

## COMPARACIÓN DE PRUEBAS SEROLÓGICAS PARA EL DIAGNÓSTICO EPIDEMIOLÓGICO DE BABESIOSIS BOVINA TRANSMITIDA POR GARRAPATAS

Irene María Castillo-Pérez<sup>1</sup>, José Juan Lira-Amaya<sup>1</sup>, Roberto Omar Castañeda-Arriola<sup>2</sup>, Antonio Cantú-Covarrubias<sup>3</sup>, Félix Mejía-Estrada<sup>4</sup>, Diego Jesús Polanco-Martínez<sup>1</sup>, Jesús Antonio Álvarez-Martínez<sup>1</sup>, Carmen Rojas-Martínez<sup>1</sup> y Julio Vicente Figueroa-Millán<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup>CENID-Parasitología Veterinaria, INIFAP. Carretera federal Cuernavaca-Cuautla No. 8534, Colonia Progreso, Jiutepec, C. P. 62550, Morelos, México.

<sup>2</sup>Campo Experimental “La Posta”, CIRGOC-INIFAP. Km 22.5 Carretera Veracruz-Córdoba, Paso del Toro Medellín de Bravo, Veracruz, México.

<sup>3</sup>Campo Experimental “Las Huastecas”, CIRNE-INIFAP. Carretera Tampico-Mante Km 55 C. P. 89610 Villa Cuauhtémoc, Tamaulipas, México.

<sup>4</sup>Sitio Experimental “Pichucalco”, CIRGOC-INIFAP. Carretera Pichucalco-Teapa Km 8 C. P. 29520 Pichucalco, Chiapas, México.

✉ Autor de correspondencia: [figueroa.julio@inifap.gob.mx](mailto:figueroa.julio@inifap.gob.mx)

**RESUMEN.** El alto impacto económico ocasionado por la enfermedad transmitida por garrapatas al ganado más importante en México, la babesiosis bovina, ha llevado a la búsqueda y desarrollo de técnicas efectivas que faciliten su diagnóstico y control. El objetivo del presente estudio consistió en comparar las pruebas serológicas Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y el ensayo Inmunoenzimático indirecto (iELISA) para la identificación de bovinos expuestos a *Babesia* spp. Se evaluaron sueros de bovino como controles negativos y positivos, sueros de animales infectados experimentalmente y sueros de animales bajo condiciones de campo. Para el iELISA se utilizaron como antígenos las proteínas recombinantes RAP-1- $\alpha$  (*Babesia bigemina*) y MSA-1 (*B. bovis*). La técnica iELISA demostró altas tasas de sensibilidad y especificidad diagnóstica utilizando el antígeno RAP-1- $\alpha$ . El índice de concordancia kappa ( $\kappa$ ) entre la técnica de IFI (antígeno de *B. bigemina* de cultivo in vitro) y el iELISA (RAP-1- $\alpha$ ) fue de 0.44. Si bien las pruebas serológicas no poseen la capacidad de discriminar exposición de un bovino a *Babesia bovis* y/o *B. bigemina*, se concluyó que el iELISA (RAP-1- $\alpha$ ) es una herramienta con altas tasas de sensibilidad y especificidad diagnóstica que podría conducir a un mejor conocimiento sobre la epidemiología de la babesiosis bovina, brindando información útil para el diseño de estrategias de control de la enfermedad transmitida por garrapatas más importante en México..

**Palabras clave:** *Babesia* spp., iELISA, IFI, Anticuerpos.

### Comparison of serologic tests for epidemiological diagnosis of tick-borne bovine babesiosis

**ABSTRACT.** The high economic impact caused by the most important tick-borne disease in Mexico, bovine babesiosis, has led to search and development of effective techniques that facilitate its diagnosis and control. The objective of this study was to compare the serological indirect fluorescent antibody test (IFAT) and the indirect enzyme-linked immunosorbent assay (iELISA) for the identification of cattle exposed to *Babesia* spp. Negative and positive sera controls, sera from experimentally infected animals and sera from animals under field conditions were evaluated. For the iELISA, the recombinant proteins RAP-1- $\alpha$  (*Babesia bigemina*) and MSA-1 (*B. bovis*) were used as antigens. The technique iELISA demonstrated high sensitivity and diagnostic specificity rates using the RAP-1- $\alpha$  antigen. The kappa index ( $\kappa$ ) between the IFAT (in vitro culture derived *B. bigemina* antigen) and iELISA (RAP-1- $\alpha$ ) was 0.44. Although the serological tests do not have the capacity to discriminate cattle exposed to either *Babesia bovis* and / or *B. bigemina*, it was concluded that iELISA (RAP-1- $\alpha$ ) is a tool with high sensitivity and diagnostic specificity, able to lead to a better knowledge on the epidemiology of bovine babesiosis, providing useful information for the design of control strategies and management of the most important tick-borne disease in Mexico.

**Keywords:** *Babesia* spp., iELISA, IFAT, Antibodies

## INTRODUCCIÓN

La babesiosis bovina es una enfermedad transmitida por garrapatas de gran importancia económica a nivel mundial, sobre todo en las zonas tropicales y subtropicales. Se caracteriza principalmente por causar fiebre, anorexia, hemoglobinuria, anemia hemolítica, aumento en la frecuencia respiratoria y cardíaca, problemas de fertilidad, debilidad y en ocasiones la muerte de los animales infectados (Spickler, 2008). En México, las especies de mayor importancia son *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, las cuales son transmitidas por la garrapata común del ganado *Rhipicephalus microplus* (Bock *et al.*, 2008; Spickler, 2008; OIE, 2013). El diagnóstico de la babesiosis bovina es una importante herramienta para el control, prevención y manejo de la enfermedad, tradicionalmente la técnica más utilizada es la observación microscópica de los parásitos en frotis sanguíneos teñidos con colorante de Giemsa, la cual, a pesar de ser una técnica con alta sensibilidad analítica y bajo costo, necesita de un analista con mucha experiencia para poder realizar la identificación del agente causal, el cual además sólo es posible observarlo durante la fase aguda de la enfermedad (Figuerola *et al.*, 1994; Bock *et al.*, 2008; OIE, 2013). Actualmente, existen métodos moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que resultan ser altamente sensibles y específicos, a partir de los cuales con el uso de iniciadores específicos se lleva a cabo la amplificación del material genético (ADN) de los parásitos. Esta técnica y sus variantes simplifican el diagnóstico de la babesiosis cuando los factores de la infección no son evidentes o cuando las pruebas serológicas resultan en falsos negativos, sin embargo, no suelen ser recomendables para realizar pruebas a gran escala debido a que el riesgo de contaminación es alto y necesariamente deben realizarse en laboratorios que cuenten con el material, los reactivos y el equipo necesario (Mosqueda *et al.*, 2012). Existen técnicas serológicas como la Inmunofluorescencia indirecta (IFI) la cual se emplea para la detección de anticuerpos específicos utilizando fluorocromos que al exponerse a la luz ultravioleta emiten una señal, a pesar de contar con buenos niveles de sensibilidad y especificidad depende de la experiencia del operador, así como también de la buena calidad del antígeno utilizado (OIE, 2013). Por otro lado, el ensayo inmunoenzimático indirecto (iELISA) al igual que la IFI, también permite la detección de anticuerpos circulantes en sangre, entre las principales ventajas con las que cuenta esta técnica son la capacidad para procesar un elevado número de muestras durante una jornada laboral, la objetividad de los resultados y la elevada sensibilidad y especificidad diagnóstica. El objetivo del presente estudio consistió en comparar las pruebas serológicas Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y el ensayo Inmunoenzimático indirecto (iELISA) para la identificación de bovinos expuestos a *Babesia* spp. transmitida por garrapatas *Rhipicephalus microplus*.

## MATERIALES Y MÉTODO

**Muestras.** Se utilizaron muestras de suero positivas (n = 30) y negativas (n = 80) para *Babesia* spp., al igual que muestras recolectadas en el sitio experimental Pichucalco, Chiapas (n = 99), sitio experimental “las Huastecas”, Tamaulipas (n = 99) y campo experimental “La posta” en Veracruz (n = 100), hatos bovinos pertenecientes al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) localizados en zonas hiperendémicas de garrapatas *Rhipicephalus microplus*. El trabajo de laboratorio se llevó a cabo en el CENID-PAVET del INIFAP ubicado en el municipio de Jiutepec, Morelos.

**Prueba de Inmunofluorescencia indirecta (IFI).** Como antígeno de la prueba se utilizaron laminillas extendidas con eritrocitos infectados con *B. bovis* y *B. bigemina* derivadas del cultivo *in vitro* (Rojas *et al.*, 2009). Las muestras de suero se incubaron en una dilución 1:100 y posteriormente, se incubó el anticuerpo secundario anti-IgG de bovino marcado con isotiocianato de fluoresceína en dilución 1:100. Los resultados se obtuvieron después de la observación en un

microscopio de epifluorescencia, tomando como positivo una señal igual o mayor al control positivo de la reacción.

**Ensayo Inmunoenzimático indirecto (iELISA).** Para la evaluación de sueros, se utilizaron como antígeno las proteínas recombinantes RAP-1- $\alpha$  de *B. bigemina* y MSA-1 de *B. bovis* expresadas en *Escherichia coli* y purificadas mediante cromatografía de afinidad en columnas con níquel (Arévalo *et al.*, 2008). El antígeno se utilizó a una concentración de 1.6  $\mu\text{g/mL}$ , las placas se bloquearon con 3% de caseína, después se colocó suero en dilución 1:200, y posteriormente se agregó un anticuerpo secundario anti-IgG de bovino marcado con peroxidasa en dilución 1:10,000. Para la revelación de la reacción fue utilizado el sustrato Tetrametil-Bencidina (TMB), finalmente, la absorbancia ( $A_{650\text{nm}}$ ) se obtuvo en un lector de placas de ELISA, considerando como positivo una  $A_{650\text{nm}}$  igual o mayor a 0.263 para *B. bigemina* y 0.301 para *B. bovis*.

**Análisis estadístico.** Las características de las pruebas de iELISA e IFI se determinaron por Estadística descriptiva mediante tablas de contingencia de 2 x 2, utilizando las siguientes fórmulas (Cuevas *et al.*, 2010). Sensibilidad = (verdaderos positivos /verdaderos positivos + falsos negativos) (100); Especificidad = (verdaderos negativos / falsos positivos + verdaderos negativos) (100); Valor predictivo positivo (VPP) = verdaderos positivos /verdaderos positivos + falsos positivos; Valor predictivo negativo (VPN) = verdaderos negativos / falsos negativos + verdaderos negativos. La fuerza de concordancia entre ELISA indirecto e IFI se determinó en base al Índice kappa ( $\kappa$ ) utilizando Tablas de contingencia 2 x 2 y de acuerdo a la siguiente fórmula (García, 2010): Índice kappa ( $k$ ) =  $Po - P/1 - Pe$ ; donde: ( $Po$ ) = verdaderos positivos + verdaderos negativos/total de muestras; Concordancia esperada ( $Pe$ ) = (verdaderos positivos + falsos positivos) (verdaderos positivos + falsos negativos) /((total de muestras)  $^2$  + ( falsos negativos + verdaderos negativos) (falsos positivos + verdaderos negativos)/(total de muestras)  $^2$ ). Prevalencia = (verdaderos positivos + falsos negativos/verdaderos positivos + falsos positivos + falsos negativos + verdaderos negativos) (100).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La seroprevalencia de anticuerpos anti-*Babesia* spp. de los tres hatos de bovinos determinada mediante iELISA/rMSA-1 y iELISA/rRAP-1 se muestran en la figura 1 y mediante IFI/*B. bovis* y *B. bigemina* en la figura 2. De las 298 muestras de suero analizadas de bovinos expuestos a garrapatas en iELISA los resultados fueron muy similares en cuanto al número de positivos a MSA-1 de *B. bovis* y RAP-1- $\alpha$  de *B. bigemina* en los hatos de Pichucalco y La Posta, no así para el hato de Aldama en donde se registró un mayor número de positivos solamente a RAP-1- $\alpha$ . En el hato de Aldama, se obtuvo un alto número de positivos a *B. bigemina* y a *B. bovis* con la prueba de IFI, lo cual no ocurrió en el iELISA, esto debido a que mientras en iELISA se detectan anticuerpos IgG contra un solo antígeno, en IFI se pueden detectar anticuerpos IgG contra varios antígenos del parásito y a que la D.O. de los controles positivos en iELISA no se acercaron a 1.0, que es el valor utilizado como referencia, por lo que la D.O. de las muestras en la placa pudieran no revelar un valor acertado y debería repetirse el experimento.

A pesar de que no fue posible la diferenciación de animales expuestos a las 2 especies de *Babesia* en las muestras de campo, se demostró que el iELISA es un ensayo útil y confiable para la determinación de la seroprevalencia de *Babesia* spp. en los hatos estudiados y que incluso se puede aprovechar esta reacción cruzada entre *B. bigemina* y *B. bovis* para utilizar una sola proteína recombinante como antígeno en iELISA para la detección de anticuerpos anti-*Babesia* spp. En cuanto a las características de las pruebas, se obtuvo una tasa de sensibilidad y especificidad diagnóstica de 73.33 % y de 81.25 % respectivamente para la prueba de IFI con antígeno de *B.*

*bigemina* derivado de cultivo *in vitro*, valores superiores a los reportados (66 % y 76 %) utilizando el antígeno *B. bovis* derivado de cultivo *in vitro* para la prueba de IFI (Castañeda *et al.*, 2013).

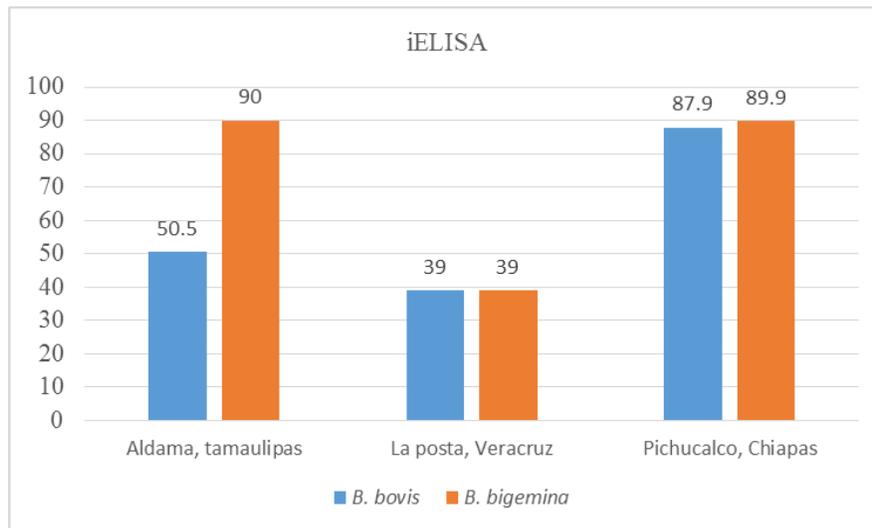


Figura 1. Seroprevalencia obtenida para *B. bovis* y *B. bigemina* utilizando el ensayo inmunoenzimático indirecto (iELISA) en bovinos expuestos a garrapatas *Rhipicephalus microplus* bajo condiciones de campo.

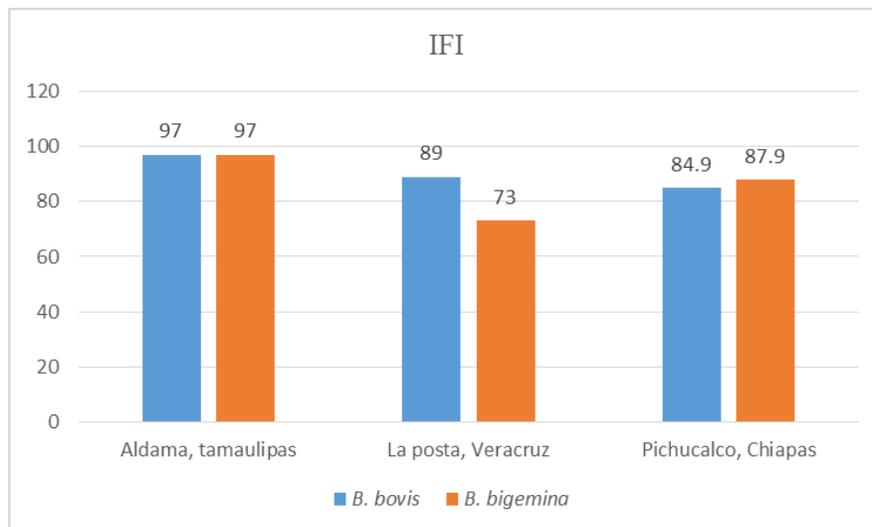


Figura 2. Seroprevalencia obtenida para *B. bovis* y *B. bigemina* utilizando la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en bovinos expuestos a garrapatas *Rhipicephalus microplus* bajo condiciones de campo.

El punto de corte del ELISA indirecto se estableció en 0.263 para RAP-1- $\alpha$  de *B. bigemina* y 0.301 para MSA-1 de *B. bovis* de acuerdo al promedio de los 80 sueros negativos de referencia más dos desviaciones estándar. El margen de las dos desviaciones estándar tiene el propósito de cubrir a más del 50 % de la población sin aumentar el número de falsos positivos. La tasa de sensibilidad y de especificidad diagnóstica para el ELISA indirecto con el antígeno recombinante RAP-1- $\alpha$  de *B. bigemina* fue de 90 % y de 98.75 %. En comparación de las características reportadas para el ELISA indirecto con el antígeno RAP-1- $\alpha$  de *B. bigemina* (Balbuena *et al.*, 2010), se mantuvo el mismo porcentaje de sensibilidad diagnóstica (90 %) y se incrementó el porcentaje de Especificidad diagnóstica de 93.75 % a 98.75 %. En cuanto al VPP también se

incrementó de 84.38 % a 96.43 %, mientras que el VPN se incrementó de 96.15 % a 96.34 %. Este aumento en los porcentajes de especificidad, VPP y VPN fue debido al cambio en el conjugado utilizado en el ensayo descrito anteriormente: Fosfatasa alcalina anti-IgG de bovino con el sustrato p-nitrofenilfosfato (Balbuena *et al.*, 2010); versus conjugado Peroxidasa anti-IgG de bovino con el sustrato TMB utilizado en este estudio. En este estudio, el volumen de reacción se redujo de 100  $\mu$ l a 50  $\mu$ l en comparación con lo descrito (Balbuena *et al.*, 2010), lo que disminuye la cantidad de reactivos utilizados y por tanto, el costo de la prueba. Complementario a esto, se encontró un Índice de concordancia de 0.44 entre el iELISA con el antígeno recombinante RAP-1- $\alpha$  de *B. bigemina* y la prueba de IFI con el antígeno *B. bigemina* de cultivo *in vitro*, lo cual de acuerdo a los criterios de Landis y Koch tiene una fuerza de concordancia moderada. Debido a que no se contaba con la suficiente cantidad de sueros control positivos a *B. bovis*, no fue posible la determinación de las características del iELISA con el antígeno recombinante MSA-1, sin embargo, en estudios realizados anteriormente (Castañeda *et al.*, 2013) se obtuvo una sensibilidad y especificidad diagnóstica de 80 % y 97 % respectivamente utilizando rMSA-1 de *B. bovis* en comparación con IFI/*B. bovis* que obtuvo valores de 66 % y 76 % en el mismo orden. En el presente estudio se demostró que el uso de la proteína recombinante RAP-1- $\alpha$  de *B. bigemina* como antígeno en el ELISA indirecto proporciona mayores tasas de sensibilidad y especificidad diagnóstica en relación con la prueba de IFI con el antígeno *B. bigemina* derivado de cultivo *in vitro*. Sin embargo, no se puede concluir que el ELISA indirecto podrá sustituir por completo a la prueba de IFI, ya que se obtuvo una fuerza de concordancia moderada entre las pruebas y a que los resultados de los sueros de bovinos del Sitio experimental “Aldama” en Tamaulipas así como los del Campo experimental “La Posta” en Veracruz tuvieron una variación importante entre positivos y negativos para la prueba IFI y el ELISA indirecto.

## CONCLUSIÓN

El iELISA/rRAP1- $\alpha$  demostró ser una prueba útil que, aunque no sustituye por completo a la prueba de IFI/*B. bigemina*, resulta más práctica para el monitoreo de la exposición a *Babesia* spp. transmitida por *Rhipicephalus microplus* en los hatos de bovinos, generando con ello información relevante sobre la epidemiología de la enfermedad para el diseño de mejores estrategias de manejo y control de la babesiosis bovina.

## Agradecimientos

Financiado parcialmente por proyectos INIFAP No. 2-1.6-16321431988-P-P.1-1 y CONACYT Problemas Nacionales 2015, clave 1336.

## Literatura Citada

- Arévalo, A. B., Borgonio, C. V. M., Rojas, M. C., Pérez, R. J. J., Álvarez, M. J. A. y J. V. Figueroa. 2008: Clonación y expresión en *Escherichia coli* de RAP-1, GP45 y 12D3: Proteínas de *Babesia bigemina* con potencial uso en prueba diagnóstica. Pp. 555–560. In: *Memorias del Congreso Nacional de Buiatría*.
- Balbuena, G. Y., Vargas, U. P., Arévalo, A. B., Álvarez, M. J. A., Rojas, M. C. y J. V. Figueroa. 2010. Instrumentación de una prueba de ELISA para identificar animales expuestos a infección por *Babesia bigemina*. Pp. 418–423, In: *Memorias XXXIV Congreso Nacional de Buiatría*.
- Bock, R. E., Jackson, L. A., de Vos, A. J. and W. K. Jorgensen. 2008. Babesiosis of cattle. Pp. 281–307. In: A. S. Bowman and P. A. Nuttall. (Eds.). *Ticks Biology, Disease and Control*. Cambridge University Press, New York,

- Castañeda, A. R. O., Vargas, U. P., Álvarez, M. J. A., Rojas, M. C. y J. V. Figueroa. 2013. Prueba de ELISA con antígenos recombinantes para diagnóstico epidemiológico de la babesiosis bovina. Pp. 1–5. In: *Memorias del Congreso Veterinario de León*.
- Cuevas, R. C. y A. Alejo Martínez. 2010. Sensibilidad y especificidad de una prueba. Facultad de Psicología, UNAM. Disponible en: [http://www.psicol.unam.mx/Investigacion2/pdf/SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD.pdf](http://www.psicol.unam.mx/Investigacion2/pdf/SENSIBILIDAD_Y_ESPECIFICIDAD.pdf). (Fecha de consulta: 26-VII-2015).
- García, G. J. J. 2010. Medición de la concordancia. Facultad de Medicina, UNAM. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/censenanza/spiii/spiii/concordanciajj.pdf>. (Fecha de consulta: 28-VII-2015).
- Figueroa, J. V., Chieves, L. P., Johnson, G. S., Goff, W. L. and G. M. Buening. 1994. Chain reaction-based diagnostic assay to detect cattle chronically infected with *Babesia bovis*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 36(1): 47–55.
- Mosqueda, G. J. J., Neri, F. A., Ramos A. J. A., Canto A. G. J. y M. Camacho-Nuez. 2012. Estrategias genómicas y moleculares para el control de la babesiosis bovina. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 3(1): 51–59.
- Organización Mundial de Salud Animal (OIE). 2013. Capítulo 2.4.2 Babesiosis bovina. *En Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres (Manual Terrestre)*. OIE, Paris, Francia. Consultado el 28 de septiembre del 2015 [en línea] página web de la OIE.
- Rojas, M. C., Figueroa, M. J. V. y J. A. Álvarez M. 2009. *Cultivo in vitro de Babesia bovis y Babesia bigemina*. Folleto técnico No. 5 Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria INIFAP. Jiutepec, Morelos.
- Spickler, A. R. 2008. Babesiosis bovina The Center for Food Security & Public Health. Disponible en: [http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/babesiosis\\_bovina.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/babesiosis_bovina.pdf). (Fecha de consulta: 5-IX-2015).