

IDENTIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ESPOROZOITO DE *Babesia bigemina*

Vicente Aragón Moreno¹, Mosqueda G.J.², Figueroa M.J.²
y Zeferino García Vázquez²

¹Facultad de Ciencias Agropecuarias de la UAEM. Av Universidad 1001, col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos. CP 62210.

²CENID- PAVET. Cuernavaca, Morelos, México. ¹pesebrev@hotmail.com

Palabras clave: *Babesia bigemina*, esporozoito, purificación.

INTRODUCCIÓN

La Babesiosis bovina es una enfermedad hemotrópica producida por parásitos protozoarios del Phylum Apicomplexa que son transmitidos por la garrapata común del ganado (1). Las dos especies reconocidas como las más importantes que infectan el ganado en las zonas tropicales y subtropicales del mundo, incluyendo México, son *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*. La enfermedad clínica causada por estos protozoarios intraeritrocíticos se caracteriza por prolongados períodos febriles, anemia hemolítica, hemoglobinuria y muerte en los bovinos afectados (1,2). *Babesia bigemina* se transmite cuando los esporozoitos, o formas infectantes son inoculados por garrapatas

durante el período de alimentación de sangre en el ganado bovino (3).

ANTECEDENTES

A diferencia de plasmodium que inicia su ciclo exoeritrocítico invadiendo los hepatocitos, el esporozoito de las especies babesiales incluidas *B. bigemina* invaden directamente al eritrocito.

En la transmisión de *B. bovis* y *B. bigemina* por garrapata de un solo huésped (*Boophilus microplus*) el patrón de transmisión para la primera es únicamente a través de la fase larval (5) y para la segunda por medio de ninfas y hembras adultas de *B. microplus* (6,7).

La forma infectante de *Babesia spp.* ha sido "olvidada" como un potencial blanco de ataque por el sistema inmune del hospedero bovino, ya que la mayoría de las investigaciones han sido enfocadas al merozoito o fase madura del protozooario logrando purificar y concentrar merozoitos a partir de eritrocitos infectados (8) y así estudiar a nivel molecular e inmunológico sus antígenos de superficie (3).

ANTECEDENTES DIRECTOS

En estudios pasados separaron el merozoito de *Babesia bigemina* utilizando un gradiente de densidad por percoll a partir de eritrocitos infectados (8).

Recientemente aislaron esporozoitos a partir de larvas de *Boophilus microplus* infectadas con *Babesia bovis* y observaron que el anticuerpo monoclonal anti RAP-1 se expresa tanto en el merozoito como en el esporozoito de *B. bovis*. (4).

JUSTIFICACIÓN

Dado que la *Babesia bigemina* es inoculada a los bovinos por los estadios ninfal y adulto de la garrapata *Boophilus microplus* (9,10) y en virtud de que estos trabajos son técnicamente más factibles de manipular en el laboratorio, nuestros esfuerzos están encaminados a obtener garrapatas *Boophilus microplus* en su estadio ninfal infectadas con *Babesia bigemina* y

así diseñar un protocolo para la identificación, purificación y el análisis del esporozoito.

OBJETIVOS

Objetivo general. Identificar, purificar el esporozoito de *Babesia bigemina*.

Objetivo específico 1. Obtención y mantenimiento de una colonia de garrapatas *Boophilus microplus* infectadas con *Babesia bigemina*.

Objetivo específico 2. Inducción del desarrollo de esporozoitos en ninfas *Boophilus microplus* infectadas con *B bigemina*.

Objetivo 3. Purificación del esporozoito de *Babesia bigemina*.

Objetivo específico 4. Realizar una caracterización preliminar de los antígenos de superficie del esporozoito.

HIPÓTESIS

Los esporozoitos de *Babesia bigemina* se aíslan y purifican a partir de ninfas *Boophilus microplus* infectadas con *Babesia bigemina*.

METODOLOGÍA

Obtención y mantenimiento de una colonia de garrapatas *Boophilus microplus* infectadas con *Babesia bigemina*. Se utilizarán bovinos (*Bos taurus*) entre 6-8 meses

de edad, sin anticuerpos anti-*Babesia* spp y provenientes de una zona libre de garrapatas. Estos se infestarán con larvas de garrapatas *Boophilus microplus* no infectadas de *Babesia* spp. Se inducirá una infección en el bovino inoculando via intramuscular y endovenosa un criopreservado de eritrocitos infectados con *Babesia bigemina* a un tiempo apropiado de tal manera que la parasitemia ascendente coincida con la repleción de las garrapatas hembras adultas (11). Solamente la progenie de garrapatas positivas a la prueba de hemolinfa serán conservadas y mantenidas para su posterior utilización.

Inducción del desarrollo de esporozoitos en ninfas infectadas de *Boophilus microplus*. Para esto, la progenie de las garrapatas infectadas obtenidas en la parte inicial de este experimento se utilizarán para infestar becerros de características similares a los anteriores. Se permitirá la alimentación de las larvas en los becerros durante 8-10 días, de tal manera que se permita la activación y desarrollo de la fase infectante de *B. bigemina* en las glándulas salivales de la garrapata ninfa. Entre los días 8-10 post-infestación, se colectará el máximo número posible de ninfas. Posteriormente, serán incubadas a 37 °C 90% HR durante 24 horas.

Purificación de la fase infectante (esporozoito) de *Babesia bigemina*. Ninfas a las cuales se les indujo el desarrollo de esporozoitos serán maceradas. El macerado se agregará

a tubos de policarbonato que contienen el gradiente de percoll (Colloidal PVP silica for-cell separation) (12), previamente formado al ser centrifugado a 30 000 G / 30 minutos / 4 °C una vez agregado se volverá a centrifugar a la misma velocidad, tiempo y temperatura. Posteriormente se retirará el gradiente superior e intermedio en tubos de 15 ml. y aforar con solución salina para volver a centrifugar a 1340 G/ 25minutos/ 4 °C y observar a microscopio para checar concentración, una parte se preparará antígeno y el resto se le adicionará una solución criopreservadora conteniendo 10% de polivinilpirrolidona como agente protector para posteriormente congelarse a – 70 °C.

Realizar una caracterización preliminar de los antígenos de superficie del esporozoito. Se buscará la expresión del anticuerpo monoclonal anti RAP-1 (proteína asociada a las roptrias –1) (13) en el esporozoito mediante una prueba de inmunohistoquímica (4).

RESULTADOS

- 1.- Se logró obtener y mantener una colonia de garrapatas *Boophilus microplus* infectadas con el protozoario *Babesia bigemina* desarrollando un calendario de manejo.
- 2.- Se aisló la fase infectante (esporozoito) a partir de ninfas infectadas utilizando la técnica de

purificación por gradiente de percoll, determinando sus características morfológicas mediante la observación microscópica con la tinción de Giemsa.

CONCLUSIONES

El establecimiento de una colonia infectada sirve como fuente de ninfas para purificación de esporozoitos.

La técnica de purificación por gradiente de percoll garantiza el aislamiento de esporozoitos libres de otros contaminantes. Esto permitirá el desarrollo de anticuerpos específicos monoclonales y policlonales contra antígenos de esporozoitos.

BIBLIOGRAFÍA

McCosker PJ. 1981. The global importance of babesiosis. En: *Babesiosis*. Ristic M, Kreier JP (eds). Academic, Press, New York, E.U.A. 1-24.

Wright IG. 1973. Observations on the hematology of experimentally induced *Babesia argentina* and *B. bigemina* infections in splenectomized calves. *Res. Vet. Sci.* 14:29-34.

Mahoney DF. 1969. Bovine Babesiosis: A study of factors concerned in transmission. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 63:1-14.

Mosqueda Juan G. Terry F Mcelwain, David Stiller, and Guy H. Palmer .December 2002. *Babesia bovis* Merozoite Surface Antigen 1 and Rhoptry-Associated Protein ! Are Expressed in Sporozoites, And Specific

Antibodies Inhibit Sporozoite Attachment to Erythrocytes.

Brown WC y Palmer GH. 1999. Designing blood-stage vaccines against *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Parasitol. Today.* 15:275-281.

Friedhoff KT, Smith RD. Transmission of babesia by ticks. En: Ristic M, Kreier JP (eds). *Babesiosis*. Academic, Press, New York, 1981. pp. 267-321.

Figueroa MJV, Cantó AGJ, Alvarez MJA, Lona R, Ramos AJA, Vega y M CA. 1998. Capacidad protectora en bovinos de una cepa de *Babesia bigemina* derivada de cultivo *in vitro*. *Tec. Pecu. Mex.* 36:95-108.

Vega A. Carlos, Gerald M. Buening, Sergio D Rodriguez, and Andrew Carson. 1986. Concentration and Enzyme Content Of In Vitro-Cultured *Babesia bigemina* Infected Erythrocytes.; *Journal of Protozoology*.

Alvarez JA, Ramos JA, Figueroa JV, Vega CA, Buening GM. 1995. Descriptive epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in cattle farms of southeastern Mexico. *Proc. 3th Biennial Meet. Society of Trop. Vet. Med.* San Jose, Costa Rica, May 7-9, p. 12.

Mahoney DF y Ross DR. 1972. Epizootiological factors in the control of bovine Babesiosis. *Aust. Vet. J.* 48:292-298.

Callow LL. 1966. The infection of *Boophilus microplus* with *Babesia bigemina*. *Parasitol.* 58:663-670.

Musoke AJ, Nantulya VM, Rurangirwa FR, Buscher G. 1984. Evidence for a common protective antigenic determinant on sporozoites of several *Theileria parva* strains. *Immunol.* 52: 231-238.

Figueroa J.V. and G.M. Buening. 1991. In vitro inhibition of multiplication of *Babesia bigemina* by using monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 29:997-1003.