ISSN 0534-5391

IICA

Centro Interamericano de Documentación e Información Agrícola
25 MAR 1992
C I D I A
Turrialba, Costa Rica

TECNICAS PARA EL DIAGNOSTICO DE

BABESIOSIS Y ANAPLASMOSIS BOVINAS

Primer informe del Comité de expertos sobre hematozoarios del área Sur del IICA. (Argentina, Chile, Paraguay y Uruguay).

PROGRAMA V: SALUD ANIMAL Y SANIDAD VEGETAL

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCION 7

AGRADECIMIENTO 11

I. TAXONOMIA DE *BABESIA spp.* y *ANAPLASMA spp.* . . 13

- *Babesia bovis* 13
- *Babesia bigémina* 14
- *Anaplasma marginale* 15
- *Anaplasma centrale* 16
- *Paranaplasma caudatum* 17

II. VECTORES Y DISTRIBUCION 17

- Distribución mundial 17
- Distribución en países del Cono Sur 18

III. TOMA DE DATOS 18

- Muestras de sangre 19
- Muestras de suero 19
- Material de autopsia 20
- Garrapatas 21
- Envío y toma de datos 21

IV. DIAGNOSTICO DIRECTO 23

- Confección de frotis fino de sangre 23
- Confección de frotis grueso de sangre (*Babesia spp.*) . 24
- Confección de Improntas de órganos 24
- Coloración 24
- Estimación del porcentaje de parasitemia 25
- Hematocrito 26
- Interpretación de resultados 26

V. DIAGNOSTICO INDIRECTO (SEROLOGICO) 27

– Fijación de complemento 28
– Aglutinación en tarjeta 39
– Aglutinación en tubo capilar 42
– Inmunofluorescencia indirecta 44

VI. DIAGNOSTICO INDIRECTO (GARRAPATAS) 55

– Recuento de garrapatas adultas en bovino 55
– Examen de hemolinfa 56
– Obtención de larvas para inocular bovinos susceptibles 56

VII. AISLAMIENTO Y MANTENIMIENTO DE CEPAS 56

– Aislamiento de *Babesia bovis* y *Babesia bigémina* . . . 56
– Aislamiento de *Anaplasma marginale* 57
– Mantenimiento de las cepas 58

VIII. MANTENIMIENTO DE SUEROS CONOCIDOS 59

– Sueros positivos 59
– Sueros negativos 59
– Registro Banco de Sueros 59

IX. TECNICAS DE APOYO AL DIAGNOSTICO 61

– Esplenectomía 61
– Descubierta de arteria carótida y técnica de sangrado . 61

APENDICE I. COMPOSICION DE SOLUCIONES Y COLORANTES 65

APENDICE II. MATERIAL BASICO Y EQUIPO 71

BIBLIOGRAFIA 77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotos y su representación esquemática de las principales formas morfológicas de *Babesia bovis* 14

Figura 2. Fotos y su representación esquemática de las principales formas morfológicas de *Babesia bigémina* 15

Figura 3. Fotos y su representación esquemática de *Anaplasma marginale* y *Anaplasma centrale* 16

Figura 4. Representación esquemática de la obtención de suero en papel parafinado 20

Figura 5. Estudio de anticuerpos y actividad complementaria de sueros problema 36

Figura 6. Titulación por fijación de complemento de sueros positivos 38

Figura 7. Representación esquemática de la aplicación de la muestra de electroforesis 47

Figura 8. Preparación de agar-prueba de inmunoelectroforesis . 50

LISTA DE TABLAS Y FICHAS

Tabla 1. Agentes de enfermedad, sus principales vectores y su distribución 17

Tabla 2. Distribución de principales hematozoarios (*Babesia spp.* y *Anaplasma spp.*) con sus posibles vectores en países del Cono Sur 18

Tabla 3. Titulación de antígeno para Fijación de Complemento (sueros positivos) 30

Tabla 4. Titulación de antígeno para Fijación de Complemento (sueros negativos) 31

Tabla 5. Inoculación de estroma de glóbulos rojos de ovino en conejo 32

Tabla 6. Titulación del complemento 35

Tabla 7. Volumen de reactivos a utilizar en el estudio de anticuerpos y actividad complementaria del suero problema 36

Tabla 8. Volumen de reactivos a utilizar en la titulación de anticuerpos de sueros positivos 37

Ficha 1. Obtención de información complementaria en el diagnóstico de hematozoarios (*Babesia spp.* y *Anaplasma spp.*) 22

Ficha 2. Registro de datos para bancos de sueros 60

INTRODUCCION

I. La colaboración interpaíses y el Programa de Salud Animal del IICA

El mejoramiento de los programas de salud animal requiere de la colaboración y coordinación a nivel internacional para que –entre otros asuntos– se establezcan normas, criterios, procedimientos, reglamentaciones y estandarización de técnicas, aceptadas bilateralmente o por grupos de países, o por todos los del Continente y que favorezcan el desarrollo científico, la investigación y la mejor capacitación de los profesionales.

Se ha reconocido ampliamente en diversas reuniones, tanto a nivel de Ministros de Agricultura como de Directores de Salud Animal y de Laboratorios de Diagnóstico, Control e Investigación, que es imperioso lograr una mayor colaboración internacional para tener éxito en los programas de prevención, control y erradicación de las principales enfermedades animales y, en especial, de aquellas que se difunden a través de las fronteras y traban el comercio intra e interregional.

Los países integrantes del Cono Sur de América del Sur (todos ellos integrantes de ALADI) y aquellos que componen la Cuenca del Plata, lo han reconocido desde hace muchos años a través de convenios sanitarios y de reuniones internacionales, a nivel de autoridades políticas y técnicas, en esa área del continente americano.

Un ejemplo de ello son las recomendaciones sobre coordinación en salud animal emanadas de las reuniones de los Cancilleres de los países de la Cuenca del Plata.

El intercambio de conocimientos científicos y técnicos, así como de la información epidemiológica, constituyen la base para alcanzar esos objetivos. Un mecanismo indispensable para ello es lograr incrementar y acelerar la generación, captación, intercambio y transferencia de tecnologías entre los países integrantes del Area Sur del IICA en aquellos asuntos de interés común.

Este aspecto es motivo del más alto interés y dedicación del Programa de Salud Animal del IICA, interpretando el sentir y las solicitudes que le han efectuado los países.

En la Segunda Reunión Interamericana de Directores de Salud Animal (REDISA II), realizada en setiembre de 1980 en la sede del IICA en Costa Rica, una de las importantes resoluciones aprobadas encomendó al Instituto la Integración de Comités de Expertos para estudiar y coordinar aspectos científicos de interés para varios países o para todos ellos.

Los miembros de los Comités de Expertos actúan honorariamente y deben ser designados teniendo en cuenta solamente la competencia científica y la experiencia en campos especializados de actividad profesional.

No actúan como representantes de gobiernos u otros organismos.

II. Antecedentes específicos sobre la Reunión de este Comité de Expertos

Es motivo de honda preocupación el problema socioeconómico que ocasiona a la industria ganadera la garrapata común del bovino y las enfermedades que transmiten en la casi totalidad de los países de América Latina.

Debido a ello los programas de control y erradicación de la garrapata y de la prevención y control de las babesiosis y anaplasmosis constituyen una de las prioridades asignadas por los países al IICA, para la asistencia técnica a brindar a través del Programa de Salud Animal.

En REDISA II (1980) y en la Primera Reunión del Comité Interamericano de Salud Animal integrado por todos los directores de Salud Animal de las Américas, realizada en setiembre de 1983 en México, se trataron ampliamente los asuntos relacionados con el

combate a la garrapata y a la trasmisión de babesiosis y anaplasma en bovinos.

En los países del Cono Sur estos temas fueron motivo de especial consideración en la Primera Reunión de los Directores de Salud Animal del Area Sur del IICA (RESASUR I), llevada a cabo en Buenos Aires, Argentina, en abril de 1981.

Por último, del 17 al 19 de octubre de 1983, el IICA efectuó en Montevideo, Uruguay, la Segunda Reunión de Directores de Laboratorio de Salud Animal (LABSUR II), cuyo tema central fue el diagnóstico de los principales hematozoarios de los bovinos.

Dentro de las resoluciones aprobadas los siguientes puntos fueron los que motivaron la preparación del presente documento.

"B. RESOLUCIONES SOBRE BABESIOSIS Y ANAPLASMOSIS BOVINA"

"1. **Diagnóstico**"

"1.1 Se recomienda integrar un Grupo de Trabajo para elaborar un documento de estandarización de técnicas de diagnóstico para uso en los países integrantes de LABSUR".

"Solicitar al IICA que efectúe la coordinación conveniente y necesaria para facilitar las reuniones de este Grupo, así como la elaboración del documento respectivo".

"Se espera que el documento esté finalizado para julio de 1984 y que sea presentado a consideración de los señores Directores de Laboratorios en la próxima reunión de LABSUR".

Dando cumplimiento a esa resolución el IICA propició la reunión de un Comité de Expertos sobre hematozoarios, que trabajan en los países del Area Sur.

La Reunión del Comité se efectuó en las ciudades fronterizas de Rivera y Sant'Ana do Livramento de Uruguay y Brasil, del 9 al 12 de abril de 1984.

III. Comité de expertos sobre hematozoarios del Area Sur del IICA

Reunión en abril de 1984 – Rivera/Livramento

Miembros:

Dr. Joaquín Patarroyo, Presidente, Universidad Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Dr. Roberto Pauli, Laboratorio de Diagnóstico e Investigación del Ministerio de Agricultura y Ganadería de la Pcia. de Santa Fe, Argentina.

Dr. Oscar Osorio, Laboratorio de Diagnóstico e Investigación del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Paraguay.

Dr. Armando Nari, Secretario, Centro de Investigaciones Veterinarias "Miguel C. Rubino", Uruguay.

Dra. María A. Solari, Relator, Centro de Investigaciones Veterinarias "Miguel C. Rubino", Uruguay.

Dr. Raúl Kessler, Centro de Gado de Corte Embrapa, Campo Grande Mato Grosso Do Sul, Brasil.

Dr. Claudio Madruga, Centro de Gado de Corte Embrapa, Campo Grande Mato Grosso Do Sul, Brasil.

Dr. Carlos C. P. Arteche, Secretaría Da Agricultura, Río Grande do Sul, Brasil.

Dra. Clara Galleto, Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias INTA, Castelar, Pcia. de Buenos Aires, Argentina (Ausente por motivo de salud).

Secretaría Ex-Oficio y Asesoría

Dr. Rubén A. Lombardo, Especialista en Salud Animal, IICA (Argentina, Chile y Paraguay).

AGRADECIMIENTO

El Programa de Salud Animal del IICA se siente muy complacido en haber cumplido con la resolución de LABSUR II que ha originado este documento para uso en los países del Area Sur y también de otras Areas.

Expresa su más profundo reconocimiento a los señores integrantes del Comité de Expertos que, en forma totalmente desinteresada, han brindado el beneficio de sus conocimientos y experiencia en esta publicación.

Estamos seguros que su esfuerzo y dedicación será ampliamente reconocido por los profesionales e instituciones a quienes está dedicado.

TECNICAS PARA EL DIAGNOSTICO DE *BABESIOSIS* Y *ANAPLASMOSIS BOVINA*

I. TAXONOMIA DE *BABESIA* spp. y *ANAPLASMA* spp.

A. *BABESIA BOVIS* (Babés, 1888).

Se encuentra preferentemente en la circulación sanguínea capilar, 0.1 a 1% de eritrocitos infestados (EI).

Su tamaño es de hasta 3μ, ocupando menos de un cuarto del eritrocito.

Cuando se intenta diagnosticar *B. bovis* en muestras de campo o de cultivo de laboratorio, existen factores tales como, el curso de la enfermedad y el tipo de cepa utilizada, que pueden producir variaciones en la morfología típica del parásito. Se describirán aquí, las formas más frecuentes en el diagnóstico de rutina (17):

Formas anaplasmoides. Representan el primer estadio del ciclo evolutivo de *B. bovis* en bovinos.

Formas en división. Multiplicación es por bipartición transversal.

Formas redondas. Son las más numerosas y representan el estado adulto.

A la tinción con Giemsa, presenta un núcleo rojizo, el plasma azulado y en su zona central, una vacuola clara (Figura 1).

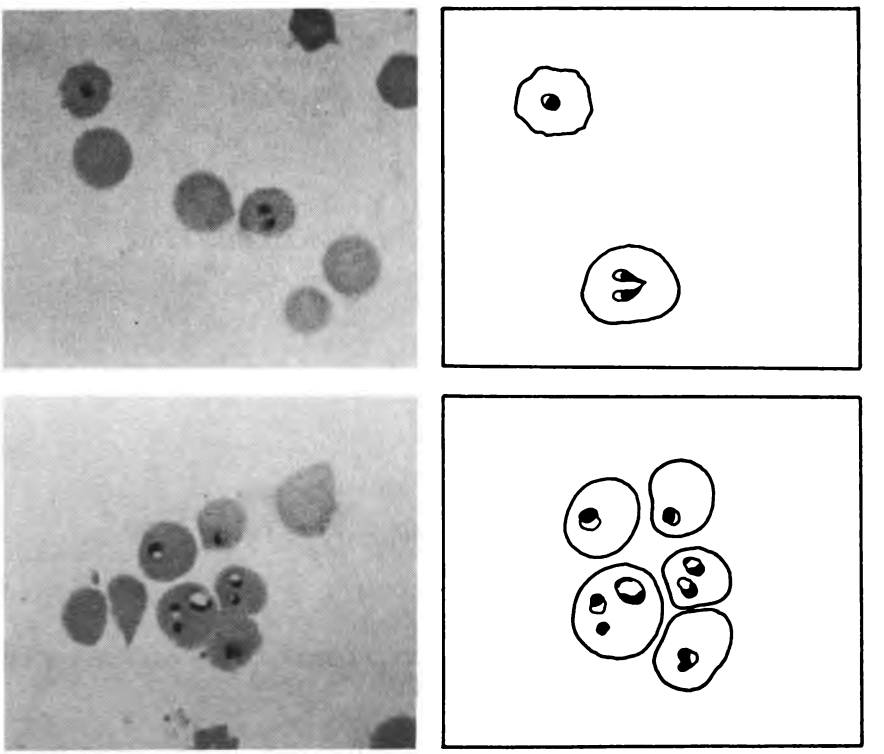


Figura 1. Fotos y su representación esquemática de las principales formas morfológicas de *B. bovis.*

B. *BABESIA BIGEMINA* (Smith y Kilborne, 1893)

Se distribuye más uniformemente que *B. bovis* en la circulación sanguínea, encontrándose en un porcentaje de EI superior a 2.

Su tamaño es de hasta 5-6μ ocupando gran parte del eritrocito.

Al igual que *B. bovis*, su morfología está relacionada con el curso de la enfermedad y el tipo de cepa utilizada:

Forma bigeminada. La más numerosa estando constituida por elementos puriformes que van de lado a lado del eritrocito unidos en un ángulo agudo.

También es posible encontrar otras formas, por ejemplo redondeadas, ameboides, elípticas, trigeminadas o cuadrigeminadas.

Su tinción con Giemsa es similar a *B. bovis* (Figura 2).

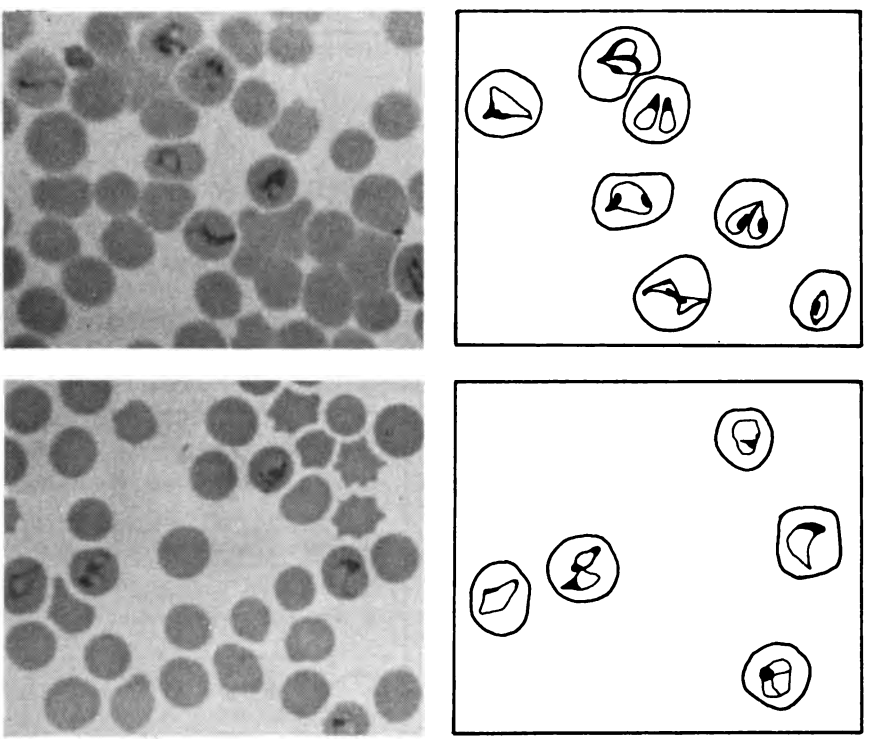


Figura 2. Fotos y su representación esquemática de las principales formas de *B. bigémina.*

C. *ANAPLASMA MARGINALE* (Theiler, 1910)

Se encuentra parasitando los eritrocitos, con la forma de un pequeño corpúsculo redondeado refringente que mide entre 0.3 a 0.8μ. Usualmente se puede descartar la refringencia con movimientos lentos del micrómetro, haciendo que el corpúsculo desaparezca del mismo plano de la superficie del eritrocito.

Los eritrocitos se encuentran parasitados con 1-2 formaciones (eventualmente más) siendo las más numerosas (80%) las ubicadas cerca de la membrana celular.

Con Giemsa se tiñen de color rojo violáceo y, frecuentemente, están rodeadas de una aureola clara (Figura 3).

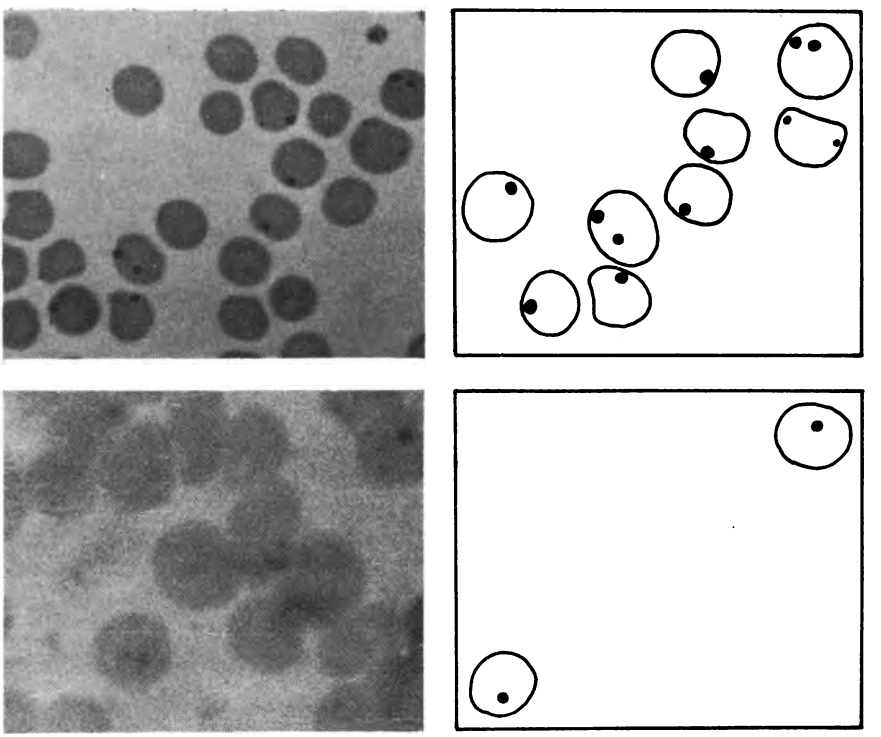


Figura 3. Fotos y su representación esquemática de *A. marginale* y *A. centrale.*

D. *ANAPLASMA CENTRALE* (Theiler, 1911)

Es similar al *A. marginale* pero su presentación es más numerosa en el centro del eritrocito (75-80%).

E. *PARANAPLASMA CAUDATUM* (Kreier y Ristic, 1963)

Este hemoparásito es considerado diferente al *Anaplasma marginale* desde el punto de vista morfológico y antigénico. Por esta razón, resulta interesante establecer el diagnóstico diferencial entre estos dos organismos.

La diferencia morfológica más evidente con *A. marginale* es la presencia de cola. Esta se manifiesta con la tinción de Azul de metileno.

II. VECTORES Y DISTRIBUCION

A. DISTRIBUCION MUNDIAL

Estos hematozoarios son de distribución mundial, como lo indica la Tabla 1, presentada en el Manual de Control de Garrapatas y Enfermedades trasmitidas por ellas (FAO, Roma 1982).

Tabla 1. Agentes de enfermedad, sus principales vectores y su distribución en varios Continentes.

Agente	Vectores principales	Distribución
Babesia bovis (= *argentina* = *berbera*)	*Boophilus microplus* *B. annulatus* (= *calcaratus*)	Mundial, aproximadamente entre las latitudes 30°S y 40°N. No se encuentran en USA (erradicada) o en grandes altitudes y zonas áridas comprendidas en estos límites.
B. bigémina	*B. microplus* *B. annulatus* *B. decoloratus*	Como ha sido mencionado arriba.
B. divergens (= *bovis*)	*Ixodes ricinus* *I. persulcatus*	Europa y zonas europeas de URSS.
B. major	*Haemaphysalis punctata*	Europa, URSS (? ?), Turquía y Medio Oriente donde se encuentra *H. punctata*.
Anaplasma marginale	*B. microplus* *B. annulatus* *B. decoloratus* Otros vectores experimentales como el *Dermacentor andersoni*, *D. occidentalis*, *D. variabilis* en USA.	Como para *B. bovis* y *B. bigémina*.
A. centrale	*B. decoloratus* (experimental)	Esta es una cepa de vacuna de laboratorio originalmente aislada en Sudáfrica. Cepas de campo, probablemente existen allí y en otras partes.

Fuente: Adaptada, en parte del Manual de control de garrapatas y enfermedades trasmitidas por ellas. Manual Práctico de Campo. Capítulo VII, parte V, FAO, Roma 1982.

B. DISTRIBUCION EN PAISES DEL CONO SUR

En América del Sur, existen hematozoarios (*Babesia* spp. y *Anaplasma* spp.) de importancia conocida, aunque muchos aspectos de su biología quedan aún por determinarse.

En Tabla 2, se incluyen los distintos hematozoarios diagnosticados en cada país del Cono Sur además de sus principales vectores.

Tabla 2. Distribución de principales Hematozoarios (*Babesia spp.* y *Anaplasma spp.*) con sus posibles vectores en países del Cono Sur.

País	Ubicación	Hemoparásito	Vectores – Transmisión				Otros
			Garrapata		Insectos		
			Conocido	Potencial	Conocido	Potencial	
Argentina	Al Norte de 34° Lat. S.	*B. bovis* *B. bigémina* *A. marginale*	*B. microplus* *B. microplus* ?	?	*Tabbanus* spp.		Mecánica
Brasil	Estado de Minas Gerais	*B. bovis* *B. bigémina* *A. marginale* *A. centrale**	*B. microplus* *B. microplus*	*B. microplus* *A. cayennense* *A. ovale*			Mecánica Mecánica
Paraguay	19°18' 27°30' Lat. S	*B. bovis* *B. bigémina* *A. marginale*	*B. microplus* *B. microplus*	*B. microplus* *A. cayennense* *A. tigrinum* *A. ovale* *A. parvum* *A. nitens*		*Tabbanus* spp. *Stomoxys* spp.	Mecánica
Uruguay	30° 35° Lat. S	*B. bovis* *B. bigémina* *A. marginale* *A. centrale*	*B. microplus* *B. microplus*	*B. microplus* *Amblyomma triste* *A. cayennense* *A. tigrinum* *A. maculatum* *A. ovale* *Haemaphisalis juxtakochi* *Ixodes ricinus* *I. affinis*		*Tabbanus* spp. *Stomoxys* spp.	Mecánica Mecánica

* Posiblemente probable.

III. TOMA DE DATOS

La obtención de las muestras a ser enviadas al laboratorio, debe realizarse lo más prolija y asépticamente posible. Para ello es

necesario disponer de material apropiado, limpio y en cantidad suficiente (Apéndice II).

Las muestras se obtendrán de la siguiente manera:

A. MUESTRAS DE SANGRE

- Depilar, lavar, desinfectar y secar la zona de donde se obtendrá el material.
- Este puede provenir del sistema circulatorio central o capilar. En el primer caso, se obtiene sangre generalmente de la vena yugular y en el segundo, de un raspado del borde de la oreja o de la punta de la cola.
- La sangre es recogida en un tubo conteniendo cantidad suficiente de anticoagulante (5 mg de E.D.T.A. por cada c.c. de sangre) asegurando un contacto homogéneo (Apéndice I).
- *In situ* puede confeccionarse frotis fino y/o grueso.

B. MUESTRAS DE SUERO

- Depilar, lavar, desinfectar y secar la zona del cuello del animal para obtener la muestra de la vena yugular.
- Con aguja estéril, recoger la muestra en un tubo hasta aproximadamente la mitad de su capacidad (± 7 ml).
- El tubo se coloca inclinado, asegurando una mayor superficie para la formación del coágulo. Los tubos deben mantenerse inmóviles a temperatura ambiente (18-22°C).
- Remover el coágulo a las 12 horas para realizar inmunofluorescencia indirecta, aglutinación en tubo capilar, fijación de complemento y a las 48 horas la técnica de aglutinación en tarjeta. (2)

También es posible obtener suero con la técnica de papel de filtro parafinado, de la siguiente manera:

- Tomar una muestra de sangre colocándola sobre papel de filtro Whatman No. 4 o equivalente (Figura 4).
- El área mínima a ser cubierta, debe ser de 7 mm.
- Dejar secar. El material puede almacenarse a temperatura ambiente durante 60 días.
- La elución consiste en diluir un trozo de 5 mm de diámetro en 0.05 ml PBS (pH 7.2). De esta manera se obtiene una solución de 1/50. (19) (8)

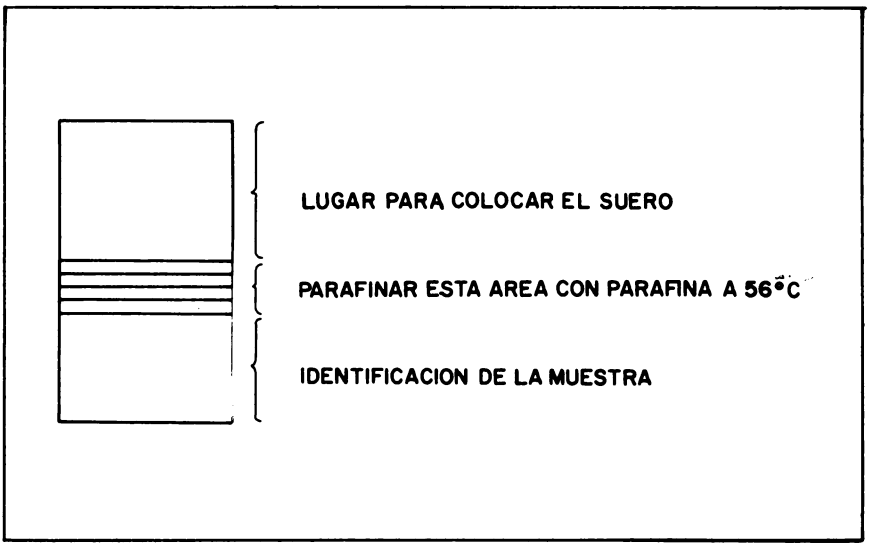


Figura 4. Representación esquemática de la obtención de suero en papel parafinado.

C. MATERIAL DE AUTOPSIA

El material a procesar en cada caso dependerá del tiempo en que el animal haya sido sacrificado o muerto por la enfermedad. La velocidad de descomposición de los órganos es dependiente de la temperatura ambiente y del grado de invasión bacteriana. (3)

1. **Animal muerto (hasta 8 horas)**

   - Frotis fino de sangre.
   - Improntas de órganos en el siguiente orden de prioridades: riñón, músculo de corazón, bazo, hígado, cerebro.

2. **Animal muerto (más 8 horas)**

   - Frotis fino de sangre.
   - Improntas de los siguientes órganos: bazo, cerebro, músculo de corazón, riñón e hígado.

3. Material para estudio anatomopatológico

Para la extracción de este material es necesario mantener el orden expuesto anteriormente.

Para la técnica de Hematoxilina eosina, los trozos de órganos (máximo 1 cm de lado) tienen que ser colocados y mantenidos hasta su procesamiento, en una solución al 10% de formol (relación 1/10). Para la técnica de Giemsa, deben ser puestos en solución de Bouin.

D. GARRAPATAS

La muestra debe ser mayor a las 10 teleóginas. Es conveniente enviar ejemplares que no hayan sido dañados durante la extracción y que estén acondicionados en un recipiente sin agregar algodón humedecido o similar, a fin de evitar la proliferación de hongos.

E. ENVIO Y TOMA DE DATOS

El material debe acondicionarse asegurando que llegue en perfectas condiciones con identificación y acompañado de información complementaria (Ficha 1). En el caso de frotis de sangre, es conveniente identificar con lápiz uno de los extremos de la lámina.

La obtención de muestras debe de estar relacionada con la población de animales en estudio.

Ficha 1. Obtención de información complementaria en el diagnóstico de hematozoarios (*Babesia spp.* y *Anaplasma spp.*)

Fecha ...../...../.....

Profesional ..... Dirección .....Tel.....

Ubicación ..... Tipo de explotación .....

Superficie ..... No. total de bovinos ..... Raza .....

Población bovina de interés (potrero/s)

Categoría	No. en riesgo	No. Enfermos	No. muertos
< 1 año 1 – 2 años 2 – 3 años > 3 años			

Infestación por Garrapatas NO SI

Baja ..... Media .... Alta*....
(0-30%) (30-60%) (> 60)

Estadio evolutivo predominante .....

Cantidad de garrapatas por animal** .....

No. tratamientos acaricidas ..... Producto .....

Presentación en el tiempo/clima predominante .....

Signos clínicos .....

Tratamiento y respuesta .....

Diagnóstico de Laboratorio .....

.....

.....

* Porcentaje de animales con garrapatas en el rodeo.

** Garrapatas >4.5 mm.

IV. DIAGNOSTICO DIRECTO

El diagnóstico de laboratorio es el procedimiento para:

- Detectar el agente causal de la infección o enfermedad en el animal (diagnóstico directo).
- Detectar la infección en animales portadores (diagnóstico indirecto, serológico).
- Detectar el agente causal, *Babesia spp.* en el vector (diagnóstico indirecto, garrapatas).

Existen varios factores que influyen en el período pre-patente de estos hemoparásitos.

El *A. marginale*, generalmente, tiene un período de incubación de 3-5 semanas, máximo de parasitemia. (15)

Para *Babesia spp.* el período pre-patente es en general de 8-16 días. En el período de patencia la temperatura encuentra su nivel máximo a los 2-3 días.

En casos fatales las parasitemias pueden persistir por 7-21 días. (10) Luego estos niveles de parasitemia descienden existiendo la posibilidad de aparecer nuevamente en la etapa crónica.

Es en la primera etapa, donde se evidencian los hematozoarios por medio de frotis de sangre u órganos coloreados.

A. CONFECCION DE FROTIS FINOS DE SANGRE

- Utilizar portas limpios y secos (mantener v/v en alcohol y eter).
- Colocar una gota pequeña en un extremo del porta.
- Contactar éste, con otro porta colocado en ángulo de 35° y hacerlo correr hacia el otro extremo.
- Secar con aire (ventilador o similar).
- Obtener una lámina fina y homogénea.
- Identificar el porta en uno de sus extremos con el No. de animal y fecha.

B. CONFECCION DE FROTIS GRUESO DE SANGRE (*BABESIA spp.*)

- Utilizar portas limpios y secos.
- Colocar en el centro una gota de sangre.
- Mediante un movimiento de rotación formar una película de 1 cm de diámetro.
- Identificar.
- Secar al aire o al calor a 50-60°C. (11)

C. CONFECCION DE IMPRONTAS DE ORGANOS

- Utilizar porta limpio y seco.
- Cuidar de no ensuciar el material.
- Seccionar un trozo pequeño de órgano.
- Contactar con el porta, la superficie recién cortada donde hay pequeños capilares de sangre.
- Secar al aire.

D. COLORACION

1. Giemsa

- Fijar en metanol durante 5 minutos.
- Secar al aire.
- Diluir 4 ml de Giemsa en 60 ml de solución de buffer (pH 6.6).
- Para 100 ml de la solución anterior, agregar 0.16 ml de Triton chis (10%).
- Colocar esta solución en una caja de vidrio.
- Introducir la lámina dentro de la misma.
- Dejar colorear durante 45 minutos. El tiempo de coloración está en función de la concentración del Giemsa.
- Lavar vigorosamente con solución buffer (pH 6.6).
- Secar con aire o al calor de la llama.
- Observar al microscopio con objetivo de inmersión.

2. May Grünwald-Giemsa

- Fijar con solución colorante pura durante 30 segundos o más.

- Secar al aire.
- Diluir 1 ml de colorante en 10 ml de solución buffer (pH 6.6).
- Colocar la solución sobre el frotis dejando colorear durante 45 minutos.
- Retirar el colorante.
- Lavar rápidamente con agua corriente.
- Secar con aire o al calor de la llama.
- Observar al microscopio con objetivo de inmersión.

3. **Naranja de acridina (preferentemente *Anaplasma spp.*)**

- Fijar, colocando 1 parte de sangre en 2 partes de formol (10%) durante 5 a 10 minutos.
- Decantar las células.
- Retirar el exceso de formalina.
- Hacer frotis con el sedimento.
- Secar con aire.
- Colorear con Naranja de acridina durante 15 segundos.
- Lavar con agua destilada (AD).
- Secar con aire.
- Observar en microscopio con fuente de luz ultravioleta (filtros UG2 ó UG5, filtro barrera 42 ó 44).

4. **Azul de metileno (para diferenciar *Paranaplasma caudatum*)**

- Colocar en un porta objeto una gota de sangre.
- Colocar en un cubre objeto una gota de azul de metileno.
- Invertir el cubre objeto y colocarlo sobre la sangre.
- Mantener para la coloración durante 5 minutos.
- Observar con microscopio convencional.

E. ESTIMACION DEL PORCENTAJE DE PARASITEMIA

- Esta estimación de infección parasitaria es igual para los hemoparásitos antes mencionados.
- No hay que trabajar en el extremo ni en el borde del frotis, pues es allí donde se agrupan los glóbulos rojos infestados (GRI).

- Seleccionar una zona que represente el promedio.
- El cálculo de los GR/campo, se realiza contando el total de GR que hay en tres campos y luego dividiendo entre tres.
- Para hallar el porcentaje de GRI observar tantos campos como sea necesario para contar hasta 10.000 GR en el caso de *B. bovis* y 1.000 a 5.000 para *B. bigémina* y *Anaplasma spp.* sumando los GRI.

F. HEMATOCRITO

Con el hematocrito, se determina el porcentaje de GR que tiene la sangre.

Este es un valor importante que contribuye al diagnóstico del estado del animal.

- Se llena un tubo capilar con sangre. Sellar un extremo.
- Se ubica en el plato del microhematocrito y se centrifuga a 7.000 r.p.m. durante 15 minutos. Si se cuenta con centrífuga específica centrifugar durante 5 minutos.
- Realizar la lectura lo más rápidamente posible luego de la centrifugación.

G. INTERPRETACION DE RESULTADOS

Si bien morfológicamente se reconocen los parásitos es muy frecuente encontrar dificultades y hacer un diagnóstico erróneo.

Para la interpretación de los resultados (de un material bien recolectado) deben analizarse las interrelaciones entre los datos anamnésicos, el diagnóstico de campo presuntivo y los resultados hematológicos.

En el caso de hallar parásitos en la sangre existe un número indicativo (NI) de GRI para determinar que son causa de enfermedad. Este NI, estará en función de varios factores tales como la ubicación geográfica, fase en que se encuentra la enfermedad, infección del vector, grado inmunitario, población parasitaria.

Según la literatura, existe un NI "guía" para cada parásito, a saber (18):

Frotis provenientes de animales vivos:

B. bovis	Presencia de GRI (frotis finos y/o gruesos).
B. bigémina	Porcentajes mayores al 0.5% GRI (frotis finos).
A. marginale	Porcentajes iguales o mayores al 1% GRI (frotis finos).

Frotis provenientes de animales muertos:

B. bovis	Porcentajes mayores al 1% de GRI o acúmulo de parásitos que distiende los capilares.
B. bigémina	Porcentajes entre un 10 a 50% de GRI.
A. marginale	Porcentajes entre un 10 a 50% de GRI.

Los frotis sanguíneos pueden estar acompañados de cambios en la composición globular, como por ejemplo, en el proceso de la anemia existe un aumento de GR inmaduros siendo éste otro resultado a tomar en cuenta.

El hematocrito es útil para el diagnóstico y también para orientar un posible tratamiento. Al igual que los valores anteriores, éste depende de varios factores (edad, estado del animal) pero con un hematocrito menor del 20% es necesario tomar otras medidas terapéuticas.

V. DIAGNOSTICO INDIRECTO (SEROLOGICO)

Existe un gran número de análisis para realizar diagnóstico indirecto de estos hematozoarios, como ser fijación de complemento, inmunofluorescencia indirecta, aglutinación en tarjeta, en tubo capilar, en partículas de latex, hemoaglutinación, prueba de inmunodifusión, de inhibición celular, radio-inmunoensayo, inmunoelectroforesis y prueba de ELISA.

En este manual se desarrollarán solamente, aquellas técnicas de utilización común en países del Cono Sur, tales como, fijación de

complemento, aglutinación en tarjeta, aglutinación en tubo capilar para *Anaplasma spp.* e inmunofluorescencia indirecta para *Babesia spp.*

A. FIJACION DE COMPLEMENTO

La inclusión de esta técnica, está justificada en el hecho de ser altamente sensible y reproducible.

La descripción que sigue a continuación se basa en las recomendaciones del Manual del Departamento de Agricultura de EEUU, para estandarización de los componentes y de Martín y Ritchie para la ejecución de la prueba. (20) (12)

1. Producción de antígeno

- Sangrar un ternero con 30% de GRI de *A. marginale* mezclando v/v en solución Alsever.
- Lavar GRI en solución buffer veronal (SBV). Repetir la operación tres veces.
- Lisar los GRI en 4 volúmenes de AD fría (4°C) previamente saturada con CO_2. Mantener el flujo constante de CO_2 hasta que el pH de AD se mantenga estable.
- Congelar este material a -20°C o menos durante 24 horas.
- Descongelar y centrifugar a 50.000 g durante 30 minutos.
- Lavar el sedimento con AD a 48.400 g durante 30 minutos.
- Suspender el sedimento en SBV y sonificar durante 30 segundos. El tubo debe mantenerse en baño de hielo.
- Lavar el material a 50.000 g en SBV.
- Homogeneizar el sedimento con homogeneizador de tejido*.
- Lavar y resuspender con SBV para obtener una concentración final del 20%.

a. Titulación de antígeno

La unidad antigénica es definida como la cantidad más pequeña de antígeno diluido que fijará completa-

* Ten Broeck.

mente dos unidades de complemento en presencia de suero positivo estándar. La unidad anticomplementaria es la cantidad de antígeno diluido que inhibe la hemólisis en presencia de un suero negativo estándar.

a.1 Material necesario

- Antígeno diluido en SBV.
- Complemento diluido en SBV que contenga 2 unidades exactas en 0.5 ml.
- Hemolisina, diluida en SBV que contenga 2 unidades exactas en 0.5 ml.
- GR de ovino diluidos al 2% en SBV.
- Suero estándar positivo y negativo inactivado.

a.2 Procedimiento

- Colocar en 19 tubos, las cantidades de SBV, suero estándar inactivado (positivo o negativo), antígeno y complemento indicados en Tablas 3 y 4.
- La gradilla es agitada y colocada en baño María a 37°C durante 1 hora.
- Paralelamente se debe mezclar la suspensión de GR ovino y hemolisina. Sensibilizar la mezcla al baño María a 37°C durante 10 minutos (inmediatamente antes de ser utilizada).
- Agregar 1 ml de la mezcla a cada tubo, agitar y colocar en baño María a 37°C durante 45 minutos.
- Centrifugar los tubos a 500 g durante 5 minutos y realizar la lectura.

a.3 Interpretación

- El objetivo de la titulación del antígeno es hallar la dilución más alta capaz de producir hemólisis completa (1 unidad exacta).
- Entre los tubos 1-8 se observa el espectro de actividad hemolítica. Si en el tubo No. 1 (mayor dilución de antígeno) hay hemólisis completa, es necesario trabajar en diluciones mayores.
- Los controles son:

No. tubo	Controles	Reacción
9	Suero +	hemólisis
16	Antígeno	hemólisis variable
17	suero –	hemólisis
18	Complemento	hemólisis
19	Hemolisina/GR	no hemólisis

– Para calcular la dilución de antígeno que contenga 2 unidades en 0.5 ml se utiliza la siguiente proporción.

$$\frac{\text{Dilución Antígeno}}{2\ \text{U}} = \frac{X}{0.5\ \text{ml}}$$

Tabla 3. Titulación de antígeno para fijación de complemento (sueros positivos).

Reactivos	Número del tubo								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
S B V	0.475	0.45	0.40	0.35	0.30	0.25	0.1	–	0.9
Antígeno	0.025	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.4	0.5	–
Suero positivo	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Complemento	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	Se incuba por una hora en un baño María a 37°C.								
Hemolisina y GRO	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	Se incuba por 45 minutos en un baño María a 37°C.								

Tabla 4. Titulación de antígeno para fijación de complemento (sueros negativos).

Reactivos	Número de los tubos									
	10	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**
SBV	0.45	0.4	0.3	0.2	0.1		0.1	0.5	0.6	1.1
Antígeno	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.5	–	–	–
Suero negativo	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1		0.1		
Complemento	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	–
	Incube por una hora en un baño María a 37°C.									
Hemolisina y GRO	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	Incube por 45 minutos en un baño María a 37°C.									

– En los tubos 10-15 se analiza la acción anticomplementaria en presencia de sueros negativos. Si es esta acción negativa el antígeno se considera satisfactorio para la prueba.

2. Sistema hemolítico

a. Producción de Hemolisina

– Inocular estroma de GR de ovino en conejos obtenido de la siguiente manera:
  . Colectar 1.000 ml de sangre ovina en 250 ml de citrato de sodio al 38%.
  . Filtrar y centrifugar a 1.000 g durante 15 minutos a 4°C.
  . Lavar en 2 volúmenes de suero fisiológico (SF) a 4°C.

- Lisar GR con 10 litros de AD (4°C) acidificada con 4 ml de ácido acético glacial. Los GR deben agregarse lentamente al AD y ésta mantenerse en agitación constante. Luego de hacer la mezcla, agitar durante 10 minutos.
- Dejar sedimentar durante 18 horas en refrigerador (4°C).
- Descartar el sobrenadante y centrifugar a 500 g durante 15 minutos (4°C).
- Descartar el sobrenadante y lavar 6 veces en solución tampón acetato 0.001 M (pH 5).
- Centrifugar a 500 g durante 15 minutos a 4°C.
- Suspender el estroma en igual volumen de solución de cloruro de sodio 0.15 M.
- Centrifugar a 4.000 r.p.m. durante 20 minutos (4°C). Repetir esta operación dos veces.
- Suspender el sedimento en 300-400 ml de solución de cloruro de sodio 0.15 M. Colocar solución en Erlemmeyer en baño María a 100°C.
- Enfriar con agitación constante hasta obtener una suspensión fina y homogénea.
- Determinar la concentración de nitrógeno de la muestra por el método de Micro-Kjeldahl. La concentración final es de 1 mg/ml.
- Agregar a la solución final 1/10.000 de Timerosal*.
- Las inoculaciones de solución de estroma de GR de ovinos en conejo, se realizan de acuerdo a la Tabla 5.

Tabla 5. Inoculación de estroma de glóbulos rojos de ovino en conejos.

No. inoculación	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Días	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Volumen de estroma	0.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0

* Mertiolato.

- Sangrar al conejo en el día 25. El suero obtenido debe contener hemolisina.
- Inactivar el suero a 56°C durante 30 minutos.
- Diluïr 1/100 con SBV.
- Almacenar en alícuotas a -20°C.

b. Suspensión de glóbulos rojos de ovinos

- Recolectar asépticamente 150 ml de sangre de ovino en igual volumen de solución Alsever.
- Conservar a 4°C de temperatura por un período de 2 semanas.
- Mezclar lentamente antes de ser utilizados.
- Centrifugar a 1.000 g durante 10 minutos.
- Remover el sobrenadante y lavar tres veces con SBV.
- Determinar el volumen de GR luego del último lavado.
- Preparar una suspensión de GR en 50 volúmenes para obtener una concentración final de 2%.
- Lisar los GR mezclando 0.3 ml de la suspensión anterior en 1.7 ml de AD.
- Leer en espectrofotómetro a 540 nanómetros (nm) comparando con un control blanco de AD. Lecturas de 0.600 ± 0.005 de densidad óptica (DO), corresponden a un 2% de suspensión.
- Si la lectura resulta diferente a 0.600 DO es necesario hacer la siguiente corrección.

$$V_f = \frac{V_s \times DO_s}{0.600}$$

V_f = Volumen final.

V_s = Volumen de la suspensión GR.

DO_s = DO de V_s.

0.600 = corresponde a un DO de una suspensión al 2%.

- Mezclar cantidades iguales de GR al 2% y hemolisina titulada. Esto representa el sistema hemolítico.
- Sensibilizar la mezcla colocándola en baño María a 37°C durante 10 minutos o dejándola a 4°C durante 18 horas.
- El sistema hemolítico debe ser utilizado dentro de las 24 horas de producido.

3. Complemento

a. Producción de Complemento

- Mantener en ayuno (mínimo 18 horas) 15 cobayos.
- Sangrar y mezclar los sueros libres de hemólisis.
- Agregar un 3% de GR de ovino manteniéndolo en baño frío (4°C) durante 10 minutos. Centrifugar a 500 g durante 10 minutos (4°C) con este procedimiento, se remueven los anticuerpos hemolíticos.
- Repetir dos veces esta operación.
- Almacenar a -50°C las alícuotas.

b. Titulación de Complemento

Se considera como unidad a la cantidad más pequeña de complemento diluido al 4% capaz de producir hemólisis total. Con este procedimiento se pueden medir 2 U exactas de complemento contenidas en 0.5 ml de solución.

- Preparar solución de complemento al 4% (0.1 ml complemento en 2.4 ml de SBV pH 7.3-7.4).
- La solución de complemento, el SBV y el sistema hemolítico, se disponen en tubos de acuerdo a lo descrito en Tabla 6.
- Incubar a 37°C durante 45 minutos.
- Tomar la dilución del último tubo que presentó hemólisis completa como una unidad. Aplicar la fórmula siguiente, para obtener 2 U exactas en un volumen de 0.5 ml:

$$\frac{\text{Dilución complemento}}{2 \text{ x (ml 1 U)}} = \frac{X}{0.5}$$

Tabla 6. Titulación del complemento.

Reactivos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SBV (1 ml c/u) más	0.45	0.425	0.4	0.375	0.35	0.325	0.30	0.275	0.250	0.50
Complemento al 4%	0.05	0.075	0.10	0.125	0.15	0.175	0.20	0.225	0.250	–
Hemolisina (2 u/0.5 ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Glóbulos rojos al 2%	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

4. Sueros

- Inactivar los sueros libres de hemólisis a 58°C durante 35 minutos.
- Agregar fenol en una concentración final de 0.25%.
- La dilución inicial del suero es 1:5.

5. Procedimiento de montaje

La prueba debe de realizarse en dos fases. La primera, para determinar los sueros positivos y la segunda para determinar su título.

a. Primera fase

Consiste en determinar si los sueros a analizar son positivos o negativos.

Para ello se estudia la presencia de anticuerpos y su posibilidad de actividad anticomplementaria. El desarrollo de este procedimiento se detalla en Tabla 7 y Figura 5.

Tabla 7. Volumen de reactivos a utilizar en el estudio de anticuerpos y actividad complementaria del suero problema.

Reactivos* (ml)	Control anticomplementario (CA)	Suero problema (SP)	Incubación
Suero problema	0.5	0.5	Baño
Antígeno	–	0.5	María
Complemento	0.5	0.5	37°C
SBV	0.5	–	1 hora
Sistema Hemolítico	1	1	Baño María 37°C 45 minutos

* Tabla aclaratoria de Figura 5.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1 CA	S2 CA	S3 CA	S4 CA	S5 CA	S6 CA	S7 CA	S8 CA	S9 CA	CN CA	CPD CA	CPF CA
B	S1 SP	S2 SP	S3 SP	S4 SP	S5 SP	S6 SP	S7 SP	S8 SP	S9 SP	CN 1:5	CPD 1:5	CPF 1:5
C	S10 CA	S11 CA	S12 CA	S13 CA	S14 CA	S15 CA	S16 CA	S17 CA	S18 CA	CN 1:10	CPD 1:10	CPF 1:10
D	S10 SP	S11 SP	S12 SP	S13 SP	S14 SP	S15 SP	S16 SP	S17 SP	S18 SP	CN 1:20	CPD 1:20	CPF 1:20
E	S19 CA	S20 CA	S21 CA	S22 CA	S23 CA	S24 CA	S25 CA	S26 CA	S27 CA	CN 1:40	CPD 1:40	CPF 1:40
F	S19 SP	S20 SP	S21 SP	S22 SP	S23 SP	S24 SP	S25 SP	S26 SP	S27 SP	CN 1:80	CPD 1:80	CPF 1:80
G	S28 CA	S29 CA	S30 CA	S31 CA	S32 CA	S33 CA	S34 CA	S35 CA	S36 CA	CN 1:160	CPD 1:160	CPF 1:160
H	S28 SP	S29 SP	S30 SP	S31 SP	S32 SP	S33 SP	S34 SP	S35 SP	S36 SP	CN 1:320	CPD 1:320	CPF 1:320

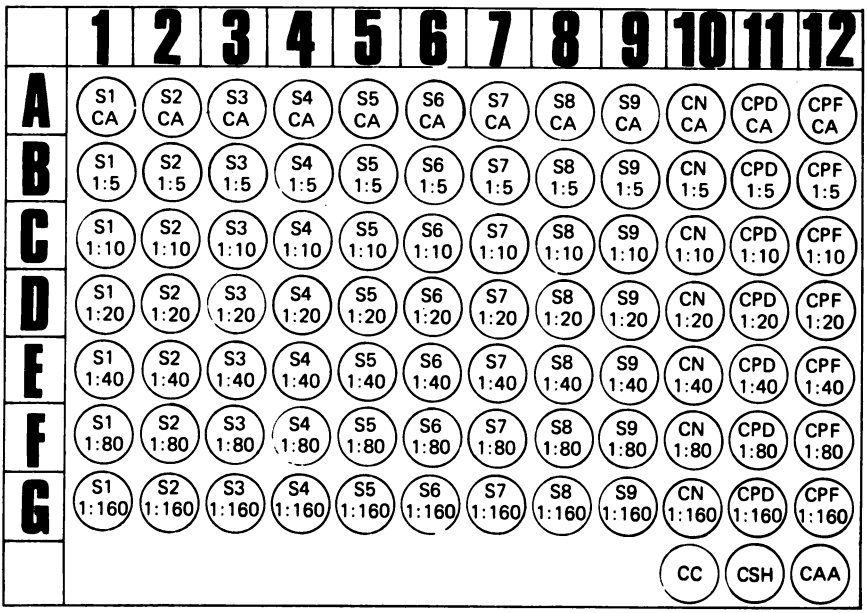
CA: CONTROL ANTICOMPLEMENTARIO **SP:** SUERO PROBLEMA **CN:** CONTROL NEGATIVO **CPD:** CONTROL POSITIVO DEBIL **CPF:** CONTROL POSITIVO FUERTE.

Figura 5. Estudio de anticuerpos y actividad complementaria de Sueros Problema.

Tabla 8. Volumen de reactivos a utilizar en la titulación de anticuerpos de sueros positivos.

Reactivos (ml)	Diluciones y números de tubos										
	1 1:5	2 1:10	3 1:20	4 1:40	5 1:80	6 1:160	7 C C	8 CSH	9 CAA	10 C A	Incubación
Suero Positivo	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	–	–	–	0.5	Baño María
Antígeno	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	–	–	0.5	–	37°C
Complemento	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	–	0.5	0.5	1 hora
SBV	–	–	–	–	–	–	–	0.5	–	0.5	
Sistema hemolítico	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Baño María 37°C 45 minutos

CC = Control complemento; CSH = Control sistema hemolítico; CAA = Control anticomplementario/antígeno; CA = Control anticomplementario/suero.



CA: CONTROL ANTICOMPLEMENTARIO **CC:** CONTROL COMPLEMENTO **CAA:** CONTROL ANTICOMPLEMENTARIO (Ag) **CN:** CONTROL NEGATIVO **CPD:** CONTROL POSITIVO DEBIL **CPF:** CONTROL POSITIVO FUERTE **S:** SUERO POSITIVO **CSH:** CONTROL SISTEMA HEMOLITICO.

Figura 6. Titulación por Fijación de Complemento de Sueros Positivos.

- Interpretación

  A los efectos de descartar la actividad anticomplementaria, los tubos dispuestos en las ordenadas D, C, E y G tienen que presentar hemólisis. (Figura 5).

- Los sueros son considerados como positivos cuando no existe complemento libre, capaz de actuar sobre el sistema hemolítico. De esta manera se tiene:

Positivo	(++++)	– Sin hemólisis.
Sospechoso	(+++)	– Un 25% de hemólisis.
Sospechoso	(++)	– Un 50% de hemólisis.
Sospechoso	(+)	– Un 75% de hemólisis.
Negativo		– Un 100% de hemólisis.

- Los sueros sospechosos (+++) tienen que ser titulados para determinar si son altamente positivos o simplemente sospechosos (fenómeno de prozona).

b. Segunda fase

Consiste en determinar el título de los sueros positivos. El desarrollo de este procedimiento se detalla en Tabla 8 y Figura 6.

- Interpretación: La titulación de cada suero corresponde a la dilución del último tubo que no presente hemólisis (++++).

B. AGLUTINACION EN TARJETA

El principio consiste en la reacción de un antígeno de *A. marginale* con las inmunoglobulinas (Ig) del suero de un animal infectado. Esta se manifiesta, en presencia de suero bovino normal, con formación de grumos.

La prueba es sencilla, de fácil alcance y rápida de realizar. Su interpretación es objetiva y comparando sus resultados con fijación de complemento, concuerdan en un 93%. (6)

1. Producción de antígeno

El antígeno puede ser obtenido comercialmente o preparado en el laboratorio. (1)

a. Obtención de sangre con parasitemia superior al 70%

- Esplenectomizar un ternero sano e inocular con una cepa de *A. marginale.*
- Controlar el curso de la enfermedad con frotis y hematocrito.
- Cuando los GRI son más del 70%, sangrar a blanco. Si no se logra esta parasitemia en un período de 10 días, obtener 500 ml (según porcentaje de GRI y hematocrito), centrifugar a 1.000 g durante 15 minutos a 4°C. Resuspender al volumen inicial con S/F e inocular a otro ternero esplenectomizado.
- La recolección total de sangre, se realiza por medio de una descubierta de carótida en un volumen igual de solución Alsever a 4°C.

b. Tratamiento de la sangre

- Centrifugar a 1.500 g durante 15 minutos, descartar el sobrenadante.
- Resuspender el sedimento con S/F al volumen inicial y repetir estos dos puntos tres veces.
- La última resuspensión debe ser con S/F más antibiótico, logrando una concentración final de GR del 50%.
- Pasar por Prensa Celular de French (PCF)* a 1.200-1.500 psi**, con un flujo de 3-5 gotas por segundo.
- Centrifugar el lisado 10.000 g durante 30 minutos a 4°C.
- Descartar el sobrenadante y suspender el sedimento en S/F más antibiótico.
- Homogeneizar con un homogeneizador de tejido.
- Repetir los tres puntos anteriores dos veces más.
- Colorear con Giemsa una muestra del sedimento y, si hay GRI enteros, repetir los puntos anteriores desde el lisado por PCF.
- Luego del último centrifugado, resuspender el sedimento con buffer acetato (pH 5) y homogeneizar.
- Pasar por PCF a 1.200-1.500 psi, con un flujo de 3-5 gotas por segundo.
- Centrifugar 10.000 g durante 30 minutos a 4°C y resuspender el sedimento en buffer acetato (pH 5) ajustando la concentración a 3.5-4.0% (microhematocrito, tubos Fitch-Hopkin).
- Para cada 25 ml de suspensión antigénica, agregar 1 ml de colorante Fast Green. Mezclar convenientemente la suspensión coloreada.
- Pasar por PCF a 1.200-1.500 psi con un flujo de 3-5 gotas por segundo.
- Centrifugar a 10.000 g durante 30 minutos a 4°C, resuspender el sedimento en buffer acetato (pH 5). Homogeneizar.
- Repetir los dos últimos pasos y ajustar la concentración antigénica a 4% en buffer acetato (pH 5).

* Marca comercial.

** Abreviatura inglesa de presión por pulgada al cuadrado.

c. **Evaluación y mantenimiento**

- Comparar el resultado de 100 sueros positivos y de 100 sueros negativos, con el preparado antigénico anterior.
- Envasar volúmenes de 1 ml en ampollas de vidrio cerradas al vacío.
- Colocar en una caja con su debida identificación a 4°C.
- Es preciso realizar estos pasos lo más rápidamente posible y a bajas temperaturas (0°C-4°C).

2. Producción de Suero Normal (SNB) o factor bovino

En la prueba de aglutinación en tarjeta de *A. marginale,* el antígeno reacciona con el anticuerpo formando un complejo que fija al complemento y luego la conglutinina, lo aglutina.

La concentración de complemento en el suero de la especie bovina es variable y esto puede ser causa de falsos negativos. Por esto se asegura en la reacción la presencia de complemento bovino y conglutinina con el agregado del SNB. (16)

- Se selecciona un bovino cuyo nivel de complemento sea óptimo (ver fijación de complemento).
- Como el complemento es inestable al calor, es necesario que el procesamiento del SNB, sea rápido hasta su almacenamiento. Puede mantenerse en nitrógeno líquido congelado en forma de pastillas.

3. Desarrollo de la técnica

- Los reactivos deben adquirir una temperatura de 22 a 26°C. (2)
- Los sueros a estudiar deben haber permanecido 48 horas con el coágulo.
- La prueba se debe realizar en condiciones de humedad y de 22 a 26°C de temperatura.

- Realizar 20 muestras con sus respectivos controles (sueros positivos-negativos y SNB) por vez.
- En una placa, se colocan*:

  . 1 gota (0.03 ml) SNB
  . 1 gota (0.03 ml) suero problema
  . 1 gota (0.015 ml) antígeno.

- Se mezclan los tres componentes y se mantiene agitando durante 4 minutos.
- Las reacciones se leen inmediatamente, siendo positivas las que presentan aglutinación.

C. AGLUTINACION EN TUBO CAPILAR

Otra posibilidad práctica, en la utilización de pruebas de aglutinación en el laboratorio, es la prueba de aglutinación en tubo capilar. (14)

1. Preparación del Antígeno

- Esplenectomizar tres o cuatro terneros libres de infección previa con *Anaplasma spp.* y que no hayan tomado calostro de vacas infectadas con este organismo.
- Realizar inoculaciones hasta que se obtenga una sangre con alrededor de 70% de GRI en 5 a 6 días postinoculación.
- Recolectar la sangre en frascos estériles con volumen igual de solución Alsever.
- Lavar los GR tres veces con una solución salina fisiológica (1.000 g durante 15 minutos a 0°C).
- Resuspender los GR en 2 volúmenes de solución salina fisiológica.
- Desintegrar las células en volúmenes de 50 ml con un sonicador durante 10 minutos (interrumpidos cada 30 segundos); manteniendo el frasco en baño María frío. Con esta finalidad se puede utilizar también un sonicador de flujo continuo o una Prensa Celular de French.

---

* Material de cármica

- Centrifugar a 6.950 g durante 30 minutos a 4°C.
- Homogeneizar (homogeneizador de tejidos) con 20 volúmenes de solución tampón veronal salina (pH 7.3).
- Repetir los dos puntos anteriores dos veces.
- Homogeneizar el sedimento con 3 volúmenes de solución tampón veronal y congelar en volúmenes de 2 ml a -65°C.
- Luego de 24 horas o más, descongelar y agregar 5 a 10 volúmenes de solución tampón salina.
- Centrifugar a 1.750 g durante 45 minutos.
- Suspender en solución veronal salina y reconstituir al volumen original del congelado.
- Homogeneizar y centrifugar a 1.750 g durante 30 segundos exactos. El sobrenadante contiene el antígeno.
- Agregar formalina al sobrenadante para obtener una concentración final de 0.2% y almacenar a 4°C de temperatura.

2. Estandarización del antígeno

- Agitar la suspensión previo al uso.
- Agregar a 5 ml de solución tampón veronal, 0.05 ml de la suspensión antigénica.
- Leer en fotocolorímetro a 550 nm siendo la DO deseada de 0.070.
- En cada nueva partida de antígeno es necesario realizar esta determinación.

3. Preparación del suero

- Inactivar el suero a 56°C durante 30 minutos.
- Agregar fenol para obtener una concentración final de 0.25% y almacenar a -65°C de temperatura hasta su posterior análisis. El suero que sea trabajado inmediatamente no es necesario agregarle fenol y se mantiene a 4°C.
- Los sueros contaminados, se pueden clarificar por centrifugación.

4. Ejecución de la prueba

- Llenar un tercio del volumen de tubo capilar (micro-hematocrito) con la suspensión antigénica.
- Completar el mismo con suero y colocarlo verticalmente, sellando con plasticina o cera la parte inferior, correspondiente al antígeno.
- Cerrar la parte superior para evitar la evaporación.
- Dejar a temperatura ambiente y realizar luego de 24 horas, la lectura usando un fondo oscuro o una fuente lumínica situada encima de los tubos.

D. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

El análisis por anticuerpos fluorescentes (IFA) es de alta sensibilidad y especificidad, de fácil preparación y conservación de su antígeno y de simple desarrollo. (7)

Su fundamento consiste en detectar inmunoglobulinas del suero animal en estudio, por intermedio de dos reacciones: a) con el parásito, b) con la globulina antibovina teñida con fluoresceína.

1. Producción de conjugado

Este es inmunoglobulina de conejo o caprino, anti-inmunoglobulina bovina, marcada con fluoresceína. Se puede obtener comercialmente o elaborar en el propio laboratorio de la siguiente manera*:

a. Obtención de suero bovino

- Utilizar material de vidrio limpio, seco, estéril y trabajar asépticamente.
- Colectar sangre de un animal adulto sin exposición previa a hematozoarios o vectores.
- Para la obtención de un suero mejor, dejar coagular la sangre durante 2 horas a 37°C y luego a 4°C durante 1 hora, permitiendo una mayor superficie de contacto con el aire.

---

* Callow, L. L. (Comunicación personal, 1974)

- Separar el suero del coágulo.
- Centrifugar 2 veces a 1.000 g durante 15 minutos a 4°C descartando el sedimento.

b. Obtención de inmunoglobulinas (Ig)

b.1 Preparación de Resina celulosa dietilaminoetil*

- Poner 10 gr de gel en 800 ml de AD (pH 6.7-7.2) durante 30 minutos. (4)
- Mezclar y dejar sedimentar durante 5 minutos.
- Descartar el sobrenadante que puede contener partículas finas de gel.
- Agregar AD y repetir esta operación por dos veces.
- Resuspender en AD y pasar por filtro Buchner, con papel filtro Whatman No. 1 ayudado con bomba de vacío.
- Pasar 1.000 ml de solución de NaOH 0.5 N.
- Pasar AD hasta que el eluente esté libre de álcali (comparar el pH de AD y del eluente).
- Pasar 1.000 ml de solución de HCl 0.5 N.
- Pasar AD hasta que el eluente esté libre de ácido (comparar el pH de AD y del eluente).
- Suspender el gel en AD y ajustar el pH a 6.5 con solución de NaOH 1 N ó de HCl N.
- Dejar sedimentar durante 5 minutos y descartar el sobrenadante.
- Suspender el gel en un buffer fosfato 0.01 M pH 6.5.
- Homogeneizar ocasionalmente, durante 15 minutos o pasar por filtro Buchner con papel filtro Whatman No. 1 ayudado con bomba de vacío, con 1.000 ml buffer fosfato 0.01 M pH 6.5.
- Mantener el gel mojado a 4°C.

Las filtraciones pueden ser sustituidas por sedimentaciones en las cuales se descarta siempre el sobrenadante.

---

* DEAE Sephadex A 50 (Pharmacia).

b.2 Purificación de Ig del suero

- Colocar 50 ml de suero bovino en 10 gr de gel DEAE Sephadex A 50.
- Homogeneizar durante 1 hora a 4°C.
- Pasar por filtro Buchner con papel filtro Whatman No. 1, ayudado con bomba de vacío hasta que no salga más líquido del gel.
- El filtrado se coloca nuevamente en 10 gr de gel y se repiten estos cuatro pasos, por lo menos seis veces.
- La composición del filtrado se controla por medio de electroforesis y la concentración de proteínas por el método de Biuret o espectrofotómetro a 280 nm.
  El filtrado óptimo debe mostrar no más de dos bandas de globulinas (las globulinas son de difícil separación). Este debe tener una concentración final de por lo menos 5mg/ml.
- Para concentrar se puede utilizar la evaporación, que consiste en colocar la solución, en un tubo de diálisis, al mismo tiempo que se hace pasar por sus paredes una corriente de aire (4°C).
- El pH es ajustado a 7.5 con K_2 H PO_4 1 M.

b.2.1 Electroforesis en Acetato de celulosa*

- Sumergir la tira en veronal sódico 0.04 M, por lo menos durante 10 minutos.
- Eliminar el exceso de líquido entre dos hojas de papel filtro.
- Extender la tira sobre el puente de la cámara electroforética (la superficie penetrable debe ir hacia arriba y los extremos sumergidos en veronal sódico con papel filtro).
- Aplicar 1.5μ 1/9 mm de muestra sobre la tira de cellogel a 2 cm del borde (Figura 7).

---

* Cellogel (Chemetron).

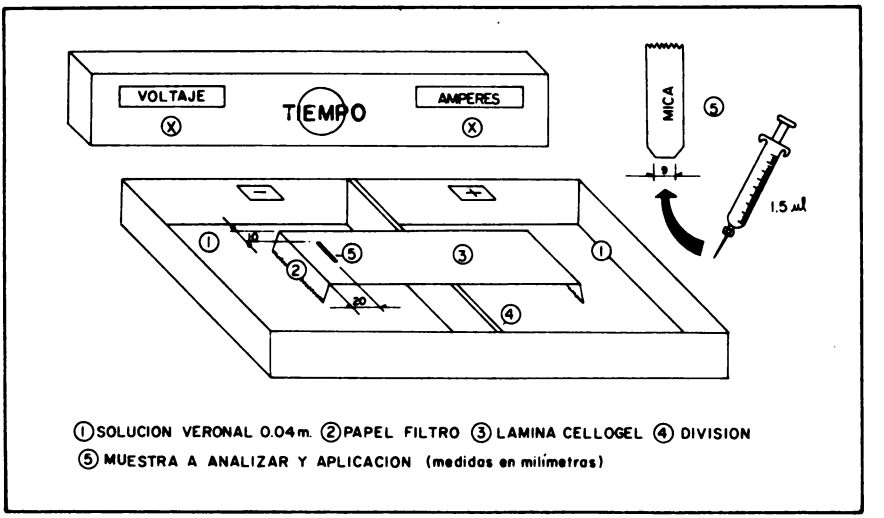


Figura 7. Representación esquemática de la aplicación de la muestra de electroforesis.

- Mantener voltaje 200 voltios durante 30 minutos.
- Colorear con Negro-amido durante 5 minutos.
- Decolorar con tres ó cuatro baños de solución decolorante para N.A.

b.2.2 Lectura en espectrofotómetro

- Diluir el suero convenientemente.
- Leer absorción a 280 nm (OD). Este valor no debe ser 0 ni superior a 1.8.
- Multiplicar el valor OD por 0.74. De esta manera se obtiene la concentración proteica*.

---

* El valor 0.74 resulta de $\frac{10}{E\ \frac{1\ cm}{1\%}}$ correspondiente a una mezcla de sueros, en donde ha sido determinado su contenido proteico, por el método de Kjeldahl.

b.2.3 Método de Biuret (RB)

Realizar las siguientes reacciones:

. Problema – 1 ml muestra + 1.5 ml R.B. Tapar y dejar durante 30 minutos.
. Blanco – 1 ml solución diluente + 1.5 ml R.B. Tapar y dejar durante 30 minutos.
. Control – 1 ml conocido + 1.5 ml R.B. Tapar y dejar durante 30 minutos.

– Leer en espectrofotómetro a densidad óptica 555 nm colocando el 0 con el blanco. Realizar las demás lecturas.
– El cálculo de mg/ml se realiza sabiendo la concentración del control por medio de una regla de tres simple.

c. Obtención de Ig anti-bovina, de conejo

c.1 Inóculo de conejo

– La solución de globulina de 5-30 mg/ml (pH 7.5) es dializada frente a suero fisiológico frío (durante 12 horas) antes de inocular.
– Homogeneizar 4 ml de solución de globulinas con 4 ml de adyuvante de Freund completo (A.F.C.).
– Inocular subcutáneamente sobre el dorso del conejo, 1 ml/punto en ocho diferentes puntos. A los 20 días medir concentración de Ig (examen experimental de sangría).
– Si es necesario se repite el inóculo (sin A.F.C.) pero en cantidades menores (2-3 ml).
– Luego de una semana se realiza cada cuatro días el examen para conocer el título de Ig.

c.1.1 Examen experimental de sangría

- Diluir el antígeno en solución fisiológica en tres diferentes concentraciones 30 μ g/ml, 100 μ g/ml y 500 μ g/ml. (5)
- Se coloca 0.2 ml de cada una, en tres tubos finos (aproximadamente 70 x 8 mm) y luego se agrega, a cada uno, una gota (0.038 ml) del antisuero a estudiar.
- Observar los cambios físicos, cada 5 minutos, durante 1 hora.

- Interpretación:

  Se provoca una reacción antígeno-anticuerpo manifiesta por precipitación. Si éstas son partículas finas, o la máxima turbidez está en el tubo de menor concentración (6 μ g/0.2 ml), el título es muy bajo. El antisuero es satisfactorio, cuando el precipitado se presenta en los tubos de concentración mayor (ej.: 20-100 μ g).

c.2 Obtención del suero de conejo

- Sangrar a blanco, obteniendo la sangre directamente del corazón.
- Colocar la sangre en tubos (siliconados o de polietileno), ofreciendo la mayor superficie posible para la formación del coágulo.
- Separar el suero de acuerdo a lo expuesto para suero bovino.
- Se realiza una prueba de inmunoelectroforesis para conocer su especificidad.

c.2.1 Inmunoelectroforesis

- Disolver en baño María caliente, 2 gr de agar en 100 ml de suero fisiológico*.
- Dejar enfriar hasta 60°C. (Figura 8)

---

* DIFCO.

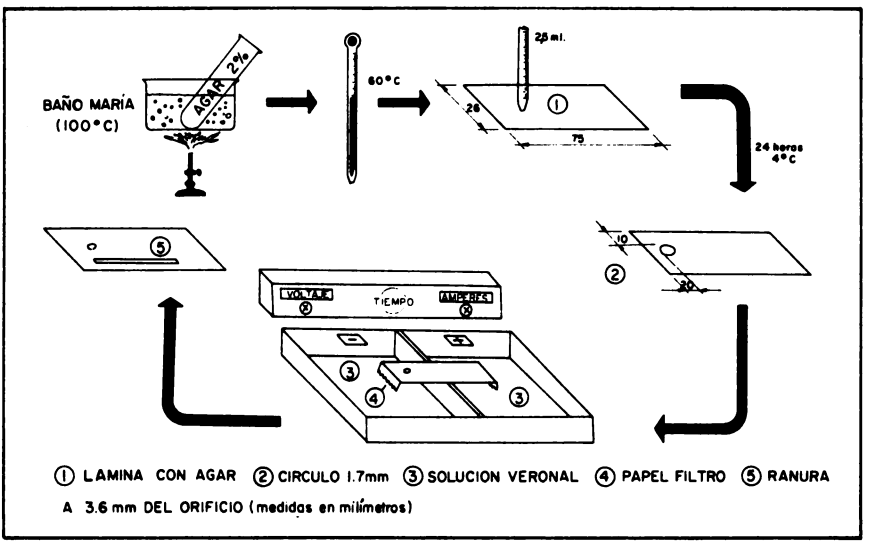


Figura 8. Preparación de agar y prueba de inmunoelectroforesis.

- Para evitar el desarrollo bacteriano, agregar Timerosal 1:10.000*.
- Cubrir una lámina (76 x 26 mm) con 2.5 ml de gel y dejar solidificar.
- Con sacabocado, preparar un hueco de 1.7 mm de diámetro a 2 cm del borde.
- Mantener a 4°C y utilizar la lámina luego de las 24 horas.
- Colocar la lámina sobre el puente de la cámara.
- Embeber tiras de papel filtro con veronal sódico y unir los bordes de láminas a la solución.
- Aplicar la solución antigénica, llenando el hueco.
- Mantener el voltaje a 200 voltios durante 30 minutos.

* Mertiolato.

- Realizar una canaleta a 3.6 mm de distancia del borde del hueco.
- Llenar con el antisuero a estudiar.
- Dejar durante 24 horas a 28°C, en Caja de Petri y con algodón mojado (asegura humedad).
- Colocar en AD durante 12 horas.
- Llenar los huecos con AD y cubrir la lámina con papel filtro mojado. Secar en estufa a 37°C, con secador a temperatura ambiente o con peso (1 kg) para facilitar la eliminación del líquido.
- Sacar el papel filtro.
- Colorear con Negro amido durante 5 minutos.
- Decolorar con baños sucesivos de solución decolorante para NA.

d. Purificación de inmunoglobulina de conejo

Se puede obtener inmunoglobulina anti-bovina de conejo a través de diferentes métodos tales como, precipitación por metanol, sulfato de amonio o filtrando a través de resinas.
En este caso se recomienda seguir el método ya descrito, de DEAE Sephadex A 50.

e. Coloración de Ig de Conejo con fluoresceína

- La concentración de Ig en suero fisiológico, debe ser de 10 mg/ml.
- Agregar buffer carbonato-bicarbonato (pH 9.0) 10% por volumen.
- Por cada mg de proteína agregar 0.025 mg de isotiocianato de fluoresceína.
- Mantener con agitación constante (4°C) durante 24 horas.
- Pasar por columna de Sephadex G 25, separando el exceso de fluoresceína.

BIBLIOTECA
Centro Interamericano de Documentación

e.1 Preparación de columna de Sephadex G 25

- Suspender 20 gr de Sephadex G 25 en 1.500 ml de PBS, decantar durante 1 hora y descartar el sobrenadante.
- Resuspender en 1.500 ml de PBS, decantar durante 1 hora y descartar el sobrenadante.
- Repetir dos veces más.
- Resuspender en 300 ml de PBS.
- Se prepara la columna (2.5 cm x 30 cm) introduciendo en su parte inferior lana de vidrio y luego 30 cm de PBS. Si no se dispone de columna se puede utilizar una pipeta o similar.
- Verter el gel con cuidado por las paredes de la columna.
- Dejar compactar el gel.
- Dejar eluir el sobrenadante e introducir 500 ml de PBS nuevo. Repetir el paso anterior hasta que la superficie superior del gel quede humedecida.
- Colocar la muestra y dejar pasar.
- Llenar la columna con PBS y dejar eluir rápidamente. Se forman dos zonas de color amarillo; la primera en eluir es la que se recoge, pues son Ig teñidas.
- Dializar el conjugado (Ig teñidas) durante 12 horas frente al suero fisiológico.

f. Pruebas y mantenimiento del conjugado

f.1 Espectrofotómetro

- Leer y relacionar los valores de OD del conjugado a dos longitudes de onda diferentes (280 y 495 nm) considerando como resultado óptimo 1.

f.2 Titulación

- Realizar diluciones crecientes del conjugado.
- Analizar éstos con diferentes sueros (débil y fuertemente positivos y negativos) cada uno por separado.

– Hallar la dilución, en donde la fluorescencia comience a variar. La dilución inmediatamente inferior, será la de trabajo.

f.3 Repetibilidad

Estudiar la repetibilidad del nuevo conjugado comparando los resultados de 100 sueros conocidos con la partida anterior.

f.4 Mantenimiento

Se mantiene en pequeñas cantidades (ej.: 0.5 ml) a -90°C o en nitrógeno líquido (cuidar que no descongele). Al descongelar se diluye con PBS de acuerdo al título, pudiéndose mantener alrededor de 10 días a 4°C.

2. Producción de antígeno

El porcentaje de GRI requerido, es de 1-3% para *B. bovis* y *B. bigémina* en períodos de incubación de hasta 7 días. De esta manera, se evita la presencia de anticuerpos. Muchas veces es necesario realizar sub-inoculaciones de sangre lavada, en terneros esplecnotomizados. (13)

– Colectar 1 volumen de sangre directamente sobre 9 volúmenes de PBS.
– Dentro de los 15 minutos centrifugar 1.000 g durante 5 minutos.
– Resuspender el sedimento al volumen inicial.
– Centrifugar a 1.000 g durante 5 minutos.
– Repetir este procedimiento cuatro veces.
– Los GR lavados son resuspendidos con PBS albúmina bovina 4%, para obtener un hematocrito de 30%.
– Realizar frotis largos, delgados y uniformes.
– Secar al aire o con calor.
– Tapar con papel absorbente, realizar paquetes de 4 láminas con papel aluminio.
– Identificar los paquetes.
– Conservar a -20 ó -90°C. La duración a -20°C es menor o igual a 6 meses. Preservar de la humedad.

3. Obtención de sueros controles

- Obtener suero proveniente de un bovino infectado conocido y realizar diluciones hasta que presente la mínima fluorescencia. De esta manera se obtienen controles débilmente y fuertemente positivo.
- Obtener suero proveniente de un bovino sin experiencia previa a *Babesia spp.* Este representa el control negativo.

4. Desarrollo de la técnica

- Preparar las diluciones de los sueros a trabajar, conforme a los resultados obtenidos en la titulación antes descrita. Si son positivos se trabajan en diluciones cada vez mayores para así conocer su título.
- Poner las láminas de antígeno a 37°C durante 5 minutos.
- Quitar el papel, marcar las divisiones e identificar con diamante marcador lápiz, goma líquida u otro procedimiento.
- Embeber ordenadamente los círculos del papel filtro en cada suero (o una gota de 10 μl) colocándolas en el espacio correspondiente de la lámina.
- En cada lámina poner controles débil y fuertemente positivos, negativo y PBS. Realizar esta operación en duplicado.
- Incubar a 37°C en cámara húmeda durante 30 minutos.
- Retirar las muestras con un lavado de PBS. Sumergir en cuba con PBS agitando constantemente durante 10 minutos.
- Hacer lo mismo con AD (pH 6.9-7.2) durante 5 minutos.
- Secar las láminas en su parte inferior y los cuatro bordes. Dejar húmeda la zona de reacción.
- Diluir el conjugado de acuerdo al título.
- Cubrir la zona de reacción con conjugado.
- Incubar a 37°C, en cámara húmeda, durante 30 minutos. Cuidar que el conjugado contacte con toda la zona constantemente (2% Twen 80/PBS).

- Sacar el excedente de conjugado y lavar con PBS durante 10 minutos y con AD (pH 6.9-7.2) durante 5 minutos.
- Secar como se indicó anteriormente.
- Superponer un cubre-objeto No. 1 con una gota de PBS/glicerol (9/1) sobre la zona de reacción.
- Leer en un microscopio con fuente de luz ultravioleta.

VI. DIAGNOSTICO INDIRECTO (GARRAPATAS)

Las probabilidades de infección encontradas en el campo dependen del número de garrapatas en el ambiente y de su infección con hemoparásitos.

El número de garrapatas en el ambiente es el resultado de diversos factores tales como: clima local, condiciones de suelo, quimioresistencia de la garrapata, resistencia del ganado, sistema de manejo y tipo de pastura.

Sirven como indicadores, los resultados de los siguientes exámenes:

A. RECUENTO DE GARRAPATAS ADULTAS EN BOVINO

- Sujetar al bovino en posición cúbito costal.
- El recuento se realiza en la totalidad de una mitad del cuerpo.
- Es conveniente tener un orden de palpación, por ejemplo, cabeza, cuello, miembro anterior (cara externa e interna) tronco, miembro posterior (cara externa e interna) y cola.
- El tamaño de las garrapatas a contar debe ser mayor de 4.5 mm.
- El resultado se multiplica por dos y se obtiene con ello una estimación de la población total de garrapatas.
- El tamaño de la muestra dependerá del número de bovinos a estudiar y de su infestación por garrapatas. Se precisan como mínimo muestras de diez bovinos.

B. EXAMEN DE HEMOLINFA

Por su intermedio sólo podemos saber si la garrapata respectiva está infectada. En este caso es posible obtener la progenie de esa teleógina, infestar un animal susceptible y aislar al hemoparásito.

- Incubar teleóginas a 26°C y > 80% de Hr durante 4 días.
- Colocar las teleóginas a examinar en forma ordenada para luego identificarlas.
- Sobre un porta-objetos, identificar y marcar círculos como teleóginas.
- Trabajar bajo la lupa. Tomar con una pinza el coxa, cortar y con la gota de hemolinfa, contactar el porta-objeto en el círculo correspondiente.
- Fijar con metanol y colorear con giemsa (igual que frotis de sangre).
- Observar en microscopio convencional.

C. OBTENCION DE LARVAS PARA INOCULAR BOVINOS SUSCEPTIBLES

- Colocar las teleóginas para realizar la oviposición.
- Acondicionar la masa de huevos (500 mg) en tubo de vidrio, cerrar con malla e identificar.
- Incubar a 26°C y > de 80% Hr.
- Controlar la eclosión.
- A partir de los 20 días de finalizada la misma, se inocula un animal susceptible, esplenectomizado.
- Controlar la aparición de enfermedad.

VII. AISLAMIENTO Y MANTENIMIENTO DE CEPAS

A. AISLAMIENTO DE *B. BOVIS* Y *B. BIGEMINA*

El aislamiento de *B. bovis* y *B. bigémina* puede realizarse utilizando diversos procedimientos aplicados aislados o simultáneamente como por ejemplo a través de garrapata, inóculo por jeringa y medicamento.

Un método es:

- Esplenectomizar un bovino susceptible.
- Infestar con larvas de *B. microplus* (libres de hematozoarios) los días -2, 0 y +2.
- Inocular con sangre infectada el día +14.
- Recolectar las teleóginas.
- Incubar a 26°C y > de 80% Hr.
- Obtener las larvas infectadas.

(Los siguientes pasos dependen del hemoparásito a aislar).

- Esplenectomizar 1 ó 2 bovinos susceptibles, según se aisle *B. bovis* o *B. bigémina* respectivamente.
- Infestar un bovino con larvas infectadas el día 0. Con esta finalidad, es conveniente utilizar sacos de tela previamente adheridos a la piel, que aseguran la infestación en un área limitada del animal.
- Quitar todas las metalarvas el día +4 y +5 (las larvas trasmiten *B. bovis*).
- Transferir las metalarvas a otro bovino susceptible esplenectomizado (trasmiten *B. bigémina*).
- Controlar los bovinos a través de la toma de temperatura, hematocrito y frotis.
- Obtener sangre a través de sangrado.
- Confirmar con la técnica de IFA.

B. AISLAMIENTO DE *ANAPLASMA MARGINAL*

Si se parte de un material que contiene los tres hemoparásitos:

- Inocular un bovino susceptible esplenectomizado.
- Suministrar al mismo tiempo una droga con acción esterilizante para *Babesia spp.* como por ejemplo, dipropionato de imidocarbo 0.5-1 mg/kg.
- Controlar los bovinos a través de la toma de temperatura, hematocrito y frotis.
- Obtener sangre a través de sangrado.
- Realizar coloración de *Anaplasma marginal* para descartar *Paranaplasma caudatum.*
- Confirmar con la técnica de IFA la ausencia de *Babesia spp.*

C. MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS

Una vez aislada la cepa hay varias posibilidades para su mantenimiento:

- Utilizando un animal como portador tiene una duración de 6 meses. Mantener al animal libre de otras posibles contaminaciones por hematozoarios.
- En refrigerador (4°C) su duración puede ser una semana.
- En cultivo celular, se realiza en GR con medio 199, suero bovino adulto normal y en 5% de tensión de CO_2. (9)
- Congelación en nitrógeno líquido.

1. Congelación en nitrógeno líquido

- El volumen final a congelar, depende de la parasitemia. (13)
- Enfriar la sangre tomada con anticoagulante (heparina 1 mg/1 ml) en forma estéril.
- Registrar el hematocrito y la parasitemia.
- Enfriar el diluente (PBS/DMSO).
- Identificar los tubos (fecha, organismo, parasitemia, No. del dador) y enfriar.
- Colocar un volumen de sangre conveniente en cada tubo.
- Agregar el mismo volumen de PBS/DMSO lentamente, mezclar y poner en frío.
- Realizar hematocrito.
- Secar bien cada tubo y acondicionar en el canister.
- Colocar primero en la fase gaseosa y luego en la líquida (en nitrógeno).
- Descongelar un tubo de muestra y realizar el hematocrito para verificar el proceso de congelamiento.
- En el registro del tanque de nitrógeno anotar: fecha de obtención y congelación, parásito, origen del mismo, diluyente, volumen congelado, posición en el tanque.
- El descongelado debe realizarse en un baño de agua de 30-40°C (forma rápida) e inocular I/V a un bobino. En condiciones óptimas, la viabilidad de los parásitos es duradera, si éstos son mantenidos en nitrógeno líquido.

VIII. MANTENIMIENTO DE SUEROS CONOCIDOS

Se recomienda a los laboratorios mantener almacenados sueros positivos a *B. bovis, B. bigémina* y *Anaplasma spp.* así como sueros negativos a estos hemoparásitos.

A. SUEROS POSITIVOS

Sueros de animales positivos conocidos deben ser recogidos y almacenados a -20°C o menos en diferentes alícuotas, para evitar que sufran constantes procesos de congelación y descongelación.

B. SUEROS NEGATIVOS

Sueros de áreas indemnes de estos hemoparásitos tienen que ser almacenados de la misma manera que los sueros positivos.

C. REGISTRO DE BANCO DE SUERO

En el libro de banco de sueros se registra el número de entrada del suero, procedencia, fecha de recolección, número de alícuotas, título del suero para inmunofluorescencia y/o fijación de complemento, como indica Ficha 2.

Ficha 2. Registro de Datos para Banco de Sueros.

No. Banco Suero	No. Animal	Fecha Recolección	Procedencia	No. alícuotas		Anaplasma			IFA	
				Obtenidas	Utilizadas	ATC	AT	FC	Bbi	Bbo

ATC = Aglutinación tubocapilar.
AT = Aglutinación tarjeta.
FC = Fijación de complemento.
IFA = Inmunofluorescencia indirecta.

IX. TECNICAS DE APOYO AL DIAGNOSTICO

A. ESPLENECTOMIA

- Sujetar al bovino previamente tranquilizado, con un preanestésico, en decúbito costal derecho. Inyectar Penicilina-estreptomicina.
- Lavar, depilar y desinfectar la zona comprendida entre las 2 últimas costillas y flanco izquierdo.
- Infiltrar 15 ml de solución de Procaína 4%, siguiendo una línea paralela a la línea del hipocondrio (1 cm del borde posterior última costilla) en un trayecto de 20 cm. Se comienza a 1 cm por debajo de la apófisis transversa de la primera vértebra lumbar.
- Incidir piel y separar planos musculares, por divulción, separando fibras musculares según la dirección de sus haces. Por último, incidir peritoneo parietal.
- En la zona superior del área operatoria, se desplaza la rama anterior de la arteria circunfleja ilíaca la que, muchas veces, debe ligarse.
- Una vez en la cavidad peritoneal, localizar el bazo y separarlo de la parrilla costal, diafragma y rumen, mediante manipulación suave. Ubicar el hilio esplénico.
- Visualizar y exteriorizar el órgano. Ligar el hilio esplénico, utilizando ligadura simple, con un nudo cirujano.
- Extirpar el bazo.
- Suturar el peritoneo parietal mediante puntos simples y luego los diferentes planos musculares según técnicas convencionales.
- Sutura del plano cutáneo con puntos separados en U (técnica según Anow).

B. DESCUBIERTA DE ARTERIA CAROTIDA Y TECNICA DE SANGRADO

- Sujetar al bovino en decúbito dorsal de modo que su cabeza quede ubicada en un plano inferior al dorso y ligeramente extendida.
- Lavar, depilar y desinfectar región ventral del cuello, en un área comprendida entre los bordes maxilares, los músculos mastoideo-humerales y la punta del externón.

- Infiltrar 15 ml de solución de Procaína 4%, sobre la línea media del cuello a unos centímetros por debajo de la laringe (2° ó 3° anillo traqueal), en un trayecto subcutáneo lineal de unos 10 cm.
- Incidir piel y separar planos musculares. Lateralizar tráquea y venas yugulares localizando por debajo de éstas, por su pulso, la arteria carótida. Visualizarla y separar de ella el nervio vago.
- Descubierta la arteria carótida, interrumpir el tránsito sanguíneo con pinzas arteriales, en un trayecto de unos 5 cm.
- Incidir la pared arterial con un pequeño corte longitudinal, suficiente como para introducir una cánula o cateter arterial (hacia el corazón) en un trayecto de unos 2 cm. Fijarlo con ligadura simple.
- Separar pinza arterial proximal y recolectar la sangre.

apéndices

apéndice 1

Composición de soluciones y colorantes

Buffer

1. Buffer acetato (pH 5)

Acido acético 0.2 M	148	ml
Solución Acetato de socio 0.2 M	352	ml
Methyl p-hidroxibenzoato	1	gr
Cloruro de sodio	8.5	gr
Agua destilada c.s.p.	1.000	ml

2. Buffer carbonato-bicarbonato 0.5 M (pH 9.0)

Na HCO_3 0.5 M	10	ml
Na_2 CO_3 0.5 M	1.2	ml

Mezclar las dos soluciones inmediatamente antes del uso.

3. Buffer fosfato 0.01 M (pH 6.5)

KH_2 PO_4 0.01 M	2	ml
K_2H PO_4 0.01 M	45	ml

4. Buffer fosfato salino (pH 6.9-7.2)

Na Cl	8	gr
K Cl	0.2	gr
Na_2 HPO_4	1.5	gr
K H_2 PO_4	0.2	gr
Agua destilada c.s.p.	1.000	ml

5. Buffer para coloración (pH 6.8)

$Na\ H_2\ PO_4$	9.2	gr
Agua destilada c.s.p.	1.000	ml
$Na_2\ H\ PO_4$	9.464	gr
Agua destilada c.s.p.	1.000	ml

Mezclar las dos soluciones hasta encontrar pH 6.8.

6. Buffer para coloración (pH 6.6)

$PO_4\ HNa_2$	3.8	gr
$PO_4\ H_2K$	5.47	gr
Agua destilada c.s.p.	1.000	ml

Homogeneizar y controlar pH 6.6. Utilizar 10 ml de esta solución en 1.000 ml de agua destilada para coloración con Giemsa.
Para coloración May-Grünwald-Giemsa, utilizarla pura.

7. Buffer tampón (pH 8)

Acido acético 1 M	10	ml
Na OH 1 M	10	ml
Agua destilada c.s.p.	250	ml

8. Buffer veronal (SBV)

Na Cl	42.5	ml
5.5 Acido dietilbarbitúrico	3.4375	gr
5.5 Dietilbarbiturato de sodio	1.3125	gr
$Mg\ Cl_2\ 6\ H_2O$	0.5	gr
$Ca\ Cl_2\ 2\ H_2O$	0.1	gr
Agua destilada c.s.p.	1.000	ml

Una parte de esta solución, debe diluirse en 4 partes de agua destilada ajustando pH a 7.3-7.4. Esta es la solución de uso diario.

OTRAS SOLUCIONES

1. Solución Alsever

Citrato de sodio	12.0	gr
Cloruro de sodio	4.2	gr
Dextrosa	20.5	gr
Agua destilada c.s.p.	1.000	ml

Las dos primeras sustancias, se disuelven en 800 ml de agua destilada. La dextrosa se disuelve en 200 ml de agua destilada y se esteriliza pasando por filtro Seitz.
Mezclar las dos soluciones asépticamente.

2. Decolorante para Negro Amido

Metanol	475	ml
Acido acético	50	ml
Agua destilada	475	ml

3. Solución de formol 10%

Formol	10	ml
Suero fisiológico	90	ml

4. Solución Veronal sódico 0.04 M

Dietil barbiturato sódico	8.24	gr
Agua destilada c.s.p.	1.000	ml

5. Suero fisiológico

Na Cl	8.5	gr
Agua destilada c.s.p.	1.000	ml

6. Solución de Bouin

Acido pícrico (solución saturada en agua destilada)	75	ml
Formalina (37 a 40%)	25	ml
Acido acético*	5	ml

* Se agrega en el momento de utilizar la solución

7. Solución de EDTA

Etilendiamina-tetra acetato de sodio	1.445	gr
Agua destilada c.s.p.	20	ml

Dos gotas de esta solución (0.038 c/u) son necesarias para la recolección de 5 ml de sangre.

8. Suero fisiológico-antibiótico

Na Cl	8.5	gr
Penicilina G potásica	100.000	UI
Sulfato dihydro-estreptomicina	100.000	μg
Agua destilada c.s.p.	1.000	ml

9. P.B.S./DMSO*

– P.B.S.

Na_2 H PO_4 2 H_2O	11.49	gr
KH_2 PO_4	1.43	gr
Na Cl	4.3	gr
Agua destilada c.s.p.	1.000	ml

– Mezclar

P.B.S.	78	ml
DMSO	22	ml

* Dimetil-sulfoxido

COLORANTES

1. Fast Green

Fast Green	1	gr
Na Cl	0.85	gr
Methyl p-hidioxibenzoato	0.1	gr
Agua destilada c.s.p.	100	ml

2. Giemsa

Giemsa en polvo (BDH)	3	gr
Glicerol	125	gr
		(100 ml)

Alcohol metílico	375	ml

Mezclar Giemsa y glicerol a 37°C durante 24 horas, luego agregar alcohol. Dejar durante 5 días a 37°C homogeneizando todos los días. Filtrar con papel Whatman No. 1.

3. Negro Amido

Negro Amido	0.5	gr
Metanol	45	ml
Acido acético	10	ml
Agua destilada c.s.p.	45	ml

4. Reactivo de Biuret

Solución Na OH 0.2

Na OH	8	gr
Agua destilada hervida y fría	1.000	ml

Disolver en 400 ml de Na OH 0.2 M

Na K tartrato	9	gr
Cu SO_4 5 H_2O	5	gr

Disolver en poca cantidad de Na OH 0.2 M

KI	5	gr

Mezclar las dos últimas soluciones y llevar a 1.000 ml con Na OH 0.2 M.

5. May Grünwald-Giemsa

Giemsa	2.27	gr
May Grünwald	1.90	gr
Glicerina*	60	ml
Alcohol metílico c.s.p.	1.000	ml

* La glicerina se utiliza en pequeñas porciones (10 ml) para disolver los colorantes por separado. Estos se lavan en alcohol metílico y se mezclan en frasco color ámbar. El colorante no debe utilizarse, antes de un reposo de 30 días y un filtrado previo.

6. Naranja de Acridina

– Solución madre

Naranja de Acridina	2.5	gr
H Cl (concentrado)	2.14	ml
Solución salina (0.85%)	250	ml

– Diluyente

Solución salina	250	ml
H Cl	2.14	ml

En el momento de usar, mezclar 1 volumen de solución madre con 9 volúmenes de diluyente.

apéndice 2

Material Básico y Equipo

1. SANGRE/SUERO

- Tubo vidrio capacidad ± 10 ml.
- Aguja hipodérmica 25 x 12 / 50 x 12.
- Porta objeto 76 x 26 mm.

2. MATERIAL DE AUTOPSIA/ESTUDIO ANATOMOPATOLOGICO

- Porta objeto 76 x 26 mm.
- Frasco tapa rosca universal/25 cc.

3. COLORACION

- Cubre objeto 24 x 24 mm.
- Porta objeto 76 x 26 mm.
- Caja de vidrio para metanol y colorante.
- Ventilador o similar.
- Microscopio convencional.
- Microscopio fuente luz ultravioleta (filtro UG25-UG5, filtro barrera 42/44).

4. HEMATOCRITO

- Centrífuga especial para microhematocrito o plato de microhematocrito.
- Tubos capilares.

5. FIJACION DE COMPLEMENTO

- Espectrofotómetro.
- Centrífuga refrigerada hasta 50.000 gr.
- Sonicador.
- Balanza de presición.
- Medidor de pH.
- Baño María hasta 58°C.
- Freezer -20°C.
- Homogeneizador de tejido.
- Gradilla.
- Pipetas 1 ml (1/100).
- Tubos ± 6 ml.

6. PRUEBA AGLUTINACION EN TARJETA

- Centrífuga refrigerada hasta 10.000 g.
- Prensa celular de French (American Instrument Company, Silver Spring, Maryland, 20910, USA).
- Rotor horizontal.
- Medidor de pH.
- Refrigerador (4°C).
- Homogeneizador de tejidos.
- Tubo con espiga graduada (tipo Hopkin).
- Ampolla de vidrio.
- Placas de material cármico con diez divisiones.
- Gotero, 0.015 ml para antígeno.
- Gotero, 0.03 ml para SNB.
- Tubo capilar de vidrio 0.03 ml para muestra a diagnosticar.
- Escobillas para mezclar.

7. PRUEBA AGLUTINACION CAPILAR

- Centrífuga refrigerada hasta 7.000 g.
- Medidor de pH.
- Fotocolorímetro 500-550 LO.
- Sonicador.
- Freezer -70°C.
- Frascos, 3 ml.
- Homogeneizador de tejidos.
- Baño María hasta 56°C.
- Tubos capilares 0.5 mm x 10 cm.
- Plasticina.

8. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

MATERIAL DE VIDRIO

- Frasco de 250 ml.
- Matraz de 2.000 ml/probeta de igual capacidad.
- Kitasato de 500 ml.
- Vaso de bohemia de 250 ml.
- Frasco precintado.
- Tubo de vidrio de 2 ml.
- Tubo de vidrio de 5 ml.
- Tubo 70 x 8 mm.
- Tubo 50 ml (vidrio siliconado o polietileno).
- Tubo microhematocrito (tipo Hopkin).
- Pipeta graduada.
- Cubre objeto 18 x 18 mm.
- Porta objetos 76 x 26 mm.
- Jeringa de 5 ml.
- Filtro Buchner.
- Homogeneizador de tejidos.

VARIOS

- Papel filtro Whatman No. 1.
- Marcador.
- Tubo de diálisis.
- Tira de cellogel.
- Coadyuvante de Freund.
- Aguja de 25 x 7 mm.
- Papel filtro millipore 0.45 μ.
- Soporte filtro (tipo jeringa).
- Termómetro.
- Sephadex G 25.
- DEAE Sephadex A 50.
- Silicogel.
- Pinza.
- Caja (porta lámina).

EQUIPO

- Centrífuga refrigerada hasta 5.000 g.
- Espectrofotómetro.
- Medidor de pH.

- Cámara electroforética/fuente energética.
- Estufa 28°C – 37°C.
- Microscopio con fuente de luz ultravioleta.
- Freezer -90°C, -20°C y/o tanque nitrógeno.
- Balanza de precisión.

9. EXAMEN DE HEMOLINFA

- Estufa 26°C > de 80% humedad.
- Portaobjeto 76 x 26 mm.
- Microscopio estereoscópico.
- Marcador.
- Pinza.
- Tubo de vidrio con tapa y malla.
- Caja cartón 8 x 5 x 3 cm (para envío).

10. MANTENIMIENTO DE LA CEPA

- Baño María a 0°C.
- Tubos resistentes al congelado/tapón de goma.
- Pipeta de 10 ml.
- Probeta 100 ml.
- Tanque nitrógeno.

11. ESPLENECTOMIA/DESCUBIERTA DE CAROTIDA

MATERIAL DE CIRUGIA

- Pinzas.
- Hemostática.
- Tijera curva.
- Tijera recta.
- Clamps.
- Sonda.
- Bisturí.
- Jeringa 10 ml.
- Aguja 7 x 25 mm.
- Hilo.
- Antibiótico (Penicilina/Estreptomicina).
- Preservador de ectoparásitos.

bibliografía

BIBLIOGRAFIA

1. AMERAULT, R. E. and ROBY, T. O. A rapid card aglutination test for bovine anaplasmosis. Journal of American Veterinary Medical Association. 153(12):1828-1834. 1965.

2. _____. Card test an accurate and simple procedure for detecting anaplasmosis. Department of Agriculture. Agricultural Research Center. Beltsville, Maryland. United States. 38 p.

3. AUSTRALIA. DEPARTMENT OF PRIMARY INDUSTRIES. DIVISION OF ANIMAL INDUSTRY. Collection and submission of specimens for laboratory examination. Field officers' Manual. Queensland, 1977. 61 p.

4. BAUMSTARK, J. S.; LAFFIN, R. J. and BARDAWIL, W. A. A preparative method for the separation of 7 s gammaglobulin from human serum. Archives of Biochemistry and Biophysics. 108:514-122. 1964.

5. CHASE, M. W. Collection and handling of serum. *In* Williams, C. A. y Chase, M. W., eds. Methods in inmunology and inmunochemistry. New York. Academic Press, 1967. pp. 237-254.

6. CHRISTENBERRY, C. C. and ALLEY, J. L. An evaluation of the rapid card aglutination test for the anaplasmosis in field diagnosis erradication studies. Proceedings of the United State Animal Health Association. 76:88-93. 1972.

7. JOHNSTON, L. A.; PEARSON, R. D. and LEATCH, G. Evaluation of an indirect fluorescent antibody test for detecting *Babesia argentina* infection in cattle. Australian Veterinary Journal. 49(8):373-377. 1973.

8. KIMBER, C. D. and BURRIDGE, M. J. The indirect fluorescent antibody test for experimental East Coast feber (Theileria parva infection of cattle). Evaluation of dried blood samples as a source of antibody. Research in Veterinary Science. 13(2):133-135. 1972.

9. LEVY, M. G. and RISTIC, M. *Babesia bovis:* continues cultivation in a micro-aerophilus stationary phase culture. Science 207:1218-1220. 1980.

10. MAHONEY, D. F. Babesia of domestic animals. *In* Kreier, J. P., ed. Parasitic Protozoa. New York. Academic Press. 1977, pp. 1-52.

11. MAHONEY, D. R. and SAAL, J. R. Bovine babesiosis: thick blood films for the detection of parasitemia. Australian Veterinary Journal. 37:44-47. 1961.

12. MARTIN, W. H. and RITCHIE, W. H. A microtiter technique for the complement fixation test for anaplasmosis. Proceedings 77th Annual Meeting V.S. Animal Health Association. 1973. pp. 582-592.

13. MC COSKER, P. El control de piroplasmosis y anaplasmosis en ganado bovino. FAO-MACA. Informe Técnico 2. Bolivia. 1973. p. 65.

14. RISTIC, M. A capillary Tube-Aglutination Test of anaplasmosis. A preliminary Report. Journal of American Medical Association. 141(5):588-594. 1962.

15. _____. Anaplasmosis *In* Nijhoff, M., ed. Diseases of cattes in the tropics. The Hague. Netherlands, 1981. pp. 327-344.

16. ROSE, J. E.; AMERAULT, T. E. and ROBY, T. O. Roles of conglutinin, complement and antibody size in card aglutination test for bovine anaplasmosis. American Journal of Veterinary Research. 35:1147-1150. 1974.

17. SERGENT, E. *et al.* Etudes sur les piroplasmoses bovines. Institut Pasteur D'Algérie. Alger. 1945.

18. SMITH, R. Guía para el diagnóstico y control de la anaplasmosis y la babesiosis en el ganado bovino. Centro para la Investigación de Zoonosis. Universidad de Illinois, United States. p. 52.

19. TODOROVIC, R. and GARCIA, R. Comparison of the dried blood on filter paper and serum techniques for the diagnosis of bovine babesiosis utilizing the indirect fluorescent antibody (IFA) test. Tropenmedizing and Parasitologie. 29(1):88-94. 1978.

20. US. DEPARTMENT OF AGRICULTURE. AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE. A manual for conducting the complement-fixation test for anaplasmosis. Washington D. C. 1958. p. 20.