CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA
SUBDIRECCION GENERAL ADJUNTA DE ENSEÑANZA
PROGRAMA DE POSGRADO

COMPARACION DE CUATRO METODOS PARA EL DIAGNOSTICO DE INFECCIONES CON *Babesia bovis* EN SANGRE BOVINA.

Tesis sometida a la consideración del Comité Técnico Académico del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, para optar al grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

por

JOSE EDUARDO CALZADA LOMBANA

Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza
Turrialba, Costa Rica
1992

Esta tesis ha sido aceptada, en su presente forma, por la Coordinación del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales Renovables del CATIE y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar al grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

COMITE ASESOR:

Gustavo Morales, Ph. D.
Profesor Consejero

Pedro Ferreira, Ph. D.
Miembro del Comité

Ramón Lastra, Ph. D.
Miembro del Comité

C. A. Carson, Ph. D.
Miembro del Comité

Ramón Lastra, Ph. D.
Coordinador Programa Maestría

José Eduardo Calzada Lombana
Candidato

DEDICATORIA

A mis padres, Lilia y José María, por su cariño y constante estímulo para mi superación personal.

A mis hermanas Nuria y Tatiana

AGRADECIMIENTOS

El autor desea expresar su sincero agradecimiento a las siguientes personas:

Al Dr. Gustavo Morales, Consejero Principal, por su desinteresada orientación y constante apoyo en la realización de la presente tesis; pero sobre todo por sus enseñanzas y amistad.

Al Dr. C.A. Carson por la oportunidad y orientación ofrecida durante mis estudios.

A los profesores del Area de Ganadería Tropical por compartir sus conocimientos y amistad.

A Nelly Vásquez y Craig Bailey por su invaluable colaboración en la ejecución de la tesis.

A los Drs. Ramón Lastra y Pedro Ferreira por su valiosa colaboración y apoyo.

A mis compañeros de Ganadería: Camero, Corado, Chema, Alfonso, Oscar, Carlos, Julio y René.

A todos mis amigos y compañeros en especial a Marta, Helga, Shuichi, Pocasangre, Gabriel, Rosa María, Cartín y Beatriz.

Al personal de Postgrado y de la Biblioteca Conmemorativa Orton.

TABLA DE CONTENIDO

Página

1. INTRODUCCION 1
2. REVISION DE LITERATURA 4
2.1 GENERALIDADES DE LA BABESIOSIS 4
2.2. DIAGNOSTICO DE LA BABESIOSIS BOVINA 7
2.2.1. Serología 9
2.2.2. Hibridación de Acidos Nucléicos 15
2.3. INMUNOLOGIA 20
2.3.1. Resistencia no específica 21
2.3.2. Resistencia Específica 23
2.4. El Ganado Criollo 25
3. MATERIALES Y METODOS 27
3.1. LOCALIZACION 27
3.2. TIPO Y NUMERO DE ANIMALES 28
3.3. PROCEDIMIENTO DE CAMPO 28
3.4. PROCEDIMIENTO DE LABORATORIO 29
3.4.1. Obtención de suero 29
3.4.2. Elaboración de frotis sanguíneos 29
3.4.3. Procesamiento de sangre completa para prueba de hibridación 30
3.5. TECNICAS DIAGNOSTICAS 31
3.5.1. Examen de frotis sanguíneos 31
3.5.2. Prueba de aglutinación en tarjeta para B. bovis. .. 31
3.5.3. Prueba de aglutinación en tarjeta para anaplasmosis 32
3.5.4. Prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para B. bovis 33
3.5.5. Prueba de ELISA para el diagnóstico de B. bovis ... 36
3.5.6. Hibridación no radiactiva de ADN de B. bovis 38
3.5.6.1. Extracción de ADN 38
3.5.6.2. Características de la sonda de diagnóstico "BoV" 40
3.5.6.3. Procedimiento "Dot-Blot" 41
3.5.6.4. Hibridación y detección no radiactiva 41

3.6. COMPARACION ENTRE PRUEBAS DIAGNOSTICAS .....-42
4. RESULTADOS Y DISCUSION 43
4.1. FROTIS SANGUINEOS 43
4.2. PRUEBA DE AGLUTINACION EN TARJETA PARA B. bOVIS (PAT) 49
4.3. PRUEBA DE ELISA PARA EL DIAGNOSTICO DE B. bOVIS 52
4.4. PRUEBA DE INMUNOFLURESCENCIA INDIRECTA (IFI) 52
4.5. PRUEBA DE HIBRIDACION DE ADN 57
4.6. PRUEBA DE AGLUTINACION EN TARJETA PARA ANAPLASMOSIS . 65
4.7. COMPARACION ENTRE PRUEBAS DIAGNOSTICAS PARA B. bOVIS 67
5. CONCLUSIONES 80
6. RECOMENDACIONES 81
7. BIBLIOGRAFIA 82
8. ANEXO 90

LISTA DE FIGURAS

Página

1. Glóbulos rojos infectados obtenidos de cultivos *in vitro* de *Babesia bovis*. Parasitema aproximada de 10%. Tinción Giemsa (100X) 35

2. Reacción positiva a *B.bovis* con la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI). (40X). 35

3. Concentración de merozoitos de *B. bovis*. Frotis delgado coloreado con Giemsa (100X). 37

4. Procedimiento para extracción de ADN de *B. bovis* ... 39

5. Parásito de *B.bovis* en el interior del glóbulo rojo. Tinción Giemsa (100X) 44

6. Parásito de *B. bigemina* dentro de los glóbulos rojos. Tinción Giemsa (100X) 44

7. Corpúsculos puntiformes de *A. marginale* localizados en la periferia de los glóbulos rojos 45

8. Tendencia en la seroprevalencia observada por grupos de edad según la prueba de aglutinación en tarjeta (PAT) para *Babesia bovis* 51

9. Tablero de titulaciones con la prueba ELISA para *B.bovis*. Las columnas corresponden a diluciones crecientes de antígeno, las filas a diluciones dobles de suero control positivo (1:40-1:1280). Las dos últimas filas contienen sueros controles negativos 53

10. Frecuencia de títulos séricos para *Babesia bovis* según la prueba de inmunofluoresciencia indirecta (IFI) 56

11. Tendencia en la seroprevalencia observada por grupos de edad según la prueba de inmunofluoresciencia indirecta (IFI) para *B. bovis* 51

12. Sensibilidad de la sonda diagnóstica "BoV" marcada con ^{32}P. Las columnas corresponden a concentraciones de ADN de *B. bovis*: a(100 ng), b(10 ng), c(1 ng), d(100 pg) 58

13. Sensibilidad y especificidad de la sonda diagnostica "BoV" marcada radiactivamente. Las filas 1 y 11 corresponden a las cepas KBb y Ka de *B. bovis*, respectivamente. Las columnas representan diferentes niveles de parasitemia: (a(1%), b(0.1%), c(0.01%), d(0.001%), e(0.0001%), f(control negativo). En las filas 111 y 1V se evaluó por duplicado la especificidad de la sonda "BoV". Las columnas a, b, c y d corresponden a un microgramo de ADN de *B. bovis*, *A. marginale*, *B. bigemia* y glóbulos blancos, respectivamente 59

14. "Dot-blot" con diferentes cepas de *B. bovis*, utizando la sonda diagnóstica "BoV" marcada radiactivamente. Cada muestra contiene aproximadamente 1 microgramo de ADN.

Foto cortesía del Dr. C.A. Carson, Director del Laboratorio de Microbiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Missouri-Columbia 61

15. Sensibilidad de la sonda diagnóstica "BoV" marcada con biotina. Las filas 1 y 11 corresponden a ADN purificado de *B. bovis*. Las columnas representan concentraciones seriadas de ADN: a(100 ng), b(10 ng), c(1 ng) 64

16. Hibridación no radiactiva con las muestras de los animales evaluados. La flecha indica la positividad del control positivo utilizado 64

LISTA DE CUADROS

Página

1. Resultados de frotis sanguineos (animales < 1 año) .. 46

2. Resultados de frotis sanguineos (animales entre uno y dos años 47

3. Resultados de frotis sanguineos (animales > 2 años) . 48

4. Resultados de prueba de aglutinación en tarjeta para *B. bovis* 50

5. Resultados de prueba de aglutinación en tarjeta para *Anaplasma marginale* 55

6. Resultados prueba de inmunofluorescencia indirecta para *B. bovis* 66

7. Resultados del diagnóstico para *B. bovis* (animales < 1 año) 69

8. Resultados del diagnóstico para *B.bovis* (animales 1-2 años) 70

9. Resultados del diagnóstico para *B. bovis* (animales > 2 años) 71

10. Resumen de los resultados obtenidos con la prueba de IFI para *B. bovis* 72

11. Resumen de los resultados obtenidos con la prueba de PAT para *B. bovis* 72

12. Resumen de los resultados obtenidos con frotis sanguíneos para *B. bovis* 72

13. Concordancia entre las pruebas de IFI y PAT para el diagnóstico de *B. bovis* 77

14. Concordancia entre las pruebas de PAT y frotis sanguíneos para el diagnóstico de *B. bovis* 77

15. Concordancia entre las pruebas de IFI y frotis sanguíneos para el diagnóstico de *B. bovis* 78

ANEXO

1A. Tabla 2x2 e índices de concordancia utilizados para comparar pruebas diagnósticas 90

CALZADA LOMBANA, J.E. 1992. Comparación de cuatro métodos para el diagnóstico de infecciones con *Babesia bovis* en sangre bovina. Tesis Mag. Sc. Turrialba, C.R., CATIE.

Palabras claves: Sensibilidad, Especificidad, Frotis sanguíneos, Inmunofluorescencia, Aglutinación, Sondas de ADN, *Babesia*.

RESUMEN

El propósito del presente estudio fue comparar cuatro métodos para el diagnóstico de infecciones con *Babesia bovis*: frotis sanguíneos coloreados con Giemsa, prueba de aglutinación en tarjeta (PAT), prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y sondas no radiactivas de ADN. Para la evaluación se muestrearon 45 animales de la raza Criollo-Romosinuano en la Finca Experimental del CATIE, localizada en Turrialba, Costa Rica. Los animales se seleccionaron aleatoriamente, distribuyéndose equitativamente en tres grupos etários (0-1 año; 1-2 años y > 2 años).

Los resultados obtenidos demuestran que la prueba de IFI detectó el mayor número de animales positivos (84.4%). Con la PAT y los frotis sanguíneos se obtuvieron tasas de positividad de 40 y 13.3%, respectivamente. La sonda no radiactiva marcada con biotina, no detectó infecciones por *B. bovis* en las muestras de campo analizadas; con ésta se había obtenido una sensibilidad de 10 ng de ADN de *B. bovis* bajo condiciones experimentales, contra 100 pg detectados con la sonda diagnóstica radiactiva.

Las técnicas diagnósticas fueron comparadas en tablas de 2x2 y se midieron los siguientes parámetros: concordancia observada, índices de Kappa, índice de Phi y Prueba Exacta de Fisher. En las comparaciones también se consideraron otros criterios tales como la complejidad y el costo de las pruebas.

Se concluye que la PAT es adecuada bajo condiciones de campo en medios tropicales, para conducir estudios preliminares epidemiológicos sobre babesiosis en zonas ganaderas. Para estudios más profundos se recomiendan pruebas de mayor sensibilidad o el uso de varias de ellas simultáneamente.

Los frotis sanguíneos siguen siendo útiles para diferenciar, aunque subjetivamente, entre infecciones por *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale*. Las sondas no radiactivas requieren de más trabajo experimental, para que sean útiles bajo condiciones en que no se pueda manejar material

radiactivo, como es el caso en la mayoría de paises en vías de desarrollo industrial

Según los resultados obtenidos, la infección con *B. bovis* se encuentran ampliamente distribuidas en el ganado criollo-Romosinuano de la Finca Experimental del CATIE, en Turrialba, Costa Rica.

CALZADA LOMBANA, J.E. 1992. Comparison of four methods for diagnosis of *Babesia bovis* infections in bovine blood. M.Sc. Thesis. Turrialba, C.R. CATIE.

Key Words: Sensitivity, Specificity, Blood Smears, Immunofluresecence, Agglutination, DNA Probes, *Babesia*.

SUMMARY

The purpose of the present study was to compare four methods for the diagnosis of *Babesia bovis* infections: Giemsa stained blood smears, card agglutination test (CAT), indirect fluorescent antibody test (IFA) and non-radioactive probes. For the evaluation, 45 samples were obtained from the Romosinuano Criollo herd thriving in CATIE's Experimental Farm, located in Turrialba, Costa Rica. The animals were randomly selected and equitably divided in three age groups (0-1 year, 1-2 years and > 2 years).

Results of the comparative evaluation showed that the IFI test detected the highest number of positive animals (84.4%). With CAT and the Giemsa stained blood smears, rates of 40 and 13.3% were obtained, respectively. The biotin-labeled diagnostic probe did not detected *B. bovis* infections in the field samples evaluated, although experimentally it had shown a sentivity of 10 ng with DNA of *B. bovis*, against 100 pg detected with the radiolabeled diagnostic probe.

The diagnostic methods were compared in 2x2 tables and the following parameters were measured: Observed agreement, Kappa Index, Phi Index and Fisher Exact Test. The comparisons of methods also included criteria such as complexity and practicability.

It was concluded, that the CAT is adequate for preliminary epidemiology studies on babesiosis in cattle raising areas. For detailed studies a more sensitive method or the use of several tests simultaneously is recommended.

Although subjectively, blood smears are still useful to differentiate between *B. bovis*, *B. bigemina* and *A. marginale* infections. Non-radioactive probes need more experimental work in order to be useful for most of the developing countries, where the management of radioactive materials is not possible.

The results obtained with the diagnostic methods demonstrated that infection with *B. bovis* is widely distributed in the Criollo-Romosinuano herd thriving in CATIE's Experimental Farm

1. INTRODUCCION

El impacto económico causado por el complejo de enfermedades hemotrópicas (babesiosis-anaplasmosis), limitan considerablemente el desarrolllo de la industria ganadera en latinoamérica. Las pérdidas causadas por este grupo de enfermedades se deben principalmente, a reducciones en la producción de leche y en la ganancia de peso. Adicionalmente, debe considerarse la alta mortalidad que ocurre en ganado importado suceptible y en aquellos animales mantenidos bajo condiciones de confinamiento estricto. Se estima que alrededor del 50% de las ganaderías en latinoamérica se encuentran en zonas de alto riesgo para contraer estas enfermedades (Vega y Murguia, 1990).

La babesiosis bovina forma parte del complejo de enfemedades hemoparasitarias. Esta enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en latinoamérica, coincidiendo la distribución con la presencia de garrapatas del género *Boophilus*, sus vectores naturales.

Dentro de los esfuerzos realizados para el control de la babesiosis, la detección de infecciones subclínicas en animales que actúan como portadores, es de vital importancia (Rodriguez *et al.*, 1988). Estos animales portadores presentan un riesgo constante para hatos de animales susceptibles.

Usualmente, el diagnóstico de esta enfermedad se ha basado en la observación del parásito en frotis sanguíneos teñidos. Sin embargo, las parasitemias en infecciones crónicas o subclínicas generalmente, son bajas para ser diagnosticadas confiablemente por este método. Las pruebas serológicas presentan numerosas ventajas sobre el diagnóstico basado en frotis sanguíneos, debido a que los anticuerpos están presentes en la sangre por un periodo extenso que incluye la fase aguda y crónica de la enfermedad. No obstante, las pruebas serológicas descritas para el diagnóstico de babesiosis, no alcanzan un nivel de sensibilidad suficiente para detectar consistentemente animales portadores. Además, carecen de la especificidad necesaria para eliminar reacciones cruzadas entre especies de *Babesia* relacionadas antigénicamente (Kuttler, 1981).

Los problemas de especificidad son de gran interés para aquellos paises donde las infecciones mixtas de hemoparásitos son comunes, principalmente las infecciones por diferentes especies de *Babesia*. Existen diferencias en la patogenicidad, epidemiología y el tratamiento para cada parásito, por lo tanto, es necesario lograr un diagnóstico etiológico preciso (Goff *et al.*, 1990).

Técnicas recientes biotecnológicas basadas en la utilización de anticuerpos monoclonales y en sondas de ácidos nucléicos tienen el potencial de mejorar notablemente el diagnóstico de la babesiosis. Si bien a nivel experimental se

han obtenido resultados alentadores en cuanto a sensibilidad y especificidad se refiere, todavía estas pruebas deben ser validadas a nivel de campo, evaluando la bondad para detectar portadores crónicos en áreas enzoóticas.

El presente estudio pretende realizar una comparación inicial de varias de las pruebas diagnósticas anteriormnete descritas. Para este propósito se plantearon los siguientes objetivos:

- Mediante pruebas de concordancia, comparar las siguientes técnicas diagnósticas para *B. bovis*: A) Frotis sanguíneos, B) Inmunofluorescencia indirecta, C) Aglutinación en tarjeta, D) Sondas no radioactivas de ADN

- Con base en la interpretación de los resultados obtenidos, establecer recomendaciones prácticas para la instrumentación de estudios epidemiológicos sobre babesiosis el el Istmo Centroamericano.

- Complementariamente se pretende evaluar la prevalencia aparente de la anaplasmois mediante las técnicas de frotis sanguíneos y aglutinación en tarjeta.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 GENERALIDADES DE LA BABESIOSIS

La babesiosis es una enfermedad infecciosa causada por un protozoario intraeritrocitico del género *Babesia*. La presentación clínica de la babesiosis se caracteriza por fiebre y hemólisis intravascular, que causan un síndrome de anemia, ictericia, hemoglobinemia y hemoglobinuria. La enfermedad puede presentarse en la mayoría de las especies domésticas; sin embargo, desde el punto de vista económico, la babesiosis bovina es la que posee mayor importancia. Las pérdidas económicas causadas por esta enfermedad, son debidas principalmente a la mortalidad y a periodos de convalecencia prolongados, que disminuyen considerablemente la producción de leche y carne. Adicionalmente, se debe considerar los costos ocasionados por inmunización y tratamientos.

De acuerdo a Hoyte (1976), se han identificado cuatro especies de *Babesia* en el ganado bovino:

- ***Babesia bovis***
- ***Babesia bigemina***
- ***Babesia divergens***
- ***Babesia major***

La *Babesia bovis* y la *B. bigemina* tienen una mayor distribución en las zonas tropicales y subtropicales,

considerándose a la *B. bovis* regularmente como la más patógena y la que mayores pérdidas causa en algunos países latinoamericanos (Corrier *et al.*, 1978). Esta distribución en trópicos y subtrópicos, coincide con la presencia de sus vectores naturales, las garrapatas de un solo huésped, del género *Boophilus*.

Las garrapatas adultas adquieren la infección al ingerir el parásito presente en la sangre de ganado infectado. Dentro del vector, la *Babesia* se multiplica en varios órganos, ocurriendo el ciclo final en las glándulas salivares. La transmisión ocurre, cuando los estadios infectivos de la garrapata inoculan la saliva parasitada al ganado. Según Mahoney y Mirre (1979), una característica particular de la *B. bovis*, es que su transmisión se realiza exclusivamente por las larvas de *B. microplus*. Una vez ocurrida la transmisión, las larvas pierden la infectividad. En el ciclo de la *Babesia* existe transmisión transovárica; sin embargo, en el caso de *B.bovis*, el parásito no persiste más allá de la etapa larvaria.

Dentro de los glóbulos rojos la *Babesia* toma formas variadas. La *B. bovis* presenta formas redondas, piriformes, o irregulares. El ángulo de divergencia de las formas pareadas es obtuso y la posición en el eritrocito es regularmente central. Sus medidas son aproximadamente, 1.5 x 2.4 micras.

La *B. bigemina* generalmente es de mayor tamaño, presentando una longitud mayor al radio del eritrocito. En los glóbulos rojos se observan parásitos redondos, ovales, ameboides o piriformes. De estos, los más característicos son los parástos piriformes separados por ángulos agudos.

Las condiciones tropicales del Istmo centroamericano, son adecuadas para el desarrollo de los vectores de estas enfermedades hemotrópicas. Por consiguiente, es fundamental definir la prevalencia y la situación de éstas, antes de aplicar medidas de control o establecer proyectos ganaderos en áreas endémicas.

Las zonas donde existen infecciones por *Babesia* han sido clasificadas, desde el punto de vista epidemiológico, en dos grupos. Las zonas **enzoóticas estables** se caracterizan por una población relativamente estable de garrapatas, con una tasa de inoculación adecuada que asegura la infección bovina durante los primeros meses de edad. Durante este período, los terneros se encuentran protegidos por anticuerpos maternos y desarrollan un estado de premunición. Los casos clínicos en estas zonas son escasos. En **zonas marginales**, por el contrario, el número de garrapatas y la tasa de inoculación es variable. Bajo estas condiciones, algunos animales no llegan a infectarse durante los primeros meses de edad, llegando susceptibles a la vida adulta, presentándose epidemias caracterizadas por la forma clínica de la enfermedad (Mahoney, 1972).

2.2. DIAGNOSTICO DE LA BABESIOSIS BOVINA

El diagnóstico presuntivo de babesiosis bovina se basa en la sintomatología, historia clínica del hato y en la presencia de vectores biológicos. Las pruebas de laboratorio son utilizadas para confirmar el diagnóstico y caracterizar el agente causal (Kuttler, 1981).

Actualmente, existen varias técnicas para diagnosticar la babesiosis bovina, la elección de las cuales depende principalmente del tipo de información que se persiga. Las infecciones agudas se diagnostican preferiblemente, mediante la detección del parásito en frotis sanguíneos coloreados (Trueblood, 1990). En el caso de estudios epidemiológicos, en donde se consideran factores tales como el número de animales a muestrear y el costo-beneficio de la investigación, la sencillez o eficacia de la prueba es de vital importancia.

Los frotis sanguíneos delgados y gruesos son coloreados con Wright-Giemsa para el diagnóstico de la enfermedad (Mahoney y Saal, 1961). Los frotis delgados se preparan de sangre periférica o de visceras (Mahoney, 1975). Los frotis gruesos son obtenidos también de sangre periférica, aumentando así las probabilidades de encontrar parásitos (Hoyte, 1971).

Las infecciones agudas por *Babesia bovis*, se caracterizan por un número significativo de parásitos que obstruyen los capilares cerebrales, observandose en ocasiones sintomatología nerviosa (Callow & Johson 1963; Hoyte, 1971; Ajayi, 1978; Callow & McGavin, 1963). En estos casos, las improntas de cerebro son útiles para el diagnóstico diferencial entre *B. bovis* y *B. bigemina* (Figueróa, 1990).

En hatos de zonas enzoóticas expuestos continuamente a la enfermedad, la prevalencia detectada mediante frotis sanguineos varía en relación con la edad. Esta va desde cero al momento del nacimiento, alcanzando el máximo entre uno y dos años, para luego declinar a medida que los animales envejecen (Mahoney 1969).

Figueroa (1989) opina que debido al pleomorfismo que presenta la *Babesia* en eritrocitos de bovinos infectados, es dificil determinar con exactitud la especie involucrada en la infección, basándose únicamente en la morfología observada al microscopio de luz.

En general, la identificación de parásitos de *Babesia* en frotis sanguineos, es evidencia inequivoca de infección. Sin embargo, se debe tener en cuenta que las infecciones recientes o crónicas, no expresan un nivel adecuado de parasitemia para ser detectadas confiablemente mediante esta prueba (Todorovic y Carson, 1981; Kuttler, 1981). Además, el examen microscópico de muestras sanguíneas es tedioso y

requiere de personal experimentado para detectar parasitemias bajas. A pesar de esto, su uso es todavía el más común en la mayoría de zonas ganaderas de Centroamérica y de Latinoamérica en general.

Las deficiencias diagnósticas en la práctica, mediante la utilización de frotis sanguineos, hacen necesario el uso de otras alternativas diagnósticas capaces de diferenciar entre especies de *Babesia* y de detectar casos subclínicos, de gran importancia estos últimos en estudios epidemiológicos. Para estos estudios se requiere de métodos capaces de detectar animales portadores, con parasitemias inferiores a las requeridas para un diagnóstico basado sólo en frotis sanguineos.

2.2.1. Serología

Las pruebas serológicas han sido ampliamente utilizadas para determinar prevalencias de hemoparásitos en regiones tropicales. Mahoney (1962), desarrolló una prueba de fijación de complemento (FC) para el diagnóstico de *B. bovis* y *B. bigemina*. Esta prueba se basó en la utilización de antigenos crudos, preparados a partir de eritrocitos infectados lisados con agua destilada. Los resultados obtenidos al evaluar esta técnica, revelaron una sensibilidad limitada. Para infecciones con *B. bovis*, la técnica fue capaz de detectar portadores durante los primeros siete meses posinfección experimental; sin embargo, a los 12 meses sólo logró detectar

un 50% de los animales infectados. El estado de portadores se confirmó, mediante inoculaciones de sangre sospechosa en terneros esplenectomizados susceptibles (Mahoney, 1964).

Ross y Löhr (1968), describieron una prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para el diagnóstico de *B. bigemina* en bovinos. Como fuente de antígeno se utilizaron frotis delgados de eritrocitos infectados. Los investigadores encontraron una alta especificidad y sensibilidad, con títulos de anticuerpos detectados 24 meses posinfección. Se entiende por sensibilidad, la habilidad de una prueba para detectar respuestas inmunológicas mínimas. La especificidad se refiere a la capacidad de la prueba para detectar anticuerpos específicos contra un antígeno y no contra otro (Morilla y Bautista, 1986).

Esta técnica también fue utilizada para detectar anticuerpos contra *B. bovis* (Johnston et al, 1973). Los autores concluyeron, que la prueba es altamente confiable para detectar animales infectados. Sin embargo, se presentaron algunas reacciones cruzadas entre ambas especies de *Babesia*.

Estudios comparativos han demostrado, que la FC es menos sensible que la IFI para detectar infecciones crónicas por babesiosis bovina (Johnston *et al*, 1969; Kuttler *et al*, 1977).

Actualmente, la IFI es considerada una de las técnicas más sensibles para el diagnóstico de la enfermedad. Sin embargo, utilizando esta técnica, se ha observado cierta tendencia a reacciones cruzadas entre especies de *Babesia* y *Plasmodium* según Ludford *et al*, (1972) y entre diferentes especies de *Babesia*, al trabajar con diluciones bajas de suero según Leeflang y Perié, (1972). Igualmente, la subjetividad en la interpretación de los resultados limitan su utilización para estudios epidemiológicos.

Las pruebas de aglutinación para detectar anticuerpos contra *B. bovis* han sido descritas por (Curnow y Curnow, 1967; Goodger y Mahoney, 1974; López y Todorovic, 1978).

Recientemente, Montenegro *et al.*, (1981), describieron una técnica rápida de aglutinación latex utilizando antígenos solubles provenientes de cultivos *in vitro* de *B. bovis*. La evaluación demostró, que esta prueba posee un alto grado de sensibilidad, siendo capaz de detectar anticuerpos contra *B. bovis* aproximadamente siete días posinfección experimental o inmunización. De los animales evaluados, se observó un 4.18 % de falsos positivos y reacciones cruzadas con sueros de animales infectados con otras *Babesia spp.* Los autores consideran, que esta prueba es adecuada, por su simplicidad y estabilidad, para utilizarse en condiciones de campo. Sin embargo, recomiendan estudios posteriores, que determinen la precisión de la misma para detectar infecciones naturales

transmitidas por garrapatas y la capacidad para diagnosticar infecciones crónicas.

Chieves *et al.*, (1989), elaboraron una prueba rápida de aglutinación en tarjeta para el diagnóstico de *B. bovis*. El antígeno utilizado se preparó a partir de glóbulos rojos infectados provenientes de terneros esplenectomizados con una parasitemia aproximada del 30%. Los parásitos fueron liberados mediante pasajes a través de una cámara de presión francesa. Los resultados obtenidos al comparar esta técnica con IFA y FC, indicaron que la prueba de tarjeta es más eficiente para detectar infecciones tempranas (5-7 días). La prueba reaccionó específicamente con sueros controles positivos de diferentes países. Además, es considerada una prueba sensible, dada la capacidad para detectar animales portadores hasta por lo menos 24 meses posinfección experimental[1].

La necesidad de pruebas diagnósticas simples, económicas y adaptables a condiciones de campo y laboratorio, hacen de las pruebas de aglutinación rápida, una valiosa herramienta para conducir estudios seroepidemiológicos preliminares en regiones tropicales. No obstante, estas técnicas deben ser evaluadas todavía a nivel de campo, haciendo énfasis en la capacidad para detectar portadores crónicos.

---

1. Chieves, L. 1990. Comunicación personal, Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA). Iowa.

La prueba inmunoenzimática (ELISA), ha sido exitosamente utilizada para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Este método es considerado de una sensibilidad superior a la mayoria de las pruebas serológicas anteriormente descritas. Barry *et al.*, (1982), describieron una prueba ELISA para cuantificar anticuerpos IgG contra *B. bovis* en suero bovino. Como fuente de antígeno usaron un extracto crudo lisado por sonicación. Las comparaciones con IFA, indicaron un 95% de concordancia entre ambas pruebas al examinar 187 sueros. La prueba ELISA resultó, sin embargo, más sensible en titulaciones de sueros positivos. Tanto la IFA como la ELISA, detectaron anticuerpos específicos 268 días posinfección experimental. Se encontró no obstante, cierto grado de reacciones cruzadas con otras especies.

En un intento por mejorar la especificidad de la prueba, Waltisbuhl *et al.*, (1987), elaboraron una prueba ELISA basada en fracciones de antígenos crudos, parcialmente purificados mediante cromatografía de filtración en gel. Unicamente se notó reacción cruzada con bajas diluciones de sueros infectados con *Anaplasma marginale*.

Goff *et al.*, (1989), aislaron una proteina de *B. bovis* con peso molecular de 40 Kd, la que utilizaron como antígeno de ELISA. El aislamiento se realizó mediante una columna de afinidad con anticuerpos monoclonales. No se encontró reacción cruzada con sueros bovinos infectados con *A. marginale* y *B. bigemina*. La prueba ELISA identificó 86% de

los bovinos detectados positivos por IFA. Sin embargo, el verdadero estado sanitario de los animales muestreados, no fue confirmado en este estudio.

Estudios comparativos indican que no existen diferencias significativas, entre las pruebas de IFA y ELISA, para detectar anticuerpos contra babesiosis bovina (Bidwell *et al*, 1978; Barry *et al*, 1982). No obstante, la prueba de ELISA posee la ventaja de ser menos subjetiva en la interpretación de resultados. Igualmente, su metodología es totalmente automatizada y podría ser acondicionada para estudios epidemiológicos a nivel de campo, en zonas ganaderas de países con una infraestructura rural regular o buena.

La técnica de radioinmunoensayo (RIE), fue adaptada para detectar anticuerpos contra *B. bovis* (Kahl et al., 1982). Los autores encontraron una mayor sensibilidad que la IFI, para detectar titulos de anticuerpos contra el parásito. Sin embargo, el uso de equipos y reactivos sofisticados limitan la utilización de esta prueba en países en vías de desarrollo industrial.

Las pruebas serológicas mencionadas, presentan numerosas ventajas sobre la tinción de frotis sanguíneos, debido a que los anticuerpos están presentes en la sangre por un período amplio, que incluye la fase aguda y crónica de la enfermedad. Desafortunadamente, estas pruebas no pueden diferenciar un portador activo, de animales con anticuerpos provenientes de

una infección previa, tranferencia pasiva o vacunación (Trueblood y Palmer, 1990). El valor diagnóstico de estos métodos serológicos, también se ve limitado por la incapacidad de detectar consistentemente animales portadores y la presencia de reacciones cruzadas, entre especies de *Babesia* relacionadas antigénicamente (Kuttler, 1981). Adicionalmente, la presencia de anticuerpos maternos transferidos pasivamente, dificultan la interpretación de reacciones positivas en terneros (Todorovic y Carson, 1981).

Actualmente, el método más sensible para confirmar portadores crónicos es la inoculación de terneros esplenectomizados con sangre de animales sospechosos. Sin embargo, este método es costoso e impráctico para diagnóstico rutinario a nivel de campo.

2.2.2. Hibridación de Acidos Nucléicos

Los avances recientes en ingeneria genética, han hecho posible el desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas basadas en la hibridación de cadenas complementarias de ácidos nucléicos. En general, el proceso implica la interacción entre una molécula de sonda marcada y una molécula de ADN "blanco", para formar un híbrido molecular o duplex (Gillespie, 1990). Una sonda de ácido nucléico, es un segmento de banda sencilla marcado, que posee una secuencia de nucleótidos idéntica a una porción del genoma de la especie que se desea diagnosticar. Si en la muestra a analizar,

existen cadenas de ácidos nucléicos complementarias a la secuencia de la sonda, ocurrirá la hibridación. La reacción de hibridación, se puede visualizar por métodos colorimétricos, luminiscentes o radiactivos, según la técnica utilizada al marcar la sonda.

Mclaughlin *et al.*, (1986), prepararon plásmidos que contenían insertos de ADN de *B. bovis*, para su utilización como sondas para el diagnóstico del parásito. Estas sondas marcadas radiactivamente, detectaron 100 pg de ADN de *B. bovis* que según los autores, corresponde a la cantidad de ADN presente en 50 microlitros de sangre infectada con 0.01 % de parasitemia. Las sondas no hibridaron con ADN de *Babesia microti, Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax* o ADN bovino. Sin embargo, se observó reacción cruzada con 10 ng de ADN de *B. bigemina.*

Holman *et al.*, (1989), informaron sobre la preparación de una sonda radiactiva altamente específica, que detectó hasta 12 pg de ADN de *B. bovis*. Los autores, no encontraron diferencias en sensibilidad, entre aislamientos originarios de México y Australia.

Jasmer *et al.*, (1990), detectaron 100 pg de ADN de *B. bovis* proveniente de México y Australia, utilizando una sonda genómica radiactiva. Sin embargo, esta sonda también reaccionó con 1.0 ng de ADN de *B. bigemina*. Los investigadores, usando una sonda diferente, encontraron

polimorfismo en los perfiles de restricción enzimática entre la cepa de Australia y la de México. El polimorfismo entre cepas o aislamientos indica la existencia de diferencias en el genoma de la *Babesia*. Estas diferencias son causadas por mutaciones que ocurren durante la replicación de ácidos nucléicos al momento de la división celular.

Buening *et al.*, (1990), evaluaron la sensibilidad y especificidad de una sonda de ADN recombinante, para detectar ADN de *B. bigemina*. La sonda marcada radiactivamente, hibridó específicamente al ADN de *B. bigemina* y no al de *B. bovis*, *A. marginale*, *Trypanosoma brucei* o ADN de leucocitos bovinos. Esta sonda, detectó 10 pg de ADN de *B. bigemina* y fue capaz de hibridar con aislamientos de diferentes paises (E.U., Puerto Rico, St Croix, Costa Rica y Kenia), característica que la hace candidata para la instrumentación de estudios epidemiológicos a nivel mundial.

En general, la sonda ideal para ser utilizada como herramienta para el diagnóstico de *B. bovis*, debe reunir las siguientes características:

- Debe ser suficientemente sensible para detectar consistentemente animales en cualquier fase de la enfermedad, especialmente aquellos en la fase crónica o prepatente.

- Debe hibridar con cepas de distintos sitios geográficos.

- Debe reaccionar especificamente con ADN de *B. bovis*.

En la actualidad, estas pruebas basadas en la hibridación de ácidos nucléicos se encuentran todavía en una fase de evaluación, para la detección de garrapatas infectadas y de bovinos portadores. Antes de aplicar esta nueva tecnología para estudios epidemiológicos, es necesario establecer la sensibilidad, especificidad, el valor positivo de predicción (VPP), el valor negativo de predicción (VNP) y la precisión de estas pruebas (Calder *et al.*, 1990).

Las limitaciones en sensibilidad presentadas por las sondas de ácidos nucléicos, se deben principalmente al sistema utilizado para detectar la sonda marcada y a la cantidad de ADN "blanco" presente en las muestras analizadas (Ibid.).

Al respecto, varios investigadores han comprobado que la detección con sondas por métodos no radiactivos, ofrece un límite de sensibilidad hasta 100 veces menor que aquel alcanzado mediante sondas radiactivas (Aboytes *et al.*, 1989; Figueroa y Buening, 1990; Gingeras et al., 1990).

Lo anterior establecería serios problemas para los países en vías de desarrollo industrial, ya que la utilización de material radiactivo requiere de personal capacitado, instalaciones y equipos costosos, y facilidades para desechos tóxicos. Esto impediría su uso rutinario en la

mayoría de los laboratorios en Latinoamérica.

Según Gingeras *et al.*, (1990), la sensibilidad de esta prueba también puede verse afectada por factores tales como:

- Eficiencia en la metodología empleada para extraer el ADN durante la preparación de la muestra.

- Eficiencia en cada paso del proceso de hibridación (inmovilización, hibridación y lavados).

- Cantidad de ADN no específico en la muestra.

Los resultados experimentales publicados indican que la hibridación de ácidos nucléicos es actualmente el método más sensitivo disponible para el diagnóstico de babesiosis bovina. No obstante, la mayoría de las sondas descritas, todavía no son lo suficientemente sensibles, para detectar niveles bajos de parasitemia en algunos animales portadores (Raymond *et al.* , 1990).

Las limitaciones en sensibilidad presentadas por las sondas de ácidos nucléicos, podrían ser superadas mediante el empleo de técnicas recientes basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Este método permite la amplificación específica del ADN "blanco", a niveles que permiten su detección mediante sondas, o inclusive, por visualización en gel de agarosa. Actualmente, se está considerando la aplicación práctica de la PCR para la detección de animales

portadores de hemoparásitos (Aboytes, 1990; Figueróa[1], 1990). Esta nueva metodología podría utilizarse en países donde la erradicación es importante, lo que en la actualidad, no se ha considerado en Latinoamérica Tropical.

Finalmente, se debe considerar que la situación de la babesiosis como enfermedad *per se*, es diferente en países industrializados, específicamente en Estados Unidos donde la enfermedad ha sido virtualmente erradicada, que en países en vías de desarrollo donde por diversas causas se tiene que convivir con ella. Esta realidad modifica en gran medida el enfoque metodológico de campo y laboratorio, en la lucha contra la enfermedad. Sin embargo, es de vital importancia crear la capacidad técnica en América Tropical para estudiar la enfermedad, incluyendo la biotecnología y lo que de ella pueda derivarse en un futuro cercano.

2.3. INMUNOLOGIA

La inmunidad a infecciones causadas por *Babesia* en bóvidos y otras especies, depende de una acción conjunta entre mecanismos de resistencia no específica y mecanismos inmunológicos específicos (James, 1988). Se entiende por resistencia no epecífica, a las defensas generales contra enfermedades que posee naturalmente el ganado. Los mecanismos inmunológicos específicos son adquiridos como resultado de

1. Figueroa, J. 1990. Comunicación personal, Departamento de Microbiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Missouri-Columbia.

una inmunización activa o transferencia pasiva, y van dirigidos especificamente hacia el antígeno y sus productos (Carson y Phillips, 1981).

2.3.1. Resistencia no específica

La edad del ganado, es un factor determinante para la presentación de sintomatología clínica de la babesiosis. Al respecto, se ha señalado que los terneros son más resistentes que el ganado adulto para sufrir la forma clínica de la enfermedad (Trueman y Blight, 1978; Latif *et al.*, 1979; Christensson y Thorburn, 1987). Varios autores concuerdan, que este fenómeno es debido a la transferencia pasiva de anticuerpos a través del calostro. En este sentido, se ha detectado experimentalmente la presencia de anticuerpos maternos en terneros hasta los seis meses de edad (Christensson, 1987).

En contraste con lo enunciado anteriormente, Christensson (1987), no encontró diferencias en la respuesta clínica y serológica, al evaluar dos grupos de terneros infectados experimentalmente con *B. divergens*. El primer grupo consistía de terneros con anticuerpos maternos contra *B. divergens* y el segundo de terneros provenientes de vacas seronegativas. El autor concluye, que podría existir otro mecanismo no específico responsable de este tipo de resistencia. Al respecto, se ha demostrado en cultivos *in*

vitro de *B. bovis*, que el suero de terneros sanos contiene un factor inhibidor del creecimiento y que eventualmente produce la muerte del parásito (Levy *et al.*, 1982).

Mahoney (1972), observó que se produjo una adecuada inmunidad contra *B. bovis*, al transferir suero hiperinmune a terneros esplenectomizados; sin embargo, ésta sólo fue efectiva, cuando la infección se producía con la misma cepa de *Babesia*.

La resistencia a ciertas infecciones de *Babesia*, debida a la especificidad de la interacción huésped-parásito, es considerada como un mecanismo de defensa no inmunológico. Sin embargo, se han descrito infecciones experimentales de *Babesia* en huéspedes atípicos.

Existen diferencias genotípicas en la susceptibilidad a infecciones por *Babesia*. Se ha señalado que las razas del género Cebú (*Bos indicus*) son más resistentes que las razas *Bos taurus* tanto a las garrapatas vectores como al padecimiento de la enfermedad (Johnston, 1967; Johston et al, 1978). Según Rogers (1971), en estudios realizados en Australia, la influencia de la raza en la presentación clínica de la enfermedad, es más evidente con *B. bovis* que con *B. bigemina*.

Actualmente, no existen estudios concluyentes que demuestren resistencia comprobada en el ganado Criollo (*Bos taurus*) a enfermedades hemotrópicas. No obstante, un proceso

de selección natural de más de 400 años al que han estado sometido estos animales, ha tenido que influenciar ésta en forma marcada, lo que sugiere la necesidad de realizar estudios al respecto.

2.3.2. Resistencia Específica

Se ha comprobado que las infecciones por *Babesia* pueden estimular una respuesta inmunológica tanto humoral como celular (James, 1988). Según Tizard (1987), los anticuerpos ayudan a controlar el nivel de parásitos libres en la sangre y en los fluidos tisulares, mientras que la respuesta inmune celular va dirigida principalmente contra los parásitos intracelulares.

Como se mencionó anteriormente, se han utilizado varias pruebas serológicas para detectar y medir la respuesta humoral hacia antígenos de *Babesia* (Mahoney, 1962; Ross y Lohr, 1968; Bidwell *et al.*, 1978). En general, el nivel de anticuerpos aumenta hasta alcanzar un pico temprano y luego declina durante la fase crónica de la infección (Smith *et al.*, 1978). Estos resultados, principalmente en lo concerniente a la duración de la respuesta humoral, están altamente influenciados por la sensibilidad de la prueba serológica empleada, así como por el tipo racial del ganado involucrado y las condiciones agroecológicas imperantes en la compleja biodiversidad tropical.

El mecanismo de acción de los anticuerpos en infecciones con *Babesia*, involucra la opsonización y posibles efectos inhibitorios y citotóxicos sobre los merozoitos (Carson y Phillips, 1981).

De acuerdo a James *et al.*, (1985), en áreas enzoóticas a babesiosis, los terneros menores de cuatro meses de edad están protegidos por anticuerpos maternos. Si durante este período el animal se infecta, la reacción a la enfermedad será mínima y el animal queda adecuadamente inmunizado. Los animales que sobreviven una infección natural, se convierten en portadores protegidos a nuevas infecciones, principalmente con cepas homólogas de *Babesia* (Callow, 1968).

Se ha indicado también, que la *B. bovis* pareciera tener la capacidad de variar antigénicamente durante la infección (Curnow, 1973). Este fenómeno, podría plantear problemas epidemilógicos y dificultades en la elaboración de vacunas.

Todos los factores enumerados relacionados con resistencia a la babesiosis, deben considerarse para lograr un adecuado control de la enfermedad y para la planificación de proyectos pecuarios en zonas enzoóticas de los países latinoaméricanos tropicales.

2.4. El Ganado Criollo

Las llamadas hoy razas criollas, de origen *Bos Taurus*, fueron introducidas de la peninsula Ibérica a latinoamérica en forma de líneas fenotípicas durante la época de la colonia (siglo XVI). Desde su llegada, el ganado criollo ha sufrido un proceso continuo de selección natural, mediante el cual ha logrado adaptarse a las condiciones ambientales adversas encontradas en el trópico. Como consecuencia, estos animales se destacan por su tolerarancia a deficiencias nutricionales, encontradas principalmente durante épocas de sequía. También se ha señalado que estas razas poseen gran tolerancia a parásitos gastrointestinales y enfermedades hemotrópicas. Sin embargo, estas observaciones requieren aún más estudios experimentales (Pinzón, 1985; Monterroso, 1989).

Dentro de las razas criollas, el ganado **Romosinuano** originario de Colombia, se destaca por su mansedunbre, longevidad, habilidad materna y rusticidad, cualidades que guardan estrecha relación con la productividad mostrada bajo condiciones tropicales (De Alba, 1984).

La Finca Experimental del CATIE en Turrialba, Costa Rica, cuenta con un hato Romosinuano de 500 cabezas aproximadamente, el que ha sido evaluado en planes de cruzamiento y mejoramiento genético (Molina, 1978; Cardona, 1989).

La introducción del germoplasma criollo Romosinuano a la región centroamericana, y su posterior evaluación regional en planes de cruzamiento, forma parte complementaria de los objetivos planteados por la Institución para el desarrollo ganadero del Istmo.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. LOCALIZACION

La primera parte de esta investigación se realizó en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria, de la Universidad de Missouri-Columbia, Estados Unidos[1]. Durante esta etapa, se efectuaron estudios preliminares sobre las técnicas diagnósticas a utilizar y se prepararon los materiales y reactivos requeridos para la ejecución del estudio.

Seguidamente, el trabajo se continuó en el Laboratorio de Biotecnología del programa I y en la Finca Experimental del Area de Ganadería Tropical del CATIE, situados en Turrialba, a 9° 53´ Latitud Norte y 80° 30´Longitud Oeste. El sitio es considerado una zona tropical húmeda, y se encuentra a una altura de 602 msnm. La temperatura media mensual es de 21.5 °C con variaciones que van desde 18 a 26.4 °C. La precipitación media anual es de 2634.1 mm, distribuidos casi uniformemente durante todo el año. La humedad relativa diaria es de 87.8%, según datos tomados de la estación metereológica del CATIE, durante los últimos 21 años.

---

1. En 1985 se firmó un acuerdo para la colaboración en investigación y enseñanza entre la universidad de Missouri-Columbia y el CATIE.

3.2. TIPO Y NUMERO DE ANIMALES

Se utilizaron 45 animales de la raza Romosinuano distribuidos equitativamente, en tres grupos de edad (15 animales por grupo). Los grupos quedaron conformados de la siguiente manera:

- **Animales desde el nacimiento hasta 12 meses de edad.**

- **Animales desde 13 hasta 24 meses de edad.**

- **Animales mayores de 24 meses.**

En general, el manejo del hato de carne en la Finca Experimental del CATIE, se basa en un pastoreo rotacional. Los potreros están constituidos por diversas pasturas, principalmente pastos nativos (*Paspalum sp.*, *Axonopus sp.*). Se practica la monta estacional por un período de tres meses. Los partos se concentran en el mes de marzo y el destete se realiza cuando los animales tienen entre siete y nueve meses de edad. El criterio utilizado para la realización de baños garrapaticidas, se basa en la observación de garrapatas adultas ingurgitadas o teologinas en los animales.

3.3. PROCEDIMIENTO DE CAMPO

De cada grupo animal seleccionado, se colectaron muestras individuales de suero y sangre completa, para su

análisis posterior en el laboratorio. Las muestras fueron obtenidas mediante punción de la vena yugular, desinfectando previamente el área con alcohol al 95%. Para el efecto se utilizaron agujas y tubos al vacio de 10 ml. La sangre completa se colectó en tubos al vacío con ácido etiléndiamino-tetra-acético (EDTA), como anticoagulante.

Los tubos al vacio, previa identificación y después de colectadas las muestras, fueron colocados en un recipiente con aislamiento especial, con hielo en bolsas plásticas, para su traslado al laboratorio.

3.4. PROCEDIMIENTO DE LABORATORIO

3.4.1. Obtención de suero

El suero se obtuvo centrifugando las muestras sanguíneas sin anticoagulante, a 1000Xg durante 15 minutos en una centrífuga clínica. Una vez separado, el suero se colocó en viales de 2 ml debidamente identificados. Estos se guardaron a -20 °C para posterior análisis serológico.

3.4.2. Elaboración de frotis sanguíneos

Se prepararon dos frotis delgados por cada muestra de sangre con EDTA. Los frotis fueron secados inmediatamente al aire y fijados en alcohol metílico absoluto durante cinco

minutos. Las láminas se colorearon con Giemsa[1] para posterior examen microscópico,

3.4.3. Procesamiento de sangre completa para prueba de hibridación

Con la finalidad de reducir el número de glóbulos blancos, las muestras sanguíneas con EDTA fueron procesadas de la siguiente manera:

La sangre con EDTA fue tranferida a tubos de polipropileno de 50 ml, se añadieron seguidamente tres volúmenes de buffer PBS (0.137 M NaCl, 10 mM Na_2HPO_4, 3.2 mM KH_2PO_4 pH 7.3) y se centrifugó a 1000Xg durante 15 minútos. Seguidamente, el sobrenadante y la capa leucocitaria fueron eliminados. Estos lavados se repitieron dos veces y luego se examinaron frotis delgados de cinco muestras escogidas al azar, para evaluar la presencia de leucocitos.

Los glóbulos rojos se dividieron en alícuotas de 0.5 ml (dos por cada muestra) y se colocaron en tubos de microcentrífuga de 2.0 ml estériles, debidamente identificados. Seguidamente, las muestras de eritrocitos se congelaron a -20 °C hasta la fase de extracción de ADN.

---

1. Sigma, St. Louis, MO. USA.

3.5. TECNICAS DIAGNOSTICAS

3.5.1. Examen de frotis sanguíneos

Las frotis coloreados se examinaron utilizando un microscopio de luz con objetivo de inmersión 100X. Cada lámina se revisó por un periodo de 20 minutos (100 campos diferentes aproximadamente), haciendo énfasis en las áreas más delgadas del frotis. La placa se consideró negativa cuando no se encontraban hemoparásitos después de 20 minutos de revisión.

3.5.2. Prueba de aglutinación en tarjeta para *B. bovis*.

Se utilizó la técnica desarrollada por Chieves *et al.*, (1990)[1]. De acuerdo a este procedimiento, el antígeno se prepara a partir de sangre infectada proveniente de terneros esplenectomizados con una parasitemia del 30%. La sangre parasitada se lava tres veces con una solución tampón de fosfatos más antibióticos (pH 7.2). Los parásitos se liberan mediante pasajes a través de una cámara de presión francesa, bajo condiciones de presión (1200 PSI) y tasa de flujo (500 ml por hora) controlados. La solución con los parásitos libres se centrifuga a altas velocidades, se descarta el sobrenadante y el precipitado se homogeniza con una solución

---

1. El equipo y los reactivos utilizados en esta prueba fueron donados con fines experimentales, por el Dr. L. Chieves del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) en Ames, Iowa.

salina más antibióticos. Finalmente, la concentración del antígeno es estandarizada.

El procedimiento de la prueba consiste en colocar sobre una tarjeta de diagnóstico Brewer (Brewer Diagnostic Kits), 0.015 ml de antígeno, 0.03 ml de factor de suero bovino (BSF) y 0.03 ml del suero problema. Los reactivos se mezclan con un palillo de madera, y seguidamente la tarjeta se agita lentamente por rotación durante diez minutos. La lectura se efectua inmediatamente al finalizar el período de rotación, declarandose como positivo cualquier grado de aglutinación evidente.

Las muestras de suero se analizaron simultaneamente, con sueros controles positivos (fuertes y débiles) y negativos. Los resultados positivos se registraron como 1+, 2+ ó 3+ según el grado de intensidad de la aglutinación, considerandose 1+ la aglutinación mínima. Cada muestra se analizó por duplicado.

3.5.3 Prueba de aglutinación en tarjeta para anaplasmosis

Para este procedimiento se utilizó una prueba de aglutinación rápida en tarjeta (Hynson, Westcott y Dunning, Baltimore, USA) basada en la técnica elaborada por Amerault y Roby, (1968)., Amerault, *et al.*, (1972)[1].

Se siguió el procedimiento descrito por los fabricantes. El antígeno (0.015 ml), el factor de suero bovino (0.03 ml) y el suero problema (0.03 ml) se mezclaron sobre una tarjeta de diagnóstico Brewer. En cada corrida se incluían sueros de referencia positivos fuertes, positivos débiles y negativos. La lectura se realizó al final de un período de rotación de cuatro minutos. Los sueros positivos se clasificaron según el grado de aglutinación, siguiendo los criterios anteriormente descritos en la prueba de aglutinación en tarjeta para *B. bovis*.

3.5.4. Prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para *B. bovis*

Como fuente de antígeno se utilizaron frotis delgados de sangre infectada con una parasitemia aproximada del 10% (Figura 1). La sangre infectada se obtuvo de cultivos *in vitro* de *B. bovis* (cepa KBb), mantenidos según el procedimiento descrito por Palmer, Buening y Carson (1982). Las placas de antígeno se envolvieron individualmente en pañuelos de papel facial y luego en papel aluminio. Seguidamente se almacenaron a -20 °C en bolsas plásticas hasta su utilización. La metodología empleada para la realización de esta prueba se modificó de Johnston *et al.*, 1973, y se detalla a continuación:

Las placas de antígeno se removieron del congelador y se colocaron en una cámara de desecación por una hora. Las

placas se fijaron durante seis minutos en acetona fría. Posteriormente, cada frotis se dividió en diez círculos con un lápiz marcador[1].

Las muestras de suero fueron diluidas en PBS (pH 7.2) en diluciones dobles desde 1:40 hasta 1:2560. Sobre cada círculo en los frotis, se colocaban aproximadamente 30 microlitros de las diluciones del suero problema, incluyendo un suero control positivo débil y un control negativo diluidos 1:80. Las placas se incubaron en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante 30 minutos. Una vez finalizado este período de incubación, las placas se lavaron tres veces con 1X PBS (pH 7.2) cinco minutos cada lavado, y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Posteriormente, la placa se cubrió con suero de cabra anti-IgG bovino, conjugado con isotiocianato de fluoresceína[2]. El conjugado se diluyó previamente en 1:60, con una solución de 1X PBS, 2% Tween 80. Se incubaron en cámara húmeda por 30 minutos a temperatura ambiente y se repitieron los lavados anteriormente descritos. Después del último lavado, las placas se dejaron secar a temperatura ambiente y fueron observadas en un microscopio de fluorescencia[3] equipado con una lámpara de alta presión de mercurio.

---

1. Tech Pen model K Marx-Tex, USA.
2. Sigma, St Louis, MO. USA.
3. Nikon, Microphot FX EPEFL.

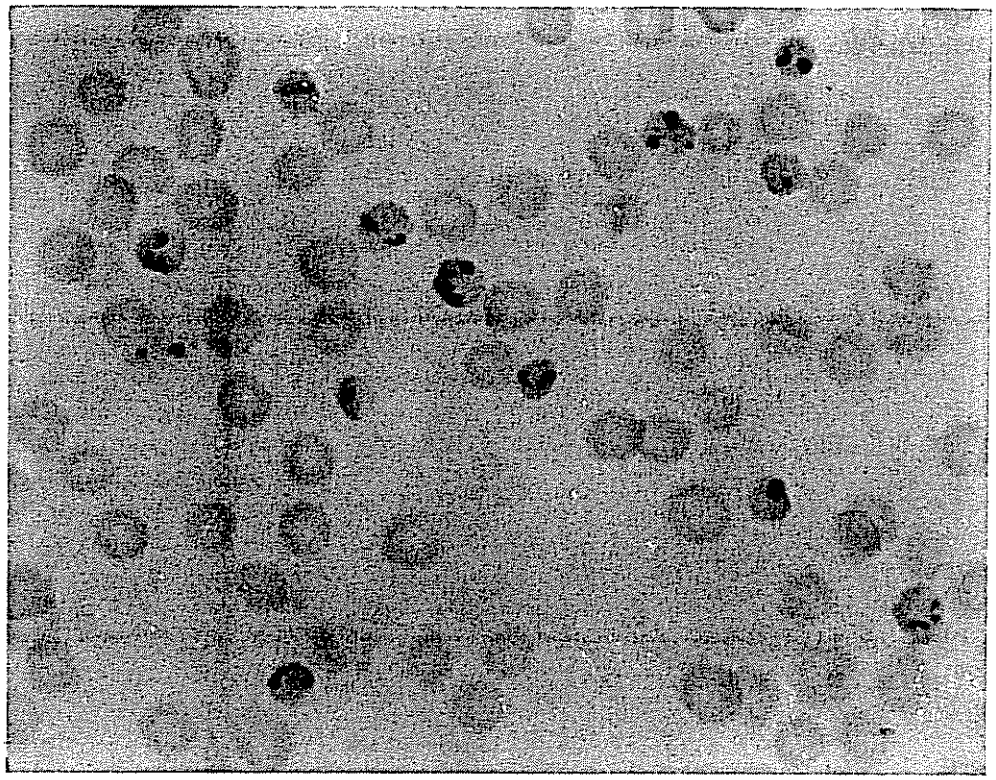

Figura 1. Glóbulos rojos infectados obtenidos de cultivos in vitro de Babesia bovis. Parasitemia aproximada de 10%. Tinción Giemsa (100X).

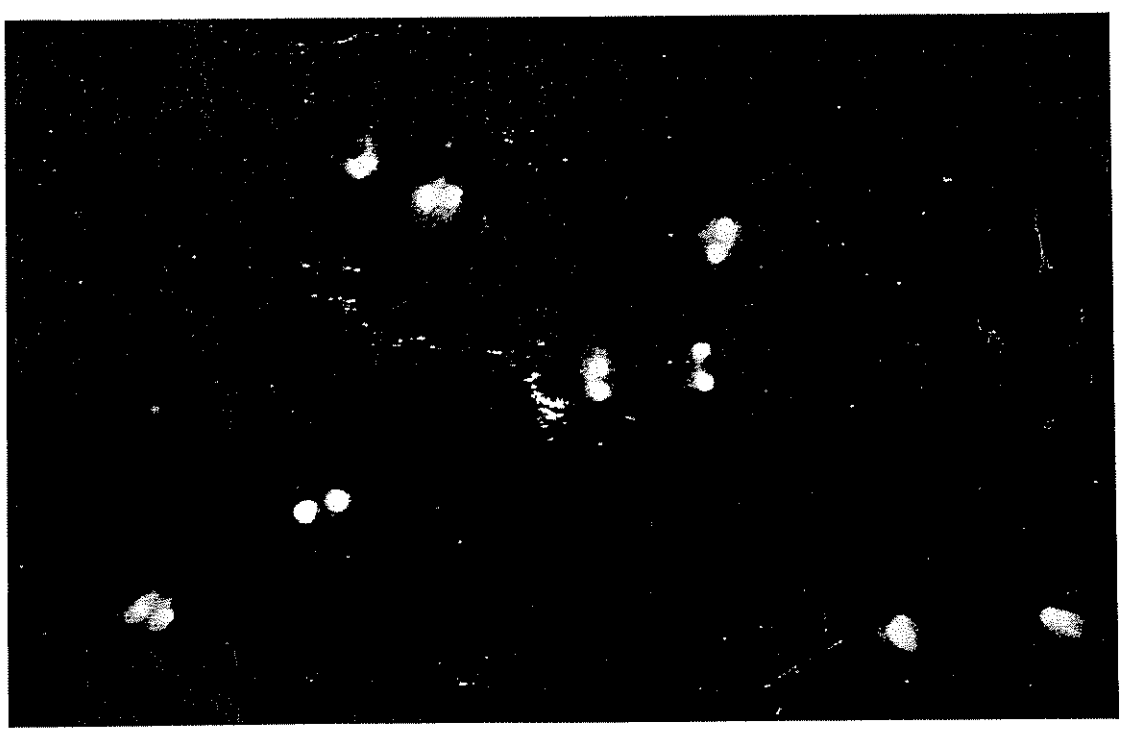

Figura 2. Reacción positiva a Babesia bovis con la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI). (40X).

Se consideraron sueros positivos, aquellas muestras con diluciones de 1:80 o mayores, que mostraron fluorescencia específica, igual, o mayor, a la mostrada por el control positivo débil. El título de una muestra positiva, se registró como la última dilución en la que se observó fluorescencia especifica, tomando como referencia los controles negativos (Figura 2).

3.5.5. Prueba de ELISA para el diagnóstico de *B. bovis*

Se intentó estandarizar una prueba de ELISA, modificando la descrita por Purnell *et al.*, (1976). El antígeno se preparó a partir de cultivos *in vitro* de *B. bovis* (KBb) con una parasitemia aproximada del 15%. Los glóbulos rojos parasitados se concentraron utilizando la metodología descrita por Mahoney, (1967). La mezcla obtenida, se centrifugó a 5000Xg durante 30 minutos a 4 °C. El sedimento se lavó con PBS y se resuspendió en 500 microlitros de la misma solución. La concentración de merozoitos se verificó mediante observación de un frotis delgado coloreado con Giemsa (Figura 3). Seguidamente, la muestra se congeló y decongeló dos veces y luego se sonicó por tres períodos de 10 segundos cada uno. La solución se centrifugó a 7000Xg durante 20 minutos y el sobrenadante obtenido se utilizó como antígeno.

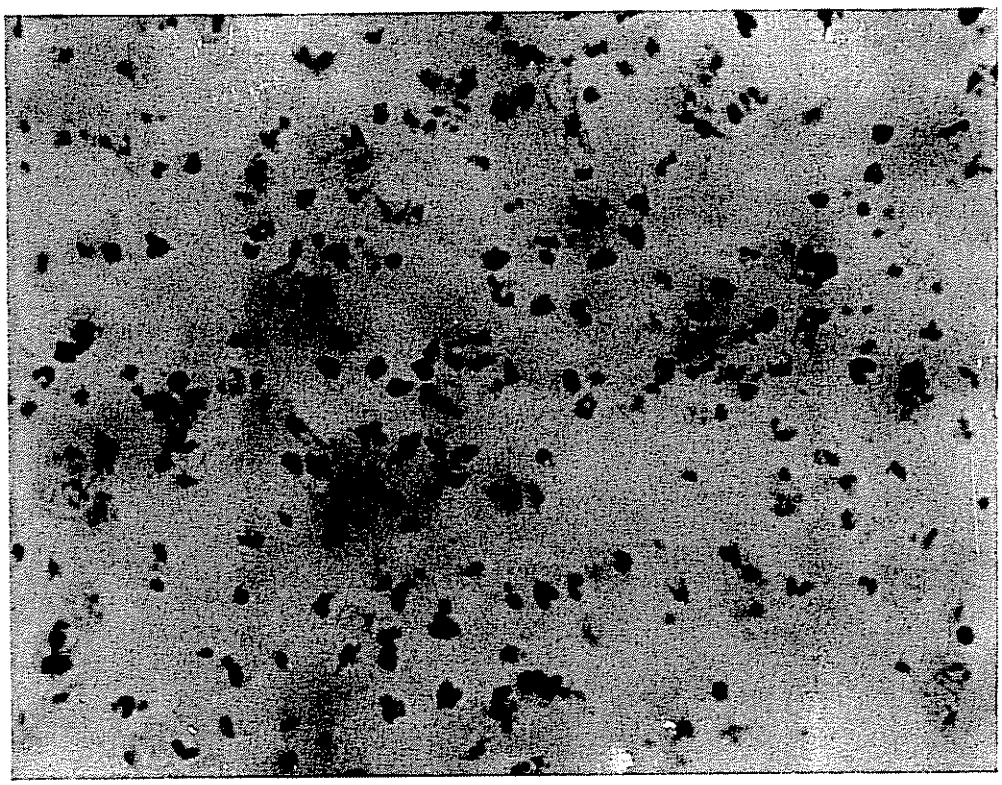

Figura 3. Concentración de merozoitos de Babesia bovis. Frotis delgado coloreado con Giemsa (100X).

Se probaron diferentes diluciones del antígeno, mediante un tablero de titulaciones, utilizando sueros de referencia positivos y negativos. El procedimiento empleado para realizar la prueba, se basó en el descrito por Figueroa, (1989).

3.5.6. Hibridación no radiactiva de ADN de *B. bovis*

3.5.6.1. Extracción de ADN

Las muestras de glóbulos rojos, anteriormente procesadas, fueron utilizadas para la extracción del ADN de *B. bovis*. La metodología empleada se detalla en la Figura 4. En general, las alicuotas de 0.5 ml se congelaron y descongelaron dos veces, con el objeto de lisar las células.

Al lisado obtenido, se le añadió 1 ml de buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 7.5) y se centrifugó a 30,000Xg durante 15 minutos, en una microcentrífuga de mesa[1]. El sobrenadante se descartó para eliminar el exceso de hemoglobina. Después de repetir este procedimiento de lavado, el precipitado se resuspendió en 200 microlitros de un buffer de extracción que contenia: 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA, 10 mM NaCl, 1% SDS y 200 microgramos/ml de proteinasa K. La mezcla se incubó a 37 °C durante toda la noche.

Una vez digeridas, los ácido nucléicos de las muestras se extrajeron con fenol-cloroformo y se precipitaron con

1. Bekman Instruments, California, USA.

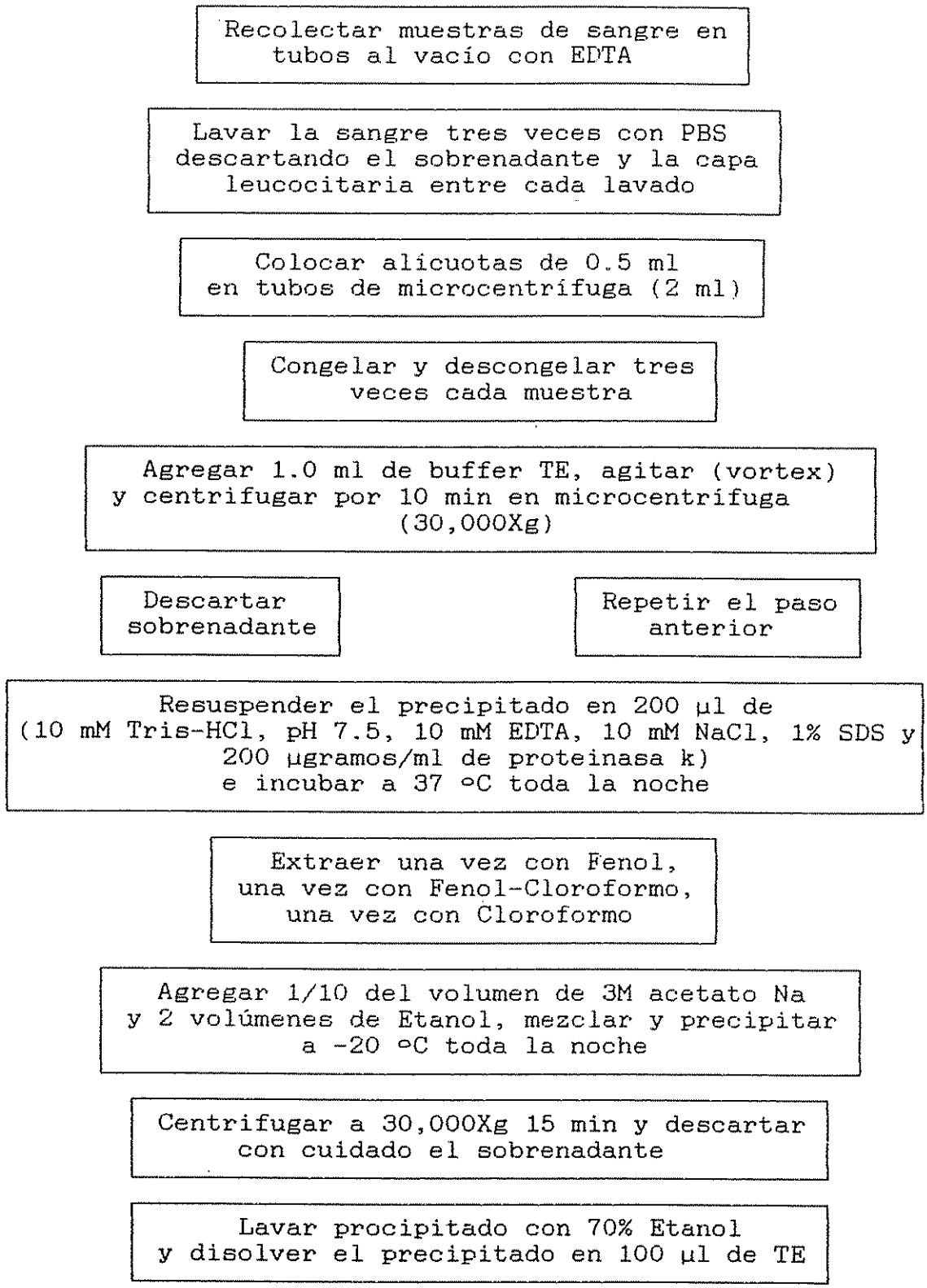

Fig. 4. Procedimiento para extracción de ADN de *B. bovis*

etanol, según el procedimiento descrito por Sambrook *et al.*, (1989). Finalmente, el ADN se disolvió en 100 microlitros de 1X TE y se almacenaron a 4 °C.

3.5.6.2. Características de la sonda de diagnóstico "BoV"

Para la prueba de hibridación se utilizó una sonda genómica[1]. La secuencia de ADN de la sonda se encuentra clonada en el plásmido pUC18 y se amplifica en *Escherichia coli*.

El inserto de ADN de *B. bovis* (aproximadamente 1.5Kb), se liberó del plásmido mediante digestión con la enzima de restricción BamHI. Seguidamente, el inserto se aisló de geles de agarosa de acuerdo al procedimiento descrito por Maniatis, (1982). La sensibilidad y especificidad de la sonda fue evaluada utilizando la técnica de hibridación en "**Dot-Blot**".

Para el análisis de las muestras, el inserto purificado se marcó con biotina mediante la técnica de "**nick-translation**", utilizando el sistema de marcaje comercial BioNick™ (BRL, MD, USA). Los nucleótidos no incorporados en la reacción de marcaje, fueron separados de la sonda por doble precipitación con etanol, según la metodología descrita por Sambrook *et al.*, (1989).

1. Esta fue suministrada por el Dr. C. A. Carson, director del laboratorio de microbiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Missouri-Columbia.

3.5.6.3. Procedimiento "Dot-Blot"

Las muestras de ADN (100 microlitros), previamente aisladas, fueron colocadas sobre membranas de nylon (PhotoGene™, BRL, USA) utilizando un aparato de microfiltración (Bio-Dot®, Bio-Rad, California, USA). La desnaturalización del ADN y el procedimiento "Dot-Blot" se realizaron siguiendo las recomendaciones del fabricante. Finalmente, los filtros de nylon se secaron en un horno al vacio (VWR Scientific, Illinois, USA) durante dos horas a 80 °C. En cada membrana se incluía un control negativo y un control positivo, que consistieron en sangre no parasitada y sangre con aproximadamente 10% de parasitemia, respectivamente. El ADN de las muestras controles se extrajo con el mismo procedimiento empleado para las muestras problema de sangre.

3.5.6.4. Hibridación y detección no radiactiva

Las membranas con las muestras de ADN fijadas, se prehibridaron por tres horas a 42 °C, en 250 microlitros/cm^2 de una solución que contenía: 50% formamida, 6X SSPE (60 mM NaH_2PO_4, 0.9 M NaCl, 6 mM EDTA pH 7.4), 5X Denhardt's (0.1% Ficoll, 0.1% BSA, 0.1% polivinilpirrolidona), 0.5% Sarcosyl y 0.2 mg/ml ADN de esperma de salmón, previamente desnaturalizado. Finalizado

el periodo de incubación, la solución de prehibridación se remplazó con 50 microlitro/cm^2 de una solución de hibridación compuesta por: 50% formamida, 6X SSPE, 5X denhardt s, 10% sulfato dextrano, 0.2 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y la sonda marcada desnaturalizada a 100 °C durante 10 minutos. El proceso de hibridación se continuó toda la noche a 42 °C. Posteriormente, la membrana fue lavada dos veces con 5X SSC, 0.5% SDS a 65 °C por cinco minutos cada lavado; una vez con 0.1X SSC, 1% SDS a 50 °C durante 30 minutos, y una vez con 2X SSC a temperatura ambiente durante cinco minutos.

La detección no radiactiva de ADN se realizó conforme a las instrucciones descritas por el fabricantes (PhotoGene™, BRL). Para visualizar la reacción de hibridación, se utilizó una pelicula Kodak Ortho-M para rayos X.

3.6. COMPARACION ENTRE PRUEBAS DIAGNOSTICAS

Las pruebas fueron comparadas en tablas de 2X2, evaluando el porcentaje de concordancia observado y los indices de concordancia, Kappa y Phi (Cuadro 1A). También se midió el nivel de asociación entre pruebas con la prueba exacta de Fisher (SAS, 1985). El estudio comparativo igualmente contempló otros parámetros tales como la complejidad y el costo de cada prueba.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. FROTIS SANGUINEOS

El examen de frotis coloreados reveló la presencia de parásitos intraeritrocíticos, *Babesia sp.* y *Anaplasma sp.* En el caso de infecciones por *Babesia*, la caracterización de la especie se realizó subjetivamente, basándose en las claves e ilustraciones presentadas por Postoian (1977). Los parásitos de *B. bovis* presentaron formas muy variadas, observándose con mayor frecuencia formas anulares e irregulares (Figura 5). La *B. bigemina* también evidenció formas variadas con tamaños superiores al radio del eritrocito (Figura 6). En algunos casos se observaron corpúsculos puntiformes en la periferia de los glóbulos rojos que se identificaron como la rickettsia *Anaplasma marginale* (Figura 7).

El porcentaje de reactores positivos para cada grupo de edad se observa en los cuadros 1, 2, 3 y 10 . El mayor número de animales infectados, tanto por *Babesia sp.*(53.3%) como por *Anaplasma sp.*(20%), se observó en los terneros menores de un año. Estos animales al momento del muestreo tenían aproximadamente cuatro meses de edad. Según James *et al.*, (1985) esta edad es posterior al descenso de los anticuerpos maternos en el calostro. Dos terneros presentaron alta parasitemia con *B. bigemina*, sin embargo, en estos animales no se observó sintomatología clínica. Este fenómeno podría sugerir una baja virulencia de la cepa local o quizas cierta

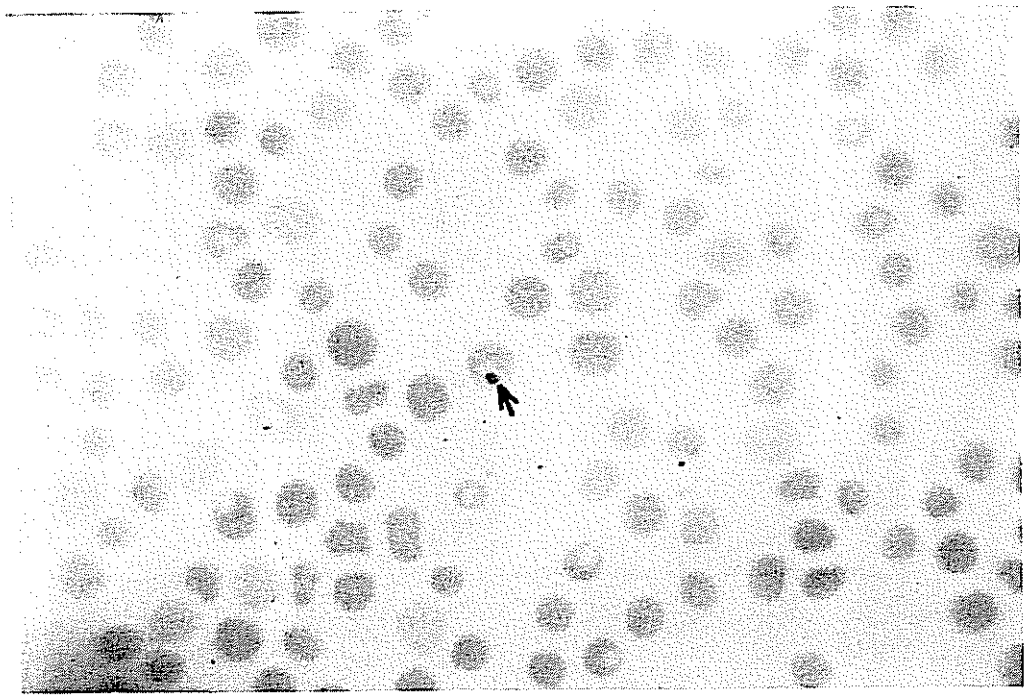

Figura 5. Babesia bovis en el interior del glóbulo rojo. Tinción Giemsa (100X).

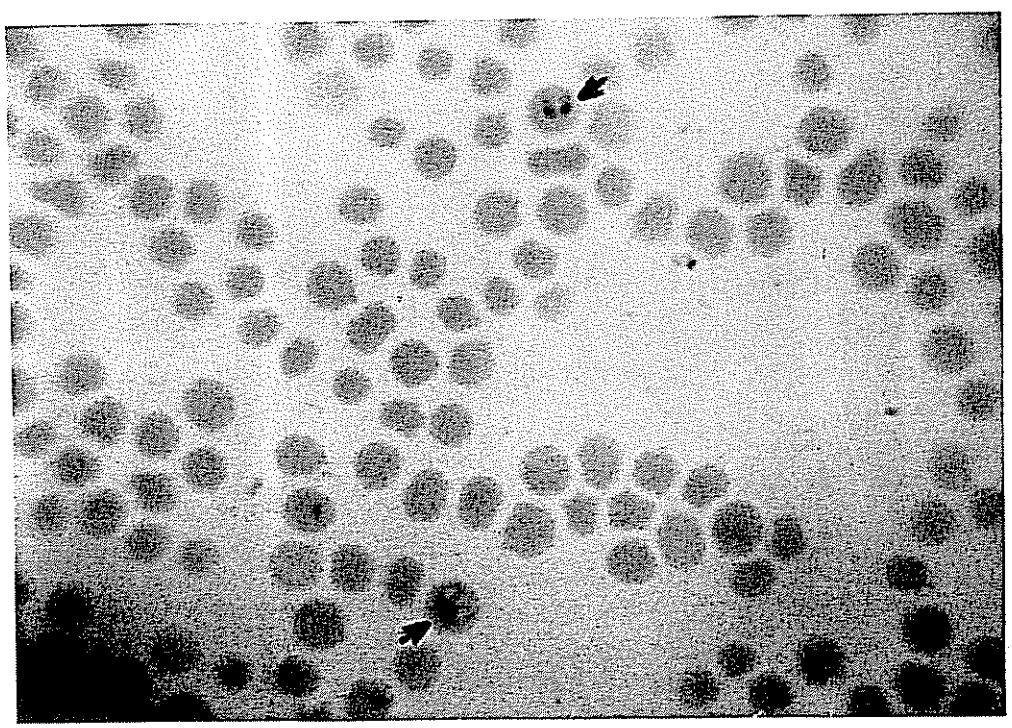

Figura 6. Babesia bigemina en el interior de los glóbulos rojos. Tinción Giemsa (100X).

Figura 7. Corpúsculos puntiformes de Anaplasma marginale localizados en la periferia de los glóbulos rojos.

Cuadro 1. Resultados Frotis Sanguíneos
(Animales < 1 Año)

Muestra	*B. bovis*	*B. bigemina*	*A . marginale*
R75I	+	-	-
R113I	-	-	-
R59I	-	-	-
R49I	-	+	-
R91I	+	-	-
R124I	+	++	-
R58I	-	-	-
R53I	-	-	-
R7I	+	-	-
R67I	-	++	-
R6I	-	-	-
R36I	-	+	-
R9I	-	-	+
R37I	-	-	+
R78I	+	+	+

+ : Parasitemia escasa.
++: Parasitemia intermedia.
+++: Parasitemia alta.

Prevalencia aparente para *Babesia* sp = 53.3%
Prevalencia aparente para *Anaplasma* sp= 20%

Cuadro 2. Resultados Frotis Sanguíneos
(Animales Entre Uno Y Dos Años)

Muestra	*B. bovis*	*B. bigemina*	*A. marginale*
R130H	-	-	-
R68H	-	-	-
R92H	-	-	-
R122H	-	-	-
R54H	-	-	-
R86H	-	+	+
R82H	+	-	-
R48H	-	-	-
R94H	-	-	-
R58H	-	-	-
R10H	-	-	-
R134H	-	-	-
R162H	-	-	-
R104H	-	-	-
R80H	-	-	-

Prevalencia aparente para *Babesia sp* = 13.3%

Prevalencia aparente para *Anaplasma sp* 6.6%

Cuadro 3. Resultados Frotis Sanguineos
(Animales > 2 Años)

Muestra	*B. bovis*	*B. bigemina*	*A. marginale*
R9-C	-	-	-
R2-C	-	-	-
R1-10	-	-	-
R70C	-	-	-
R132G	-	-	-
R8-20	-	-	-
R60	-	-	-
R2-58	-	-	-
R0-48	-	-	-
R118G	-	-	+
RI04G	-	-	-
R012	-	+	-
R48G	-	-	-
R12C	-	-	-
R56G	-	-	-

Prevalencia aparente para *Babesia* sp = 6.6%

prevalencia aparente para *Anaplasma* sp = 6.6%

Prevalencia aparente total para *Babesia* sp = 24.4%

Prevalencia aparente total para *Anaplasma* sp = 11%

tolerancia de estos animales a infecciones por *B. bigemina*.

El porcentaje de positivos para el total de animales muestrados fue de 24.4 % para *Babesia sp.* y 11% para *Anaplasma sp.*. Se debe señalar que los frotis fueron preparados con sangre de la vena yugular. Es probable que con frotis de sangre periférica, se hubiera encontrado un mayor número de animales positivos para estos hemoparásitos.

4.2. PRUEBA DE AGLUTINACION EN TARJETA PARA *B. bOVIS* (PAT)

Los resultados obtenidos se observan en los Cuadros 4 y 11. La prueba de aglutinación en tarjeta detectó un 40% de animales positivos, observándose el mayor número de reactores (73.3%) en el grupo de animales entre uno y dos años de edad (Figura 8). Los animales menores de un año y mayores de dos, presentaron una positividad del 6.6 y 40% respectivamente. Debido a la baja seroprevalencia observada con la prueba de PAT en animales menores de un año, se podría pensar que éstos no se encuentran adecuadamente protegidos contra *B. bovis*. No obstante, los casos clínicos por babesiosis en esta área son escasos, lo que indica que los terneros se encuentran protegidos por algún mecanismo, ya sea por anticuerpos pasivos o por alguna forma de resistencia innata. Estos animales menores de un año resultaron altamente positivos con la prueba de IFI (Cuadros 6 y 12), indicando marcadas diferencias en sensibilidad o especificidad entre estas pruebas, cuando se evalúan animales menores de un año.

Cuadro 4. Resultados prueba de aglutinación en tarjeta para *Babesia bovis*

< 1 AÑO	1-2 AÑOS	> 2 AÑOS
R75I -	R130H ++	R9-6 -
R113I -	R68H +++	R2-C -
R59I -	R92H +++	R1-10 -
R49I -	R122H +	R70C ++
R91I -	R54H -	R132G -
R124I -	R86H -	R8-20 -
R58I -	R82H +	R60 -
R53I +	R48H -	R258 -
R7I -	R94H +	RO-48 +
R67I -	R58H +	R118G +++
R6I -	R10H ++	R104G +
R36I -	R134H -	RO-12 -
R9I -	R162H +++	R48G +
R37I -	R104H +	R12G -
R78I -	R80H ++	R56G +

\+ Aglutinación mínima observada.
++ Aglutinación intermedia.
+++ Aglutinación máxima observada.

Prevalencia aparente < 1 año = 6.6%

Prevalencia aparente 1-2 años = 73.3%

Prevalencia aparente > 2 años = 40%

Prevalencia aparente total = 40%

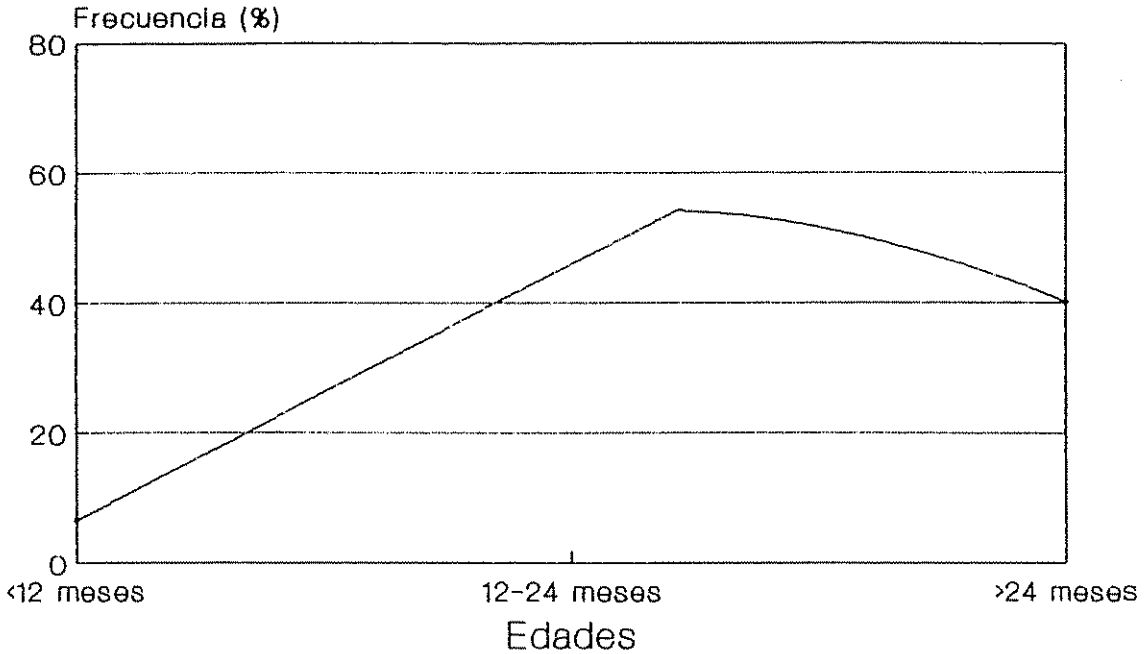

Figura 8. Tendencia en la seroprevalencia observada por grupos de edad según la prueba de aglutinación en tarjeta (PAT) para Babesia bovis.

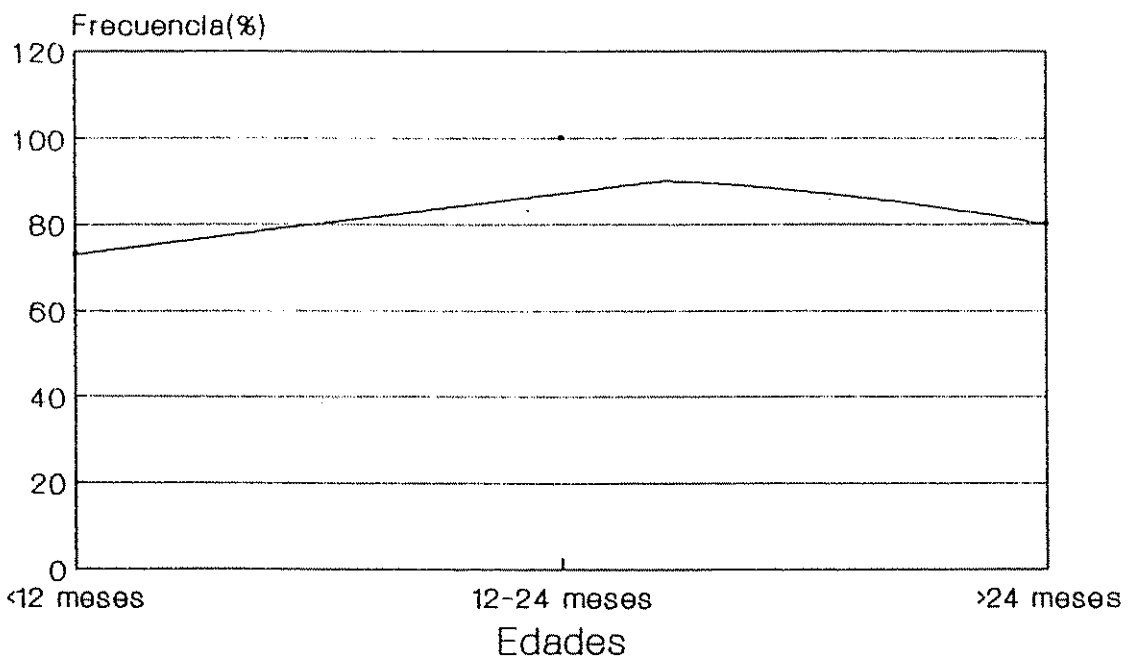

Figura 11. Tendencia en la seroprevalencia observada por grupos de edad según la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para Babesia bovis.

4.3. PRUEBA DE ELISA PARA EL DIAGNOSTICO DE *B. bOVIS*

Los resultados preliminares mostraron una adecuada sensibilidad, detectandose sueros positivos en diluciones hasta 1:1280. Sin embargo, se observaron reacciones inespecificas con sueros controles negativos, principalmente a bajas diluciones (Figura 9).

Dada las dificultades para lograr un adecuado afinamiento, esta prueba no fue incluída en el presente estudio comparativo, para el diagnóstico de *B. bovis*. No obstante, debe señalarse que la prueba de ELISA posee un gran potencial para la instrumentación de estudios epidemiológicos a gran escala en áreas endémicas. Su procedimiento es totalmente automatizable, la interpretación de resultados es menos subjetiva y pueden analizarse varias muestras simultáneamente. Esta técnica todavía debe ser perfeccionada en cuanto a su especificidad, y su procedimiento estandarizado para uso práctico.

4.4. PRUEBA DE INMUNOFLURESCENCIA INDIRECTA (IFI)

Los resultados de la prueba de IFI para el diagnóstico de *B. bovis* se observan en los Cuadros 5 y 12 . De un total de 45 animales examinados, 38 presentaron anticuerpos contra *B. bovis*, obteniendose una prevalencia de 84.4%. Este resultado es inferior al encontrado por Pérez *et al.*, (1980) en la Estación Experimental Los Diamantes, una zona húmeda en

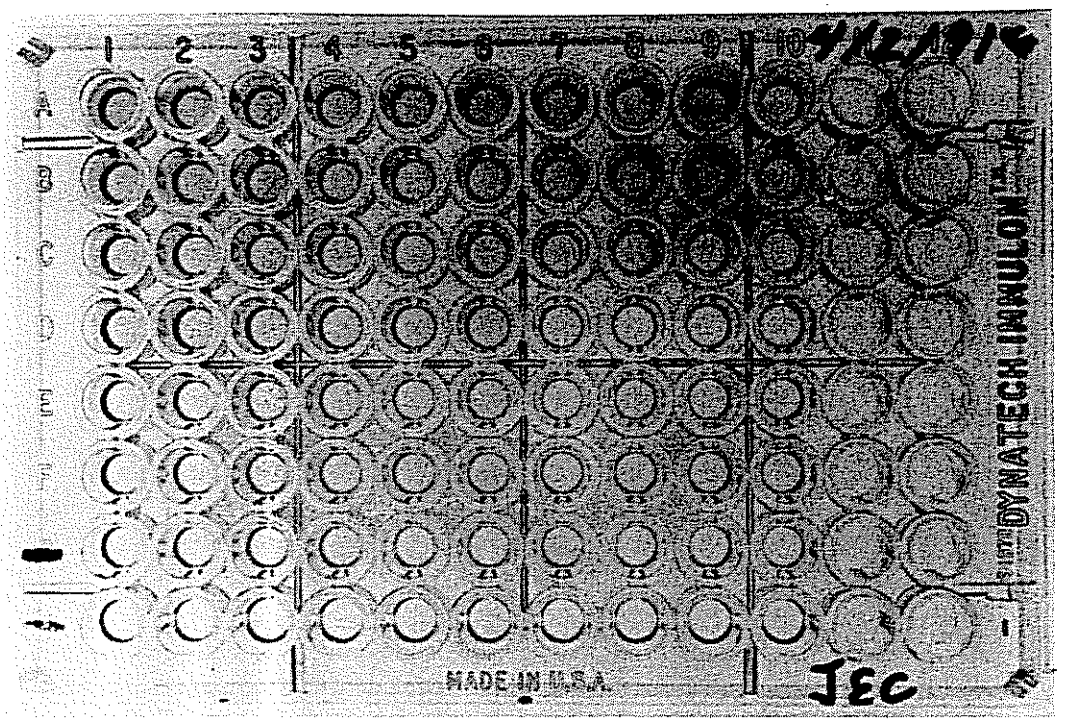

Figura 9. Tablero de titulaciones con la prueba de ELISA para Babesia bovis. Las columnas corresponden a diluciones crecientes de antígeno, las filas a diluciones dobles de suero control positivo (1:40-1:1280). Las dos últimas filas contienen sueros controles negativos.

Guápiles, Costa Rica, donde observaron un 93.3% de reactores positivos para *B. bovis*, según la prueba de IFI.

Los títulos séricos observados en los animales positivos, variaron desde 1:80 hasta 1:2560, siendo 1:320 el título más frecuente (Figura 10).

El máximo número de reactores positivos se encontró en el grupo de animales entre uno y dos años de edad (100%). En este grupo también se observaron los mayores títulos séricos, que oscilaron entre 1:80 y 1:2560. Los animales menores de 12 meses presentaron el menor porcentaje de reactores positivos (73.3%), con títulos generalmente inferiores a los observados en los otros grupos. En el grupo de animales mayores de dos años se detectó un 80% de reactores positivos con títulos séricos que variaron de 1:80 a 1:1280.

La tendencia observada en la prevalencia de anticuerpos detectados por IFI, se observa en la Figura 11. La prevalencia aumenta hasta alcanzar un pico entre 1 y 2 años, y luego disminuye.

Los resultados de la prueba de IFI pueden verse afectados por diferentes factores. La elección del título crítico, o dilución a partir de la cual un animal es considerado positivo, es de vital importancia, principalmente en zonas donde ocurren infecciones mixtas con hemoparásitos relacionados antigénicamente. En este estudio, procurando disminuir el número de reacciones cruzadas con otras especies

Cuadro 5. Resultados prueba de inmunofluorescencia indirecta para *Babesia bovis*

< 1 AÑO		1-2 AÑOS		> 2 AÑOS	
R75I	+640	R130H	+640	R9-6	+320
R113I	+640	R68H	+2560	R2-C	-
R591	+80	R92H	+2560	R1-10	-
R49I	+160	R122H	+640	R70C	+1280
R91I	-	R54H	+320	R132G	+160
R124I	+160	R86H	+320	R8-20	+160
R58I	-	R82H	+320	R60	-
R53I	-	R48H	+320	R258	+80
R7I	+80	R94H	+80	R0-48	+320
R67I	-	R58H	+1280	R118G	+640
R6I	+320	R10H	+640	R104G	+320
R36I	+320	R134H	+640	R0-12	+80
R9I	+80	R162H	+1280	R48G	+1280
R37I	+160	R104H	+2560	R12G	+160
R78I	+320	R80H	+640	R56G	+320

Prevalencia aparente < 1 años = 73.3%

Prevalencia aparente 1-2 años = 100%

Prevalencia aparente > 2 años = 80%

Prevalencia aparente total = 84.4%

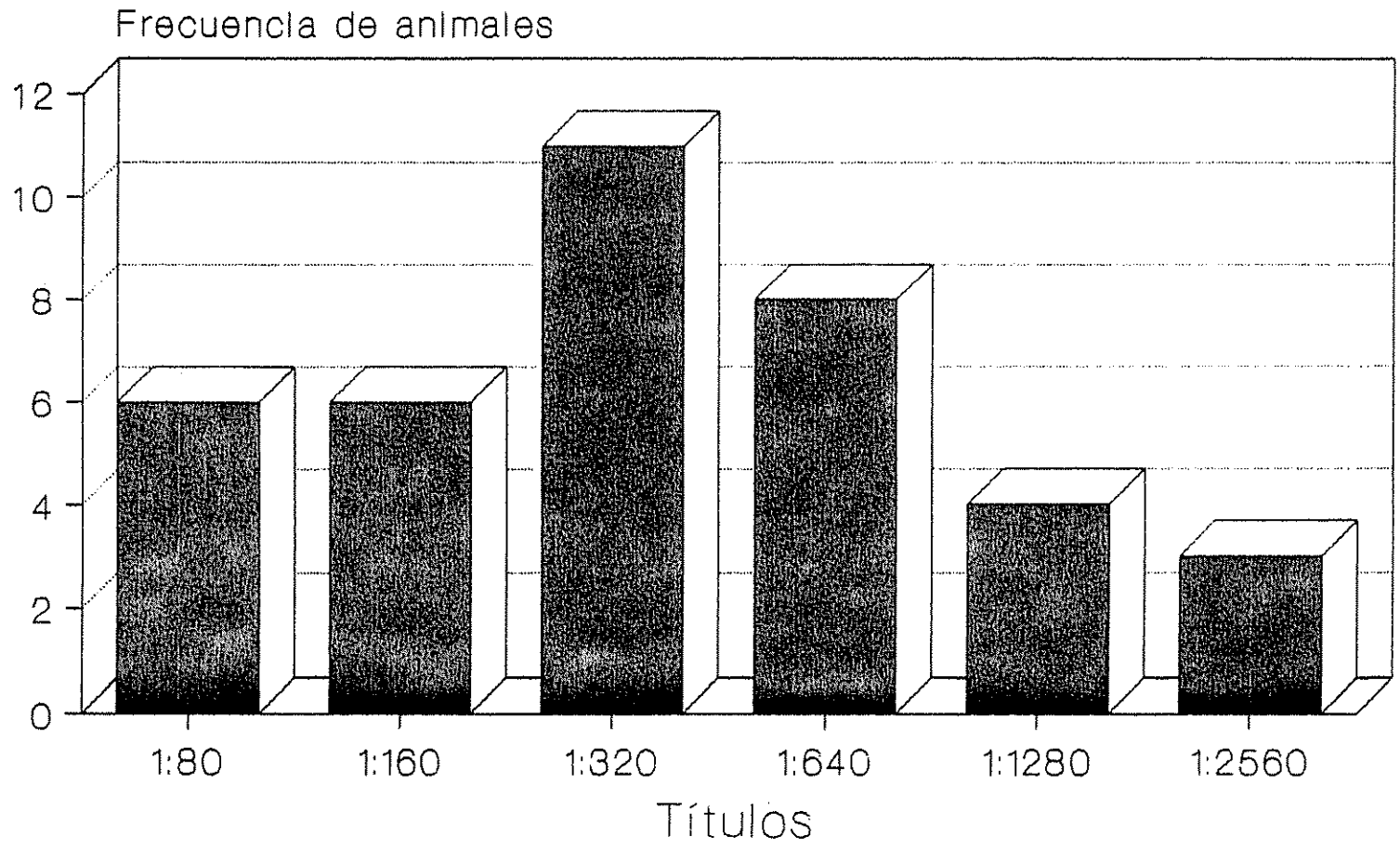

Figura 10. Frecuencia de títulos séricos para Babesia bovis según la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI).

de *Babesia*, se eligió como título crítico la dilución 1:80. De haberse escogido un título crítico diferente, los resultados de prevalencia obtenidos hubiesen variado notablemente. Los títulos observados en los animales positivos pueden también verse afectados por factores subjetivos como la agudeza visual y el cansancio del investigador, o por la naturaleza y pureza del material utilizado en la prueba de IFA (placas de antígeno, diluyentes, conjugado).

4.5. PRUEBA DE HIBRIDACION DE ADN

Inicialmente se evaluó la sensibilidad y especificidad de la sonda de diagnóstico "BoV". Al utilizar diferentes concentraciones (100 ng-100 pg) de ADN purificado de *B. bovis*, la sonda marcada radiactivamente detectó hasta por lo menos 100 pg de ADN de *B. bovis* (Figura 12).

De igual forma se analizaron dos cepas de *B. bovis* (Ka y KBb) provenientes de cultivos *in vitro* con una parasitemia aproximada del 10%. Se realizaron diluciones seriadas (1%-0.001%) de la parasitemia con glóbulos rojos no infectados. A las muestras, con un volumen final de 0.5 ml, se les extrajo el ADN siguiendo la metodología anteriormente descrita. El control negativo consistió en 0.5 ml de eritrocitos no infectados, procesados de idéntica manera. La sonda radiactiva detectó hasta 0.001% de parasitemia con ambas cepas de *B. bovis* (Figura 13). En esta figura también se

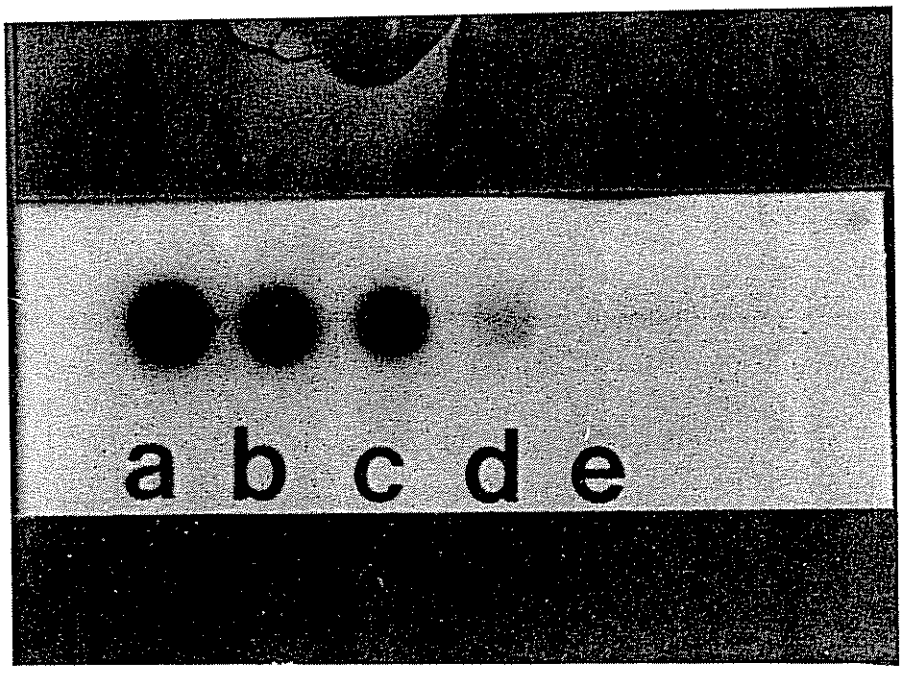

Figura 12. Sensibilidad de la sonda diagnóstica "BoV" marcada radiactivamente. Las columnas corresponden a concentraciones de ADN de Babesia bovis: a(100 ng), b(10 ng), c(1 ng), d(100 pg).

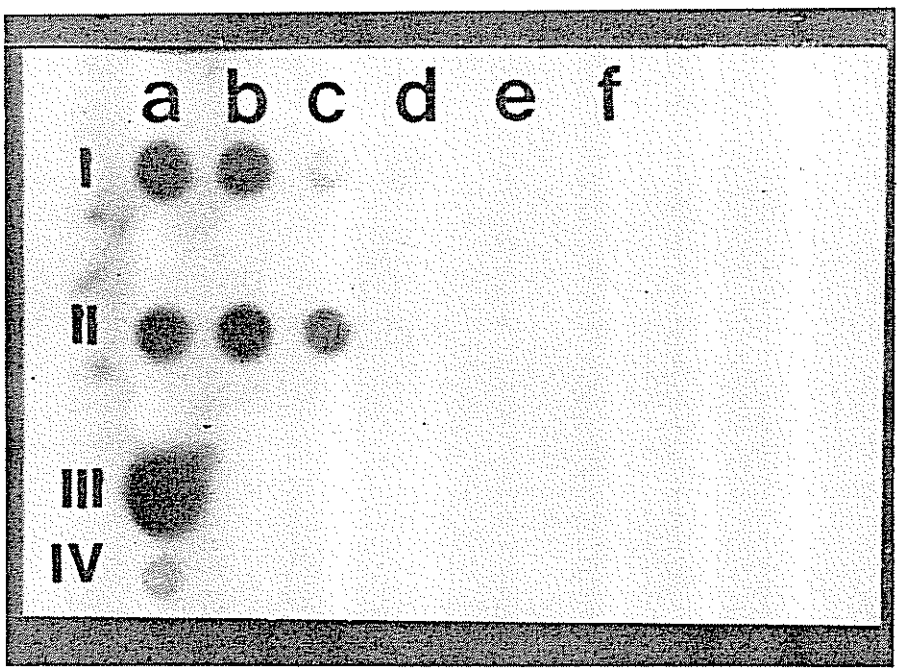

Figura 13. Sensibilidad y especificidad de la sonda diagnóstica "BoV" marcada radiactivamente. Las filas 1 y 11 corresponden a las cepas KBb y Ka de Babesia bovis, respectivamente. Las columnas representan diferentes niveles de parasitema: a(1%), b(0.1%), c(0.01%), d(0.001%), e(0.0001%), f(control negativo). En las filas 111 y 1V se evaluó por duplicado la especificidad de la sondo "BoV". Las columnas a, b, c y d corresponden a un microgramo de ADN de B. bovis, A.marginale, B. bigemina y glóbulos blancos respectivamente.

puede observar que la sonda no reaccionó con un microgramo de ADN purificado de *A. marginale*, glóbulos blancos o *B. bigemina*.

Previamente se había determinado la capacidad de la sonda para reaccionar con ADN extraído de diferentes aislamientos geográficos de *B. bovis* (Figura 14). Se puede notar que la sonda marcada radiactivamente reaccionó con una misma intensidad con cinco diferentes cepas de *B. bovis* (KBb, MO7, MO3, T_2BoS_2, Ka).

Con propósitos comparativos se determinó la sensibilidad general de la sonda utilizando un sistema de detección no radiactivo (PhotoGene, BRL, USA). Se siguió el procedimiento de hibridación detallado anteriormente. La sonda marcada con biotina detectó hasta 10 ng de ADN purificado de *B. bovis* (Figura 15). Este límite de sensibilidad es aproximadamente 100 veces menor que aquel encontrado con la sonda marcada radiactivamente (100 pg). La diferencia en sensibilidad entre el métodos radiactivo y el no radiactivo, concuerda con la señalada por varios investigadores (Aboytes *et al.*, 1989; Figueroa y Buening, 1990). La intensidad en la señal de detección fue considerablemente menor con el sistema de detección no radiactivo.

La sensibilidad encontrada con la sonda "BoV" marcada radiactivamente (100 pg), es comparable con la descrita por varios investigadores para el diagnóstico de *B. bovis*. Al

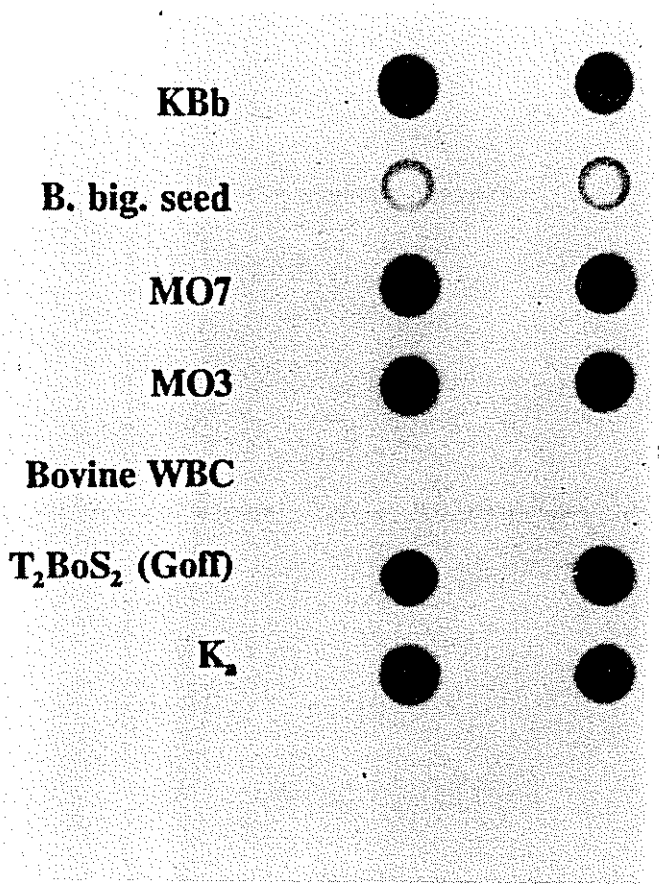

Figura 14. "Dot-blot" con diferentes cepas de Babesia bovis utilizando la sonda diagnóstica "BoV" marcada radiactivamente. Cada muestra contiene aproximadamente 1 microgramo de ADN.

Foto cortesía del Dr. C.A. Carson, Director del Laboratorio de Microbiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Missouri-Columbia.

respecto, McLaughlin *et al.*, (1986) detectaron experimentalmente 100 pg de ADN de *B. bovis*, sensibilidad, que según los autores, corresponde a una parasitemia de 0.01%. Holman *et al.*, (1989) informaron sobre la preparación de una sonda radiactiva que detectó hasta 12 pg de *B. bovis*. Jasmer *et al.*, (1990) encontraron una sensibilidad de 100 pg de ADN al utilizar una sonda genómica radiactiva. Esta última sonda, no obstante, mostró reacción cruzada con ADN de *B. bigemina*.

Los estudios preliminares mostraron que la sonda diagnóstica "BoV" es altamente específica para *B. bovis*. No se observó hibridación con ADN de *B. bigemina*, *A. marginale* o glóbulos blancos. Además, su capacidad de reaccionar con diferentes aislamientos geográficos la hace adecuada para estudios epidemiológicos en diferentes partes del mundo.

Para estudios epidemiológicos en zonas endémicas se requieren sondas capaces de detectar animales portadores con niveles muy bajos de parasitemia. En este sentido, Raymond *et al.*, (1990) opinan que la mayoría de las sondas hasta ahora descritas, no son suficientemente sensibles para detectar un porcentaje alto de animales portadores. Los métodos de detección no radiactivos son una buena alternativa para ser empleados en laboratorios no sofisticados carentes de equipo, instalaciones, presupuesto, y personal entrenado para utilizar materiales radiactivos. Sin embargo, la sensibilidad inferior observada con los métodos no isotópicos

(colorimétricos o luminiscentes) comparada con la obtenida mediante sondas radiactivas, limitan considerablemente su utilización en la actualidad, para detectar portadores crónicos. Estos límites en sensibilidad podrían ser superados mediante técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Este método permite la amplificación específica del ADN "blanco" a niveles que permiten su fácil detección, inclusive mediante sondas no radiactivas. Al igual que con la metodología de hibridación, la técnica de PCR no ha sido aún estandarizada ni validada en el campo para la instrumentación de estudios epidemiológicos sobre hemoparásitos.

Los resultados obtenidos con la prueba de hibridación no radiactiva, muestran que todas las muestras analizadas, con excepción del control positivo, resultaron negativas (Figura 16). Es posible que el límite de sensibilidad observado con esta técnica (10 ng) no sea suficiente para detectar los bajos niveles de parasitemia que presentan los animales portadores. La cantidad de ADN no específico en las muestras procesadas podría haber afectado los resultados obtenidos. Por otra parte, también deben considerarse ineficiencias en cada paso del proceso de hibridación.

Antes de adoptar estas técnicas como herramientas diagnósticas para países tropicales en vías de desarrollo, es importante considerar varios factores. En primer lugar, la técnica debe estar estandarizada y debe ser capaz de detectar

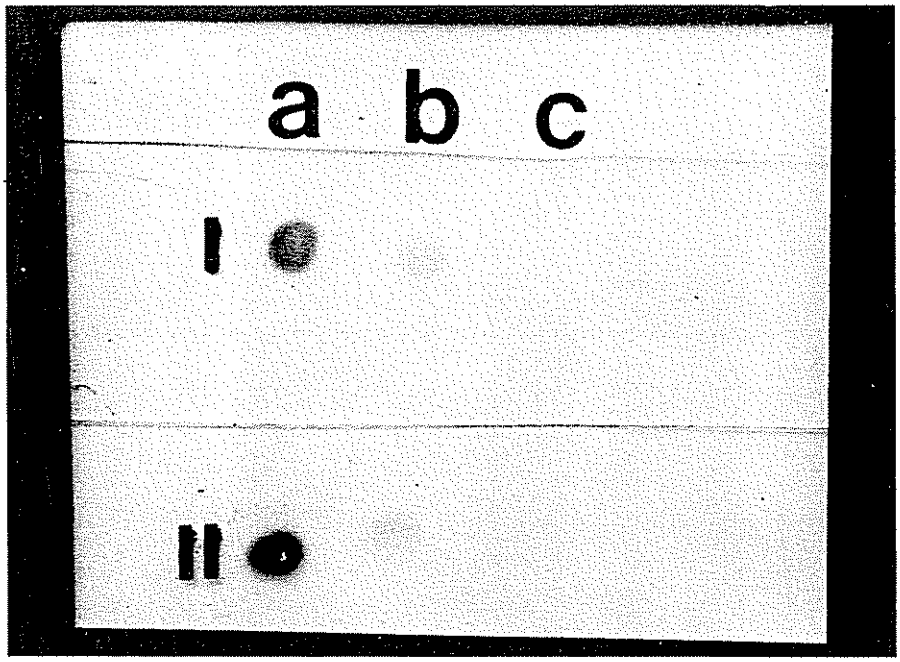

Figura 15. Sensibilidad de la sonda diagnóstica "BoV" marcada con biotina. Las filas I y II corresponden a ADN purificado de B. bovis. Las columnas representan concentraciones seriadas de ADN: a(100 ng), b(10 ng), c(1 ng).

Figura 16. Hibridación no radiactiva con las muestras de los animales evaluados. La flecha indica la positividad del control positivo utilizado.

portadores crónicos en áreas enzoóticas. Igualmente, debe establecerse la relación costo-beneficio de las técnicas; ya que actualmente, éstas (hibridación y PCR) requieren de equipos y materiales costosos.

Finalmente, hay que tener en cuenta que en el corto plazo, las deficiencias en sensibilidad serán corregidas, por lo que los países latinoamericanos deben prepararse y adiestrarse en biotecnología, si desean detectar con precisión el número de reactores en áreas endémicas.

Para países donde la erradicaión de la enfermedad es factible, las sondas de ácidos nucléicos y la técnica de PCR son una valiosa herramienta. El panorama en América Latina es diferente; las condiciones agroecológicas y la situación económica existentes en la región, hacen impráctico considerar una campaña de erradicación. No obstante, las sondas de ácidos nucléicos, además de su utilidad como técnica diagnóstica, tienen otras funciones que también deben considerarse.

4.6. PRUEBA DE AGLUTINACION EN TARJETA PARA ANAPLASMOSIS

De manera complementaria al estudio comparativo, se determinó el porcentaje de reactores positivos a *Anaplasma* con la prueba de aglutinación en tarjeta. Los resultados obtenidos se observan en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Resultados pueba de aglutinación en tarjeta para *Anaplasma marginale*

< 1 AÑO		1-2 AÑOS		> 2 AÑOS	
R75I	-	R130H	+	R9-6	-
R113I	-	R68H	+	R2-C	++
R591	-	R92H	-	R1-10	-
R49I	-	R122H	+++	R70C	+
R91I	-	R54H	-	R132G	-
R124I	-	R86H	++	R8-20	+++
R58I	-	R82H	+	R60	+
R53I	-	R48H	-	R258	-
R7I	+	R94H	++	R0-48	-
R67I	-	R58H	+	R118G	++
R6I	-	R10H	-	R104G	-
R36I	-	R134H	+	R0-12	-
R9I	++	R162H	+	R48G	-
R37I	++	R104H	++	R12G	-
R78I	-	R80H	+	R56G	++

\+ Aglutinación mínima.
++ Aglutinación intermedia.
+++ Aglutinación máxima.

Prevalencia aparente < 1 años = 20%

Prevalencia aparente 1-2 años = 73.3%

Prevalencia aparente > 2 años = 40%

Prevalencia aparente total = 44.4%

4.7. COMPARACION ENTRE PRUEBAS DIAGNOSTICAS PARA *B. bOVIS*

Las pruebas diagnósticas utilizadas para reconocer un agente causal, tienen características particulares. Dentro de estas características cabe mencionar el funcionamiento, la sensibilidad, la complejidad y el costo de cada una. Por ejemplo, los frotis sanguineos y las sondas de ADN reconocen directamente la presencia del parásito y ofrecen la posibilidad de cuantificar la parasitemia. Un diagnóstico positivo con este tipo de prueba es evidencia inequivoca de infección. Resultados negativos, sin embargo, no descartan la posibilidad de infección. Las pruebas serológicas (Aglutinación, IFI, ELISA), a diferencia, detectan cambios secundarios que predicen la presencia o ausencia del agente causal. Específicamente, estas pruebas miden la respuesta inmune humoral de un animal hacia los diferentes agentes infecciosos. La presencia de anticuerpos hacia un determinado organismo no necesariamente indican enfermedad, es posible que estos anticuerpos residuales se deban a una infección previa. En este sentido, también existen probabilidades de resultados falsos positivos con este tipo de pruebas.

Por otra parte, las pruebas serológicas difieren en su capacidad para reconocer los diferentes tipos de inmunoglobulinas. Los anticuerpos IgM son considerablemente mejores aglutinadores que los IgG (Tizard, 1987; Morilla y Bautista, 1986). Por lo tanto, es probable que las pruebas de aglutinación detecten con mayor eficiencia los anticuerpos

IgM. Las ventajas y desventajas de cada prueba, principalmente en lo referente a sensibilidad, especificidad, complejidad y economía, deben tomarse en cuenta al momento de seleccionar una técnica diagnóstica para uso rutinario.

El objetivo final de estas pruebas diagnósticas, ya sea que detecten el parásito o los anticuepos, es el de estudiar la prevalencia de enfermedades hemoparasitarias en zonas ganaderas, por lo que es válido comparar las diversas pruebas diagnósticas para *B. bovis*.

En los cuadros 7, 8, 9 se observan los resultados del diagnóstico para *B. bovis* al emplear las cuatros técnicas dagnósticas. Debido a que no se detectaron reactores positivos con las sondas de ADN, esta técnica no fue incluida en el análisis comparativo.

Los resultados estadísticos obtenidos al comparar la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la prueba de aglutinación en tarjeta (PAT) se muestran en el Cuadro 13. El porcentaje de concordancia observado entre las dos pruebas fue 51.1%. Al realizar los ajustes de concordancia por chance, se obtuvieron coeficientes de PHI y de Kappa con valores de 0.225 y 0.14, respectivamente. Estos resultados indican un ligero nivel de concordancia entre ambas pruebas. El valor de P obtenido para la prueba exacta de Fisher (0.135) indica cierto nivel de asociación, aunque no permite rechazar la hipótesis nula de independencia. Específicamente,

Cuadro 7. Resultados del diagnóstico para *Babesia bovis* (animales < 1 año)

Muestra	Frotis.	PAT	IFI	Sondas ADN
R75I	+	-	+640	-
R113I	-	-	+640	-
R59I	-	-	+80	-
R49I	-	-	+160	-
R91I	+	-	-	-
R124I	+	-	+160	-
R58I	-	-	-	-
R53I	-	+	-	-
R7I	-	-	+80	-
R67I	-	-	-	-
R6I	+	-	+320	-
R36I	-	-	+320	-
R9I	-	-	+80	-
R37I	-	-	+160	-
R78I	+	-	+320	-

IFI: Inmunofluorescencia indirecta. .
PAT: Prueba de aglutinación en tarjeta.

Cuadro 8. Resultados del diagnóstico para *Babesia bovis* (animales 1-2 años)

Muestra	Frotis.	PAT	IFI	Sondas ADN
R130H	-	++	+640	-
R68HI	-	+++	+2560	-
R92H	-	+++	+2560	-
R122H	-	+	+640	-
R54H	-	-	+320	-
R86H	-	-	+320	-
R82H	+	+	+320	-
R48H	-	-	+320	-
R94H	-	+	+80	-
R58H	-	+	+1280	-
R10H	-	++	+640	-
R134H	-	-	+640	-
R162H	-	+++	+1280	-
R104H	-	+	+2560	-
R80H	-	++	+640	-

IFI: Inmunofluorescencia indirecta.
PAT: Prueba de aglutinación en tarjeta.

Cuadro 9. Resultados del diagnóstico para *Babesia bovis* (animales > 2 años)

Muestra	Frotis.	PAT	IFI	Sondas ADN
R9-6H	-	-	+320	-
R2-CI	-	-	-	-
R1-10	-	-	-	-
R70C	-	++	+1280	-
R132G	-	-	+160	-
R8-20	-	-	+160	-
R60	-	-	-	-
R258	-	-	+80	-
R0-48	-	+	+320	-
R118G	-	+++	+640	-
R104G	-	+	+320	-
R0-12	-	-	+80	-
R48G	-	+	+1280	-
R12C	-	-	+160	-
R56G	-	+	+320	-

IFI: Inmunuflurescencia indirecta.
PAT: Prueba de aglutinación en tarjeta.

Cuadro 10. Resumen de los resultados obtenidos con frotis sanguíneos para *Babesia bovis*.

Categoría	Total Analizados	Total Positivos	% Reactores
< 1 año	15	5	33.3%
1-2 años	15	1	6.6%
> 2 años	15	0	0.0%
Total	45	6	13.3%

Cuadro 11. Resumen de los resultados obtenidos con la prueba de PAT para *Babesia bovis*.

Categoría	Total Analizados	Total Positivos	% Reactores
< 1 año	15	1	6.6%
1-2 años	15	11	73.3%
> 2 años	15	6	40.0%
Total	45	18	40.0%

PAT : Prueba de aglutinación en tarjeta.

Cuadro 12. Resumen de los resultados obtenidos con la prueba de IFI para *Babesia bovis*.

Categoría	Total Analizados	Total Positivos	% Reactores
< 1 año	15	11	73.3%
1-2 años	15	15	100.0%
> 2 años	15	12	80.0%
Total	45	38	84.4%

IFI : Inmunofluorescencia indirecta.

el resultado obtenido con la prueba de Fisher, indica que existe una probabilidad del 13.7% de obtener una tabla con un nivel de asociación positiva mayor que el observado, bajo la hipótesis de independencia.

La prevalencia aparente obtenida con la prueba de IFI (84.4%) fue considerablemente mayor a la obtenida con la prueba de PAT (40%). En general, la IFI es considerada una prueba altamente sensible para el diagnóstico de babesiosis (Bidwell *et al.*, 1978; Johnston *et al.*, 1973; Kuttler *et al.*, 1977). Sin embargo, con esta prueba se han señalado algunos resultados falsos positivos debidos principalmente, a reacciones cruzadas entre diversas especies de *Babesia*.

Al respecto, es importante señalar que la prueba de IFI y de PAT difieren en su habilidad para reconocer las diferentes inmunoglobulinas. La prueba de IFI empleada en este estudio detecta únicamente la IgG. La prueba de aglutinación reconoce principalmente IgM y en menor intensidad IgG. Esta característica podría plantear dificultades en la interpretación de resultados con IFI en terneras nacidas en áreas enzoóticas, debido a que los anticuerpos maternos tranferidos a través del calostro consisten primordialmente de IgG (Tizard, 1987). En el caso de infecciones con *Babesia* se ha demostrado la presencia de anticuerpos maternos en terneras hasta los seis meses de edad (Ross y Löhr, 1970). Por estas razones, Todorovic y Carson (1981) consideran la prueba de inmunofluorescencia inadecuada

para la evaluación de terneras en áreas enzoóticas. A su vez, Christensoon (1987) considera posible utilizar la presencia de IgM específicos para *Babesia*, como indicador de que el animal ha adquirido anticuerpos activamente por infección con el parásito. La tranferencia pasiva de anticuerpos en el calostro podria explicar parcialmente la marcada diferencia en prevalencia (73.3% IFI y 6.6% PAT) observada con estas pruebas, al evaluar animales menores de un año.

Otro aspecto que debe considerarse al comparar estas pruebas serológicas, es la cinética de la respuesta inmune humoral para infecciones con *Babesia*. O´Donoghue *et al.*, (1985) utilizando pruebas inmunuenzimáticas específicas para IgM e IgG, encontraron que para infecciones con *B. bigemina* ambas inmunoglobulinas aparecen en el suero a los siete días posinfección y alcanzan un máximo alrededor de los doce días. Después de alcanzado este pico, las IgM tienden a declinar gradualmente mientras que las IgG se mantienen a niveles elevados. Los autores indican que se requiere de más investigaciones para determinar si la dinámica en la respuesta humoral puede ser utilizada para diferenciar confiablemente, entre infecciones recientes o crónicas.

Según Weiland y Reiter (1988), la mayoría de las pruebas de aglutinación rápida son consideradas de baja sensibilidad. Con la prueba de aglutinación en tarjeta para *B. bovis* se obtuvo un 40% de reactores positivos. Esta prevalencia es

considerablemente inferior a la observada con la prueba de IFI. No es posible determinar si esta diferencia es debida a falsos positivos con IFI o a falsos negativos con PAT, sin confirmar los resultados mediante inoculaciones de sangre sospechosa en terneros esplenectomizados susceptibles.

La prueba PAT utilizada en el estudio resultó ser sencilla de efectuar, no requiere de equipos costosos ni de personal entrenado para su ejecución. A su vez, pueden analizarse un alto número de muestras diarias y es fácilmente adaptable a condiciones de campo. Debido a estas características, consideramos la prueba de aglutinación en tarjeta adecuada para conducir evaluaciones epidemiológicas preliminares en áreas endémicas con infraestructura y recursos escazos.

El procedimiento de la prueba de IFA también es sencillo de realizar, sin embargo, sólo permite analizar un limitado número de muestras al día. Asimismo, para su uso rutinario, se reqiuere de una fuente constante para la preparación de antígeno y un microscopio de luz ultra violeta. Para laboratorios donde existan estas facilidades, la prueba de IFA es una buena alternativa para implementar estudios seroepidemiológicos en áreas endémicas, debido principalmente a la alta sensibilidad señalada. No obstante, los resultados obtenidos con terneros o animales vacunados deben ser interpretados con cautela.

Las comparaciones de frotis sanguineos con las pruebas serólogicas (PAT y IFI) se observan en los cuadros 14 y 15. Entre la prueba de PAT y los frotis sanguineos se observó 51% de concordancia. Sin embargo, los valores de Kappa y Phi indican que no existió concordancia superior a la esperada por chance. El resultado de la prueba exacta de Fisher (P >0.21) no permite rechazar la hipótesis de independencia. Los resultados obtenidos al comparar IFI y frotis sanguíneos indican que no se observó asociación ni concordancia más alla de la esperada por chance.

Los frotis sanguíneos son fáciles y económicos de realizar, sin embargo, presentan una baja sensibilidad y su lectura es tediosa, especialmente cuando se trata de varias muestras provenientes de portadores asintomáticos. A pesar de estos incovenientes, los frotis sanguíneos ofrecen algunas ventajas sobre las otras pruebas diagnósticas. En una sola muestra se puede constatar la presencia de diferentes tipos de hemoparásitos y, dependiendo de la calidad del frotis, se puede evaluar algunas patologías (anemias e infecciones). Por estas razones, los frotis son apropiados para complementar estudios epidemiológicos sobre hemoparásitos en el trópico.

Debido a las deficiencias mencionadas anteriormente, las pruebas serológicas no son del todo confiables para detectar infecciones crónicas de babesiosis. Sin embargo, utilizando estas pruebas se puede obtener un panorama aceptable de la situación epidemiológica de la enfermedad en determinada

Cuadro 13. Concordancia entre las pruebas de IFI y PAT para el diagnóstico de *Babesia bovis*.

		IFI +	IFI −	Total	Prevalencia aparente
PAT	+	17	1	18	0.4
	−	21	6	27	
		38	7	45	

Prevalencia aparente 0.84

Concordancia observada	0.51
Indice de Kappa	0.13
Indice de Phi	0.22
Prueba exacta de Fisher	P= 0.137

IFI: Inmunofluorescencia indirecta
PAT: Prueba de aglutinación en tarjeta

Cuadro 14. Concordancia entre las pruebas de PAT y frotis sanguíneos para el diagnóstico de *Babesia bovis*.

		Frotis +	Frotis −	Total	Prevalencia aparente
PAT	+	1	17	18	0.4
	−	5	22	27	
		6	39	45	

Prevalencia aparente 0.13

Concordancia observada	0.51
Indice de Kappa	-0.14
Indice de Phi	0.19
Prueba exacta de Fisher	P= 0.215

PAT: Prueba de aglutinación en tarjeta

Cuadro 15. Concordancia entre las pruebas de IFI y frotis sanguíneos para el diagnóstico de *Babesia bovis*.

		Frotis +	Frotis -	Total	Prevalencia aparente
IF	+	5	35	40	0.84
I	-	0	5	5	
		5	40-	45	

Prevalencia aparente 0.13

Concordancia observada	0.22
Indice de Kappa	0.03
Indice de Phi	0.12
Prueba exacta de Fisher	P= 0.54

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

zona, y así orientar la planificación de proyectos pecuarios en la región. Rodriguez *et al.*, (1988) sugieren la utilización de un sistema de pruebas serológicas simultaneas para la detección de portadores crónicos. En este sentido, puede resultar provechoso el elegir pruebas serológicas que detecten diferentes clases de inmunoglobulinas. De esta manera, se podría interpretar con cierto fundamento, infecciones crónicas o reacciones positivas debidas a transferencia pasiva de anticuerpos o vacunación, donde ésta se practique.

Para estudios epidemiológicos destinados en detectar portadores, es conveniente combinar una prueba serológica con alguna técnica sensible que detecte directamente el parásito. Las sondas de ácido nucléico, por la alta sensibilidad y especificidad mostradas experimentalmente, tienen un gran potencial para ser utilizadas con este fin.

Finalmente, la elección de la tecnica(s) diagnóstica dependerá principalmente, del propósito del estudio. Para estudios epidemiológicos en nuestras condiciones tropicales, se necesitan métodos diagnósticos sensible y específicos, pero sobre todo sencillos y económicos. En todo caso, es necesario tener un conocimiento mínimo del nivel de prevalencia de esta enfermedad, para así planear eficientemente los programas pecuarios a seguir, incluyendo el presupuesto y los recursos humanos necesarios.

5. CONCLUSIONES

1. La prueba de inmunofluorescencia indirecta detectó mayor número de animales positivos, que las demás pruebas empleadas.

2. La prueba de aglutinación en tarjeta resultó ser la más sencilla y rápida de realizar, permitiendo analizar un mayor número de muestras diarias.

3. La metodología y detección no radiactiva utilizadas en este estudio para la prueba de hibridación, no permitió detectar animales portadores.

4. Los frotis sanguíneos detectaron la presencia de los hemoparásitos *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale*.

5. Para áreas tropicales de escazos recursos y sin infraestructura adecuada, consideramos la prueba de aglutinación en tarjeta apropiada para conducir estudios epidemiológicos preliminares.

6. Para estudios más profundos se necesitan pruebas más sensibles o el uso de varias pruebas simultaneamente.

7. Los resultados obtenidos con los métodos diagnósticos utilizados, demuestran que las infecciones con *Babesia bovis* se encuentran ampliamente distribuidas en la Finca Experimental del CATIE, Turrialba, C.R.

6. RECOMENDACIONES

1. Realizar las distintas pruebas diagnósticas en muestras seriadas provenientes de animales preinoculados, para evaluar la capacidad de cada prueba en detectar infecciones recientes y crónicas.

2. Ensayar diferentes metodologías de hibridación y comparar los resultados utilizando métodos de detección radiactivos y no radiactivos con muestras de campo provenientes de zonas endémicas.

3. Una vez estandarizadas las diferentes pruebas diagnósticas, profundizar en la definición de áreas endémicas a babesiosis en los diferentes países centroamericanos, donde se llevan a cabo estudios epidemiológicos sobre hemoparásitos.

4. De lograrse adecuados niveles de sensibilidad con las sondas de ADN, sería conveniente, conocer a qué edad se infectan inicialmente los terneros en áreas enzoóticas.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABOYTES-TORRES, R.; BUENING, G.M.; ALVAREZ, A.; VEGA, C.A. 1989. Recombinant DNA probe construction and application in anaplasmosis research. In Veterinary Hemoparasite Disease Conference, (8, 1989 St Louis, MO.) Proceedings. Missouri. p. 305-316.

_____ 1990. DNA amplification by polymerase chain reaction as a new diagnostic technique. Anaplasmosis Babesiosis Network Newsletter (EE.UU.) 3(1):3.

AMERAULT, T.E.; ROBY, T.O. 1968. A rapid aglutination test for bovine anaplasmosis. Journal of the American Veterinary Association (EE.UU.) 153:1828-1834.

_____; ROSE, J.E.; ROBY, T.O. 1972. Modified card test for bovine anaplasmosis: Evaluation with serum and plasma for experimental and natural cases of anaplasmosis. In Annual Meeting US Animal Health Association (76, 1972, Miami Beach, Florida). Proceedings. Florida. p. 736-744.

AYAYI, S.A. 1978. A survey of cerebral babesiosis in Nigerian local cattle. Veterinary Record (G.B.) 103:564.

BARRY, D.N.; RODWELL, B.J.; TIMMS, P.; McGREGOR, W. 1982. A microplate enzyme immunoassay for detecting and measuring antibodies to *Babesia bovis* in cattle serum. Australian Veterinary Journal (Australia) 59:136-140.

BIDWELL, D.E.; TURP, P.; JOYNER, L.P.; PAYNE, R.C.; PURNELL, R.E. 1978. Comparisons of serological test for babesia in British cattle. Veterinary Record (G.B.) 103:446-449.

BUENING, G.M.; BARBET, A.; MYLER, P.; MAHAN, S.; NENE, V.; McGUIRE, T.C. 1990. Characterization of a DNA probe for *Babesia bigemina*. Veterinary Parasitology (Holanda) 36:11-20.

CALDER, J.A.M.; DAME, J.B.; COURTNEY, C.H. 1990. The application of recombinant DNA technology to epidemiological studies of babesiosis. Anaplasmosis Babesiosis Network Newsletter (EE.UU.) 2(3):5-7.

CALLOW, L.L.; JOHNSTON, L.A.Y. 1963. *Babesia* spp. in the brains of clinically normal cattle and their detection by a brain smear technique. Australian Veterinary Journal (Australia) 39:25-31.

_____; McGAVIN, M.D. 1963. Cerebral babesiosis due to *Babesia argentina*. Australian Veterinary Journal (Australia) 39:15-21.

_____ 1968. A note on homologous strain immunity in *Babesia argentina* infections. Australian Veterinary Journal (Australia) 44:268-269.

CAMARA, L. 1987. Prevalencia da babesiose bovina em gado leiteiro no municipio de garanhuns, estado de pernambuco. Tese de Mestre. Sao Paulo, Bra., Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia da Universidade de Sao Paulo. 122 p.

CARDONA, J.L. 1989. Efectos genéticos directos, maternos, correlación entre ellos, e indicadores de productividad total en ganado Romosinuano bajo condiciones de trópico húmedo. Tesis Mag. Sc. Turrialba, C.R., CATIE. 128 p.

CARSON, C.A.; PHILLIPS, R.S. 1981. Immunologic response of the vertebrate host to *Babesia*. In Babesiosis. Ed. by M. Ristic, J.P. Kreier. New York, Academic Press. p. 411-443.

CHIEVES, L.; WAGNER, G.G.; BYERS, P.T.; FRERICHS,M. 1989. Rapid card test for bovine babesiosis. In National Veterinary Hemoparasite Disease Conference (8, 1989, St. Louis, MO.). Proceedings. MO. p. 341-346

CHRISTENSSON, D.A.; THORBURN, M.A. 1987. Age distribution of naturally acute babesiosis in cattle in Sweden. Acta Veterinaria Scandinavia (Dinamarca) 28:373-379.

_____ 1987. Clinical and serological response after experimental inoculation with *Babesia divergens* of new born calves with and without materńal antibodies. Acta Veterinaria Scandinavia (Dinamarca) 28:381-392.

_____ 1987. A modified IF-test to demostrate IgM antibodies to *Babesia divergens* of cattle. Acta Veterinaria Scandinavia (Dinamarca) 28:361-371.

CORRIER, D.E.; GONZALES, E.F.; BETANCOURT, A. 1978. Current information on the epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Colombia. In Tick-borne diseases and their vectors. Ed. by J.K.H Wilde. Scotland, University of Edinburgh. 114 p.

CURNOW, J.A.; CURNOW, B.A. 1967. An indirect hemagglutination test for the diagnosis of *Babesia* infections in cattle. Australian Veterinary Journal (Australia) 43:286-290.

_____ 1973. Studies on antigenic changes and strain differences in *Babesia argentina* infections. Australian Veterinary Journal (Australia) 47:290-293.

DE ALBA, J. 1984. El bovino Romosinuano en Turrialba. CATIE (C.R.) Serie Técnica. Boletín Técnico no. 13. 16 p.

FIGUEROA, J.V. 1989. Studies on antigenic identification and characterization of the protozoan of cattle B. bigemina. Ph.D. Thesis. Columbia, EE.UU., University of Missouri. 329 p.

_____; BUENING, G.M. 1990. Detection of Babesia bigemina by dot blot hybridization using a non-radioactive DNA probe. In Annual Meeting American Society for Microbiology (1990, Anaheim, California). Proceedings. California. p. 436.

GILLESPIE, D. 1990. The magic and challenge of DNA probes as diagnostic reagents. Veterinary Microbiology (Holanda) 24:217-233.

GINGERAS, T.R.; RICHMAN, D.D.; KWOH, D.Y.; GUATELLI, J.C. 1990. Methodologies for in vitro nucleic acid amplification and their applications. Veterinary Microbiology (Holanda) 24:235-251.

GOFF, W.L.; PALMER, G.H.; MCELWAIN, T.F.; DAVIS, W.C.; McGUIRE, T.C. 1989. Development of ELISA diagnostic test for Babesia infections, using highly immunogenic, species-specific and strain-common surface glycoprteins. In National Veterinary Hemoparasite Disease Conference.(8, 1989, St. Louis, MO.) Proceedings. Missouri p. 352-376.

GOODGER, B.V.; MAHONEY, D.F. 1974. A rapid slide agglutination test for the herd diagnosis of *Babesia argentina* infections. Australian Veterinary Journal (Australia) 50:246-249.

HADRILL, D.J.; BOID, R.; JONES, T.W.; BELLSAKYI. 1990. Bovine babesisosis in Nevis, implications for tick control. Vetrinary Record (G.B.) 126:403-404.

HOLMAN, P.J.; TRIPP, C.A.; RICE-FICHT, A.C.; WAGNER, G.G. 1989. A specific DNA probe for detection of *Babesia bovis* in blood samples. In National Veterinary Hemoparasite Disease Conference (8, 1989, St. Louis, MO.). Proceedings. Missouiri. p. 407.

HOYTE, H.M.D. 1971. Diferential diagnosis of *Babesia argentina* and *Babesia bigemina* infections in cattle using thin blood smears and brain smears. Australian Veterinary Journal (Australia) 47:248-250.

_____ 1976. The tick fever parasites of cattle. Proceedings of the Royal Society of Queensland (Australia). 87: V-xiii.

JAMES, M.A.; CORONADO, A.; LOPEZ, W.; MELENDEZ, R.; RISTIC, M. 1985. Seroepidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Venezuela. Tropical Animal Health and Production (G.B.) 17:9-18.

_____ 1988. Immunology of babesiosis. In Babesiosis of domestic animals and man. Ed. by M. Ristic. CRC Press. p. 119-130.

_____; REDUKER, D.W.; GOFF, W.L.; STILLER, D.; McGUIRE, T.C. 1990. DNA probes distinguish geographical isolates and identify a novel DNA molecule of *Babesia bovis*. Journal of Parasitology (EE.UU.) 76(6):834-841.

JOHNSTON, L.A.Y. 1967. Epidemiology of bovine babesiosis in northern Queensland. Australian Veterinary Journal (Australia) 43:427-432.

_____; TAMMEMAGI, L. 1969. Bovine babesiosis: Duration of latent infections and immunity to *Babesia argentina*. Australian Veterinary Journal (Australia) 45:445-449.

_____; PEARSON, R.V.; LEATCH, G. 1973. Evaluation of an indirect fluorescent antibody test for detecting *Babesia argentina* in cattle. Australian Veterinary Journal (Australia) 49:373-377.

_____; LEATCH, G.; JONES, P.N. 1978. The duration of latent infection and functional immunity in droughtmaster and herford cattle following nautral infection with *Babesia argentina* and *Babesia bigemina*. Australian Veterinary Journal (Australia) 54:14-18.

KAHL, L.P.; ANDERS, R.F.; CALLOW, LL.; RODWELL, B.J.; MITCHELL, G.F. 1982. Development of a solid phase radioimmunoassay for antibody to antigens of *Babesia bovis* infected bovine erythrocytes. International Journal of Parasitology (G.B.) 12:103-106.

KUTTLER, K.L.; ADAMS, L.G.; TODOROVIC, R.A. 1977. Comparisons of the complement-fixaton and indirect fluorescent antibody reactions in the detection of bovine babesiasis. American Journal of Veterinary Research (EE.UU.) 38:(2)153-156.

KUTTLER, K.L. 1981. Diagnosis of anaplasmosis. and babesiosis. An overview. In Anaplasmosis Conference (7, 1981, Starkville, Mississippi). Proceedings. Mississippi. p. 245-268.

_____; CLIFFORD, D.J.; TOURAY, B.N. 1988. Prevalence of anaplasmosis and babesiosis in N'Dama cattle of tha Gambia. Tropical Animal Health and Production (G.B.) 20:37-41.

LATIF, B.M.A.; SAID, M.S.; ALI, S.R. 1979. Effect of age on the immune response of cattle infected with *Babesia bigemina*. Veterinary Parasitology (Holanda) 5:307-314.

LEEFLANG, P.; PERIE, N.M. 1972. Comparative immunofluorescent studies on 4 *Babesia* species of cattle. Research in Veterinary Science (G.B.) 13:342-346.

LEVY, M.G.; CLABAUGH, G.; RISTIC, M. 1982. Age resistance in bovine babesiosis: role of blood factors in resistance to *Babesia bovis*. Infection and Immunity (EE.UU.) 37:1127-1131.

LOPEZ, G.; TODOROVIC, R.A. 1978. Rapid latex agglutination (RLA) test for the diagnosis of *Babesia argentina*. Veterinary Parasitology (Holanda) 4:1-9.

LUDFORD, C.G.; HALL, W.T.K.; SULZER, A.J.; WILSON, M. 1972. *Babesia argentina*, *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*: Antigenic cross reactions. Experimental Parasitology (EE.UU.) 32:317-326.

MAHONEY, D.F.; SAAL, J.R. 1961. Bovine babesiosis: thick blood films for the detection of parasitemia. Australian Veterinary Journal (Australia) 37:44-47.

_____ 1962. Diagnosis of infection by a complement fixation test. Australian Veterinary Journal (Australia) 38:48-52.

_____ 1964. Bovine babesiosis: An assessment of the significance of complement fixing antibody based upon experimental infection. Australian Veterinary Journal (Australia) 40:369-375.

_____ 1967. Bovine babesiosis: Preparation and assesment of complement fixing antigens. Experimental Parasitology (EE.UU.) 20:232-241.

_____ 1969. Bovine babesiasis: a study of factors concerned in transmission. Annals of Tropical Medicine and Parasitology (G.B.) 63:1-14.

MAHONEY, D.F.; ROSS, D.R. 1972. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. Australian Veterinary Journal (Australia) 48:292-298.

_____ 1972. Immune response to hemoprotozoa II. *Babesia spp.* In Immunity to animal parasites. Ed. by E.J.L. Soulsby. Ney York, Academic Press. p. 301-341.

_____ 1975. The diagnosis of babesiosis in Australia. In Workshop on hemoparasites (anaplasmosis and babesiosis) Ed. by E.A. Wells. Cali, Col., CIAT. p. 49-62.

_____; MIRRE, G.B. 1979. A note on the transmission of *Babesia bovis* (syn. B. argentina) by the one-host tick, *Boophilus microplus*. Research in Veterinary Science (G.B.) 26: 253-254.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK,J. 1982. Molecular cloning, a laboratory manual. Ney York, Cold Spring Harbor. 545 p.

MARTIN, S.W.; MEEK, A.H.; WILLEBERG, P. 1987. Veterinary epidemiology; Pinciples and methods. Ames, Iowa State University Press. 343 p.

McLAUGHLIN, G.L.; EDLIND, T.D.; IHLER, G.M. 1986. Detection of *Babesia bovis* using DNA hybridization. Journal of Protozoology (EE.UU) 33(1):125-128.

MILLER D.K.; DIALL, O.; CRAIG, T.M.; WAGNER, G.G. 1984. Serological prevalence of bovine babesiosis in Mali. Tropical Animal Health and Production (G.B.) 16:71-77.

MOLINA, R.A. 1978. Evaluación del potencial productivo de la raza Romosinuano y su uso en cruzamientos para ganado de carne. Tesis Mag. Sc. Turrialba, C.R., UCR/CATIE. 51 p.

MONTENEGRO, S.; JAMES, M.A.; LEVY, M.G.; PRESTON, M.D.; ESPARZA, H.; RISTIC, M. 1981. Utilization of a culture-derived soluble antigen in the latex agglutination test for bovine babesiosis and anaplasmosis. Veterinary Parasitology (Holanda) 8:291-297.

MONTERROSO, K.A. 1989. Epidemiología de la helmintiasis en el ganado Romosinuano en la finca experimental del CATIE. Tesis Mag. Sc. Turrialba, C.R., CATIE. 84 p.

MORILLA, A.; BAUTISTA, C.R. 1986. Manual de inmunología. México, D.F., Editorial Diana. 433 p

O'DONOGHUE, P.J.; FRIEDHOFF, K.T.; VIZCAINO O.G.; WEYRETER, H. 1985. The detection of IgM and IgG antibodies against *Babesia bigemina* in bovine sera using semi-defined antigens in enzyme immunoassays. Veterinary Parasitology (Holanda) 18:1-12.

PALMER, D.A.; BUENING, G.M.; CARSON, C.A. 1982. Cryopreservation of *Babesia bovis* for *in vitro* cultivation. Parasitology (G.B.) 84:567-572.

PEREZ, E.; LEROY, E.; CARRILLO, J.M. 1980. Anaplamosis y piroplasmosis: Estudio epidemiológico en la estación experimental "Los Diamantes". Ciencias Veterinarias (C.R.) 2:7-20.

PINZON, M.E. 1985. Historia de la ganaderia bovina colombiana. Bogotá, Colombia, Banco Ganadero Colombiano. 200 p.

POSTOIAN, S. 1977. Hemosporidiosis y anaplasmosis del ganado bovino; sus transmisores en Cuba. La Habana, Academia de Ciencias de Cuba. 35 p.

PURNELL, D.E.; HENDRY, D.J.; BIDWELL, D.E.; TURP, P. 1976. Microplate enzyme linked immunosorbent assay for antibody to *Babesia divergens* in cattle. Veterinary Record (G.B.) 99:102.

RAYMOND, R.J.; PALMER, G.H.; KNOWLES, D.P. 1990. The polymerase chain reaction: A new tool for detecting hemoparasitic diseases. Anaplasmosis Babesiosis Network Newsletter (EE.UU.) 2(4):1-2.

RODRIGUEZ, O.N.; ESPAINE, L.; RODRIGUEZ, P.; RIVAS, A. 1988. Resultados obtenidos con cuatro pruebas serológicas en el estudio de la anaplasmosis y babesiosis bovina. Revista Cubana de Ciencias Veterinarias (Cuba) 19(2): 85-92.

ROGERS, R.J. 1971. An evaluation of tick fever outbreaks in northern Queensland in recent years. Australian Veterinary Journal (Australia) 47:415-417.

ROSS, J.P.J.; LOHR, K.F. 1968. Serologic diagnosis of *Babesia bigemina* infection in cattle by the indirect fluorescent antibody test. Research in Veterinary Science (G.B.) 9:557-562.

_____; LOHR, K.F. 1970. Transmision and duration of calostral derived antibodies to B. divergens and A. marginale. Zeitschrift fuer Tropenmedizin und Parasitologie (Alemania) 21:401-411.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning, a laboratory manual. 2 ed. Ney York CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 3 v.

SAS INSTITUTE INC. 1985. SAS: User's guide statistics. 5 ed. Cary, NC. 956 p.

SMITH, R.D.; OSORNO, B.M.; BRENER, J.; DE LA ROSA, R.; RISTIC, M. 1978. Bovine babesiosis: severity and reproducibility of *Babesia bovis* infections induced by *Boophilus microplus* under laboratory conditions. Research in Veterinary Science (G.B.) 24: 287-291.

TODOROVIC, R.A.; CARSON, C.A. 1981. Methods for measuring the immunological response to *Babesia*. In Babesiosis. Ed. by M. Ristic, J.P. Kreier. New York, Academic Press. p. 381-410.

TRUEBLOOD, E.S.; PALMER G.H. 1990. Anaplasmosis: A review in diagnostic techniques. Anaplasmosis Babesiosis Network Newsletter (EE.UU.) 2(3):2-4.

TRUEMAN, K.F.; BLIGHT, G.W. 1978. The effect of age on resistance of cattle to *Babesia bovis*. Australian Veterinary Journal (Australia) 54:301-305.

VEGA Y MURGUIA, C.A. 1990. Distribution of anaplasmosis and babesiosis in Latin American countries. Anaplasmosis Babesiosis Network Newsletter (EE.UU.) 2(3): 1-2.

WALTISBUHL, D.J.; GOODGER, B.V.; WRIGHT, I.G.; COMMINS, M.A; MAHONEY, D.F. 1987. An enzyme linked immunosorbent asssay to diagnose *Babesia bovis* infection in cattle. Parasitology Research (EE.UU.) 73:126-131.

WEILAND, G.; REITER, I. 1988. Methods for the measurement of the serological response to *Babesia*. In Babesiosis of domestic animals and man. Ed. by M. Ristic. CRC Press p. 143-162.

Cuadro 1A. Tabla 2x2 e indices de concordancia utilizados para comparar pruebas diagnósticas

TABLA 2X2

PRUEBA B	PRUEBA A		
	Si	No	TOTAL
Si	a	b	f_1
No	c	d	f_2
TOTAL	n_1	n_2	N

$$\% \text{ de concordancia} = \frac{a + d}{N}$$

$$\text{Kappa (K)} = \frac{N(a+d) - (n_1f_1+n_2f_2)}{N^2 - (n_1f_1+n_2f_2)}$$

$$\text{Phi} = \frac{(ad - bc)}{(n_1n_2f_1f_2)^{.5}}$$