

DOT ELISA PARA EL DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE LA ANAPLASMOSIS Y BABESIOSIS BOVINA

Dot-ELISA for the serodiagnosis of bovine anaplasmosis and babesiosis

Sonia Montenegro-James*

Teresa Guillén**

Manuel Toro^{1*}

* Departamento de Medicina Tropical.
Universidad de Tulane,
New Orleans, LA, USA.

** Instituto de Investigaciones Veterinarias
IIV-FONAIAP,
Maracay, Estado Aragua, Venezuela.

RESUMEN

La detección rápida de anticuerpos contra hemoparásitos de *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* y *B. bigerrina* fue lograda exitosamente mediante el uso de cuerpos de inclusión de *A. marginale* y merozoitos purificados de *B. bovis* y *B. bigerrina*, en una prueba serodiagnóstica Dot-ELISA. El inmunoensayo enzimático utilizó solamente 20 ng de merozoitos de *Babesia* spp. y 25 ng de antígeno de *A. marginale* aplicado sobre discos de nitrocelulosa. Los complejos antígeno-anticuerpo fueron detectados mediante fosfatasa alcalina conjugada a proteína A y las reacciones fueron leídas visualmente después de la adición de un substrato cromogénico precipitable. La prueba permitió en menos de 3 horas, el procesamiento de múltiples sueros para tamizaje serológico o para determinación de título y fue tan sensible como la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI). El comportamiento de Dot-ELISA para el diagnóstico serológico de la anaplasmosis y babesiosis bovina fue analizado en 580 y 200 sueros respectivamente y fue como sigue: *A. marginale* - sensibilidad, 93%; especificidad, 96%; y valor predictivo, 95%; *B. bovis* - sensibilidad, 95%; especificidad, 82%; y valor predictivo, 95%; *B. bigerrina* - sensibilidad, 98%; especificidad, 79%; y valor predictivo, 97%. No se observaron reacciones cruzadas con sueros bovinos positivos a *Babesia* spp., *A. marginale*, *Trypanosoma vivax* o a infecciones virales y bacterianas comunes. El antígeno aplicado en la nitrocelulosa fue estable almacenado a -20°, 4° o 25° C. Comparado con IFI, Dot-ELISA resultó más fácil, más rápida y con interpretación más objetiva de los resultados. La simplicidad y bajo costo combinados con alta sensibilidad y especificidad hacen de Dot-ELISA una prueba fácilmente adaptable al trópico donde sería de la mayor utilidad para estudios seroepidemiológicos de la anaplasmosis y babesiosis bovina.

Palabras claves: Anaplasmosis, babesiosis, bovino, serodiagnóstico, Dot-ELISA.

ABSTRACT

Rapid detection of antibodies to *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* and *B. bigerrina* parasites was successfully achieved using isolated *A. marginale* initial bodies and *B. bovis* and *B. bigerrina* merozoites in a Dot-ELISA serodiagnostic test. The enzyme immunoassay used only 20 ng of *Babesia* spp. merozoites and 25 ng of *A. marginale* antigen dotted onto nitrocellulose disks. Antigen-antibody complexes were detected by use of alkaline phosphatase-conjugated protein A and reactions were read visually after addition of a precipitable chromogenic substrate. The test allowed the processing of multiple sera either for screening or for titer determinations of samples in less than 3 hours and was found to be as sensitive as the indirect fluorescent antibody test (IFAT). The overall performance of the Dot-ELISA for the serodiagnosis of bovine anaplasmosis and babesiosis was determined in 580 and 200 sera respectively and was as follows: *A. marginale* - sensitivity, 93%; specificity, 96%; and predictive value, 95%; *B. bovis* - sensitivity, 95%; specificity, 82% and predictive value, 95%; *B. bigerrina* - sensitivity, 98%; specificity, 79% and predictive value, 97%. Cross-reactivity was not observed with bovine sera positive to *Babesia* spp., *A. marginale*, *Trypanosoma vivax* or common bacterial or viral infectious agents. The antigen dotted onto nitrocellulose disks was stable when stored at -20°, 4° or 25° C. Compared with the IFAT, the Dot-ELISA allowed easier, faster, and more objective interpretation of results. Its simplicity and low cost combined with high sensitivity and specificity makes this test a convenient immunoassay system readily applicable to the tropics where it will be most useful for seroepidemiological studies of bovine anaplasmosis and babesiosis.

Key words: Anaplasmosis, babesiosis, cattle, serodiagnosis, Dot-ELISA.

Recibido el: 20 mayo 1992

Aceptado el: 29 octubre 1992

INTRODUCCION

Existe un creciente interés por el desarrollo de técnicas específicas, sensibles y rápidas para el diagnóstico serológico de infecciones microbianas y parasitarias. Si bien se cuenta con una variedad de pruebas para detectar anticuerpos de *Anaplasma marginale* y *Babesia bovis* y *B. bigemina* en bovinos (fijación del complemento^[8,16], aglutinación en tarjeta^[1,19], inmunofluorescencia indirecta (IFI)^[6,11], aglutinación con látex^[10], ELISA^[20,23] y radio inmunoensayo^[18]), la mayoría de ellas adolecen de adecuada sensibilidad y especificidad, o requieren equipos especializados y compleja estandarización. En consecuencia, esos procedimientos resultan a menudo poco prácticos para el diagnóstico de rutina.

La excelente capacidad de la nitrocelulosa para adsorber proteína^[21] sentó las bases para el desarrollo del DOT-ELISA, un ensayo inmunoenzimático simple, rápido y económico^[5]. Actualmente, la técnica es ampliamente aceptada para el diagnóstico serológico de numerosas infecciones parasitarias^[15].

Usando cuerpos de inclusión purificados de *A. marginale* extractos solubilizados de merozoitos de *B. bovis* y *B. bigemina* como antígeno "doteado" o aplicado en forma de mancha sobre discos de nitrocelulosa, hemos desarrollado una prueba de DOT-ELISA para la detección de anticuerpos de *A. marginale*, *B. bovis* y *B. bigemina*, respectivamente. En el presente estudio, hemos evaluado el DOT-ELISA para el diagnóstico serológico de la anaplasmosis y babesiosis bovina en comparación con la prueba IFI.

MATERIALES Y METODOS

Preparación del antígeno

1. *Anaplasma marginale*. La cepa Florida de *A. marginale* fue usada para infectar un ternero esplenectomizado. Al pico de la parasitemia (75-80%), se colectó sangre en forma aseptica usando EDTA (ethinelediamine tetraacetic acid) como anticoagulante. Después de centrifugar (2.000 g por 15 minutos) para eliminar el plasma, los eritrocitos infectados fueron lavados con buffer glicina 0.1 M, pH 3.0, a fin de remover anticuerpos adheridos^[11]. A continuación, los eritrocitos se lavaron 3 veces en PBS (Phosphate buffered saline), pH 7.4, conteniendo antiproteasas (3.5 mM de tetratoato de sodio, Sigma) y 0.01% de timerosal. Después de cada lavado la capa superior (buffy coat) fue cuidadosamente removida. El paquete de glóbulos rojos lavados fue nuevamente suspendido en 5 volúmenes de PBS y fue sonicado a 20 kilociclos con un flujo de 40 ml por minuto, en un sonicador ultrasonico LS 175 Branson. Luego de 3 ciclos de congelación y descongelación, se repitió nuevamente la sonicación. Para asegurar una completa ruptura celular, el material

sonicado se mezcló con un volumen igual de Nonidet P-40 (Sigma) al 1% en PBS y se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente. La recuperación de los cuerpos de inclusión de *Anaplasma* se logró mediante centrifugación diferencial de acuerdo a métodos previamente descritos^[9]. El pellet conteniendo la fracción parasitaria se lavó 3 veces en buffer frío (155 mM de cloruro de colina y 5 mM de HEPES a pH 7.4). El pellet final conteniendo los cuerpos de inclusión purificados, fue resuspendido en PBS y la concentración de proteína fue estimada por el método de Lowry^[7], modificado por la adición de 3.5 mM de sodiododecyl sulfato (SDS) al buffer alcalino de la reacción, a fin de determinar el contenido de proteínas de una suspensión particulada.

2. *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*. Cepas de *B. bovis* y *B. bigemina* originalmente aisladas en México fueron utilizadas para infectar terneros esplenectomizados. En el pico de la parasitemia (2-4%), la sangre infectada fue asepticamente colectada y procesada para lisar en forma selectiva los eritrocitos no-infectados. Para *B. bovis* se utilizó solución hipotónica de cloruro de sodio (0.06M) seguida de centrifugación a diferentes velocidades para colectar los merozoitos intactos^[14]. El pellet de merozoitos se suspendió nuevamente en PBS y fueron solubilizados por sonicación. Para *B. bigemina* los merozoitos fueron concentrados con solución acuosa de cloruro de amonio al 0.83%, tamponada con buffer Tris 0.17 M pH 7.6 y mantenida a 37°C. Los merozoitos se recuperaron por centrifugación diferencial y se solubilizaron con 1% de Nonidet-40 mezclado a volúmenes iguales. La concentración de proteína de las respectivas suspensiones de merozoitos fue determinada por el método de Lowry^[7].

Muestras de suero. Setecientos ochenta sueros se obtuvieron de varias fuentes: (1) banco de sueros del Instituto de Investigaciones Veterinarias en Maracay, Venezuela: 408 sueros de bovinos con historia clínica conocida; (2) una finca de ganado de carne en Dixon Springs, Illinois, USA: 200 muestras de suero tomadas 4 meses después de un brote de anaplasmosis; y (3) 172 sueros obtenidos de 24 animales para experimentación usados en pruebas de vacunación de *Anaplasma*. Además, 32 sueros de bovinos positivos a *Trypanosoma vivax*, rabia, fiebre aftosa, leptospirosis, strongilosis y encefalitis viral bovina se utilizaron para pruebas de reacción cruzada.

Preparación de los discos de nitrocelulosa. Se cortaron discos de 6 mm de diámetro de la nitrocelulosa con una perforadora para Papel. Se empleó nitrocelulosa de BioRad (Richmond, CA, USA) de poro de 0.45 µm. Para evitar contaminación con otras proteínas, los discos se manejan con pinzas. A cada disco de nitrocelulosa se le aplicó con una pipeta Pasteur un punto (dot) de aproximadamente 1 µl de suspensión conteniendo el antígeno respectivo. Para los cuerpos de inclusión de *A. marginale*, la concentración de antígeno fue de 25 µg de proteína/ml y para los merozoitos de *B. bovis* y *B. bigemina* fue de 20 µg de proteína/ml. Una vez aplicado el antígeno, los discos se secaron a temperatura ambiente por 10 minutos y se almacenaron a diferentes temperaturas (-20°C, 4°C).

temperatura ambiente y 37° C) hasta ser usados. Discos de nitrocelulosa con antígeno recién adsorbido se usaron para comparación de la estabilidad del antígeno a diferentes temperaturas.

Procedimiento del DOT-ELISA. Los discos de nitrocelulosa (con el antígeno adsorbido) se colocaron en pocillos de microplacas de fondo plano de 96 o de 24 pocillos. Todos los pasos de la prueba se realizaron a temperatura ambiente, usando PBS como buffer base. Los volúmenes de reactivos fueron de 100 a 200 μ l/pocillo, cantidades suficientes para cubrir los discos de nitrocelulosa. Sueros controles conocidos, positivos y negativos se emplearon en cada prueba, además de un control de antígeno (PBS solo).

1. Bloqueo. PBS-0.5% Tween-20 se agregó a cada pocillo, e incubado durante 15 minutos y descartado.
2. Incubación de anticuerpo. Las muestras de suero diluidas a una dilución inicial de 1:200 en PBS-0.05% Tween-20 fueron incubadas por 1 hora. Para la titulación de los sueros, se hicieron diluciones dobles a partir de la inicial.
3. Lavado. Tres lavados de 10 minutos cada uno con PBS-0.1% Tween-20.
4. Iricubación del conjugado. Se incubó durante 30 minutos, utilizando fosfatasa alcalina-proteína A 0.5 mg (Sigma) a una dilución de 1:500 en PBS-0.05% Tween-20.
5. Lavado. Como en el punto 3, agregando un cuarto lavado con buffer TRIS pH 9.5 (0.1M TRIS, 0.1M NaCl, 5 mM MgCl₂).
6. Substrato de la enzima. El substrato utilizado fue uno comercialmente producido por Kirkegaard and Perry Laboratories Inc. (Gaithersburg, Maryland, USA). Nitroblue tetrazolium (NBT), 5-bromo-4-chloroindoxyl phosphate (BCIP) y buffer Tris 0.1 M pH 9.5, mezclado en la proporción de 1:1:10 y dejándolo actuar de 5 a 10 minutos.
7. Parar la reacción con 20 μ M EDTA en PBS.
8. Visualización. Se observó en los discos positivos, unos puntos o manchas de color púrpura de diferente intensidad y ausencia de color en los discos negativos.

Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). La técnica fue conducida de acuerdo a la metodología descrita por Montenegro-James y col.^[11]. La dilución inicial del suero fue de 1:40. Se hizo la determinación de títulos de anticuerpos en 292 muestras de suero. El rango de títulos se estableció de la siguiente manera: Bajo, 1:40 a 1:80 (IFI), 1:200 a 1:400 (DOT), Medio 1:60 a 1:320 (IFI), 1:800 a 1:1600 (DOT), Alto \geq 1:640 (IFI), \geq 1:3200 (DOT). El porcentaje de acuerdo^[3] entre IFI y DOT-ELISA fue determinado en 3 grupos de sueros con un total de 608 muestras.

Determinación de los valores de sensibilidad, especificidad y valor predictivo, del DOT-ELISA. En base a los resultados de 780 sueros de bovinos con historias

conocidas de infección natural o experimental con *A. marginale*, *B. bovis* y *B. bigemina*, los valores de especificidad, sensibilidad y valor predictivo del DOT-ELISA fueron calculados de acuerdo a las fórmulas establecidas para la validación de pruebas diagnósticas^[3].

RESULTADOS

Estandarización de los antígenos

Los antígenos de *A. marginale*, *B. bovis* y *B. bigemina*, preparados en la forma indicada y almacenados a -20°C resultaron óptimos para ser usados en DOT-ELISA. Después de titular las suspensiones de antígenos, las concentraciones más adecuadas a usar en la prueba fueron las siguientes: *A. marginale*, 25 μ g de proteína/ml o aproximadamente 25 μ g de proteína/DOT. Para *B. bovis* y *B. bigemina* 20 μ g de proteína/ml o aproximadamente 20 μ g de proteína/DOT. La actividad antigénica disminuyó gradualmente luego de varios ciclos de congelación y descongelación; sin embargo, el antígeno adsorbido en los discos de nitrocelulosa permaneció estable por más de dos años almacenado a -20°C o a 4°C. Conservado a temperatura ambiente permaneció estable por lo menos 3 meses y por un mes a 37°C.

Procedimiento del DOT-ELISA. El bloqueo más efectivo de los sitios libres de unión de la nitrocelulosa conteniendo el antígeno, fue con 0.5% de Tween-20 en PBS, con un periodo de incubación de 15 minutos. El bloqueo resultó menos satisfactorio cuando se usó albúmina de suero de bovino, leche en polvo descremada o gelatina. Debido a su efectividad y bajo costo, se escogió el Tween-20 a la concentración de 0.5% como el agente bloqueador para la prueba. Para la prueba de DOT-ELISA se seleccionó la enzima fosfatasa alcalina acoplada a la proteína A como sistema de detección del complejo antígeno-anticuerpo debido a su capacidad de reducir en forma notable las reacciones inespecíficas sin reducir en forma significativa la sensibilidad del ensayo.

Los resultados de una típica prueba de DOT-ELISA para *A. marginale* aparecen en la Fig. 1. La columna 1 muestra (izq. a der.) el control positivo, el negativo y el control de antígeno; las columnas 2-6 corresponden a 5 grupos de 3 animales experimentales cada uno, a los que se les tomaron muestras seriadas de suero una vez por semana. Las primeras reacciones positivas aparecen débiles (filas superiores) luego se pusieron más intensas en los grupos vacunados (columnas 2 a 5), mientras que los animales no vacunados (columna 6) permanecieron negativos durante las 9 semanas de monitoreo. Fig. 1. Una titulación de anticuerpos para *B. bovis* y *B. bigemina* usando el DOT-ELISA se demuestra en la Fig. 2. Se visualiza claramente la reacción indicativa del punto final del título para cada suero (izq. a der.).

El porcentaje de acuerdo entre el DOT-ELISA y la prueba estándar IFI para el diagnóstico serológico de la anaplasmosis bovina fue calculado en dos grupos de sueros de Venezuela y de Estados Unidos (agrupados por

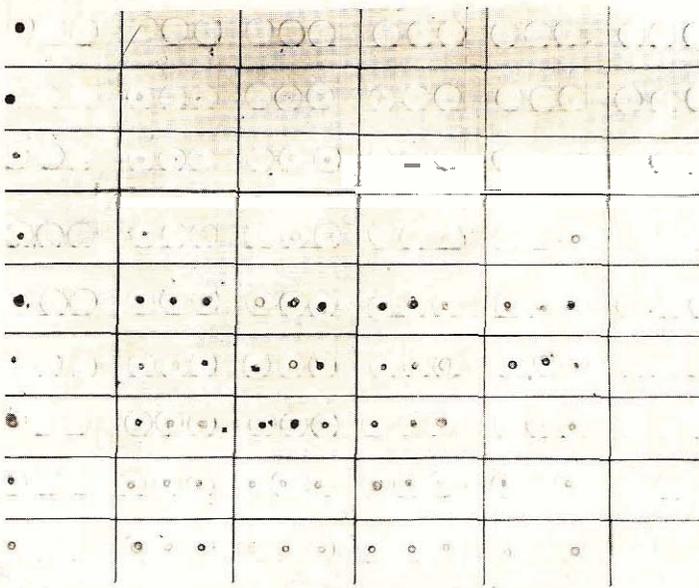


Fig. 1. DOT-ELISA usando cuerpos de inclusión aislados de *A. marginale* para el diagnóstico serológico. Columna 1 (izq. a der.), controles positivo y negativo y del antígeno. Columnas 2-5, suero de 3 animales por grupo vacunal, colectado semanalmente en forma seriada de la semana 0 a la 8. Columna 6, sueros de 3 animales del grupo control sin vacunar, colectado seriadamente

edad). Los resultados demostraron un porcentaje de acuerdo del 92% y 93% respectivamente. Fig. 3, indicando que el DOT-ELISA resultó tan sensible como la prueba IFI en detectar anticuerpos IgG para anaplasmosis bovina. La distribución de frecuencias de títulos de anticuerpos fue analizada con 92 muestras de suero positivas a *A. marginale*. El DOT-ELISA demostró frecuencias relativamente mayores para títulos altos (42%), y medios (38%) al compararlos con frecuencias de 34% y 16% para los mismos rangos de títulos obtenidos por IFI, Fig. 4.

El porcentaje de acuerdo entre el DOT-ELISA e IFI para *B. bovis* y *B. bigemina* calculado en 200 sueros, fue de 89% para *B. bovis* y 95% para *B. bigemina* respectivamente, ver TABLA. La distribución de frecuencias de títulos de anticuerpos según los rangos establecidos, mostró mayor frecuencia de títulos medios y altos en DOT-ELISA para *B. bovis* y una distribución de frecuencias de títulos similar para ambas pruebas para *B. bigemina*, Fig. 5.

No hubo reacciones cruzadas con sueros bovinos positivos a otras infecciones (ver Materiales y Métodos) ni con el antígeno de *Anaplasma* ni con los de *Babesia*. La validación de la prueba DOT-ELISA de acuerdo a los valores de sensibilidad, especificidad y valor predictivo para el diagnóstico serológico de la anaplasmosis bovina, fue determinada en 580 sueros con los siguientes resultados: 93% de sensibilidad (19 reacciones falsas negativas de un total de 269 verdaderas positivas); 96% de especificidad (13 falsos positivos de un total de 311 verdaderos negativos), dando un valor predictivo de 95% para la prueba. La validación del DOT-ELISA para el serodiagnóstico de babesiosis bovina determinada en 200'

sueros fue la siguiente: *B. bovis*: 95% de sensibilidad (9 reacciones falsas negativas de un total de 158 verdaderas positivas); 82% de especificidad (9 reacciones falsas positivas, de un total de 42 verdaderas negativas) por lo que el valor predictivo del ensayo fue de 95%; *B. bigemina*: 98% de sensibilidad (3 reacciones falsas negativas de un total de 185 verdaderas positivas); 79% de especificidad (4 reacciones falsas positivas de un total de 15 verdaderas negativas), resultando en un valor predictivo del 97%. La confiabilidad entre pruebas o reproducibilidad del ensayo fue establecida por la inherente invariabilidad de los resultados obtenidos luego de repetido el examen de los mismos sueros.

DISCUSION

Una prueba diagnóstica ideal debiera ser sensible, específica, reproducible, económica y simple de realizar. El DOT-ELISA aquí descrito, utilizando cuerpos de inclusión aislados de *A. marginale* extractos de merozoitos de *B. bovis* o *B. bigemina*, resultó una prueba altamente

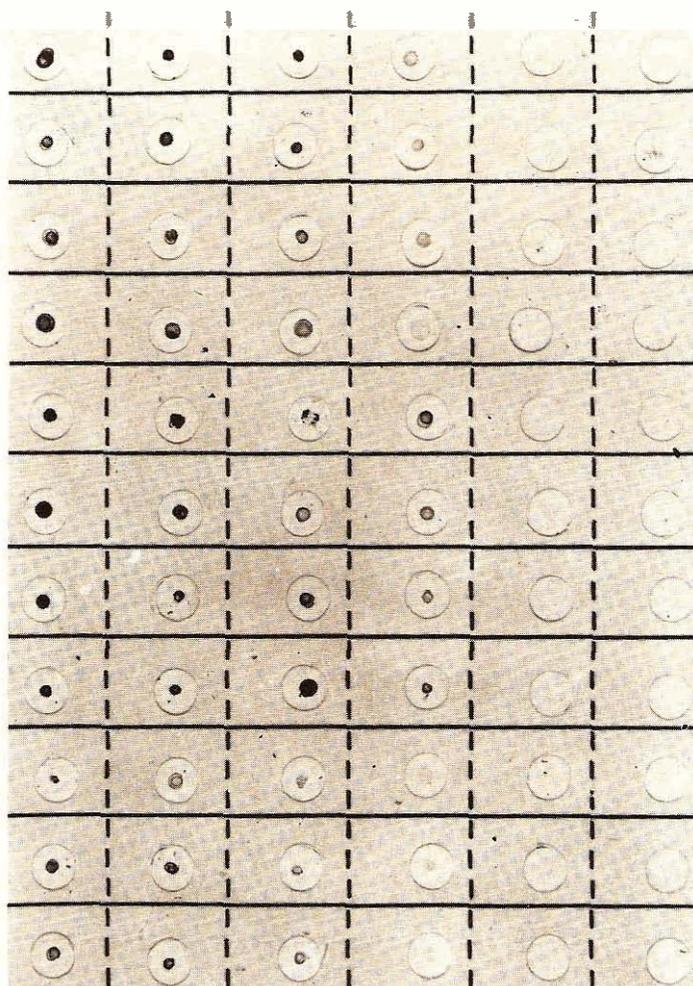
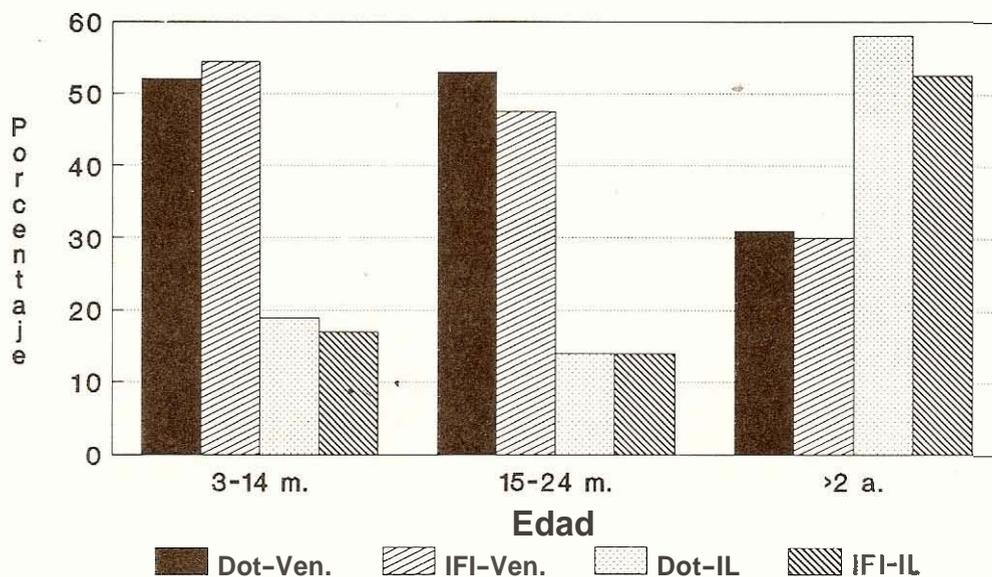


Fig. 2. Titulación de sueros individuales usando DOT-ELISA con merozoitos de *B. bovis* y *B. Bigemina*. Izq. a der.; diluciones dobles empezando con 1.200.

Comparacion de IFI y DOT-ELISA

Venezuela y D.Springs, IL, USA

Anaplasmosis bovina



n=208 Venezuela, 92% n=200 IL USA, 93%

Fig. 3 Distribucion de frecuencias de serorreacores a *A. marginale* usando DOT-ELISA e IFI en dos grupos de sueros. Porcentaje de acuerdo es indicado

Comparacion de IFI y DOT-ELISA

Anaplasma marginale

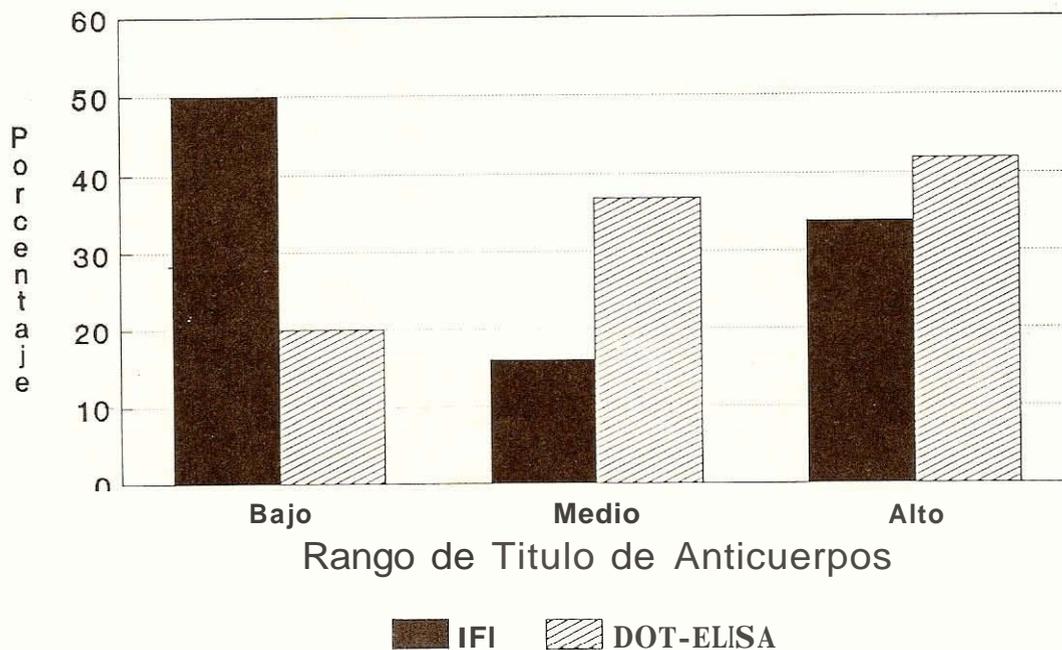


Fig. 4. Distribucion de frecuencias de rango de titulo de anticuerpos para serorreacores a *A. marginale* usando DOT-ELISA e IFI.

Comparación de IFI y DOT-ELISA Babesia bovis y Babesia bigemina

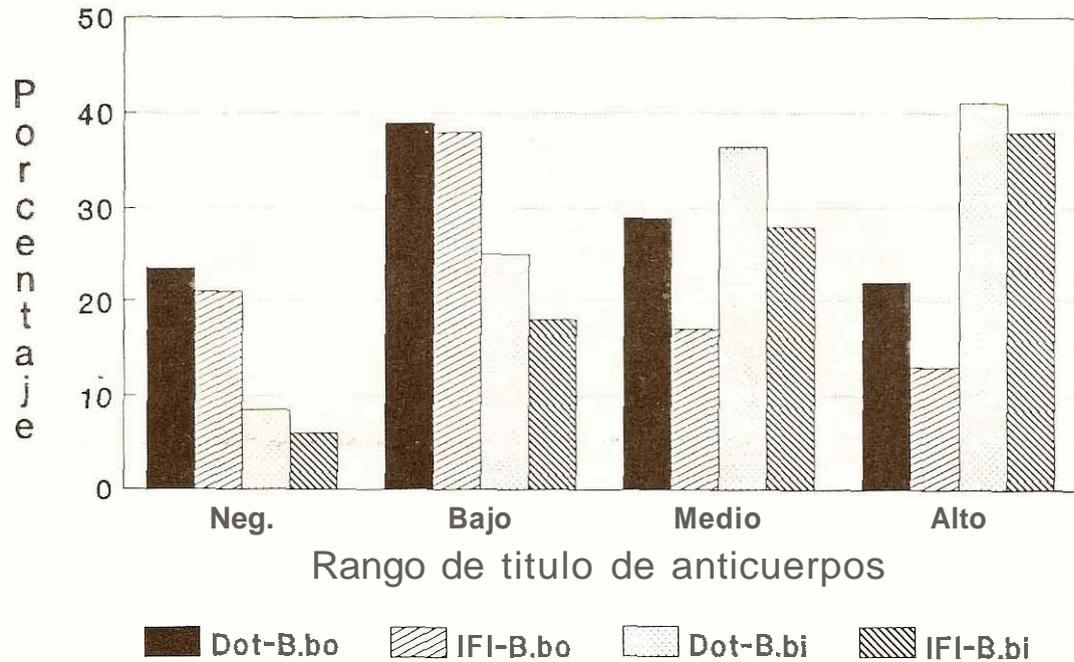


Fig 5. Distribución de frecuencias de rango de título de anticuerpos para *B. bovis* y *B. bigemina* usando DOT-ELISA e IFI

TABLA

PORCENTAJE DE ACUERDO ENTRE LAS PRUEBAS DOT-ELISA E IFI PARA EL DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE LA BABESIOSIS BOVINA

Babesia bovis

IFI

Prueba de Referencia

	Positivos	Negativos	Total
DOT-ELISA Positivo	145	9	154
DOT-ELISA Negativo	13	33	46
TOTAL	158	42	200

Porcentaje de Acuerdo = 89% n = 200

Babesia bigemina

IFI *

Prueba de Referencia

	Positivos	Negativos	Total
DOT-ELISA Positivo	179	4	183
DOT-ELISA Negativo	6	11	17
TOTAL	185	15	200

Porcentaje de Acuerdo = 95% n = 200

sensible y específica con un valor predictivo promedio de 95% para el diagnóstico serológico de la anaplasmosis y babesiosis bovina.

Pappas^[15] en una revisión reciente del uso, hoy en día, del DOT-ELISA en inmunoparasitología, concluyó que la prueba es una de las más versátiles ya sea para detectar antígeno o anticuerpo y que se adapta tanto a condiciones de laboratorio como a las de campo. El DOT-ELISA puede completarse en menos de 3 horas y permite el procesamiento simultáneo de muchos sueros.

El punto final de las titulaciones puede determinarse fácilmente, ya que la interpretación de resultados, es visual. La prueba en formato de microplaca economiza reactivos y no requiere de equipo especializado. Además de estas ventajas, tiene una mayor sensibilidad que la prueba tradicional de ELISA, debido a la mayor capacidad de la nitrocelulosa de adsorber antígeno, en comparación con el poliestireno o polivinil^[5].

Un valor de especificidad aceptable para cualquier ensayo es primariamente función de la calidad del antígeno más que de la metodología de la prueba. En el diagnóstico serológico de la anaplasmosis bovina, reacciones inespecíficas se atribuyen a la presencia de anticuerpos dirigidos a antígenos eritrocitarios^[2,11,16]. Estos anticuerpos se conjugan con las inmunoglobulinas antibovinas resultando a menudo en especificidad subóptima^[20]. En el presente estudio, se observó un aumento de la especificidad de la prueba cuando se utilizó un antígeno ourificado. De esta manera se pudo reducir efectivamente

la reactividad indeseada causada por la unión inespecífica de anticuerpos a la nitrocelulosa. Además, se pudo conseguir un aumento en la sensibilidad al usar proteína A^[23] en lugar de la enzima conjugada con IgG bovina, que es lo que tradicionalmente se usa en la prueba convencional de ELISA. En comparación con IFI, el DOT-ELISA resultó claramente ventajoso, al ser más rápido, sencillo y objetivo. Más importante aún, no requiere de un equipo especializado como lo es un microscopio de fluorescencia. El porcentaje de acuerdo (93%) entre ambas pruebas resultó satisfactorio e indicó que el DOT-ELISA podría efectivamente sustituir o complementar la prueba de IFI para el diagnóstico serológico de la anaplasmosis bovina. Una apreciación similar puede concluirse a partir de los resultados obtenidos con el uso del DOT-ELISA para la detección de anticuerpos anti-*Babesia*. Aunque aparentemente los valores de especificidad resultaron más bajos con *Babesia* (promedio 81%), es importante hacer notar que la reacción cruzada entre *B. bovis* y *B. bigemina* está bien documentada^[19, 17, 24]. Al parecer ambas especies de *Babesia* comparten uno o más antígenos^[4, 12, 24], observándose títulos más altos y persistentes al antígeno de *B. bigemina* con suero inmune anti-*B. bovis*^[3, 17]. Los resultados aquí obtenidos parecen confirmar esas hipótesis.

Voller y De Savigny^[22] en una revisión del diagnóstico serológico de enfermedades parasitarias tropicales, enfatizaron que la inadecuada validación de las pruebas inmunodiagnósticas, constituye uno de los mayores obstáculos para el rápido desarrollo de ensayos mejorados. Ellos propusieron que para la validación de una prueba, parámetros esenciales, tales como sensibilidad, especificidad, valor predictivo, reacción cruzada y reproducibilidad, debieran ser determinados para cada nuevo ensayo desarrollado. En el presente estudio hemos reportado la validación del DOT-ELISA para anaplasmosis y babesiosis. Los excelentes valores obtenidos en los diferentes parámetros hacen a esta prueba un inmunoensayo conveniente, fácilmente adaptado a los trópicos donde será de gran utilidad para estudios seroepidemiológicos de la anaplasmosis y babesiosis bovina.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] Amerault, T.E., Roby, T.O. A rapid card agglutination test for bovine anaplasmosis. *JAVMA* 153: 1828-1834, 1968.
- [2] Barry, D.N., Parker, R.J., de Vos, A.J., et al. A microplate enzyme-linked immunosorbent assay for measuring antibody to *Anaplasma marginale* in cattle serum. *Aust. Vet. J.* 63: 76-79, 1986.
- [3] Fletcher, R.H., Fletcher, S.W., Wagner, E.H. Clinical epidemiology--the essentials. Baltimore: Williams and Wilkins Company; 41-58, 1982.
- [4] Goodger, B.V. Preparation and preliminary assessment of purified antigens in the passive haemagglutination test for bovine babesiosis. *Aust. Vet. J.* 47: 251-253, 1971.
- [5] Hawkes, R.E., Niday, E., Gordon, J. A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal. Biochem.* 119: 142-147, 1982.
- [6] Leeflang, P. and Perie N.M. Comparative immunofluorescence studies on 4 *Babesia* spp of cattle. *Res. Vet. Sci.* 13: 342-346, 1972.
- [7] Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., et al. Protein measurements with the Folinphenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 250-261, 1951.
- [8] Mahoney, D.F. Bovine babesiosis. Diagnosis of infection by a complement fixation test. *Aust. Vet. J.* 38: 48-52, 1962.
- [9] McHardy, N., Gilson, C. An electron microscopy study of diagnostic antigens prepared from *Anaplasma marginale*. *Z. Trop. Parasitol.* 25: 11-14, 1974.
- [10] Montenegro, S., James, M.A., Levy, M.G., et al. Utilization of culture-derived soluble antigen in the latex agglutination test for bovine babesiosis and anaplasmosis. *Vet. Parasitol.* 8: 291-297, 1981.
- [11] Montenegro-James, S., James, M.A., Ristic, M.A. Modified indirect fluorescent antibody test for the serodiagnosis of *Anaplasma* infections in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 46: 2401-2403, 1985.
- [12] Montenegro-James, S., Kakoma, I., Ristic, M. Culture-derived *Babesia* exoantigens as immunogens. In: Veterinary Protozoan and Hemoparasite Vaccines. I.O. Wright (Ed.) CRC Press, pp. 61-97, 1989.
- [13] Montenegro-James, S., Toro, M., Leon, E. et al. Bovine babesiosis: induction of protective immunity with culture-derived *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* immunogens. *Parasitol. Res.* 74: 142-150, 1987.
- [14] O'Donoghue, P.J., Friedhoff, K.T., Vizcaino, O.G. et al. The detection of IgM and IgG antibodies against *Babesia bigemina* in bovine sera using semi-defined antigens in enzyme immunoassays. *Vet. Parasitol.* 18: 1-12, 1985.
- [15] Pappas, M.G. Recent applications of the DOT-ELISA in immunoparasitology. *Vet. Parasitol.* 29: 105-129, 1988.
- [16] Price, K.E., Pollma, S.A., Faber, J.E. Preparation of an improved antigen for anaplasmosis complement-fixation test. *Am. J. Vet. Res.* 13: 149-151, 1952.
- [17] Smith, R.D., Molinar, E., Larios, F. et al. Bovine babesiosis: pathogenicity and heterologous species immunity of tick-borne *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infections. *Am. J. Vet. Res.* 41: 1957-1962, 1980.
- [18] Schunter, C.A., Leatch, G. Radioimmunoassay for *Anaplasma marginale* antibodies. *Am. J. Vet. Res.* 49: 504-507, 1988.
- [19] Todorovic, R.A., and Kuttler, K.L. Babesiosis card agglutination test. *Am. J. Vet. Res.* 35: 1347-1350, 1974.
- [20] Thoen, C.O., Blackburn, B., Mills, K., et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies in a herd in which anaplasmosis was diagnosed. *J. Clin. Microbiol.* 11: 499-502, 1989.
- [21] Towbin, A., Staehelin, T., Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354, 1979.
- [22] Voller, A., De Savigny, D. Diagnostic serology of tropical parasitic diseases. *J. Immunol. Meth.* 46: 1-29, 1981.
- [23] Waltisbuhl, D.H., Goodger, B.V., Wright, I.O., et al. An enzyme-linked immunosorbent assay to diagnose *Babesia bovis* infection in cattle. *Parasitol. Res.* 73: 120-131, 1987.
- [24] Wright, I.G., Goodger, B.V., Leatds, G. et al. Protection of *Babesia bigemina* immune animals against subsequent challenge with virulent *Babesia bovis*. *Infec. Immun.* 55: 364-368, 1987.