



VE0000049

DIAGNÓSTICO DE LA BABESIOSIS BOVINA (*Babesia bovis*) MEDIANTE LA PRUEBA DE ELISA

Edgar León Arenas, Ana Teresa Guillén y Maglene Silva.

Laboratorio de Parasitología, Instituto de Investigaciones Veterinarias,
CENIAP/FONAIAP

RESUMEN

Entre los años 1994 y 1996 se validó un estuche (kit) de ELISA indirecta, elaborado por la FAO/AIEA para el diagnóstico de la babesiosis bovina producida por *Babesia bovis*. Se procesaron un total de 547 sueros sanguíneos de bovinos entre 9 y 18 meses de edad, procedentes de zonas de alto y bajo riesgo a la enfermedad. El punto de corte que se obtuvo para la prueba fue de 0.178 (DO) y los porcentajes obtenidos dentro de la población estudiada fueron de 48% de animales positivos y un 52% de bovinos negativos. Los resultados confirman que nuestra población bovina se encuentra en áreas de inestabilidad enzoótica para la babesiosis bovina.

Palabras claves: Inmunoensayos, diagnóstico, *Babesia bovis*.

INTRODUCCIÓN

La babesiosis bovina es una enfermedad causada por un parásito protozoario de localización intraeritrocítica, perteneciente al género *Babesia*. Estos hemoparásitos son transmitidos de un animal a otro por las garrapatas. La enfermedad se caracteriza usualmente por temperatura muy elevada, anemia de tipo hemolítico y en los casos severos síntomas nerviosos y muerte.

La babesiosis es particularmente impactante en los países en desarrollo, porque representa uno de los obstáculos a vencer cuando se pretende mejorar los rebaños con razas lecheras de alta producción. En Venezuela la enfermedad está presente en forma enzoótica por lo que teóricamente están amenazados aproximadamente 3 millones de cabezas.

Resultados serológicos anteriores, utilizando inmunofluorescencia indirecta, nos indican que la *Babesia bovis* está ampliamente distribuida en el país. Por lo tanto, con el fin de utilizar las bondades en cuanto a sensibilidad, especificidad, rapidez y facilidad de ejecución de la prueba de ELISA para el diagnóstico de la babesiosis bovina, se condujo este ensayo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Establecido que en Venezuela esta enfermedad es enzoótica, que afecta más a la ganadería de leche, que no existen zonas libres de la enfermedad, que la práctica de la premunición y la infección más tratamiento son comunes, se decidió muestrear usando como criterios de selección de los animales, aquellos bovinos de razas lecheras en edades comprendidas entre los 9 y 18 meses, para garantizar que los resultados positivos de un animal respondieron a una infección natural a campo y no a la presencia de anticuerpos calostrales ni tampoco a ninguna de las prácticas mencionadas anteriormente.

Por la condición de enfermedad enzoótica y por los resultados obtenidos anteriormente por Toro *et al* (1983), se dividió al país en dos zonas: zona de alto riesgo, definida como aquellas fincas lecheras situadas en áreas por encima de los 2000 metros sobre el nivel del mar (msnm), con poca presencia de vectores durante el año y donde la movilización de animales (salida/entrada) fuese poca o nada. La segunda zona corresponde a las de bajo riesgo, donde las fincas están situadas por debajo de los 2000 msnm con alta presencia de garrapatas durante el año y alto grado de movilización de animales.

Para este trabajo se recolectaron 699 sueros de diez estados del país, discriminados de la forma siguiente: 60 de Aragua, 24 de Cojedes, 93 de Falcón, 67 de Guárico, 142 de Lara, 26 de Mérida, 45 de Portuguesa, 48 de trujillo, 44 de Yaracuy y 150 de Zulia. A todos los sueros recolectados para el estudio epidemiológico se les guardó información relevante: edad, sexo, raza, historia de vacunación en la finca, ubicación geográfica del rebaño, identificación de campo y de laboratorio, propietario y dirección de la finca, tamaño del rebaño.

El estuche (kit) para la prueba, está basado en la técnica indirecta de ELISA para determinar la presencia de anticuerpos contra *Babesia bovis* en suero sanguíneo, según la técnica descrita por Waltisbuhl *et al* (1987).

El antígeno se obtiene por la lisis de eritrocitos no infectados con solución salina hipotónica. Luego se concentran los infectados por centrifugación y se liberan los parásitos por sonicación. Más tarde se realiza una ultracentrifugación y por último una clarificación de la oxihemoglobina a través de una columna de CM-sephadex, (Goodger *et al*, 1983). El conjugado es comercial y consiste en antiinmunoglobulinas G bovinas obtenidas en conejos, unidas a la enzima peroxidasa.

El sustrato es peróxido de hidrógeno al 3% y el cromógeno es ortofenildiamina OPD. Se utilizaron como controles, sueros de animales ya probados por el laboratorio de la OIEA. Los controles consisten en un suero positivo fuerte C++, un suero positivo débil C+, un suero negativo C- y un control de conjugado Cc: todos en réplicas.

El antígeno fue pasivamente adherido a la microplaca de poliestireno, seguido por un bloqueo. Se le adicionaron los sueros problema en 2 réplicas y después de la incubación se añadió el conjugado, el cual reaccionaría con los anticuerpos (si éstos

están presentes). Por último con el agregado de la solución substrato/cromógeno aparece un producto coloreado que se lee por espectrofotometría (multiscan) con filtro de 492 nm.

Todos los sueros que posean un valor igual o mayor a tres veces el valor de porcentaje de positividad (PP) de esa placa, serán considerados positivos. Los valores menores constituirán sueros negativos.

Las lecturas de las placas se realizan por medio de un programa para computadores, especialmente diseñado para la asociación FAI/AIEA conocido como BAEIA versión 1.01, el cual automatiza las lecturas y los cálculos de los resultados de las pruebas.

Las ventajas de este programa se resumen en:

El computador controla el multiscan o lector de ELISA

- Los datos son automáticamente, transferidos, almacenados y manipulados por el computador.

Los datos expresados en valores de densidad óptica (DO) o en porcentajes de positividad (PP) para el control positivo fuerte C++ y los expresados en (PP) para los otros tres controles, son usados para determinar si la prueba ha sido realizada dentro de los límites de variabilidad aceptados.

El porcentaje de positividad (PP), viene dado por la siguiente fórmula:

$$PP = \frac{\text{Valor DO C++}}{\text{Promd DO C++}} \times 100$$

Debido a que las variaciones en los valores de DO y PP tienden a tener una distribución normal, la casa productora del kit ha calculado e incluye en el estuche los valores límites, así por ejemplo, los límites para los controles son:

C++ Li=0,850 Ls= 1.150

C= Li=0,230 Ls= 0,430

C- Li=0,000 Ls= 0,100

Cc Li=0,000 Ls= 0,040

Li=Límite inferior Ls= Límite superior

La secuencia de criterios para la aceptación de la placa sería:

1. Comparar los valores de DO de las cuatro réplicas de los controles con los límites de aceptación. Las cuatro réplicas o mínimo tres, deben caer dentro de los valores límites.

2. Comparar los valores promedios de las cuatro réplicas de cada control con los límites preestablecidos por el kit. Mínimo tres de las cuatro réplicas deben estar dentro de los valores límites.

La determinación del valor de decisión diagnóstica se calcula de varias formas, pero lo fundamental es que dicho valor sea representativo de la población a la cual se está aplicando. En este caso se aplicó el criterio de doblar el valor promedio de los animales pertenecientes a la población negativa, es decir doblar el valor de los negativos conocidos.

Todos los sueros problemas se probaron por duplicado y la variación entre estos dos valores es inversamente proporcional a la precisión en la realización de la prueba.

Para que los valores de cualquier suero problema y su réplica sean aceptados, ambos valores deben estar por encima o por debajo del valor de decisión diagnóstica establecido.

Los sueros problemas necesitan ser repetidos solamente en aquellos casos en que los valores obtenidos estén uno por encima y el otro por debajo del valor del punto de corte.

Una vez utilizados los criterios descritos, todos aquellos sueros cuyos valores de DO (ambas réplicas) estén por encima del valor de corte serán considerados positivos, por debajo de ese valor serán considerados negativos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se procesaron por el ensayo inmunoenzimático 547 sueros, con los siguientes resultados: el promedio de densidad óptica obtenido dentro del total de población negativa resultó 0.089 sd \pm 0.057: con un intervalo de confianza para alfa de 0,032-0,146.

Si como premisa se asume que, para las muestras positivas el valor de línea de corte es el doble del valor promedio de la población negativa, tendremos $0,089 \times 2 = 0,178$. Lo que significa que todo valor igual o por encima de éste será positivo. Utilizando este valor y un 20% de PP, se obtuvo para el total de sueros procesados los siguientes resultados: 263 sueros positivos a *Babesia bovis*, lo que representa un 48% del total de muestras. Los 284 animales restantes resultaron negativos por esta prueba de ELISA, para un porcentaje del 52%.

Por lo tanto, las posibilidades de brotes de la enfermedad son altas, especialmente en los casos de movilización de animales dentro del país o la introducción de bovinos de otras latitudes.

La técnica descrita evidenció una mayor sensibilidad al ser comparada con otras pruebas serológicas utilizadas en el laboratorio, en encuestas anteriores. Además la gran cantidad de sueros por prueba que se pueden procesar, redundan en ahorro de tiempo y mayor eficiencia.

Es recomendable la utilización de la técnica como rutina de diagnóstico en el laboratorio; así como también, realizarla con antígenos autóctonos tanto de *Babesia bovis* como de *Babesia bigemina* con los fines de no depender de material importado.

BIBLIOGRAFÍA

- DUZGUN, A. Wright, I.G. Walthisbuhl, D.J., Gale, K.R., Goodger, B.V., Dargie, J.D., Alabay, M., and Cerci, H. (1991). An ELISA for the diagnosis of Babesia bovis infection utilizing a synthryic, Babesia bovis derived antigen. *Vet. Parasitol.* 39:225-291.
- GOODGER, B.V. Wright, I.G. Walthisbuhl, D.J. (1983). The lysate from bovine erythrocytes infected with Babesia bovis. Analysis of antigens and a report on their immunogenicity when polymerized with glutaraldehyde. *Z. Parasitenkd.* 69: 473-482.
- MOORHOUSE, P.D. and HUGH-JONES. M.E. (1981). Serum banks. *The Veterinary bulletin.* 51:(5).277-290.
- TOTO BENÍTEZ M., LEÓN ARENAS, E. PALLOTA, F., LOPEZ, G., GARCÍA J.A., y RUIZ, A. (1983). Prevalencia de las hemoparasitosis en bovinos del estado Guárico. *Vet. Tropical.* 8:21-35.
- VIZARD, A.L., ANDERSON, G.A. and GASSER, r.b. (1990). Determination of the optimum cut-off value of a diagnostic test. *Preventive Veterinary Medicine,* 10:137-143.
- WALTISBUHL, D.J., GOODGER, B.J., WRIGHT, I.G., COMMINS. M.A. and MAHONEY, D.F. (1987). An enzyme linked immunosorbent assay to diagnose Babesia bovisinfection in cattle, *Parasitol. Res.* 73:126-131.