; Nguyenb, V.K.; Goto, Y.; Suzuki, Y.; Kawazu, S. y Inoue, N. (2014). Diagnostic value of the recombinant tandem repeat antigen TeGM6-4r for surra in water buffaloes. *Veterinary Parasitology*, 201, 18-23.

OIE. (2004). Babesiosis bovina. En: Manual de la OIE sobre animales terrestres, pp. 548-559. Disponible en: <https://www.oie.int/doc/ged/d6508.pdf> [Ultimo acceso: 07 de julio de 2020].

Ojeda, J.J.; Orozco, L.; Flores, R.; Rojas, C.; Figueroa, J.V. y Álvarez, M.J.A. (2010). Validation of an attenuated live vaccine against babesiosis in native cattle in an endemic area. *Transboundary and Emerging Diseases*, 57, 84-86.

Ojeda, C.J.J.; Espinosa, A.E.; Hernández, G.P.A.; Rojas, M.C. y Álvarez, M.J.A. (2016). Seroprevalencia de enfermedades que afectan la reproducción de bovinos para leche con énfasis en neosporosis. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 3(8), 243-249.

Pérez, J.; Pérez, J.J.; Vargas, P.; Álvarez, J.A.; Rojas, C. y Figueroa, J.V. (2010). Sequence conservation of the 12D3 gene in Mexican isolates of *Babesia bovis*. *Transboundary and Emerging Diseases*, 57, 57-60.

Pérez, R.J.J.; Vargas, U.P.; Álvarez, M.J.A.; Rojas, M.C.; González, Z.V.M. y Figueroa, M.J.V. (2012). Identificación inicial de genes en *Babesia bigemina* mediante análisis de etiquetas de secuencia expresadas en el estadio intraeritrocítico del parásito. *Revista Mexicana Ciencias Pecuarias*, 3, 61-87.

Reyes, S.R.M.; Bautista, G.C.R.; Castañeda, A.R.O.; Vargas, U.P.; Álvarez, J.A.; Rojas, C.; Mejía, E.F. y Figueroa, J.V. (2016). Babesiosis: Field assessment of protection in cattle immunized with a mixture of *Babesia bovis* recombinant proteins. *Quehacer Científico en Chiapas*, 11(2), 36-46.

Richardson, D.C.; Ciach, M.; Zhong, K.J.Y.; Crandall, I. y Kain, K.C. (2002). Evaluation of the Makromed dipstick assay versus PCR for diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in returned travelers. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 4528-4530.

Ríos, T.S. y Ríos O.L. (2011). Principales marcadores moleculares utilizados para la identificación de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*. *Revista MVZ Córdoba*, 16(2), 2470-2483.

Ristic, M. (1981). Babesiosis. En: Ristic M., McIntyre I. (eds.). Diseases of Cattle in the Tropics. Martinus Nihhoff Publishers. The Hague, Holland, pp. 443-468.

Rodríguez, V.R.I.; Grisi, L.; Pérez de León, A.A.; Silva, V.H.; Torres, A.J.F.J.; Fragoso S. H.; Romero S.D.; Cruz, R.R.; Saldierna, F. y García C.D. (2017). Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias, 8(1), 61-74.

Rojas, E.; Domínguez, P.; García, M.; Cruz, V.C.; Figueroa, J. y Ramos, J. (2004). Prevalencia e incidencia de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en un hato bovino en Axochiapan, Morelos. Avances en investigación agropecuaria, 8(2), 1-8.

Rojas, M.C.; Rodríguez, V.R.I.; Figueroa, J.V.; Bautista, G.C.R.; Castañeda, A.R.O.; Lira, A.J.J.; Vargas, U.P.; Ojeda, C.J.J. y Álvarez, J.A. (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, 190-195.

Romero, S.D.; Mira, A.; Mosqueda, J.; García, V.Z.; Hidalgo R.M.; Ortiz, V.N.A.; Pérez, L.A.A.; Florin-Christensen, M. y 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.

Sánchez, N.V.; Borgonio, C.V.; Rojas, M.C.; Pérez, R.J.J.; Álvarez, M.J.A. y Figueroa, M.J.V. (2008). *Babesia bovis*: Clonación, expresión y purificación de antígenos recombinantes MSA-1, MSA-2c y 12D3, Memorias del XXXII Congreso Nacional de Buiatría, Boca del Río, Ver. México, agosto 14-16, 2008, pp. 544-548.

Santamaria, E.R.M.; Rojas, M.C.; Martínez, G.G.; Figueroa, M.J.V.; Álvarez, M.J.A.; Lira, A.J.J. y Polanco, M.D.J. (2018). Impacto del cambio climático en la incidencia de la babesiosis bovina en México. [Consulta en línea]: Disponible en: <https://www.ganaderia.com/destacado/El-impacto-del-cambio-climatico-en-la-incidencia-de-la-babesiosis-bovina-en-Mexico> (Consultado: 05/10/2020).

Santamaria, R.M.; Lira, J.J.; Vargas, P.; Alvarez, J.A.; Rojas, C. y Figueroa, J.V. (2020). Validation of an indirect ELISA using recombinant proteins as antigen to identify animals exposed to *Babesia bigemina*. *Transboundary Emerging Diseases*, 67(S2):1-7; doi.org/10.1111/tbed.13522.

SIAP. (2018). Producción ganadera. [Consulta en línea]: Disponible en: <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-pecuaria> (Consultado: 05/03/2019).

Silva, F.A.C. y Molina, V.M. (2016) *Likelihood ratio* (razón de verosimilitud): definición y aplicación en radiología. *Revista Argentina de Radiología*, 192; doi.org/10.1016/j.rard.2016.11.002.

Smith, R.D. (1978). Ciclo biológico de *Babesia* en la garrapata. *Ciencias Veterinarias*, 2, 234-260.

Smith, T. y Kilborne, F.R. (1893). Investigation into the nature, causation, and prevention of Texas or Southern Cattle fever. Washington, DC: Bureau of Animal Industry, U.S. Departmente of Agriculture, 1893. (Bulletin, n.1) pp. 1-301.

Smits, H.L.; Eapen, C.K.; Sugathan, S.; Kurikose, M.; Gasem, H.; Yersin, C.; Sasaki, D.; Punjianto, B.; Vestering, M.; Abdoel, T. y Gussenhoven, G.C. (2001). Lateral-flow assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8(1), 166-169.

Solorio, R.J.L. y Rodríguez, V.R.I. (1997). Epidemiología de la babesiosis bovina. II. Indicadores epidemiológicos y elementos para el diseño de estrategias de control. *Revista Biomédica*, 8(2), 95-105.

Stuart, T.D.; Magdy, B.A.; El-Saber, B.G.; Komugisha, M.; Joseph, B.; Vudriko, P.; Yahia, R.; Alkazmi, L.; Hetta, H.F.; Yokoyama, N. y Igarashi, I. (2020). Assessing the immunochromatographic test strip for serological detection of bovine babesiosis in Uganda. *Microorganisms*, 8, 1110; doi:10.3390/microorganisms8081110.

Suarez, C.E.; Florin, C.M.; Hines, S.A.; Palmer, G.H.; Brown, W.C. y McElwain, T.F. (2000). Characterization of allelic variation in the *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 (MSA-1) locus and identification of a Cross-reactive inhibition-sensitive MSA-1 epitope. *Infection and Immunity*, 68(12), 6865–6870.

Terkawi, M.A.; Alhasan, H.; Huyena, N.X.; Sabagh, A.; Awier, K.; Cao, S.; Goo, Y.K.; Aboge, G.; Yokoyama, N.; Nishikawa, Y.; Kalb-Allouz, A.K.; Tabbaa, D.; Igarashi, I. y Xuan, X. (2012). Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle from central region of Syria. *Veterinary Parasitology*, 187, 307-311.

Toussaint, M. (1906). La Ranilla y el *Piroplasma bigeminum*. Comisión de Parasitología Agrícola. México, D.F. Secretaria de Fomento: pp. 5-12.

Urdaneta, F. (2009). Mejoramiento de la eficiencia productiva de los sistemas de ganadería bovina de doble propósito (*Taurus-Indicus*). *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 17, 109-120.

Wright, I.G.; Casu, R.; Commins, M.A.; Dalrymple, B.P.; Gale, K.R.; Goodger, B.V.; Riddles, P.W.; Waltisbuhl, D.J.; Abetz, I. y Berrie, D.A. (1992). The development of a recombinant *Babesia* vaccine. *Veterinary Parasitology*, 44, 3-13.

Yokoyama, N.; Okamura, M. y 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, 22-32.

Zhang, G.; Guo, J. y Wang, X. (2009). Immunochromatographic lateral flow strip tests. En: A. Rasooly, K.E. Herold (eds). *Methods in molecular biology: Biosensors and biodetection*, Vol. 504. Electrochemical and mechanical detectors, Lateral flow and ligands for biosensors. Humana Press, New York, N. Y., pp. 169-183.

13. ANEXOS

Anexo 1. Preparación de solución amortiguadora de fosfatos (PBS 1X)

1. Disolver en 700 mL de agua destilada

Reactivo	Cantidad (g)
NaCl	4.0
KCl	0.10
Na ₂ HPO ₄	0.72
KH ₂ PO ₄	0.12

2. Ajustar el pH a 7.2, aforar a 1000 mL con agua destilada.
3. Mantener a 4-8°C.

Anexo 2. Preparación de solución de lisis para solubilización de proteínas

1. Disolver en 60 mL de agua destilada

Reactivo	Cantidad (g)
Tris base	0.60
NaCl	1.75
ZnCl ₂	0.70
2-mercaptoetanol	0.63 (mL)
Sarcosyl	3.0

2. Aforar a 100 mL con agua destilada.
3. Mantener a temperatura ambiente.
4. Agregar a la solución de lisis hasta el momento de uso 2.5 µL/mL ARNasa, 15 µL/mL ADNasa, 10 µL/mL inhibidor de proteasas.

Anexo 3. Purificación del antígeno recombinante con el protocolo ProBond™ Purification System

A. Preparación de la columna

1. Resuspender la resina invirtiendo el bote gentilmente.
2. Agregar 2 mL de la resina dentro de la una columna de purificación de 10 mL. Permitir que la resina se sedimente completamente por gravedad (5-10 minutos) o sedimentar mediante centrifugación a baja velocidad (800 x g 1 minuto). Aspirar suavemente y desechar sobrenadante.
3. Agregar 6 mL de agua destilada estéril y resuspender la resina invirtiendo y golpeando suavemente la columna.
4. Permitir que la resina se sedimente completamente mediante gravedad o centrifugación como se describe en el paso 2. Aspirar suavemente y desechar sobrenadante.
5. Agregar 6 mL de la solución de unión (para condiciones nativas).
6. Resuspender la resina invirtiendo y golpeando suavemente la columna.
7. Permitir que la resina se sedimente completamente mediante gravedad o centrifugación como se describe en el paso 2. Aspirar suavemente y desechar sobrenadante.
8. Repetir los pasos del 5 al 7.

B. Purificación del antígeno recombinante bajo condiciones nativas

1. Agregar 8 mL del sobrenadante de la lisis a la columna de purificación preparada para condiciones nativas.
2. Permitir la unión durante 30-60 minutos usando agitación suave para mantener la resina suspendida en el sobrenadante de la lisis.

3. Dejar sedimentar la resina mediante gravedad o centrifugación a baja velocidad ($800 \times g$ 1 minuto), y aspirar cuidadosamente el sobrenadante. Guardar el sobrenadante a 4-8°C para su análisis por SDS-PAGE.
4. Agregar 8 mL de la solución de lavado. Dejar sedimentar la resina mediante gravedad o centrifugación a baja velocidad ($800 \times g$ 1 minuto), y aspirar cuidadosamente el sobrenadante. Guardar el sobrenadante a 4-8°C para su análisis por SDS-PAGE.
5. Repetir el paso 4 tres veces más.
6. Sujetar la columna en posición vertical y retirar la tapa del inferior de la columna. Eluir la proteína agregando 8-12 mL de la solución de elución. Colectar fracciones de 1 mL para su análisis por SDS-PAGE.

Anexo 4. Preparación de solución amortiguadora de recubrimiento

1. Disolver el contenido de una capsula (C3041, Sigma-Aldrich) en 100 mL de agua destilada. El contenido de una capsula produce una solución amortiguadora de carbonato-bicarbonato 0.05 M, pH 9.6 a 25°C.
2. Mantener a 4-8°C.

Anexo 5. Preparación de solución de lavado (PBS-Tween 20 0.1%)

1. Disolver 1 mL de Tween 20 en 1000 mL de PBS 1X mediante agitación lenta.
2. Mantener a 4-8°C.

Anexo 6. Preparación de solución bloqueo

1. Disolver 5 mL de leche evaporada en 100 mL de PBS-Tween 20 0.1%.
2. Mantener a 4-8°C.

Anexo 7. Preparación de solución de corrimiento

1. Agregar a 100 mL de PBS 1X pH 7.6

Reactivo	Cantidad
BSA	1.67 gr
Tween 20	3.0 mL

2. Disolver en agitación lenta.
3. Mantener a 4-8°C.

Anexo 8. Resultados obtenidos de las pruebas ELISA, IFI e ICT para la detección de anticuerpos contra *B. bovis* en sueros negativos de referencia

ID Suero	Resultados del análisis de los sueros		
	ELISA	IFI	ICT
1	-	-	+
2	-	+	-
3	+	+	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	-
7	+	-	-
8	+	-	-
9	-	-	-
10	-	-	-
11	-	-	-
12	-	-	-
13	-	-	-
14	-	+	-
15	-	-	-
16	-	-	+
17	-	-	+
18	-	+	-
19	-	+	-
20	-	-	+
21	+	+	-
22	-	-	-
23	-	-	-
24	-	+	-
25	-	-	-
26	-	-	-
27	-	+	+
28	+	-	-
29	+	-	-
30	-	-	-

Anexo 9. Resultados obtenidos de las pruebas ELISA, IFI e ICT para la detección de anticuerpos contra *B. bovis* en sueros positivos de referencia

ID Suero	Resultados del análisis de los sueros por:		
	ELISA	IFI	ICT
1	+	+	+
2	+	+	+
3	+	+	+
4	+	+	+
5	+	+	+
6	+	+	+
7	-	-	+
8	+	+	+
9	+	+	+
10	+	+	+
11	+	+	-
12	+	+	+
13	+	+	+
14	+	+	+
15	+	+	+
16	+	+	+
17	-	+	+
18	+	+	+
19	+	-	+
20	-	+	+
21	+	-	-
22	+	+	-
23	+	+	+
24	+	+	+
25	+	+	+
26	+	+	+
27	+	+	+
28	-	+	+
29	+	+	+
30	+	+	+

Anexo 10. Resultados obtenidos de las pruebas ELISA, IFI e ICT para la detección de anticuerpos contra *B. bovis* en sueros de bovinos del Sitio Experimental Pichucalco

ID Suero	Resultados del análisis de los sueros por:		
	ELISA	IFI	ICT
1	+	+	+
2	+	+	+
3	+	+	+
4	+	+	+
5	+	+	+
6	+	+	+
7	+	+	+
8	+	+	+
9	+	+	+
10	+	+	+
11	+	+	+
12	+	+	+
13	+	-	+
14	+	+	+
15	+	+	+
16	+	+	+
17	+	+	+
18	+	+	+
19	+	+	+
20	+	+	+
21	+	+	+
22	+	+	+
23	+	+	+
24	+	+	+
25	+	+	+
26	+	+	+
27	+	+	-
28	+	+	+
29	+	+	+
30	+	+	+

	Resultados del análisis de los sueros por:		
ID Suero	ELISA	IFI	ICT
31	+	+	+
32	+	+	+
33	+	+	+
34	+	+	+
35	+	+	+
36	+	+	+
37	+	+	+
38	-	+	+
39	+	+	+
40	-	+	+
41	+	+	+
42	-	-	+
43	+	+	+
44	+	+	+
45	+	+	+
46	-	+	+
47	+	+	+
48	-	+	+
49	+	+	+
50	+	+	+
51	-	+	-
52	+	+	+
53	+	+	+
54	+	+	+
55	+	+	+
56	+	+	+
57	+	+	+
58	+	+	+
59	+	+	+
60	+	+	+

ID Suero	Resultados del análisis de los sueros por:		
	ELISA	IFI	ICT
61	+	+	+
62	+	+	+
63	+	+	+
64	+	+	+
65	+	+	+
66	+	+	+
67	+	+	+
68	+	+	+
69	+	+	+
70	-	+	+
71	+	+	+
72	+	-	+

Anexo 11. Informe impreso de las muestras observadas para IFI con el programa de computación estadística disponible en línea VassarStats (<http://vassarstats.net/>)

Valores ingresados:

	Condition		Totals
	Absent	Present	
Test Positive	8	27	35
Test Negative	22	3	25
Totals	30	30	60

	Estimated Value	95% Confidence Interval	
		Lower Limit	Upper Limit
Prevalence	0.5	0.369535	0.630465
Sensitivity	0.9	0.723237	0.973812
Specificity	0.733333	0.538273	0.870245
For any particular test result, the probability that it will be:			
Positive	0.583333	0.449141	0.706848
Negative	0.416667	0.293152	0.550859
For any particular positive test result, the probability that it is:			
True Positive	0.771429	0.59448	0.889556
False Positive	0.228571	0.110444	0.40552
For any particular negative test result, the probability that it is:			
True Negative	0.88	0.676643	0.968484
False Negative	0.12	0.031516	0.323357
likelihood Ratios: [C] = conventional [W] = weighted by prevalence			
Positive [C]	3.375	1.842491	6.182186
Negative [C]	0.136364	0.045516	0.408543
Positive [W]	3.375	1.788927	6.367296
Negative [W]	0.136364	0.046671	0.398431

Anexo 12. Informe impreso de las muestras observadas para la ICT con el programa de computación estadística disponible en línea VassarStats (<http://vassarstats.net/>)

Valores ingresados:

	Condition		Totals
	Absent	Present	
Test Positive	5	27	32
Test Negative	25	3	28
Totals	30	30	60

	Estimated Value	95% Confidence Interval	
		Lower Limit	Upper Limit
Prevalence	0.5	0.369535	0.630465
Sensitivity	0.9	0.723237	0.973812
Specificity	0.833333	0.64549	0.936964
For any particular test result, the probability that it will be:			
Positive	0.533333	0.40099	0.661408
Negative	0.466667	0.338592	0.59901
For any particular positive test result, the probability that it is:			
True Positive	0.84375	0.664536	0.941008
False Positive	0.15625	0.058992	0.335464
For any particular negative test result, the probability that it is:			
True Negative	0.892857	0.7063	0.971912
False Negative	0.107143	0.028088	0.2937
likelihood Ratios: [C] = conventional [W] = weighted by prevalence			
Positive [C]	5.4	2.404656	12.126474
Negative [C]	0.12	0.040484	0.355695
Positive [W]	5.4	2.381128	12.246299
Negative [W]	0.12	0.040848	0.352531

Anexo 13. Informe impreso de las muestras observadas para el ELISA con el programa de computación estadística disponible en línea VassarStats (<http://vassarstats.net/>)

Valores ingresados:

	Condition		Totals
	Absent	Present	
Test Positive	6	26	32
Test Negative	24	4	28
Totals	30	30	60

	Estimated Value	95% Confidence Interval	
		Lower Limit	Upper Limit
Prevalence	0.5	0.369535	0.630465
Sensitivity	0.866667	0.683577	0.956403
Specificity	0.8	0.608693	0.915952
For any particular test result, the probability that it will be:			
Positive	0.533333	0.40099	0.661408
Negative	0.466667	0.338592	0.59901
For any particular positive test result, the probability that it is:			
True Positive	0.8125	0.629554	0.921378
False Positive	0.1875	0.078622	0.370446
For any particular negative test result, the probability that it is:			
True Negative	0.857143	0.664382	0.953218
False Negative	0.142857	0.046782	0.335618
likelihood Ratios: [C] = conventional [W] = weighted by prevalence			
Positive [C]	4.333333	2.089715	8.985808
Negative [C]	0.166667	0.065848	0.421846
Positive [W]	4.333333	2.067077	9.084217
Negative [W]	0.166667	0.06649	0.417777