

BABESIOSIS BOVINA

RESUMEN

La babesiosis bovina es una enfermedad del ganado bovino transmitida por las garrapatas y causada por parásitos protozoarios como Babesia bovis, B. bigemina y B. divergens. Rhipicephalus (Boophilus) microplus, el vector principal de B. bovis y B. bigemina, se encuentra ampliamente distribuido en países tropicales y subtropicales. El vector más importante de B. divergens es Ixodes ricinus. Otros vectores importantes que pueden transmitir estos agentes patógenos son Haemaphysalis y otras especies del género Rhipicephalus sp.

Detección del agente: *En el caso de los animales vivos, se deben preparar gotas finas o gruesas de sangre extraída de un vaso sanguíneo periférico o lecho capilar pequeño, por ejemplo, del extremo de la cola. Se pueden poner de manifiesto parásitos en animales muertos, mediante el examen microscópico de frotis de sangre periférica, encéfalo, riñón, músculo cardíaco, bazo o hígado, siempre que no se encuentren en avanzado estado de descomposición. Los frotis se fijan con metanol, se tiñen con Giemsa al 10% durante 15–30 minutos, y se examinan a $\times 800$ – 1000 con aceite de inmersión. Existen pruebas sensibles de la reacción en cadena de la polimerasa con las que se pueden detectar y diferenciar especies de Babesia en el ganado bovino.*

Pruebas serológicas: *El enzimoimmunoanálisis (ELISA) y el ELISA de competición (C-ELISA) con proteínas de merozoito de B. bovis y B. bigemina recombinantes ha sustituido en gran medida la inmunofluorescencia indirecta (IFAT) para la detección de anticuerpos contra Babesia sp., debido a la eficiencia del procesado y la objetividad en la interpretación de los resultados. La IFAT se ha utilizado mucho en el pasado, pero las reacciones serológicas cruzadas hacen difícil el diagnóstico a nivel de especie en B. bigemina. También se han desarrollado pruebas inmunocromatográficas (ICT) con proteínas de merozoito de B. bovis y B. bigemina recombinantes y se utilizan en estudios epidemiológicos de estas infecciones.*

Requisitos para las vacunas: *En varios países se preparan vacunas con cepas vivas o atenuadas de B. bovis, B. bigemina o B. divergens a partir de la sangre de animales donantes infectados o bien de cultivos in-vitro. Las vacunas se presentan en forma congelada o refrigerada. Las vacunas congeladas tienen la ventaja de que permiten un control exhaustivo post-producción de cada lote, pero tienen un periodo de validez post-descongelación muy corto en comparación con la vacuna refrigerada. El riesgo de contaminación de esta vacuna derivada de la sangre hace que sea esencial un minucioso control de la calidad, aunque su coste puede ser prohibitivo.*

Aunque los métodos de producción in-vitro ofrecen obvias ventajas en cuanto a bienestar animal, también pueden producirse vacunas utilizando sistemas de producción in-vivo siguiendo rigurosamente las directrices de bienestar animal. Tanto si se utilizan sistemas in-vivo como sistemas in-vitro, es fundamental ceñirse a los protocolos de producción para garantizar una uniformidad de la vacuna y para evitar posibles cambios en la virulencia, la inmunogenicidad y la consecuente capacidad de protección asociada a pases continuos de Babesia spp. tanto en cultivo celular como en terneros esplenectomizados.

En el caso de las vacunas vivas contra Babesia, es prudente, por motivos de seguridad, limitar su uso a terneros de menos de un año de edad, puesto que es estos animales todavía tengan inmunidad inespecífica. Los animales que se vacunen a edades posteriores deben mantenerse bajo vigilancia y tratarse con fármacos que maten el parásito en caso de que aparezcan acontecimientos adversos.

La inmunidad protectora aparece en 3–4 semanas. Una dosis única de vacuna suele proporcionar inmunidad de por vida.

A. INTRODUCCIÓN

La babesiosis bovina está causada por parásitos protozoarios del género *Babesia*, orden Piroplasmida, phylum Apicomplexa. De las especies que afectan al ganado bovino, dos – *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* – se encuentran ampliamente distribuidas y son muy importantes en África, Asia, Australia, y el continente americano, desde el sur de EE.UU. hasta el norte de Argentina. *Babesia divergens* es económicamente importante en algunas partes de Europa. Un estudio reciente describe babesiosis clínica grave causada por *Babesia* sp. Mymensingh en una vaca (Sivakumar *et al.*, 2018). Sin embargo, estudios posteriores serán esenciales para confirmar experimentalmente la virulencia de esta especie novedosa de *Babesia* y para determinar su distribución geográfica.

Ciertas especies de garrapatas son vectores de *Babesia* (Bock *et al.*, 2008). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* es el vector principal de *B. bigemina* y *B. bovis*, y se encuentra ampliamente distribuido en los trópicos y subtrópicos. El vector de *B. divergens* es *Ixodes ricinus*. Otros vectores importantes son *Haemaphysalis*, así como otras especies de *Rhipicephalus*.

Babesia bigemina presenta la distribución más amplia, pero *B. bovis* en general es más patógena que *B. bigemina* o que *B. divergens*. Las infecciones por *Babesia bovis* se caracterizan por fiebre alta, ataxia, anorexia, shock circulatorio general y, a veces, también signos nerviosos como resultado del secuestro de eritrocitos infectados en capilares cerebrales. Puede aparecer anemia y hemoglobinuria en una fase más avanzada de la enfermedad. En casos agudos, la parasitemia máxima (porcentaje de eritrocitos infectados) en la sangre circulante es inferior al 1%. Esto contrasta con las infecciones por *B. bigemina*, donde la parasitemia a menudo supera el 10% y puede llegar a un 30%. En las infecciones por *B. bigemina*, los signos más importantes consisten en fiebre, hemoglobinuria y anemia. En las infecciones por *B. bigemina* no se produce secuestro intravascular de eritrocitos infectados. La parasitemia y el aspecto clínico de las infecciones por *B. divergens* son algo parecidos a los de las infecciones por *B. bigemina* (Zintl *et al.*, 2003).

Los animales infectados desarrollan una inmunidad de por vida frente a la reinfección por las mismas especies. También existen indicios de un grado de protección cruzada en los animales inmunes a *B. bigemina* frente a las infecciones posteriores por *B. bovis*. Los terneros casi nunca presentan signos de la enfermedad después de la infección, independientemente de la especie de *Babesia* implicada y del estado inmunitario de las madres (Bock *et al.*, 2008; Zintl *et al.*, 2003).

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la babesiosis en ganado bovino y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Detección del agente¹						
Examen microscópico	–	–	–	+++	+	–
PCR	+++	+++	+++	+++	+++	–
Detección de respuesta inmunitaria						
ELISA	+++	+++	+++	–	+++	+++
IFAT	++	++	++	–	++	+++
ICT	–	–	–	–	++	+

Clave: +++ = recomendado para este propósito; ++ = recomendado pero tiene limitaciones; + = adecuado en muy pocas circunstancias; – = no adecuado para este propósito.
 PCR = reacción en cadena de la polimerasa; ELISA = enzimoimmunoanálisis;
 IFAT = inmunofluorescencia indirecta; ICT = prueba inmunocromatográfica.

1 Se recomienda aplicar una combinación de los métodos de identificación del agente a la misma muestra clínica.

1. Detección del agente

1.1. Examen microscópico directo

El método tradicional de identificación del agente patógeno en animales infectados es el examen microscópico de gotas gruesas y finas teñidas con tinción de Giemsa, Romanowsky (tinción de Giemsa al 10% con solución salina tamponada con fosfato (PBS) o tampón de Sörensen a un pH de 7,4). La sensibilidad de la gota fina es tal que permite detectar parasitemias de incluso 1 parásito en 10^6 hematíes. La diferenciación de especies es buena en las gotas finas pero deficiente en gotas gruesas, que son más sensibles. Normalmente, esta técnica es adecuada para la detección de las infecciones agudas, pero no para la detección de los portadores donde las parasitemias son en su mayoría muy bajas. La identificación y diferenciación del parásito puede mejorarse empleando un colorante fluorescente, como el naranja de acridina, en lugar del Giemsa.

Las muestras de animales vivos deben ser preferiblemente extensiones de sangre fresca tomada de capilares, como los de la punta de la oreja o de la cola, ya que *B. bovis* es más frecuente en sangre capilar. Los parásitos *Babesia bigemina* y *B. divergens* se encuentran distribuidos uniformemente por los vasos sanguíneos. Si no se pueden realizar extensiones de sangre fresca tomada de capilares, hay que tomar sangre estéril de la yugular en un tubo con anticoagulante, como la heparina de litio o el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). La sangre debe mantenerse refrigerada, preferiblemente a 5°C, hasta que se envíe al laboratorio. Las extensiones de sangre se secan al aire, se fijan en metanol absoluto durante 10-60 segundos, y se tiñen con el colorante Giemsa al 10% durante 15–30 minutos. Es preferible teñir las extensiones de sangre lo antes posible después de su preparación para asegurar una definición adecuada del colorante. Las extensiones de sangre se preparan depositando una gotita de sangre (de unos 50 µl) sobre un porta limpio de vidrio y extendiéndola sobre una pequeña área mediante un movimiento circular con la esquina de otro porta. Esta gota no se fija en metanol sino que simplemente se seca al aire, se fija con calor a 80°C durante 5 minutos y se tiñe con tinción de Giemsa al 10%. Esta técnica es más sensible para la detección de *Babesia* sp., porque los hematíes se lisan y los parásitos se concentran, pero la diferenciación de especies es más difícil. Las extensiones de sangre sin teñir no deben guardarse en soluciones con formalina, ya que esta puede afectar a la calidad de la futura tinción. La humedad también afecta a la calidad de la tinción.

Las muestras de animales muertos deben consistir en gotas finas, así como en frotis de corteza cerebral, riñón (de animal recién muerto), bazo (cuando haya una evidente descomposición), músculo cardíaco, pulmón e hígado (Bock *et al.*, 2006). Los frotis de órganos se preparan presionando un porta limpio sobre la superficie de un corte fresco del órgano o aplastando una pequeña muestra del tejido (en concreto de corteza cerebral) entre dos portas limpios desplazándolos uno respecto a otro longitudinalmente para dejar una película de tejido sobre la superficie de cada uno. A continuación, el frotis se seca al aire (en climas húmedos, ayudado mediante un calentamiento suave), se fija durante 10-60 segundos en metanol absoluto, y se tiñe durante 15-30 minutos en Giemsa al 10%. Este método resulta especialmente adecuado para el diagnóstico de las infecciones por *B. bovis* utilizando frotis de corteza cerebral, pero es poco fiable si las muestras se recogen 24 o más horas después de que se haya producido la muerte, sobre todo en climas más cálidos. Sin embargo, a veces pueden detectarse parásitos en sangre tomada de capilares del extremo distal de las extremidades uno o más días después de la muerte.

Todos los frotis teñidos se observan con aceite de inmersión utilizando (como mínimo) lentes oculares de 10x y objetivo de 100x. *Babesia bovis* es un parásito pequeño, localizado normalmente en posición central en el eritrocito. Mide aproximadamente 1–1,5 µm de largo y 0,5–1,0 µm de ancho, y habitualmente se encuentra en parejas que forman un ángulo obtuso. *Babesia divergens* es también un parásito pequeño y morfológicamente muy parecido a *B. bovis*. Sin embargo, las parejas que forman ángulos obtusos suelen estar localizadas en el borde del eritrocito. *Babesia bigemina* suele tener forma de pera, pero es posible observar muy diversas formas. Normalmente es un parásito mucho más grande (de 3–3,5 µm de largo y 1–1,5 µm de ancho), y a menudo se encuentra a modo de pares que forman un ángulo agudo, o dispuestos casi en paralelo. En los casos agudos, la parasitemia por *B. bovis* apenas alcanza el 1% (medida en la circulación general, y no en la sangre capilar), pero con *B. bigemina* y *B. divergens* es habitual hallar parasitemias mucho más altas.

1.2. Pruebas de diagnóstico basadas en el ácido nucleico

Las pruebas de diagnóstico basadas en el ácido nucleico son muy sensibles, en concreto para detectar *B. bovis* y *B. bigemina* en ganado bovino portador (Buling *et al.*, 2007; Criado-Fornelio, 2007). Se ha observado que las técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son incluso 1.000 veces más sensibles que la microscopía para la detección de *Babesia* sp., y que permiten detectar el parásito a parasitemias de entre el 0,001% y el 0,0000001% (1 parásito por cada

10⁹ hematíes) (Criado-Fornelio, 2007). Se han descrito varias técnicas de PCR que permiten detectar y diferenciar especies de Babesia en las infecciones de portadores (Buling *et al.*, 2007; Criado-Fornelio, 2007). También se han descrito pruebas de PCR para diferenciar entre distintas cepas de *B. bovis*. La aplicación de la transferencia de línea inversa, en la cual se hibridan productos de la PCR a sondas de oligonucleótidos específicas de especie unidas a membrana, para Babesia y, más recientemente, dos métodos de PCR cuantitativa (Criado-Fornelio *et al.*, 2009) han permitido la detección simultánea de múltiples especies, incluso en infecciones en estado de portador. Sin embargo, en la actualidad las PCR no se prestan bien para pruebas a gran escala y son poco prometedoras para sustituir a las pruebas serológicas como método de elección para los estudios epidemiológicos. Las PCR son útiles como pruebas confirmativas, y en algunos casos como pruebas reguladoras. Recientemente, se ha desarrollado un método de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) y un método de LAMP múltiple (Iseki *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2012) que tienen mayor sensibilidad que la PCR, aunque debe abordarse la optimización para la detección de cepas de distintas partes del mundo. Este último método requiere un equipo caro y sofisticado, mientras que la LAMP solo requiere un baño de agua común y los resultados pueden leerse a simple vista. La LAMP, por lo tanto, es un método de amplificación del ADN rentable, sencillo y rápido, adecuado para el diagnóstico a pie de explotación. No obstante, debe tenerse cuidado para evitar la contaminación cruzada, puesto que la LAMP suele tener una sensibilidad muy alta.

1.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa para la detección simultánea de *B. bovis* y *B. bigemina*

Dado que la sensibilidad de la PCR anidada es mayor que la de la PCR, la PCR anidada es una prueba adecuada para el comercio internacional, sobre todo para *B. bovis*, que normalmente provoca una parasitemia baja o estados de portador. Aunque con la PCR anidada pueden utilizarse varios genes, para *B. bovis* y *B. bigemina* se han utilizado RAP-1 y AMA-1, respectivamente.

i) Extracción de ADN

- a) Se extrae una muestra de sangre total mediante un tubo de extracción de sangre con sistema de vacío que contenga EDTA.
- b) Se transfieren 200 µl de sangre bovina a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml
- c) Se añade un ml de PBS frío y la mezcla se centrifuga a 1.000 **g** durante 5 minutos a 4°C. Este paso se repite tres veces.
- d) El sobrenadante se desecha y el sedimento se vuelve a suspender en 200 µl de PBS.
- e) Tras medir las concentraciones de ADN con un espectrofotómetro, las muestras pueden guardarse a -20°C.

Obsérvese que las muestras de ADN también se pueden preparar a partir de muestras de sangre infectada empleando kits comerciales de extracción de ADN.

ii) PCR anidada múltiple

El siguiente procedimiento analítico es una adaptación de Figueroa *et al.* (1993) con modificaciones para la detección de *B. bovis* y *B. bigemina* mediante PCR anidada múltiple basado en *RAP-1* y *Spel-Aval*, respectivamente.

- a) Para la primera ronda de PCR, se preparan 9 µl de mezcla de reacción que incluyan 1 µl de tampón de reacción 10x, cada una de las dNTP a una concentración 200 µM, 0,5 µM de los cebadores externos directos (BoF y BiIA) e inversos (BoR y BiIB), 0,5 unidades de ADN polimerasa Taq (Applied Biosystems), y agua doblemente destilada.
- b) Se añade 1 µl de la muestra de ADN extraído a la mezcla de reacción y a continuación se somete a los siguientes ciclos de PCR. La activación enzimática inicial a 95°C durante 5 minutos va seguida de 35 ciclos, cada uno de los cuales consiste en un paso de desnaturalización a 95°C de 30 segundos, un paso de hibridación a 55°C de 1 minuto y un paso de extensión a 72°C de 1 minuto. El paso final de elongación tiene lugar a 72°C durante 10 minutos.
- c) Para la ronda anidada de la PCR, se transfiere 1 µl del producto de la primera PCR a un tubo de PCR nuevo que contenga una mezcla de reacción con la misma composición que la de la primera PCR excepto por los cebadores externos, que se sustituyen por los cebadores internos directos (BoFN y BiIAN) e inversos (BoRN y BiBN).

iii) Lista de cebadores de la PCR

Parásito	PCR	Cebador	Secuencia (5'-3')
<i>B. bovis</i>	Primaria	BoF	CAC-GAG-GAA-GGA-ACT-ACC-GAT-GTT-GA
		BoR	CCA-AGG-AGC-TTC-AAC-GTA-CGA-GGT-CA
	Anidada	BoFN	TCA-ACA-AGG-TAC-TCT-ATA-TGG-CTA-CC
		BoRN	CTA-CCG-AGC-AGA-ACC-TTC-TTC-ACC-AT
<i>B. bigemina</i>	Primaria	BiIA	CAT-CTA-ATT-TCT-CTC-CAT-ACC-CCT-CC
		BiIB	CCT-CGG-CTT-CAA-CTC-TGA-TGC-CAA-AG
	Anidada	BiIAN	CGC-AAG-CCC-AGC-ACG-CCC-CGG-TGC
		BiIBN	CCG-ACC-TGG-ATA-GGC-TGT-GTG-ATG

a) Los productos de la PCR se separan mediante electroforesis (100 V) en geles de agarosa al 1,5% y tampón Tris/borato/EDTA /TBE) 0,5x. A continuación, los geles se tiñen con una tinción fluorescente para ADN, se visualizan con luz ultravioleta y se fotografían.

iv) Interpretación de los resultados

- a) Las muestras positivas deben dar productos de la PCR del tamaño esperado (170 pb en el caso de *B. bigemina* y 298 pb en el caso de *B. bovis*), similar al de los controles positivos.
- b) La prueba debe repetirse si el control positivo permanece negativo o si los controles negativos dan positivo.

Nota: Aunque el procedimiento descrito arriba es para la PCR múltiple, para detectar tanto *B. bovis* como *B. bigemina* también puede realizarse una PCR anidada simple utilizando solo los respectivos cebadores de la PCR.

Sivakumar *et al.* (2012) observaron que los cebadores que tienen por diana el fragmento de restricción *SpeI*-Aval de *B. bigemina* también pueden amplificar ADN de *B. ovata*. Por lo tanto, debe procederse con cautela al analizar muestras de ADN que procedan de regiones en las que *B. ovata* sea endémica.

Recientemente, se ha desarrollado un método nuevo y mejorado para el diagnóstico basado en genes de apocitocromo b (CYTb) de *B. bovis* y *B. bigemina* (Romero-Salas *et al.*, 2016), el cual permite la detección de apenas 0,1 fg de ADN de cada agente patógeno del género *Babesia*, y presenta 100 y 1000 veces mayor sensibilidad para detectar *B. bovis* y *B. bigemina*, respectivamente, que los métodos descritos por Figueroa *et al.* (1993).

1.3. Cultivo *in vitro*

Se han utilizado métodos de cultivo *in-vitro* para poner de manifiesto la presencia de infecciones por *Babesia* sp. en estado de portador (Holman *et al.*, 1993), y *B. bovis* también ha sido multiplicada en cultivo. La parasitemia mínima detectable por este método dependerá, en gran medida, de los métodos del equipo del que se disponga y de las habilidades del técnico, pero podría ser de apenas 10^{-10} (Friedhoff & Bose, 1994) lo cual hace de este un método muy sensible, con una especificidad del 100% para poner de manifiesto la infección.

2. Pruebas serológicas

La prueba de la inmunofluorescencia indirecta (IFAT) se ha utilizado mucho en el pasado para detectar anticuerpos contra *Babesia* sp., aunque tiene poca especificidad para la detección de *B. bigemina*. En la IFAT para *B. bigemina* las reacciones cruzadas con anticuerpos frente a *B. bovis* constituían un especial problema en las áreas donde coexistían los dos parásitos. La IFAT también tiene los inconvenientes del bajo rendimiento de

las muestras y de la subjetividad. La prueba de fijación del complemento ya no se utiliza para el diagnóstico de estas infecciones.

El enzoinmunoanálisis (ELISA) ha sustituido en gran parte a la IFAT como prueba de diagnóstico de elección para *Babesia* sp. debido a la objetividad en la interpretación de los resultados y a la capacidad de procesar grandes cantidades de muestra por día. Se ha evaluado ampliamente un ELISA para el diagnóstico de la infección por *B. bovis* en el que se utiliza un antígeno del merozoíto (Molloy *et al.*, 1998). Se ha observado una alta sensibilidad y especificidad de esta prueba tanto en Australia como en Zimbabwe, aunque los umbrales variaron entre laboratorios (Molloy *et al.*, 1998). También se han desarrollado ELISA indirectos (Bono *et al.*, 2008; Boonchit *et al.*, 2006) y de competición (Goff *et al.*, 2003) utilizando antígenos recombinantes de la superficie del merozoíto y asociados a roprorio de *B. bovis*. El ELISA de competición se ha validado más ampliamente en distintos laboratorios, y el antígeno ha sido reconocido por anticuerpos de distintas partes de todo el mundo (Goff *et al.*, 2006). En ciertas situaciones, al utilizar antígenos recombinantes se ha observado una reducción de la especificidad del ELISA indirecto para *B. bovis* (Bono *et al.*, 2008).

Todavía no se dispone de un ELISA bien validado para *B. bigemina* a pesar de los esfuerzos de varios investigadores de distintos laboratorios. Los ELISA para la detección de anticuerpos contra el antígeno crudo de *B. bigemina* suelen tener poca especificidad. Los ELISA de competición desarrollados y validados en Australia y EE.UU. (Goff *et al.*, 2008) parecen ser los únicos que se utilizan sistemáticamente. A diferencia de *B. bovis*, en cuya infección se considera que los animales quedan como portadores de por vida tras la infección, en el caso de *B. bigemina* la infección podría desaparecer y los anticuerpos podrían disminuir por debajo del umbral de negatividad en cuestión de meses tras la infección (Goff *et al.*, 2008). Pueden obtenerse resultados inconcluyentes situados alrededor del umbral de negatividad, y este fenómeno puede suponer un reto diagnóstico en animales en los que los títulos están disminuyendo al desaparecer la infección.

También se han desarrollado ELISA para *B. divergens* utilizando antígeno derivado de cultivo, *Meriones* o ganado bovino, pero no parece que haya sido validado internacionalmente (Zintl *et al.*, 2003).

La prueba inmunocromatográfica (ICT) es un método de diagnóstico rápido que detecta anticuerpos contra un antígeno específico mediante anticuerpos y antígenos específicos impregnados en una tira analítica con membrana de nitrocelulosa. La ICT es un ensayo rápido y fácil de leer muy necesario en condiciones de campo, sobre todo en países en vías de desarrollo, en los que el equipamiento y la electricidad son limitados. Se ha desarrollado una ICT para el serodiagnóstico rápido simultáneo de babesiosis bovinas causadas por *B. bovis* y *B. bigemina* (Kim *et al.*, 2008).

2.1. Enzoinmunoanálisis indirecto para *Babesia bovis*

La preparación del antígeno se basa en una técnica descrita por Waltisbuhl *et al.* (1987). Se recoge sangre infectada (normalmente de un animal con una parasitemia del 5–10%) de un ternero esplenectomizado, en EDTA. En primer lugar, se centrifuga la sangre, y el plasma se retira y se guarda para utilizarlo más tarde. Los eritrocitos infectados también pueden obtenerse de cultivos *in vitro*. A continuación, los hematíes se lavan tres veces en cinco volúmenes de solución salina tamponada con fosfato (PBS), y se concentran células infectadas mediante una lisis diferencial de células no infectadas en solución salina hipotónica. Las células infectadas son más resistentes a la lisis en soluciones salinas hipotónicas que las células no infectadas.

Para hallar la mejor concentración para un tipo determinado de sangre infectada, se prepara una serie de soluciones salinas hipotónicas, cuyas concentraciones oscilen entre el 0,35% y el 0,50% de NaCl en incrementos del 0,025%. A continuación, se añaden cinco volúmenes de cada solución salina a un volumen de hematíes concentrados, se mezcla suavemente y se deja reposar durante 5 minutos. Después, se centrifugan las mezclas y se aspiran los sobrenadantes. Se añade un volumen igual de plasma (el que se ha guardado de la sangre inicial) a cada tubo con hematíes concentrados, y los contenidos de los tubos se mezclan. Se preparan extensiones finas de sangre a partir de cada una de estas mezclas de células hemáticas resuspendidas, se fijan en metanol y se tiñen con tinción de Giemsa. Estas extensiones se examinan al microscopio para determinar qué solución salina lisa más hematíes no infectados pero deja intactos los hematíes infectados. Se debe poder lograr >95% de infección en los hematíes intactos restantes.

A continuación, la mayor parte de los hematíes concentrados se lisan de forma diferencial con la solución salina óptima, se centrifugan y se retira el sobrenadante. El sedimento (>95% de los hematíes concentrados) se lisa en agua destilada a 4°C, y los parásitos se precipitan a 12.000 **g** durante 30 minutos. El precipitado se lava al menos tres veces en PBS mediante resuspensión y centrifugación a 4°C hasta que el sobrenadante contenga muy poca hemoglobina. A continuación, se vuelve a suspender en uno de dos volúmenes de PBS a 4°C, y se sonica en volúmenes adecuados a potencia media durante 60-90 segundos. El material sonicado se ultracentrifuga (105.000 **g** durante 60 minutos a 4°C), y el sobrenadante, que contiene el antígeno de merozoíto solubilizado, se guarda.

El sobrenadante se mezcla con un volumen igual de glicerol y se guarda en alícuotas de 2–5 ml a –70°C. Para la alícuota de trabajo es aceptable un almacenaje de corta duración a –20°C.

2.1.1. Procedimiento analítico

El siguiente procedimiento analítico se basa en el descrito por Molloy *et al.* (1998) con ciertas modificaciones.

- i) Se añaden 100 µl de la solución de antígeno (con el antígeno normalmente diluido a 1/400 a 1/1600 en tampón carbonato 0,1 M (pH 9,6) a cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos de poliestireno. La placa se cubre y se incuba durante toda la noche a 4°C.
- ii) La solución con todo el antígeno no unido se retira y los pocillos se bloquean durante 1 hora a 20–25°C añadiendo 200 µl de una solución de caseinato de sodio al 2% en tampón carbonato (pH a 9,6).
- iii) Tras el bloqueo, los pocillos se lavan tres veces con PBS que contenga un 0,1% de Tween 20 (PBST); a continuación, se añaden 100 µl de suero bovino problema diluido y suero bovino control (diluido a 1/100 en PBST que contenga un 2% de leche descremada en polvo) a cada pocillo, y las placas se incuban durante 30 minutos a 20–25°C con agitación.
- iv) El paso del lavado consiste en cinco lavados con PBST. Durante el último lavado, la placa se agita 5 minutos.
- iv) A continuación, se añaden 100 µl de suero con anticuerpos anti IgG bovina marcados con peroxidasa diluido en PBST que contenga un 2% de leche descremada en polvo, y las placas se agitan durante 30 minutos más a 20–25°C. (NB: algunos lotes de leche descremada en polvo podrían contener inmunoglobulinas que pueden interferir con los conjugados anti IgG bovina, y antes de utilizarlos debe comprobarse si son adecuados).
- vi) Los pocillos se lavan como se ha descrito anteriormente, y a cada pocillo se añaden 100 µl de sustrato de peroxidasa/cromógeno (ABTS 2,2'-Azino-bis-[ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico]) a una concentración de 0,3 g/litro en un tampón de glicerina/ácido cítrico; con una concentración de H₂O₂ de 0,01%). La reacción del sustrato se deja continuar hasta que la absorbancia de un suero control positivo fuerte incluido en cada placa se acerque a 1.
- vii) En este punto, la reacción se detiene utilizando un volumen igual (100 µl) de ABTS de Solución de Parada de Peroxidasa (a una concentración de trabajo de un 1% de dodecilsulfato de sodio). En un plazo de 30 minutos se lee la absorbancia a 414 nm en una placa de microtitulación. La 3,3',5,5'-tetrametil bencidina (TMB) también es un cromógeno adecuado, pero se detiene con volúmenes iguales de ácido fosfórico (H₃PO₄) 1M y se lee a una longitud de onda de 450 nm.

Para controlar la variación inter-placas, se incluyen sueros controles positivos y negativos en cada placa. A continuación, se bareman los sueros problema respecto al control positivo. Los resultados de absorbancia de ELISA se expresan como porcentaje de este control positivo (porcentaje de positividad). Deben determinarse los valores umbral positivo y negativo en cada laboratorio analizando la mayor cantidad posible de sueros control positivos y negativos.

Cada lote de antígeno y conjugado deberá titularse mediante un sistema de doble entrada o método del tablero de ajedrez. Con esta prueba, se pueden detectar anticuerpos al menos 4 años después de una sola infección. Debe haber un 95–100% de reacciones positivas en animales inmunes a *B. bovis*, un 1–2% de falsos positivos con sueros negativos, y <2% de falsos positivos con animales inmunes a *B. bigemina*.

2.2. Enzimoimmunoanálisis de competición para *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*

El formato de estas pruebas se basa en el descrito por Goff *et al.* (2003). Las pruebas se describen conjuntamente por la similitud de los procesos. También se han desarrollado con fines de validación como pruebas estándares internacionales e incluyen antígeno recombinante purificado secado en pocillos de microtitulación para facilitar la estandarización, manipulación y distribución, así como la utilización por parte de distintos laboratorios y la comparación en distintas condiciones (Goff *et al.*, 2006; 2008). Estas pruebas se basan en un epítipo de célula B específico de especie, muy conservado y repetido en tándem situado en la terminación C de la proteína 1 asociada a ropro (RAP 1), expresada como péptido de fusión de la tioredoxina marcado con histidina. El antígeno purificado expresado se recubre y a continuación se seca en pocillos de microtitulación; la concentración óptima

de antígeno y de anticuerpo monoclonal (MAb) viene determinada por la titulación en bloque. En el caso de *B. bovis*, los sueros positivos inhiben la unión del MAb específico del epítipo BABB75A4; en el caso de *B. bigemina*, los sueros positivos inhiben la unión del MAb 64/04.10.3.

Se han calculado la especificidad, la sensibilidad y los valores predictivos de estos ELISA de competición, y se ha comparado la fiabilidad de la prueba entre laboratorios. En el caso de *B. bovis* (Goff *et al.*, 2006), en base a un análisis del receptor operador aleatorio (ROC), se escogió un 21% de inhibición como el valor umbral para definir lo que es una muestra positiva y una negativa. Utilizando este valor, la especificidad fue del 100% y la sensibilidad del 91,1%, y el valor predictivo positivo, del 100%; El valor predictivo negativo varió con la prevalencia, oscilando entre el 99% para una prevalencia del 10%, y el 55,6% para una prevalencia del 90%. Se ha evaluado un ELISA de competición con antígeno recombinante 2c (rMSA-2c) de la superficie del merozoito en *B. bovis* en Argentina y se ha observado una especificidad del 98% y una sensibilidad del 96,2% (Dominguez *et al.*, 2012). En el caso de *B. bigemina* (Goff *et al.*, 2008), utilizando una prevalencia hipotética del 25% y una inhibición umbral para un valor negativo del 16%, la prueba tuvo una especificidad del 98,3% y una sensibilidad del 94,7%. Cuando la inhibición umbral se aumentó al 21%, la especificidad fue del 100%, pero la sensibilidad se redujo al 87,2%; el valor predictivo negativo con una prevalencia del 25% se redujo pasando del 98,2% al 95,9%; y el valor predictivo positivo aumentó, pasando del 94,9% al 100%. Para una inhibición del 21%, el valor predictivo negativo varió pasando del 97,0% para una prevalencia del 10%, a un 48,2% para una prevalencia del 95%; los valores predictivos positivos fueron del 90,7% (para una prevalencia del 10%), del 95,7% (para una prevalencia del 15%) y del 100% para cualquier prevalencia más alta. Ambas pruebas parecen cumplir las normas exigidas para la aplicación a nivel internacional.

2.3. Prueba de inmunofluorescencia indirecta

2.3.1. Preparación del antígeno

Se preparan portas con antígeno a partir de sangre extraída de la vena yugular o de cultivo *in-vitro*, si puede ser cuando la parasitemia se encuentra entre el 2% y el 5%.

Se deposita la sangre en un tubo con el anticoagulante adecuado (citrato de sodio o EDTA), y a continuación se lava al menos tres veces en cinco a diez volúmenes de PBS para eliminar proteínas plasmáticas contaminantes y, en concreto, inmunoglobulinas del hospedador. Después de lavar, los hematíes infectados se resuspenden en dos volúmenes de PBS a los que se habrá añadido un 1% de seroalbúmina bovina (BSA). La BSA se emplea para adherir los hematíes al porta. Preferentemente, se preparan unas extensiones monocapa depositando una gota de sangre sobre un porta limpio, el cual se centrifuga en una citocentrífuga. El sistema proporciona frotis muy uniformes. Como alternativa, se pueden preparar gotas finas mediante la técnica convencional (arrastrando una gota de sangre con el extremo de otro cubreobjetos). También resulta cómodo el uso de portaobjetos de microscopio comerciales que contienen pocillos. Las extensiones se secan al aire o se fijan en un horno de aire caliente durante 5 minutos a 80°C o en acetona seca fría durante 1 minuto a -20°C. A continuación, las extensiones de sangre fijadas se recubren (por ejemplo, con papel de aluminio o cinta adhesiva de papel marrón) de forma que no entre aire, y se guardan a -70°C hasta que sean necesarias (durante un máximo de 5 años).

2.3.2. Procedimiento analítico

Los sueros problema se diluyen a 1/80 en PBS. Los sueros se pueden utilizar con o sin inactivación térmica a 56°C durante 30 minutos. Los portas se marcan con 8–10 divisiones con un bolígrafo de aceite para crear divisiones hidrofóbicas. Con una pipeta de precisión, se añaden 5–10 µl de cada dilución de suero a cada cuadrado de prueba sobre un disco de papel de filtro. A continuación, las preparaciones se incuban a 37°C durante 30 minutos, en una cámara con humedad. En el caso de los controles, se utilizan sueros negativos y débilmente positivos (a la misma dilución de 1/80) en cada porta problema.

Tras la incubación, los portas se lavan con un chorro suave de PBS para eliminar los discos de papel de filtro. Los portas se empapan durante 10 minutos en rejillas en PBS, y después 10 minutos en agua. La PBS y el agua se hacen circular mediante un agitador magnético. A continuación, se añade anticuerpo anti Ig bovina marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) a cada cuadro de prueba. La dilución adecuada depende de la titulación de cada nuevo lote de conjugado, y el intervalo de trabajo suele situarse entre 1/400 y 1/1200. Los anticuerpos de conejo, asno y pollo conjugados suelen ser más adecuados para este fin que los anticuerpos de cabra. Actualmente, fluorocromos más nuevos constituyen opciones mejores debido a su mejorada fotoestabilidad y brillo, y una gama más amplia de pH (para más información, contacte con los Laboratorios de Referencia de la OIE). Los portas con el

conjugado se incuban de nuevo a 20–25°C durante 30 minutos, y se lavan como se ha explicado anteriormente. Los portas húmedos se montan con cubreobjetos en una solución que contenga 1 parte de glicerol y 1 parte de PBS, y se examinan mediante microscopía de fluorescencia estándar. Un técnico experto puede examinar unas 150 muestras al día.

2.4. Otras pruebas

Durante los últimos años se han descrito otras pruebas serológicas, como ELISA puntual, un ELISA de porta, pruebas de aglutinación en látex y en tarjeta y una prueba inmunocromatográfica (ICT) (Kim *et al.*, 2008). Estas pruebas muestran niveles aceptables de sensibilidad y especificidad para *B. bovis* y, en el caso del ELISA puntual y de la ICT, también para *B. bigemina*. Sin embargo, ninguna de estas pruebas parece haber sido adoptada para el diagnóstico sistemático en laboratorios distintos de aquellos en los que se realizaron el desarrollo y validación iniciales. Por tanto, en el futuro deberá determinarse cuál es la adaptabilidad de estas técnicas a los laboratorios de diagnóstico sistemático.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

1. Antecedentes

El ganado bovino desarrolla una infección de larga duración tras una única infección por *B. bovis*, *B. divergens* o *B. bigemina*. Este hecho se ha explotado en ciertos países para inmunizar el ganado bovino contra la babesiosis (Bock *et al.*, 2008; Mangold *et al.*, 1996; Pipano, 1997). La mayor parte de estas vacunas contiene cepas especialmente escogidas de *Babesia*, principalmente *B. bovis* y *B. bigemina*, y se producen en instalaciones de producción financiadas por el gobierno como servicio a la industria ganadera, en concreto en Australia, Argentina, Sudáfrica e Israel. Algunos otros países poseen la capacidad de producir vacuna a una menor escala. En Irlanda también se ha utilizado con éxito una vacuna experimental contra *B. divergens* preparada a partir de sangre de *Meriones unguiculatus* (gerbil de Mongolia) infectado (Zintl *et al.*, 2003).

Se ha preparado una vacuna muerta contra *B. divergens* a partir de la sangre de terneros infectados (Zintl *et al.*, 2003), pero se dispone de poca información sobre el nivel y la duración de la inmunidad que confiere. También se han desarrollado otras vacunas experimentales que contienen antígenos de *Babesia* spp. producidas *in vitro* (Montenegro-James *et al.*, 1992), pero no está claro cuál es el nivel y la duración de la protección contra cepas heterólogas de desafío. A pesar de la caracterización de distintas proteínas del parásito y del genoma de *B. bovis* (Brayton *et al.*, 2007) y de los considerables esfuerzos realizados a nivel internacional para lograr la identificación de antígenos candidatos a formar parte de la vacuna, las posibilidades de conseguir vacunas recombinantes contra *Babesia* spp. siguen siendo escasas (Brown *et al.*, 2006). Hasta ahora no se ha comercializado ninguna vacuna de subunidades eficaz.

Las directrices de producción de vacunas veterinarias se describen en el capítulo 1.1.8 *Principios de producción de vacunas veterinarias*. Las directrices que se muestran aquí y en el capítulo 1.1.8 pretenden ser de carácter general y pueden completarse mediante requisitos nacionales o regionales.

Este apartado trata la producción de vacunas vivas contra la babesiosis, principalmente las dirigidas contra infecciones del ganado bovino por *B. bovis* y *B. bigemina*. La producción implica la infección de terneros con cepas escogidas, y la utilización de los hematíes infectados como vacunas (Bock *et al.*, 2008), o métodos de cultivo *in-vitro* para producir parásitos para las vacunas (Mangold *et al.*, 1996). Los terneros que se utilizan para la infección por estas cepas o, en el caso de los métodos *in vitro*, como fuente de suero y hematíes para cultivo, deben estar libres de agentes infecciosos que puedan ser transmitidos por productos derivados de su sangre. En el caso de *B. divergens*, puede utilizarse sangre de gerbos (*Meriones unguiculatus*) infectados en lugar de sangre bovina. Los indicios de que se producen cambios en la inmunogenicidad al realizar repetidos pases en terneros, y de que se produce una posible deriva antigénica durante el mantenimiento de *B. bovis* en cultivo a largo plazo deben tratarse reduciendo el número de pases o de subcultivos realizados antes de volver al estabilizado del inóculo de trabajo para la vacuna. Aunque los métodos de producción *in-vitro* ofrecen obvias ventajas en cuanto a bienestar animal, también pueden producirse vacunas utilizando sistemas de producción *in-vivo* siguiendo rigurosamente las directrices de bienestar animal. En Argentina se han producido cerca de 400.000 dosis de vacuna al año bajo la autoridad del SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria) utilizando cultivo *in-vitro*, y en Australia se han producido hasta 850.000 dosis al año bajo la autoridad de la APVMA (*Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority*) utilizando técnicas *in-vivo*.

Se pueden preparar vacunas contra *Babesia bovis* y contra *B. bigemina* tanto en forma congelada como refrigerada, dependiendo de la demanda, las vías de transporte y la disponibilidad de nitrógeno líquido o hielo seco. La preparación de vacuna congelada (Bock *et al.*, 2008; Mangold *et al.*, 1996; Pipano, 1997) permite un exhaustivo análisis de cada lote post-producción. Sin embargo, tiene un periodo de validez muy corto una vez descongelada, es más cara de producir y es más difícil de transportar que la vacuna refrigerada. El posible riesgo

de contaminación de esta vacuna preparada a partir de sangre hace que el control de calidad pre y post-producción sea crucial, pero es posible que por este motivo en algunos países de zonas endémicas no se disponga de recursos financieros suficientes para la producción.

2. Descripción de la producción de vacuna

2.1. Características del inóculo

2.1.1. Cepas disponibles en todo el mundo

Se han utilizado con éxito cepas de Australia atenuadas de *B. bovis* y *B. bigemina* para vacunar ganado bovino en África, Sudamérica y el sudeste asiático (Bock *et al.*, 2008). Se dispone de cepas transmisibles por garrapatas y no transmisibles por garrapatas. También se ha desarrollado una cepa de *B. divergens* con poca virulencia en *Meriones* (Zintl *et al.*, 2003).

2.1.2. Aislamiento y purificación de cepas locales

Las cepas de *B. bovis*, *B. divergens* y *B. bigemina* que están libres de agentes extraños, como *Anaplasma*, *Eperythrozoon*, *Theileria*, *Trypanosoma* y distintos agentes víricos y bacterianos son más fáciles de aislar alimentando garrapatas infectadas en ganado bovino esplenectomizado susceptible. Los vectores y los modos de transmisión de cada especie son distintos, y estos rasgos se pueden utilizar para diferenciar las especies (Friedhoff & Bose, 1994).

Babesia spp. también se puede aislar de ganado bovino infectado mediante subinoculación de sangre en terneros susceptibles esplenectomizados. Un importante inconveniente de este método es la dificultad de diferenciar *Babesia* de contaminantes como *Anaplasma* o *Eperythrozoon*. El aislamiento de *B. divergens* es un proceso relativamente sencillo debido a la susceptibilidad de *Meriones* (Zintl *et al.*, 2003). Puede utilizarse el mantenimiento de cepas aisladas *in vitro* (Jorgensen & Waldron, 1994) para eliminar la mayoría de contaminantes, pero no para distinguir *Babesia* spp. Puede utilizarse una quimioterapia selectiva (por ejemplo, azul de tripano al 1% para eliminar *B. bigemina*) con el fin de obtener *B. bovis* puro de una infección mixta por *Babesia*, mientras que un pase rápido en terneros susceptibles permitirá el aislamiento de *B. bigemina*.

2.1.3. Atenuación de cepas

Se han comunicado varias formas de atenuar *Babesia* spp. El método más fiable de reducir la virulencia de *B. bovis* es el pase rápido de la cepa por terneros susceptibles esplenectomizados. La atenuación no está garantizada, pero suele tener lugar tras 8 a 20 pases por ternero (Bock *et al.*, 2008). La virulencia de *B. bigemina* disminuye durante una larga permanencia del parásito en animales infectados de forma latente. Esta característica se ha utilizado para obtener cepas avirulentas infectando terneros, esplenectomizándolos 6 a 12 semanas después de la inoculación y a continuación utilizando los parásitos resultantes para repetir el procedimiento (Bock *et al.*, 2008). Tras un largo mantenimiento *in vitro* se ha logrado la atenuación de *B. divergens* en *M. unguiculatus* (Zintl *et al.*, 2003).

Se ha intentado la atenuación de *Babesia* spp. con irradiación, pero los resultados han sido variables. De forma similar, se ha utilizado experimentalmente el mantenimiento *in vitro* en medios modificados.

Deben guardarse cepas avirulentas como estabilizado para pruebas de inocuidad y para la futura utilización como inóculo primario en la producción de vacuna.

2.1.4. Preparación y conservación del inóculo primario

Se conservan cepas avirulentas fácilmente como sangre infectada congelada en nitrógeno líquido o hielo seco. El dimetilsulfóxido (DMSO) y la polivinilpirrolidona (PVP) MW 40.000 (Bock *et al.*, 2008) son los crioprotectores recomendados, puesto que permiten la administración intravenosa tras la descongelación del inóculo primario.

Para el procedimiento mediante DMSO, se recoge sangre infectada y se refrigera a 4°C. A continuación, se aplica crioprotector (DMSO 4M en PBS), removiendo lentamente, hasta llegar a una proporción final de sangre:crioprotector de 1:1 (la concentración final de DMSO es 2 M). Este procedimiento de dilución se lleva a cabo en un baño de hielo, y la sangre diluida se dispensa en recipientes adecuados (por ejemplo, crioviales de 5 ml), que se congelan, cuanto

antes, en la fase de vapor de un recipiente de nitrógeno líquido. Los viales se guardan en la fase líquida en un depósito adecuado para prevenir la pérdida de viabilidad y la contaminación. Guardados de este modo, se ha observado que los lotes de inóculo original de *Babesia* spp. permanecen viables durante 20 años.

A diferencia del DMSO, no se ha observado que sea necesario trabajar con estabilizados que contengan PVP en un baño de hielo (Standfast y Jorgensen, 1997). La conservación pre y post-descongelación a 20-25°C no ha afectado a la infectividad. La PVP es un polímero complejo que no traspasa membranas celulares intactas. Tiene una baja toxicidad en los vertebrados y en los parásitos, y la PVP que contiene estabilizado es infectiva cuando se inocula por vía intravenosa. Se prepara PVP con un peso molecular de 40.000 para una solución al 20% con PBS y se autoclava para esterilizarla. Se mezcla lentamente sangre de un ternero infectado con un volumen igual de la solución de PVP al 20% en PBS para producir una concentración final de PVP al 10%. A continuación, la mezcla se dispensa en crioviales de 5 ml, se congela en la fase de vapor de nitrógeno líquido enfriando a una velocidad de unos 10°C por minuto durante 15 minutos, y a continuación se guarda en nitrógeno líquido (Standfast & Jorgensen, 1997).

Los cultivos *in-vitro* se basan en el método de la fase estacionaria microaerófila (Levy & Ristic, 1980). Se recoge sangre infectada por cepas avirulentas de *B. bovis* o *B. bigemina* de terneros esplenectomizados y se lava con solución salina tamponada con VYM fosfato (Vega *et al.*, 1985) para eliminar el plasma y la capa leucocitaria. La solución VYM está compuesta de CaCl₂.2H₂O (16,0 mg), KCl (400,0 mg), KH₂PO₄ (1415,4 mg), MgSO₄.7H₂O (154,0 mg), Na₂HPO₄.7H₂O (1450 mg), NaCl (7077,0 mg) y dextrosa (20,5 g) en 1 litro de agua desionizada doblemente destilada que contenga adenina 0,25 mM y guanosina 0,50 mM. A continuación, se preparan suspensiones individuales al 5% de hematíes infectados y no infectados en medio de cultivo básico formado por medio M199 y suero bovino normal (60/40). El medio básico se suplementa con HEPES (ácido 4-[2-Hidroxietil] piperazina-1-etanesulfónico) 18 mM, NaHCO₂ 10 mM, 100 µg/ml de sulfato de estreptomina y 100 U/ml de penicilina G. Las suspensiones de hematíes parasitados y normales se mezclan (1/1), se distribuyen en frascos de cultivo y se incuban a una atmosfera al 90% de N₂, 5% de O₂ y 5% de CO₂ a 37°C. Tras 8 a 10 subcultivos en frascos de cultivos de distintos tamaños, los cultivos completos finales se centrifugan a 1.200 **g** durante 10 minutos a 4°C, y se retira el sobrenadante. Se mezclan suavemente los hematíes parasitados concentrados con un volumen igual (1/1) de PVP al 20% en solución VYM, y se distribuyen en crioviales de 2 ml. Los hematíes parasitados se congelan en la fase de vapor de nitrógeno líquido enfriando a una velocidad de unos 10°C por minuto durante 15 minutos, y a continuación se guardan en nitrógeno líquido (Standfast & Jorgensen, 1997). Se desfibrina sangre normal de ganado bovino donante con bolas de vidrio, y se utiliza como fuente de suero y de hematíes no infectados para medios de cultivo. Los hematíes se lavan y se guardan un máximo de 3 semanas en solución VYM a 4°C, y se guarda suero normal congelado a -20°C hasta que se utilice.

2.1.5. Preparación y conservación del inóculo de trabajo

El inóculo de trabajo se prepara del mismo modo que el inóculo primario (apartado C.2.1), utilizando inóculo primario como material de partida.

2.1.6. Validación de la inocuidad y la eficacia del inóculo de trabajo

La idoneidad de un inóculo de trabajo se determina por la repetibilidad de la infectividad en terneros esplenectomizados, o en cultivos de iniciación, y por su seguridad y eficacia en ganado bovino no esplenectomizado. La repetibilidad se determina inoculando varios terneros susceptibles esplenectomizados y realizando un seguimiento del avance del parásito mediante frotis de sangre teñidos. El periodo de prepatencia y el avance del parásito deben ser relativamente constantes entre terneros para poder programar las inoculaciones con cierto grado de certeza.

Los viales de inóculo de trabajo preparados *in-vitro* se descongelan por inmersión en agua precalentada a 40°C y se dispensan directamente en medios de cultivo. El proceso de multiplicación *in-vitro* empieza con una suspensión de hematíes al 5%, que se aumenta progresivamente hasta el 10%. El inóculo de trabajo se considera aceptable cuando los cultivos continuos derivados del mismo logran un 8–12% de hematíes parasitados por merozoitos/trofozoitos morfológicamente normales tras el tercer subcultivo y un crecimiento en una atmosfera de un 5% de CO₂ en aire a 37°C.

La inocuidad y eficacia de la cepa vacunal se determinan mediante la inoculación de cantidades adecuadas de reses adultas susceptibles con vacuna preparada a partir de

hematíes de un ternero que haya sido inoculado con la cepa, o de un proceso de cultivo *in-vitro*. La inocuidad se puede evaluar realizando un seguimiento de la temperatura corporal, la parasitemia en extensiones de sangre teñidas, y la disminución del hematocrito tras la vacunación. La eficacia se evalúa realizando un seguimiento de los mismos parámetros tras la inoculación del ganado bovino vacunado con una cepa heteróloga. La pureza del inóculo de trabajo se determina realizando un seguimiento del ganado bovino utilizado en la prueba de inocuidad para averiguar si hay indicios de posibles agentes extraños, o mediante un análisis exhaustivo del ternero a partir del cual se produjo el estabilizado (véase el apartado C.2.2.3). Los bovinos donantes de sangre no infectada utilizada para cultivos *in-vitro* se mantienen en corrales aislados, y se realiza un seguimiento de su estado de salud.

2.2. Método de fabricación

2.2.1. Producción de concentrado de vacuna congelado

En primer lugar, se descongelan rápidamente cantidades de 5–10 ml de inóculo de trabajo sumergiendo los viales en agua precalentada a 37°C. El material descongelado se utiliza cuanto antes para infectar un ternero susceptible esplenectomizado (libre de posibles agentes extraños para la vacuna) mediante inoculación intravenosa. Si se utiliza DMSO como crioprotector, el inóculo de trabajo descongelado debe guardarse en hielo e inocularse en un plazo de 30 minutos tras la descongelación.

Se obtiene sangre adecuada para la vacuna realizando un seguimiento de extensiones de sangre yugular y recogiendo el volumen necesario de sangre cuando se alcance una parasitemia adecuada. Para la producción de vacuna congelada suele ser suficiente una parasitemia de $3,5 \times 10^8$ /ml para *B. bovis* en sangre yugular, o 3×10^7 /ml para *B. bigemina*. Si no se obtiene una parasitemia adecuada por *B. bovis*, puede ser necesario pasar la cepa mediante una subinoculación de 100-800 ml de sangre en un segundo ternero esplenectomizado. No se recomienda el pase de *B. bigemina* por terneros esplenectomizados debido a que la cepa atenuada puede aumentar su virulencia.

Se recoge sangre del ternero infectado donante mediante canulación de la yugular utilizando heparina sin conservante como anticoagulante (5 UI de heparina/ml de sangre).

En el laboratorio, la sangre parasitada se mantiene a 20–25°C y se mezcla en volúmenes iguales con glicerol 3M en PBS suplementado con glucosa 5 mM (la concentración final de la mezcla de glicerol en sangre es de 1,5 M) mantenida a 37°C. A continuación, la mezcla se equilibra a 37°C durante 30 minutos, y se dispensa en recipientes adecuados (por ejemplo, crioviales de 5 ml). Los viales se enfrían a razón de unos 10°C/minuto en la fase de vapor de nitrógeno líquido y, una vez congelados, se guardan en la fase líquida (Bock *et al.*, 2008).

Puede utilizarse DMSO como crioprotector en lugar de glicerol. Esto se lleva a cabo del mismo modo que se ha descrito para la preparación del inóculo primario (Pipano, 1997).

Cuando se diluye vacuna congelada glicerolizada para ser utilizada como vacuna, el diluyente debe ser iso-osmótico y consistir en PBS que contenga glicerol 1,5 M y glucosa 5 mM. De forma similar, el diluyente utilizado en la vacuna crioprotegida con DMSO debe ser iso-osmótico, y debe contener la misma concentración de DMSO en PBS que la concentración de DMSO en el concentrado de vacuna.

Puede prepararse vacuna congelada que contenga tanto *B. bovis* como *B. bigemina* mezclando volúmenes iguales de sangres que contengan cada uno de los parásitos, obtenidas de distintos donantes (Mangold *et al.*, 1996). En Australia también se ha creado una vacuna trivalente que contiene hematíes infectados por *B. bovis*, *B. bigemina* y *Anaplasma centrale*. Se concentran hematíes de tres donantes (uno para cada parásito) mediante centrifugación y se mezclan con solución de glicerol para producir el concentrado trivalente, que se descongela y se mezcla con un diluyente antes de ser utilizado (Bock *et al.*, 2008).

El volumen de la dosis recomendada de vacuna tras la reconstitución y dilución oscila entre 1 y 2 ml en función de las prácticas y requisitos locales, pero el objetivo es administrar una dosis mínima infectiva de parásitos, en base a la parasitemia previa a la congelación.

2.2.2. Producción de vacuna refrigerada

El material infectivo que se utiliza en la producción de vacuna refrigerada se obtiene del mismo modo que para la vacuna congelada, pero debe expedirse y utilizarse cuanto antes tras la

recogida. Si es necesario obtener el máximo número de dosis por ternero, el material infectivo puede diluirse para proporcionar el número necesario de parásitos por dosis (normalmente de 2,5 a 10×10^6). Un diluyente adecuado es el suero bovino estéril al 10% en una solución salina equilibrada que contenga los siguientes ingredientes por litro: NaCl (7,00 g), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (0,34 g), glucosa (1,00 g), Na_2HPO_4 (2,52 g), KH_2PO_4 (0,90 g) y $NaHCO_3$ (0,52 g).

Se lleva a cabo una multiplicación *in-vitro* en frascos de cultivo de tejido de 225 cm², donde se dispensan 115 ml de medio de cultivo completo para lograr una profundidad de 5,0–5,2 mm. Se sustituyen a diario 90 ml de sobrenadante por medio fresco y el 50–75% de los hematíes parasitados se sustituye cada 48 horas por hematíes no infectados (subcultivo). Se recogen hematíes parasitados que contengan *Babesia* sp. cuando los parásitos presentan la morfología típica y alcanzan la parasitemia máxima todavía dentro de los hematíes. Se extrae el 90% del medio básico de cada frasco sin perturbar los hematíes sedimentados. A continuación, los hematíes parasitados con *Babesia*, todavía suspendidos en el medio restante, se mezclan en una proporción de 1/1 con solución salina equilibrada, se dispensan en una botella y se refrigeran a 5°C hasta que se utilicen. Las suspensiones de cada especie de *Babesia*, ambas con una alta concentración de parásitos, se diluyen por último con la misma solución salina equilibrada enriquecida con un 10% de suero bovino para alcanzar una concentración de hematíes parasitados con 10^7 *B. bovis* y 10^7 *B. bigemina* por dosis de 2 ml.

En los casos en que preocupe la anaplasmosis, también puede añadirse *Anaplasma centrale* a la vacuna para crear una vacuna trivalente eficaz contra *B. bovis*, *B. bigemina* y *Anaplasma marginale*.

2.2.3. Controles durante el proceso

i) Fuentes y mantenimiento de donantes para la producción de vacuna

Debe identificarse una fuente de donantes libres de infecciones naturales por *Babesia*, otras enfermedades transmitidas por garrapatas y otros agentes infecciosos transmisibles por la sangre. Si no se dispone de una fuente adecuada, podría ser necesario criar terneros donantes en condiciones de ausencia de garrapatas específicamente para este fin.

Los terneros donantes deben mantenerse en condiciones tales que prevengan la exposición a enfermedades infecciosas y a garrapatas e insectos picadores. En ausencia de instalaciones adecuadas, debe estimarse el riesgo de contaminación con los agentes causantes de enfermedades infecciosas presentes en el país en cuestión, y debe determinarse si los beneficios de producir la vacuna a nivel local (por oposición a la importación de un producto adecuado) superan las posibles consecuencias adversas de propagar la enfermedad (Bock *et al.*, 2008).

ii) Cirugía

Los terneros a utilizar como donantes de vacuna deben estar esplenectomizados, con el fin de conseguir una cantidad máxima de parásitos para la producción de vacuna. Esto es más fácil en terneros de menos de 3 meses de edad y debe llevarse a cabo bajo anestesia general.

iii) Pruebas sistemáticas de detección en donantes de vacuna antes de la inoculación

En los terneros donantes debe comprobarse si presentan alguno de todos los posibles agentes causantes de las infecciones transmitidas por la sangre prevalentes en el país en cuestión, incluyendo *Babesia*, *Anaplasma*, *Theileria*, *Eperythrozoon* y *Trypanosoma*. Esto puede llevarse a cabo mediante un examen sistemático de extensiones de sangre teñidas tras la esplenectomía, y preferiblemente también mediante pruebas serológicas pre y post-cuarentena. Los terneros que presenten indicios de infecciones naturales por cualquiera de estos agentes debe ser rechazado, o bien deben eliminarse dichas infecciones químicamente. También debe confirmarse la ausencia de otros agentes infecciosos endémicos en el país; esto puede incluir los agentes causantes de la leucosis bovina enzoótica, el virus de la inmunodeficiencia bovina, el pestivirus bovino, el virus sincitial bovino, la rinotraqueítis bovina infecciosa, la enfermedad de Akabane, el virus Aino, la fiebre efímera, la lengua azul, la fiebre aftosa, *Brucella abortus*, *Leptospira* spp., la cowdriosis, la enfermedad de Jembrana, la fiebre del Valle del Rift, la rabia, la dermatitis nodular contagiosa, la perineumonía contagiosa bovina y la peste bovina. La elección de los procedimientos analíticos dependerá de cuáles sean las enfermedades prevalentes en el país y de la disponibilidad de pruebas, pero deben incluir la serología de sueros

pareados y, en algunos casos, el aislamiento del virus o la detección de antígeno o del ADN (Bock *et al.*, 2008; Pipano, 1997).

iv) Seguimiento de las parasitemias tras la inoculación

Es necesario determinar la concentración de parásitos en sangre recogida para la vacuna o en hematíes obtenidos de un cultivo. Existen técnicas precisas para determinar el recuento de parásitos, pero la concentración del parásito también puede estimarse con exactitud a partir del recuento de hematíes y de la parasitemia (% de hematíes infectados).

v) Recogida de sangre para la vacuna

Todo el equipo debe esterilizarse antes de ser utilizado (por ejemplo, mediante esterilización en autoclave). La sangre se recoge en heparina utilizando técnicas estrictamente asépticas en un sistema de recogida de circuito cerrado, cuando se alcance la parasitemia exigida. El ternero debe estar sedado (por ejemplo, con xilacina).

De un ternero de 6 meses de edad pueden extraerse hasta 3 litros de sangre intensamente infectada. Si el ternero no va a ser sacrificado, está indicado realizarle una transfusión de una cantidad similar de sangre de un donante adecuado (o de sangre previamente recogida del propio donante). De lo contrario, el ternero tiene que sacrificarse de inmediato tras la recogida de la sangre.

Utilizando cultivo *in-vitro*, un frasco de 225 cm² puede proporcionar sistemáticamente 1.800 dosis. A partir de un frasco de 225 cm² que contenga 11 ml de hematíes parasitados al 8–10%, es posible recoger unas 45.000 dosis tras 6 días de crecimiento continuo.

vi) Distribución de la vacuna

Todos los procedimientos se deben llevar a cabo en un ambiente adecuado, como una cabina de flujo laminar, utilizando técnicas estándar estériles. Con un agitador mecánico o magnético se garantizará un buen mezclado de los hematíes infectados con el diluyente a lo largo de todo el proceso de distribución.

2.2.4. Control por lotes

La potencia, inocuidad y esterilidad de los lotes de vacuna no pueden determinarse en el caso de la vacuna refrigerada, excepto mediante un análisis exhaustivo de los donantes de vacuna que se ciña a los principios de buenas prácticas de fabricación. Las especificaciones de la vacuna congelada dependen del código de práctica del país en cuestión. Estas son las especificaciones para las vacunas congeladas producidas en Australia.

i) Esterilidad y ausencia de contaminantes

Se utilizan pruebas estándar de esterilidad para cada lote de vacuna y diluyente. La ausencia de contaminantes se determina realizando pruebas serológicas adecuadas y pruebas moleculares de diagnóstico en el ganado bovino donante que permitan detectar infección vírica y bacteriana. Los posibles contaminantes son los agentes de la lista del apartado C.2.2.3.

ii) Inocuidad

Se puede realizar un seguimiento de las reacciones adversas en el ganado bovino inoculado en la prueba de inocuidad midiendo la parasitemia, la temperatura y el hematocrito, o bien mediante la observación periódica del estado de salud y el comportamiento de los animales vacunados. Un seguimiento detallado se asocia con mayor frecuencia al desarrollo y análisis de cepas del parásito como posibles candidatas para la producción de la vacuna. Solo se permite utilizar los lotes con niveles de patogenidad iguales o inferiores al estándar predeterminado. La vacuna se utiliza preferiblemente en terneros de menos de 1 año de edad.

Las especies distintas de las de destino no se consideran relevantes. Ciertas vacunas atenuadas de *B. bovis* son transmisibles por garrapatas y existen indicios que sugieren que podrían volver a ser virulentas tras la transmisión por garrapatas. Esto tiene poca importancia en las situaciones endémicas.

Tras la utilización de la vacuna no es necesario aplicar periodos de retirada ni para carne ni para leche, a no ser que así lo exija la legislación del lugar en cuestión.

iii) Potencia

Se descongela concentrado de vacuna congelado y glicerolizado y se diluye a 1/10 con diluyente isotónico (Bock *et al.*, 2008; Pipano, 1997). A continuación, se guarda la vacuna preparada durante 8 horas a 4°C, y se inoculan 5 a 25 cabezas de ganado bovino susceptible (mantenidas en zonas libres de garrapatas de ganado bovino) por vía subcutánea con una dosis de 2 ml de ese lote de vacuna. Después, se realiza un seguimiento para determinar si el ganado inoculado presenta infecciones por *Babesia* sp. viables mediante el examen de frotis de sangre teñida, mediante técnicas de PCR o constatando la seroconversión. Solo se utilizan lotes con una infectividad aceptable, a una dilución de trabajo de 1/10. Lo esperable es que más de un 95% de los animales vacunados desarrolle inmunidad contra *Babesia* sp. tras una sola inoculación con una dosis suficiente (1×10^7 parásitos) en una vacuna refrigerada o congelada, que se haya preparado, almacenado y transportado según protocolos adecuados.

iv) Duración de la inmunidad

Una sola inoculación suele producir una inmunidad duradera. Aparece inmunidad protectora en 3 a 4 semanas, y dura al menos 4 años en la mayoría de los casos (Bock & de Vos, 2001). Se han observado fracasos de la vacuna contra *B. bovis* y se asocian a la elección de la cepa vacunal, la presencia de cepas naturales heterólogas y factores relacionados con el hospedador (Bock *et al.*, 2008). Hay pocos indicios de que la inmunidad mengüe con el paso del tiempo (Bock y de Vos, 2001).

v) Estabilidad

La vacuna se puede mantener almacenada en nitrógeno líquido durante 5 años. El diluyente se puede mantener almacenado en una nevera hasta 2 años. La vacuna descongelada pierde potencia rápidamente y no puede volver a congelarse.

vi) Conservantes

Se añade bencilpenicilina (500.000 UI/litro) y estreptomycin (370.000 µg/litro) al concentrado de vacuna antes de distribuirla en criotubos. No se utiliza conservante.

vii) Utilización de la vacuna

En el caso de la vacuna congelada, los viales deben descongelarse mediante inmersión en agua precalentada a 37°C. La vacuna glicerolizada debe guardarse refrigerada y utilizarse en un plazo de 8 horas (Bock *et al.*, 2008), mientras que la vacuna con DMSO como crioprotector debe guardarse sobre hielo y utilizarse en un plazo de 15–30 minutos tras la descongelación (Pipano, 1997).

La vacuna refrigerada debe mantenerse refrigerada y utilizarse en un plazo de 4 a 7 días tras la preparación, en función de la viabilidad de los parásitos y de la recomendación del fabricante de la vacuna.

Las cepas de *B. bovis*, *B. divergens* y *B. bigemina* utilizadas en la vacuna pueden ser de poca virulencia, pero pueden no ser del todo inocuas. Por tanto, una recomendación práctica es limitar la utilización de la vacuna a terneros de menos de 1 año cuando la inmunidad inespecífica reduzca el riesgo de reacciones adversas. Si se van a vacunar animales de mayor edad, existe un mayor riesgo de reacciones a la vacuna. Estas reacciones tienen lugar de manera infrecuente, pero los reproductores de alto valor o las hembras gestantes justifican la debida atención y deben observarse a diario durante 3 semanas tras la vacunación. Lo ideal es tomar la temperatura rectal del ganado bovino vacunado, y si aparece una fiebre importante los animales deberán tratarse. Suelen observarse reacciones a *B. bigemina* y a *B. divergens* antes del día 6–8, y a *B. bovis* antes del día 14–18 (Bock *et al.*, 2008).

Suelen utilizarse a la vez vacunas contra la babesiosis y contra la anaplasmosis, pero es preferible no utilizar ninguna otra vacuna al mismo tiempo (Bock *et al.*, 2008).

viii) Precauciones

Las vacunas contra *Babesia bovis* y *B. bigemina* no son infectivas para el ser humano. Sin embargo, se han observado casos de *B. divergens* en personas esplenectomizadas. Cuando la vacuna se guarda en nitrógeno líquido, son aplicables las precauciones habituales relativas al almacenaje, el transporte y la manipulación de nitrógeno líquido y material completamente congelado.

2.3. Requisitos para la aprobación del registro

En los apartados anteriores se tratan aspectos relativos a la inocuidad, la potencia, la estabilidad de las cepas vacunales, las especies distintas de las de destino y la reversión a la virulencia. La vacuna solo se utiliza para controlar la babesiosis. Solo puede lograrse una erradicación de la babesiosis mediante la erradicación de la garrapata vector y/o con pautas de quimioterapia intensiva.

3. Vacunas desarrolladas mediante ingeniería genética

Actualmente no se dispone de vacunas desarrolladas mediante la ingeniería genética.

BIBLIOGRAFÍA

- BOCK R.E. & DE VOS A.J. (2001). Immunity following use of Australian tick fever vaccine: a review of the evidence. *Aust. Vet. J.*, **79**, 832–839.
- BOCK R.E., DE VOS A.J. & MOLLOY J.B. (2006). Tick-borne diseases. *In: Australian New Zealand Standard Diagnostic Procedures*, Faragher J.T., ed. Subcommittee on Animal Health Laboratory Standards http://www.scahls.org.au/__data/assets/pdf_file/0008/1280852/tick_borne_diseases.pdf
- BOCK R., JACKSON L., DE VOS A.J. & JORGENSEN W. (2008). Babesiosis of cattle. *In: Ticks: Biology, Disease and Control*, Bowman A.S. & Nuttall P.A., eds. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 281–307.
- BONO M.F., MANGOLD A.J., BARAVALLE M.E., VALENTINI B. S., THOMPSON C.S., WILKOWSKY S.E., ECHAIDE I.E., FARBER M.D. & TORIONI DE ECHAIDE S.M. (2008). Efficiency of a recombinant MSA-2c-based ELISA to establish the persistence of antibodies in cattle vaccinated with *Babesia bovis*. *Vet. Parasitol.*, **157**, 203–210.
- BOONCHIT S., XUAN X., YOKOYAMA N., GOFF W.L., WAGHELA S.D., WAGNER G. & IGARASHI I. (2006). Improved enzyme-linked immunosorbent assay using C-terminal truncated recombinant antigens of *Babesia bovis* rhoptry-associated protein-1 for detection of specific antibodies. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 1601–1604.
- BRAYTON K.A., LAU A.O.T., HERNDON D.R., HANNICK L., KAPPMAYER L.S., BERENS S.J., BIDWELL S.L., BROWN W.C., CRABTREE J., FADROSH D., FELDBLUM T., FORBERGER H.A., HAAS B.J., HOWELL J.M., KHOURI H., KOO H., MANN D.J., NORIMINE, J., PAULSEN I.T., RADUNE D., REN Q., SMITH JR, R.K., SUAREZ C.E., WHITE O., WORTMAN J.R., KNOWLES JR, D.P., McELWAIN T.F. & NENE V.M. (2007). Genome sequence of *Babesia bovis* and comparative analysis of apicomplexan hemoprotozoa. *PLoS Pathogens*, **3**, 1401–1413.
- BROWN W.C., NORIMINE J., KNOWLES D.P. & GOFF W.L. (2006). Immune control of *Babesia bovis* infection. *Vet. Parasitol.*, **138**, 75–87.
- BULING A., CRIADO-FORNELIO A., ASENZO G., BENITEZ D., BARBA-CARRETERO J.C. & FLORIN-CHRISTENSEN M. (2007). A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Vet. Parasitol.*, **147**, 16–25.
- CRIADO-FORNELIO A. (2007). A review of nucleic acid-based diagnostic tests for *Babesia* and *Theileria*, with emphasis on bovine piroplasms. *Parassitologia (Rome)*, **49**, 39–44.
- CRIADO-FORNELIO A., BULING A., ASENZO G., BENITEZ D., FLORIN-CHRISTENSEN M., GONZALEZ-OLIVA A., HENRIQUES G., SILVA M., ALONGI A., AGNONE A., TORINA A. & MADRUGA C.R. (2009). Development of fluorogenic probe-based PCR assays for the detection and quantification of bovine piroplasmids. *Vet. Parasitol.*, **162**, 200–206.
- DOMINGUEZ M., ECHAIDE I., DE ECHAIDE S.T., WILKOWSKY S., ZABAL O., MOSQUEDA J.J., SCHNITTGER L. & FLORIN-CHRISTENSEN M. (2012). Validation and field evaluation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Babesia bovis* infections in Argentina. *Clin. Vaccine Immunol.*, **19**, 924–928.

- FIGUEROA J.V., CHIEVES L.P., JOHNSON G.S. & BUENING G.M. (1993). Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Vet. Parasitol.*, **50**, 69–81.
- FRIEDHOFF K. & BOSE R. (1994). Recent developments in diagnostics of some tick-borne diseases. *In: Use of Applicable Biotechnological Methods for Diagnosing Haemoparasites*. Proceedings of the Expert Consultation, Merida, Mexico, 4–6 October 1993, Uilenberg G., Permin A. & Hansen J.W., eds. Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO), Rome, Italy, 46–57.
- GOFF W.L., JOHNSON W.C., MOLLOY J.B., JORGENSEN W.K., WALDRON S.J., FIGUEROA J.V., MATTHEE O., ADAMS D.S., MCGUIRE T.C., PINO I., MOSQUEDA J., PALMER G. H., SUAREZ C.E., KNOWLES D.P. & MCELWAIN T.F. (2008). Validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Babesia bigemina* antibodies in cattle. *Clin. Vac. Immunol.*, **15**, 1316–1321
- GOFF W.L., MCELWAIN T.F., SUAREZ C.E., JOHNSON W.C., BROWN W.C., NORIMINE J. & KNOWLES D. P. (2003). Competitive enzyme-linked immunosorbent assay based on a rhoptry-associated protein 1 epitope specifically identifies *Babesia bovis*-infected cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **10**, 38–43.
- GOFF W.L., MOLLOY J.B., JOHNSON W.C., SUAREZ C.E., PINO I., RHALERN A., SAHIBI H., CECI L., CARELLI G., ADARNS D.S., MCGUIRE T.C., KNOWLES D.P. & MCELWAIN T.F. (2006). Validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Babesia bovis*. *Clin. Vac. Immunol.*, **13**, 1212–1216
- HOLMAN P.J., WALDRUP K.A., DROLESKEY R.E., CORRIER D.E. & WAGNER G.G. (1993). *In vitro* growth of *Babesia bovis* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) erythrocytes. *J. Parasitol.*, **79**, 233–237.
- ISEKI H., ALHASSAN A., OHTA N., THEKISOE O.M., YOKOYAMA N., INOUE N., NAMBOTA A., YASUDA J. & IGARASHI I. (2007). Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine *Babesia* parasites. *J. Microbiol. Methods*, **271**, 281–287.
- JORGENSEN W.K. & WALDRON N S.J. (1994). Use of *in vitro* culture to isolate *Babesia bovis* from *Theileria buffeli*, *Eperythrozoon wenyoni* and *Anaplasma* spp. *Vet. Parasitol.*, **53**, 45–51.
- KIM C.M., BLANCO L.B.C., ALHASSAN A., ISEKI H., YOKOYAMA N., XUAN X. & IGARASHI I. (2008). Development of a rapid immunochromatographic test for simultaneous serodiagnosis of bovine babesioses caused by *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **78**, 117–121.
- LEVY M.G. & RISTIC M. (1980). *Babesia bovis*: continuous cultivation in a microaerophilous stationary phase culture. *Science*, **207**, 1218–1220.
- LIU A., GUAN G., DU P., GOU H., LIU Z., LIU J., MA M., YANG J., LI Y., NIU Q., REN Q., BAI Q., YIN H. & LUO J. (2012). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method based on two species-specific primer sets for the rapid identification of Chinese *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Parasitol. Int.*, **61**, 658–663.
- MANGOLD A.J., VANZINI V.R., ECHAIDE I.E., DE ESCHAIDE S.T., VOLPOGNI M.M. & GUGLIELMONE A.A. (1996). Viability after thawing and dilution of simultaneously cryopreserved vaccinal *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* strains cultured *in vitro*. *Vet. Parasit.*, **61**, 345–348.
- MOLLOY J.B., BOWLES P.M., BOCK R.E., TURTON J.A., KATSANDE T.C., KATENDE J.M., MABIKACHECHE L.G., WALDRON S.J., BLIGHT G.W. & DALGLIESH R.J. (1998). Evaluation of an ELISA for detection of antibodies to *Babesia bovis* in cattle in Australia and Zimbabwe. *Prev. Vet. Med.*, **33**, 59–67.
- MONTENEGRO-JAMES S., TORO M. & GUILLEN A.T. (1992). Field evaluation of an exoantigen-containing *Babesia* vaccine in Venezuela. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, **87**, Supplement III, 283–288.
- PIPANO E. (1997). Vaccines against hemoparasitic diseases in Israel with special reference to quality assurance. *Trop. Anim. Health Prod.*, **29** (Suppl.), S86–S90.
- ROMERO-SALAS D., MIRA A., MOSQUEDA J., GARCÍA-VÁZQUEZ Z., HIDALGO-RUIZ M., ORTIZ-VELA N., FLORIN-CHRISTENSEN M. & SCHNITTGER L. (2016). Molecular and serological detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*-infection in bovines and water buffaloes raised jointly in an endemic field. *Vet. Parasitol.*, **217**, 101–107.
- SIVAKUMAR T., ALTANGEREL K., BATTSETSEG B., BATTUR B., ABOULAILA M., MUNKHJARGAL T., YOSHINARI T., YOKOYAMA N. & IGARASHI I. (2012). Genetic detection of *Babesia bigemina* from Mongolian cattle using *apical membrane antigen-1* gene based PCR assay. *Vet. Parasitol.*, **187**, 17–22.

SIVAKUMAR T., TUVSHINTULGA B., ZHYLDYZ A., KOTHALAWALA H., YAPA P.R., KANAGARATNAM R., VIMALAKUMAR S.C., ABEYSEKERA T.S., WEERASINGHA A.S., YAMAGISHI J., IGARASHI I., SILVA S.S.P. & YOKOYAMA N. (2018). Genetic analysis of *Babesia* isolates from cattle with clinical babesiosis in Sri Lanka. *J. Clin. Microbiol.*, **56**, e00895–18.

STANDFAST N.F. & JORGENSEN W.K. (1997). Comparison of the infectivity of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma centrale* for cattle after cryopreservation in either dimethylsulphoxide (DMSO) or polyvinylpyrrolidone (PVP). *Aust. Vet. J.*, **75**, 62–63.

VEGA C.A., BUENING G.M., GREEN T.J. & CARSON C.A. (1985). *In vitro* cultivation of *Babesia bigemina*. *Am. J. Vet. Res.*, **46**, 416–420.

WALTISBUHL D.J., GOODGER B.V., WRIGHT I.G., COMMINIS M.A. & MAHONEY D.F. (1987). An enzyme linked immunosorbent assay to diagnose *Babesia bovis* infection in cattle. *Parasitol. Res.*, **73**, 126–131.

ZINTL A., MULCAHY G., SKERRETT H.E., TAYLOR S.M. & GRAY J.S. (2003). *Babesia divergens*: A Bovine Blood Parasite of Veterinary and Zoonotic Importance. *Clin. Microbiol. Rev.*, **16**, 622–636.

*
* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la Babesiosis bovina (puede consultarse la página web de la OIE: <https://www.oie.int/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>) Por favor, contacte con los Laboratorios de Referencia de la OIE para más información sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la babesiosis bovina.

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1991; ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2021.