



EL SABER DE MIS HIJOS
PARA MI GRANDEZA

UNIVERSIDAD DE SONORA

UNIDAD REGIONAL SUR

DIVISION DE CIENCIAS E INGENIERIAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUIMICO-BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DETECCION DE Babesia microti EN PACIENTES
CON SINDROME FEBRIL INESPECIFICO DEL SUR
DEL ESTADO DE SONORA

TESIS PROFESIONAL
PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO BIOLOGO CLINICO

PRESENTAN

Rosario Verenice Leyva Valenzuela
Tania Eveline Moroyoqui Solís

NAVOJOA, SONORA

JUNIO DEL 2015

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON




**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

APROBACIÓN

Los miembros del jurado asignado para revisar la Tesis Profesional de **Rosario Verenice Leyva Valenzuela y Tania Eveline Moroyoqui Solís**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el título de **Químico Biólogo Clínico**.



Dra. Norma Patricia Adán Bante
Director



Dr. Danilo Manuel González Román
Secretario



M.C. Ramona Icedo García
Vocal

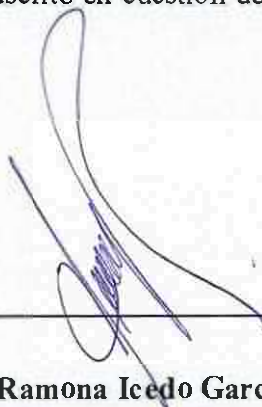


Q.B. Silvia Elena Rodríguez Márquez
Suplente

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permite y agradece las citas breves del material contenido en este trabajo de Tesis sin permiso especial de los autores, siempre y cuando se de crédito correspondiente al autor y a la Universidad de Sonora, Unidad Regional Sur.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en este trabajo de tesis, deberá dar créditos a la Universidad de Sonora, previa aprobación escrito del manuscrito en cuestión del Director de tesis.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke, positioned above a solid horizontal line.

M.C. Ramona Icedo García

Jefe del Departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a nuestra Alma Mater la Universidad de Sonora Unidad Regional Sur, por otorgarnos las herramientas necesarias para ser profesionistas.

Primeramente nos gustaría agradecer a nuestra directora de tesis Dra. Norma Patricia Adán Bante, por brindarnos sus conocimientos, orientación, motivación y generosidad al brindarnos la oportunidad de trabajar en este proyecto, así como sentirnos en deuda por todo lo recibido durante el periodo que duró nuestra tesis.

Asimismo agradecemos a nuestros sinodales Dr. Danilo Manuel González Román, M.C. Ramona Icedo García y M.C. Silvia Elena Rodríguez Márquez, por sus conocimientos y el valioso apoyo brindado.

Agradecemos a nuestros maestros no solo de la licenciatura sino de toda la vida, porque de alguna manera forman parte de lo que ahora somos.

Agradecemos al Laboratorio de Referencia Sonora LABS, por permitirnos llevar a cabo nuestro trabajo en sus instalaciones, en especial al Q.B.C. Alan Andrei López López por su apoyo y atención durante nuestra estancia.

DEDICATORIA

A Dios, por darme fortaleza para seguir adelante y ser mi motivo de fe enseñándome a ser valiente frente a las adversidades.

A mis padres, Natividad y Juan Manuel, por su apoyo, comprensión y amor, quienes me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia, mi coraje para conseguir mis objetivos.

A mi nanita Tungui, por su cariño, compañía y ayudarme en el transcurso de mi camino.

A mis hermanos Gladys, Fernando, Manuel y a mi cuñado Juan Carlos, por estar siempre presentes, acompañándome para poderme realizar. A mi sobrino Carlitos, quién es mi motivación, inspiración y felicidad.

A Bibiano, de quién recibí un gran optimismo, cariño y consejos que contribuyeron a lograr me profesionalmente.

A mi compañera y amiga Tania, con quién trabajé en equipo para la elaboración de esta tesis, alcanzando juntas una meta muy importante en nuestra vida, lucha siempre por cumplir tus mayores anhelos, te estimo mucho y que dios te bendiga siempre.

A mis amigos, Berayma, Alejandra, Tania, Bibi, porque gracias a su apoyo hicieron esta experiencia una de las más especiales, Isis (†) a quién siempre llevo en mi corazón.

"Volví a sentir unas inmensas ganas de vivir cuando descubrí que el sentido de mi vida era el que yo le quisiera dar". Paulo Coelho.

Rosario Verenice

DEDICATORIA

A dios por permitirme concluir esta etapa de mi vida.

Este trabajo y esfuerzo va dedicado a toda mi familia a las personas que siempre han estado a mi lado y a quienes me han apoyado para llegar a esta instancia de mis estudios.

Principalmente dedico este logro a mis padres Rosario y Jesús que son personas que me han ofrecido el amor y la calidez de una familia a la cual amo, pues su afecto y su cariño son los detonantes de mi felicidad de mis esfuerzos y de mis ganas de buscar siempre lo mejor.

A mis tres personas muy importantes en mi vida mis dos hermanos y mi novio Pablo por su amor y por compartir momentos bonitos de mi vida juntos. Por tal motivo este logro también es dedicado para ustedes.

A mis amigos de la universidad que me permitieron entrar en su vida durante estos años, la verdadera amistad no desaparece queda para siempre Rosario, Berayma y Bibiano, principalmente a mi amiga y compañera de proyecto de tesis Rosario no solo por haber estado juntas en este proyecto de tesis si no por los agradables y buenos momentos en los que convivimos, te deseo una vida exitosa y llena de bendiciones.

Tania Eveline

CONTENIDO

APROBACIÓN	II
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	III
AGRADECIMIENTOS	IV
DEDICATORIAS	V
CONTENIDO	VII
LISTA DE TABLAS	X
LISTA DE FIGURAS	XI
JUSTIFICACIÓN	XII
OBJETIVOS	XIII
HIPÓTESIS	XIV
RESUMEN	XV
PROTOZOARIOS	I
Generalidades de los Protozoarios	2
Género <i>Babesia</i>	5
<i>BABESIA MICROTI</i>	9
Morfología	9
Ciclo Biológico	12
BABESIOSIS	16
Síndrome Febril Inespecífico	17
Patogenicidad	18
Síntomas y Signos Clínicos	18
Epidemiología	20

Tratamiento	21
Prevención	21
DIAGNÓSTICO POR LABORATORIO	23
Tinciones de Laboratorio	23
Tinción Wrigth	23
Tinción Giemsa	24
Tinción Wrigth-Giemsa	24
Enzimoimmunoanálisis de Absorción (ELISA)	24
ELISA Directo	25
ELISA Indirecto	25
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	28
Cultivo <i>In Vitro</i>	29
Inmunotransferencia (Western Blot)	30
Microscopio de Campo Oscuro	32
Microscopía de Fluorescencia	32
Inmunofluorescencia Directa	33
Inmunofluorescencia Indirecta	33
MATERIALES Y MÉTODOS	35
Área de Estudio y Población de Muestra	35
Criterios de Inclusión	35
Criterios de Exclusión	35
Diagnóstico del Síndrome Febril Inespecífico	37
Toma de Muestra	37

Extracción de Muestra de Sangre Periférica	39
Separación de la Muestra	40
Traslado de Muestras y Materiales	40
Detección de Anticuerpos contra <i>Babesia microti</i>	42
Preparación de la Muestra y Reactivos	42
Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta para la Detección de Anticuerpos IgG contra <i>Babesia microti</i>	46
Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta para la Detección de Anticuerpos IgM contra <i>Babesia microti</i>	47
Interpretación de Resultados para IgG e IgM	48
RESULTADOS	52
DISCUSIÓN	59
CONCLUSIONES	62
RECOMENDACIONES	63
BIBLIOGRAFÍA	64
ANEXOS	71
Glosario	71
Inserto para la Detección de Anticuerpos IgG contra <i>Babesia microti</i>	74
Inserto para la Detección de Anticuerpos IgM contra <i>Babesia microti</i>	76
Laboratorio Clínico Sonora LABS	78

LISTA DE TABLAS

No.	Tabla	Pág.
1	Clasificación del reino <i>Protozoa</i>	4
2	Principales especies de <i>Babesia</i> de importancia médica	8
3	Taxonomía del parásito <i>Babesia microti</i>	10
4	Manifestaciones clínicas de Babesiosis, signos y síntomas frecuentes	19
5	Tratamiento de la Babesiosis causada por <i>Babesia microti</i>	22
6	Reactivos kit IFI para anticuerpos <i>Babesia microti</i> de clase IgG	44
7	Reactivos kit IFI para anticuerpos <i>Babesia microti</i> de clase IgM	45
8	Grupos de edades y seropositivos detectados para anticuerpos de clase IgG e IgM en habitantes de la Región del Sur del Estado de Sonora	54
9	Características sociodemográficas de pacientes seropositivos a <i>Babesia microti</i>	55
10	Demostración sintomatológica de los pacientes seropositivos a <i>B. microti</i>	56
11	Títulos de reacciones febriles en individuos seropositivos	57

LISTA DE FIGURAS

No.	Figura	Pág.
1	Piroplásmidos de <i>Babesia</i>	7
2	Trofozoítos de <i>Babesia microti</i> en frotis de sangre humana	11
3	<i>Babesia microti</i> en tinción Giemsa	11
4	Transmisión de <i>B. microti</i> por <i>Ixodes scapularis</i>	15
5	Ciclo biológico de <i>Babesia microti</i>	15
6	Técnica de ELISA	27
7	Inmunodetección	31
8	Detección de anticuerpos por la técnica de Inmunofluorescencia directa	34
9	Detección de anticuerpos por la técnica de Inmunofluorescencia indirecta	34
10	Representación del Sur del Estado de Sonora	36
11	Formato para pacientes	38
12	Instalaciones del laboratorio Sonora Labs S.C., Hermosillo, Sonora	41
13	Kit comercial de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para anticuerpos de clase IgG, marca Fuller	43
14	Diagrama del método de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) parte I.	49
15	Diagrama del método de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) parte II.	50
16	Microscopio de fluorescencia (LEICA-DDLS)	51
17	<i>Babesia microti</i> observada en microscopio de fluorescencia con objetivo de 100X.	58

JUSTIFICACIÓN

El síndrome febril inespecífico es uno de los signos clínicos que se presenta en una diversidad de enfermedades tanto autoinmunes, bacteriales, virales, así como también parasitarias.

La Babesiosis es una enfermedad producida por el parásito de la familia *Babesia*, este parásito desencadena una diversidad de padecimientos en el ser humano, entre ellos, el síndrome febril inespecífico cuyo patógeno es *Babesia microti*; cuando este parásito intraeritrocítico se introduce al huésped es difícil su diagnóstico, por tal motivo, ha sido poco estudiado.

Babesiosis es una enfermedad de difícil diagnóstico por lo que no se puede emitir un diagnóstico basado solamente en un frotis sanguíneo, se deben emplear técnicas serológicas principalmente Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), siendo esta la más utilizada en estudios realizados, otras técnicas para su diagnóstico son Enzimoimmunoanálisis de Absorción (ELISA), cultivo *In Vitro* y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La presencia de *Babesia* ha aumentado progresivamente, tanto en Europa como en Estados Unidos de Norteamérica y en otros países por lo cual desde 1976, la Organización Mundial de la Salud (OMS) la clasificó como una zoonosis.

A nivel nacional se tienen pocos datos epidemiológicos del parásito *Babesia*. Osorno y colaboradores en 1976 encontraron anticuerpos contra una especie indeterminada de *Babesia* en muestras de residentes rurales de México. En el Estado de Sonora, no hay registros de estudios de este tipo, por tal motivo, es de nuestro interés detectar la presencia de *Babesia microti* mediante el método de Inmunofluorescencia Indirecta en pacientes que presentan el Síndrome Febril Inespecífico en la Región Sur del Estado.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la relación entre el síndrome febril inespecífico y la detección de anticuerpos contra *Babesia microti* en pacientes provenientes del Sur del Estado de Sonora.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la presencia de anticuerpos de tipo IgM contra el antígeno de *Babesia microti* mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta.
- Determinar la presencia de anticuerpos de tipo IgG contra el antígeno de *Babesia microti* mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta.

HIPÓTESIS

El síndrome febril inespecífico está relacionado a la presencia de anticuerpos contra el antígeno de *Babesia microti* en pacientes provenientes del Sur del Estado de Sonora.

RESUMEN

La Babesiosis es una zoonosis ocasionada por el parásito del género *Babesia* este requiere de un huésped invertebrado y uno vertebrado para asegurar su cadena de transmisión. La mayoría de las *Babesias* son transmitidas por garrapatas del género *Ixodes*. En los vertebrados el parásito vive en el interior de los glóbulos rojos y la infección produce una respuesta inmunológica.

En esta investigación se determinó la relación del síndrome febril inespecífico y la detección de anticuerpos contra *Babesia microti*, en pacientes provenientes del Sur del Estado de Sonora. Se analizaron 117 sueros de pacientes que presentaban síndrome febril inespecífico, procedentes de los municipios de Navojoa, Huatabampo, Etchojoa, Álamos, Hermosillo y Obregón.

La presencia de anticuerpos séricos IgG e IgM específicos *anti-Babesia microti* se llevó a cabo por el método de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) utilizando el kit (Fuller Laboratories, Fullerton, California, USA).

Se encontró una seroprevalencia total de anticuerpos IgG e IgM *anti-Babesia microti* de 83.26% (98/117), en donde 36.73% fueron hombres y 63.26% mujeres, lo cual indica, que el parásito se encuentra presente en la Región del Sur del Estado de Sonora. Por tal motivo, es importante ampliar la investigación para determinar las repercusiones en salud pública.

PROTOZOARIOS

Parásito son todos aquellos seres que viven a expensas de otro causándole perjuicio o enfermedad, tradicionalmente, este nombre se ha reservado a los protozoos y los helmintos que viven temporalmente o de manera permanente en el hombre, la mayoría de los cuales le ocasionan enfermedad. El parasitismo, como los otros tipos de simbiosis, implica imprescindiblemente una interrelación íntima entre las dos especies y es este contacto estrecho y prolongado el que diferencia al parasitismo de las actividades predatoras de los no parásitos (Prats, 2007).

De acuerdo a diversas investigaciones se estima que son aproximadamente 45,000 especies de protozoarios. Se encuentran prácticamente en todos los hábitats en que hay vida, formando parte de las cadenas alimenticias. Los protozoarios poseen un papel muy importante en la salud del hombre y de los animales: paludismo, piroplasmosis, amibiasis, coccidiosis son ejemplos de importantes enfermedades en el mundo (Quiroz, 2005).

Los animales domésticos también se ven atacados por algunas especies de protozoarios así como los animales silvestres. La importancia biológica de muchas especies es actualmente una herramienta indispensable para la biología molecular. Como modelos celulares se utilizan en investigación biomédica y aún como agentes para el control biológico contra ciertos insectos vectores de importantes enfermedades. Su velocidad de reproducción, su tamaño, su abundancia y facilidad de obtención, su adaptabilidad fisiológica, la facilidad de cultivo así como su similitud estructural y funcional con las células de organismos multicelulares los hacen material valioso para el avance de la ciencia (López, 2005).

Generalidades de los Protozoarios

La etimología de la palabra protozoo significa “primer animal”. Esto indica que un protozoo es el tipo de animal más simple, sin embargo, si se valora su estructura y función se puede decir que su unidad fundamental representa el tipo de células más complejo ya que pueden desempeñar todas las funciones que realiza cualquier organismo vivo (Calderón, 2004).

Los protozoos son microorganismos unicelulares eucariotas con un tamaño que oscila entre 3 y 100 μm . Carecen de pared celular rígida y tienen movilidad. Poseen un metabolismo heterótrofo, los dos mecanismos de obtener sus nutrientes orgánicos son por absorción o por fagocitosis (Viñafane, 2008). El color también varía mucho, hay especies verdes porque tienen clorofila, o porque albergan algas en simbiosis, aunque la mayoría son transparentes. Los protozoos son seres cosmopolitas que se encuentran en todos los medios en donde exista humedad, aunque hay especies que prefieren nichos o microhábitats dentro de los grandes ecosistemas (López, 2005). Algunos parasitan células histiocitarias y otros diversos tipos de células fijas (Apt y Werner, 2013).

Los protozoos son transmitidos mediante la picadura de un artrópodo ó por ingestión cuando el parásito se encuentra en fase de infección. La forma de reproducción sugiere dos formas en el insecto: asexual (fisión binaria) o sexual, produciéndose formas intermediarias que varían al parásito adulto (Méndez, 2002).

La clasificación se basa en sus características morfológicas, fisiológicas y de reproducción. En los últimos años también se han utilizado como criterio taxonómico diversos datos aportados por la biología molecular (Viñafane, 2008).

La forma más simple y rápida de agrupar a los protozoos es observando su manera de moverse. La locomoción la llevan a cabo mediante flagelos, cilios, pseudópodos o simple flexión del cuerpo. Así, la primera clasificación que puede hacerse de estos organismos es con base a su órgano de locomoción. Pero como hay especies

que presentan simultáneamente flagelos y pseudópodos deben tomarse en cuenta también los ciclos de vida, el tipo de núcleo y el tipo de reproducción. El hábitat, aunque importante para ubicar algunas especies, no es carácter taxonómico. La clasificación propuesta por Lee y cols., en 1985 sigue utilizándose hasta la fecha, instrumento que agrupa a los protozoarios en seis *Phyla*, ver Tabla 1 (López, 2005).

Tabla 1. Clasificación del reino *Protozoa* (Lee y cols., 1985; López, 2005).

Phylum	Género
<i>Phylum Sarcomastigophora</i>	
<i>Phylum Labyrinthomorpha</i>	
<i>Phylum Apicomplexa</i>	<i>Plasmodium</i>
	<i>Isospora</i>
	<i>Criptosporidium</i>
	<i>Sarcocystis</i>
	<i>Toxoplasma</i>
	<i>Babesia</i>
	<i>Pneumocytis</i>
<i>Phylum Microspora</i>	
<i>Phylum Ascetospora</i>	
<i>Phylum Myxozoa</i>	
<i>Phylum Ciliophora</i>	

Género *Babesia*

Los hemoparásitos *Babesia* pertenecientes al filo *Apicomplexa* son los segundos parásitos transmitidos por la sangre de los mamíferos después de los tripanosomas. Fue Victor Babes quien a finales del siglo XIX primero descubrió los microorganismos en los eritrocitos de ganado en Rumanía y les asocia con hemoglobinuria bovina o fiebre agua roja. Cinco años más tarde, Smith y Kilbourne establecieron *Pyrosoma* más tarde rebautizado *Babesia bigemia* como el agente causal de Texas Cattle Fever, un hallazgo de importancia histórica porque este piroplasma fue el primer patógeno transmitido por artrópodos reconocido de los vertebrados. Una infección por *Babesia divergens* fatal en 1956 fue el primer caso confirmado de Babesiosis humana y, desde entonces, la Babesiosis apareció a la vista como una zoonosis potencialmente mortal en los seres humanos. Desde entonces, recién *Babesia* con potencial zoonótico reconocido seguirá surgiendo en todo el mundo y el impacto económico sustancial de Babesiosis en el ganado y los animales de compañía, especialmente en los trópicos y subtropicos es en curso (Hundfel y cols., 2008).

En los eritrocitos las *Babesias* aparecen bajo el aspecto de pequeños elementos, piriformes u ovals y con un núcleo excéntrico, que recuerdan los anillos de los plasmódidos y que se dividen, binariamente, en dos formas semejantes a la progenitora o en cuatro células hijas que suelen disponerse en forma de cruz de Malta, en la Figura 1 se muestran las formas aisladas (1-3) y en división (4-6) de trofozoítos de diferentes especies del género *Babesia* en los eritrocitos de sus hospedadores vertebrados (Berenguer, 2006). El tamaño de las *Babesias* oscila entre 1.5 μ m a 5 μ m y para efectos prácticos se ha acordado que toda *Babesia* superior a 2.5 μ m es considerada una *Babesia* grande y aquellas menores de 2.5 μ m son *Babesias* pequeñas (Kjemtrup y Conrad, 2006; Melendez, 2000; Paniker, 2013).

Los agentes etiológicos de la Babesiosis en animales y hombre, se transmiten por vectores principalmente las garrapatas. Se conoce que los parásitos de ésta familia han ocasionado enfermedades en los animales domésticos, *Babesia spp* ha surgido recientemente como una creciente preocupación de salud pública para los seres humanos (Leiby, 2011).

Más de 100 especies de *Babesia* infectan a una amplia variedad de animales salvajes y domésticos, pero sólo unos pocos han sido documentados para infectar humanos (Vannier y Krause, 2012). Aunque las especies de *Babesia* son por lo general específicas para su huésped, es posible que una sola especie de *Babesia* infecte a más de un huésped vertebrado, como se puede observar con *Babesia microti* (roedores y el hombre) y *Babesia divergens* (bovinos, hombre y gerbiles) como se muestra en la Tabla 2 (Izquierdo y Avellaneda, 2004).

Se ha descrito en la literatura, que *Babesia bovis*, *B. divergens* y *B. bigemina*, afectan más a pacientes esplenectomizados, ancianos e inmunosuprimidos, mientras que *Babesia microti* se presenta más en personas inmunocompetentes (Delmoral y cols., 2009). Recientemente se han aislado dos nuevas especies de *Babesia* en los Estados Unidos, la denominada WA-1 y la MO1, que aunque son muy parecidas con *B. microti*, difieren en sus características genéticas (Hernández, 2006).

La garrapata vector para las especies descubiertas más recientemente WAI no se conoce. Hay unos pocos candidatos, sin embargo, las garrapatas *Variabilis Dermacentor*, *Ornithodoros coriaceus*, e *Ixodes pacificus* se encuentran en zonas donde se han producido casos de infección WAI. El depósito huésped vertebrado para WAI también se desconoce. WAI está más estrechamente relacionada con el patógeno canino *Babesia gibsoni* (Homer y cols., 2000).

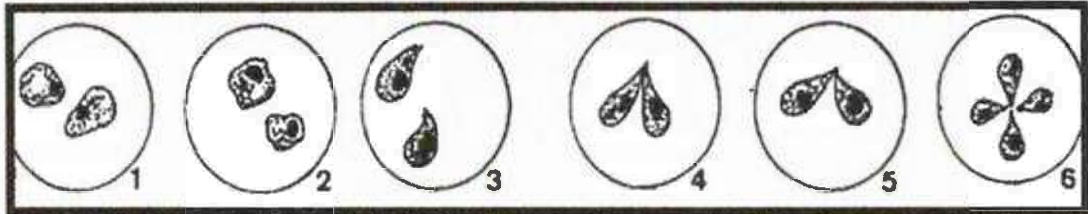


Figura 1. Piroplásmidos de *Babesia* (Berenguer, 2006).

Tabla 2. Principales especies de *Babesia* de importancia médica (Rodríguez, 2007).

Especie	Hospederos	Localización Geográfica
<i>B. microti</i>	Roedores y humanos	Cosmopolita
<i>B. divergens</i>	Vacunos y humanos	Europa
<i>Especie relacionada con B. gibsoni – B. WAI</i>	Perros y humanos	África, Asia y EUA
<i>Especie relacionada con B. divergens – B. MOI</i>	Diversos mamíferos y humanos	Cosmopolita
<i>Especie relacionada con B. microti – B. TWI</i>	Diversos mamíferos y Humanos	Cosmopolita
<i>B. caucásica</i>	Animales y humanos	Cosmopolita
<i>B. canis</i>	Animales domésticos y humanos	Cosmopolita
<i>B. CAI-CA4</i>	Humanos	Cosmopolita

BABESIA MICROTI

Una de las especies de distribución mundial y que es de preocupación para la salud pública es el parásito *B. microti* el cual ha ocasionado el mayor número de Babesiosis en humanos, son transmitidos a través de la mordedura de artrópodos del género *Ixodes* ó accidentalmente durante transfusiones (Hong y cols., 2014).

El vector primario de esta especie es la garrapata *Ixodes scapularis*. El reservorio primario para *B. microti* es el ratón patas blancas (*Peromyscus leucopus*) (Vannier, 2008; Moro y cols., 2002). En la Tabla 3 se señala la Taxonomía del parásito *Babesia microti*.

Morfología

Las *Babesias* son parásitos exclusivos de los glóbulos rojos; cuando se encuentran en fase de trofozoíto son pleomórficos, pueden presentar forma anular, ameboide o piriforme (uni, bi, tetra o poligeminadas), generalmente en pares. Las formas de anillo o anulares con un punto de cromatina diminuto y una cantidad mínima de citoplasma como se muestra en las Figuras 2 y 3.

Los merozoítos pueden ser esféricos u ovaes ó piriformes, que se encuentran en pares. Pueden ser confundidas con los parásitos de la malaria, particularmente *Plasmodium falciparum*. Sin embargo *Babesia* no forma pigmento y no causa alteraciones en la morfología o tinción del glóbulo rojo (Rodak, 2005; Paniker, 2013).

Babesia microti forma parte del grupo de las *Babesias* pequeñas, su tamaño es menor a 2.5 µm.

Tabla 3. Taxonomía del parásito *Babesia microti* (Paniker, 2013).

Reino	<i>Protozoa</i>
Filo	<i>Apicomplexa</i>
Subfilo	<i>Esporozoa</i>
Clase	<i>Piroplasmia</i>
Orden	<i>Piroplasmida</i>
Familia	<i>Babesiidae</i>
Género	<i>Babesia</i>
Especie	<i>Microti</i>

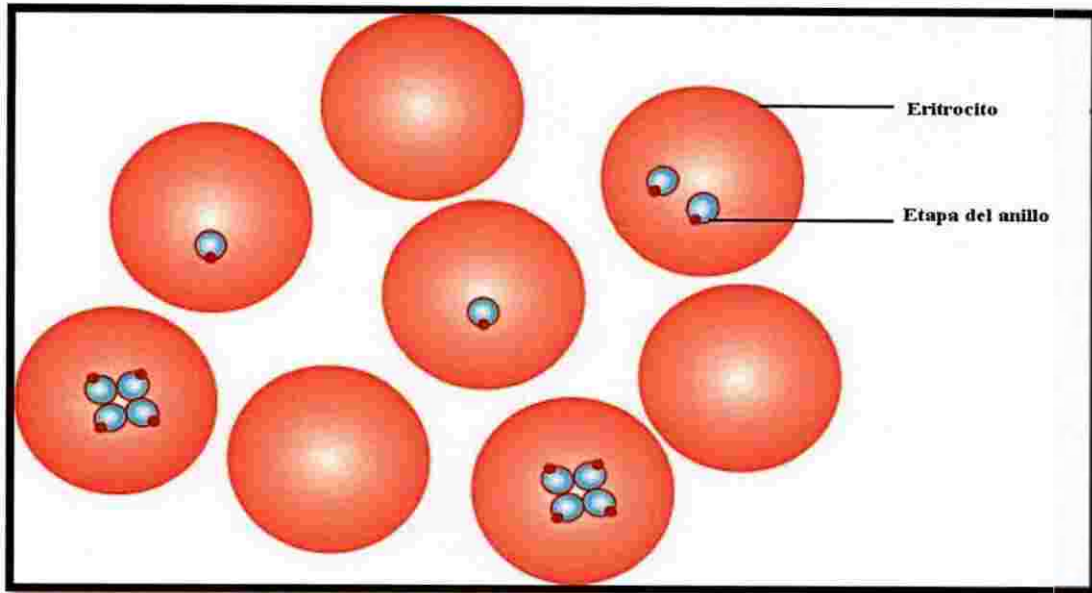


Figura 2. Trofozoitos de *Babesia microti* en frotis de sangre humana (Paniker, 2013).

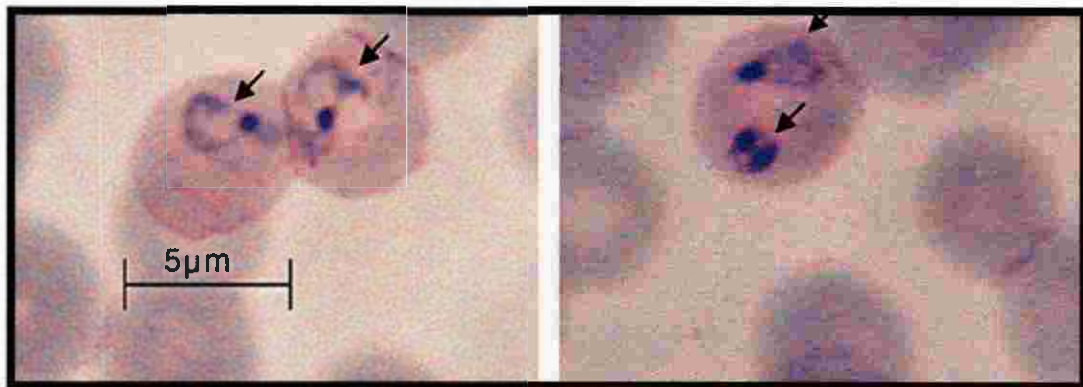


Figura 3. *Babesia microti* en tinción Giemsa (Hundfel y cols., 2008).

Ciclo Biológico

El ciclo de vida de *Babesia microti* incluye dos huéspedes, un huésped invertebrado, la garrapata (*Ixodes scapularis*) y un huésped vertebrado, el ratón patas blancas (*Peromyscus leucopus*) (Homer y cols., 2000).

Babesia microti se somete a cambios de desarrollo dentro de sus huéspedes (Vannier y Krause, 2012). Implica la reproducción asexual merogonia en los eritrocitos de los huéspedes mamíferos y la reproducción sexual esporogonia en el vector artrópodo (Paniker, 2013).

Vector: garrapata (*Ixodes scapularis*). Cada una de las tres fases activas del ciclo de vida de *Ixodes scapularis* (larva, ninfa y adulto) toma sangre de un huésped vertebrado para alimentarse y madurar a la siguiente etapa. El ciclo de transmisión garrapata inicia en la primavera, cuando las hembras adultas ponen huevos que eclosionan en larvas. A finales del verano, las larvas recién nacidas ingieren el parásito *Babesia microti* cuando toman una comida de la sangre de un roedor infectado. Posteriormente las larvas mudan a la etapa de ninfa. Las ninfas ya infectadas se alimentan del roedor ratón patas blancas (*Peromyscus leucopus*) y le transmiten el parásito. Las ninfas mudan a adultos que se alimentan del venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) que es un anfitrión importante para la garrapata, pero no es un depósito importante para para *B. microti*. La hembra garrapata adulta pone huevos que están libres de *B. microti* (sin transmisión transovárica) y el ciclo se repite, ver Figura 4 (Vannier y cols. 2008; Vannier y Krause, 2012).

Las larvas, ninfas y adultos pueden alimentarse de los humanos y así transmitir el parásito, pero las ninfas son el vector principal del parásito *Babesia microti* (Leiby, 2011).

Huésped vertebrado: Es en el que se lleva a cabo la reproducción asexual e intraeritrocítica. Como la garrapata se alimenta de un huésped vertebrado, los esporozoítos presentes en las glándulas salivales del artrópodo se inoculan en el huésped ratón patas blancas (*Peromyscus leucopus*) y entonces los esporozoítos a diferencia de otras *Babesias*, *Babesia microti* primero ingresa a los linfocitos y posteriormente se diferencia en esquizontes multinucleadas (proceso asexual llamado merogonia). Estos se diferencian en merozoítos, los cuales brotan fuera del esquizonte y lisan la célula. Estos merozoítos o esporozoítos infectan los eritrocitos. El merozoíto invade el eritrocito a través de un proceso de invaginación, formando una vacuola. La membrana de la vacuola se desintegra gradualmente, y el parásito se queda con la característica piroplasma definición de una sola membrana (Rodríguez, 2007).

Dentro de los eritrocitos, la mayoría de los merozoítos se convierten en trofozoítos y se dividen por fisión binaria esta reproducción asexual produce más merozoítos, que lisan la célula y pasar a infectar eritrocitos adicionales (Homer y cols., 2000). Cuatro parásitos pueden formar al mismo tiempo *Babesia microti* puede someterse a dos divisiones sucesivas y a si dar lugar a una forma de cruz de Malta (Vannier y cols., 2008). La reproducción rápida destruye la célula huésped y conduce a la hemoglobinuria en el huésped. Algunos trofozoítos se convierten en gametocitos potenciales. Estos trofozoítos no se reproducen en este punto, sino que aumentan de tamaño. Más tarde, cuando se encuentran en el intestino de la garrapata, estos gametocitos se transforman en gametos antes de salir de los eritrocitos en el interior (Montes, 2012).

Huésped Invertebrado: En el artrópodo *Ixodes scapularis* de género femenino se produce el ciclo sexual, cuando la garrapata se alimenta del ratón patas blancas (*Peromyscus leucopus*) ingiere eritrocitos infectados. Los gametocitos se acumulan en el intestino de la garrapata y se diferencian en gametos. Los gametos se fusionan para formar cigotos que migran a través del epitelio intestinal en la hemolinfa, donde maduran en ooquistes, ya en forma de ooquistes se trasladan a las glándulas y

posteriormente ocurre un proceso de diferenciación para la formación de los esporozoítos (Montes, 2012; Vannier y Krause., 2012).

Transmisión en el humano: El ser humano es un reservorio incidental, se comprometen monocitos, macrófagos y distintas células del sistema endotelial. Se inhibe la fusión del complejo fagosoma-lisosoma y se retrasa la apoptosis celular (Montes, 2012). Se puede adquirir la enfermedad cuando se introduce accidentalmente en el ciclo natural del parásito, pues el hombre no hace parte del mismo, esto sucede cuando es mordido por garrapatas infectadas, que introducen junto con la saliva los esporozoítos directamente al torrente sanguíneo para completar el ciclo, o en menor proporción también se transmite a *Babesia microti* por medio de transfusiones sanguíneas a los humanos ver Figura 5 (Rodríguez, 2007; Meléndez, 2000).

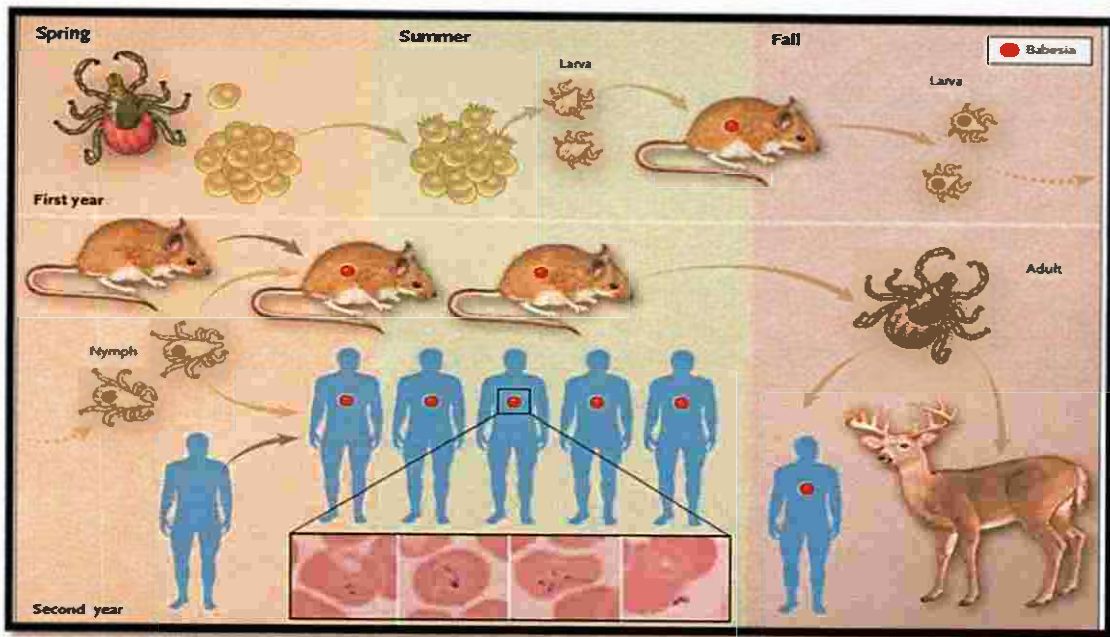


Figura 4. Transmisión de *Babesia microti* por *Ixodes scapularis* (Vannier y Krause, 2012).

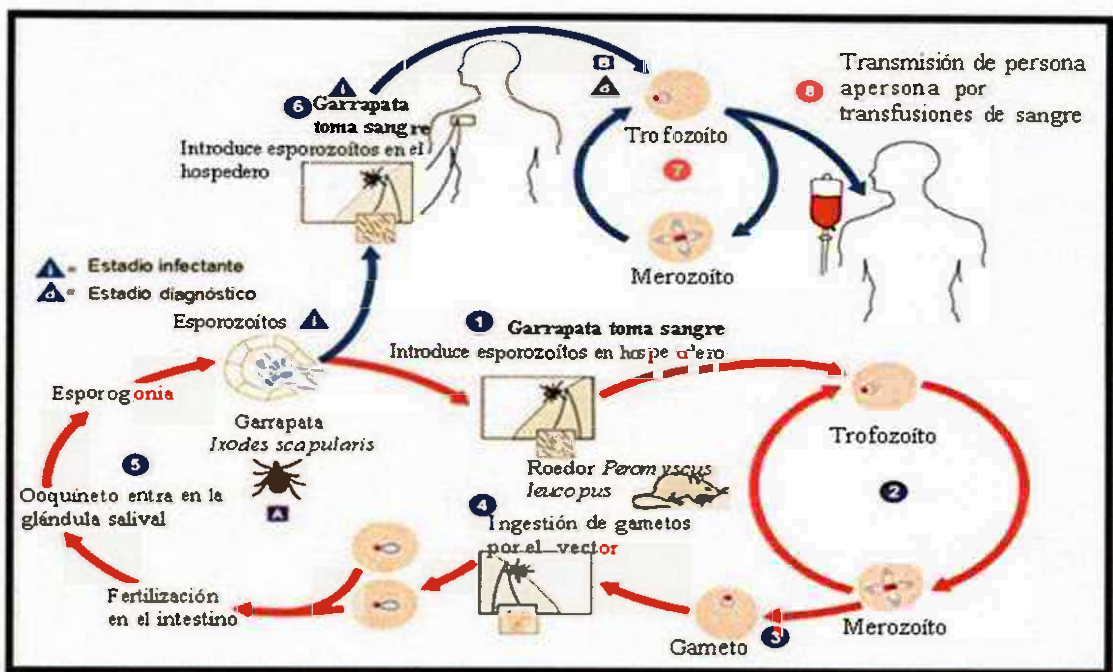


Figura 5. Ciclo biológico de *Babesia microti* (Fuente: Rodríguez, 2007).

BABESIOSIS

La Babesiosis, Piroplasmosis o “Fiebre de garrapatas” es una enfermedad febril anemizante, causada por protozoo intraeritrocíticos del género *Babesia* (Wójcik y cols., 2006; Hernández, 2006). Además según datos reportados por la Administración de Alimentos y Drogas (FDA), *Babesia microti* es el patógeno de este género transmitido mediante transfusiones sanguíneas (Vannier y Krause, 2012). Debido al creciente número de casos de humanos infectados con *Babesia spp.*, desde 1976 la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reconocido a la Babesiosis como una zoonosis (Rodríguez, 2007; Meléndez, 2000).

Enfermedades transmitidas por diversos parásitos de *Babesia* ocasionalmente afectan a los humanos, causando un espectro de la enfermedad que va desde una infección subclínica y autolimitada, a la enfermedad febril grave con hemoglobinuria, anemia hemolítica e insuficiencia renal (Centeno y cols., 2003). Además, para todas las infecciones de *Babesia* en pacientes esplenectomizados, edad avanzada, de inmunidad celular deprimida y coinfectados con VIH se asocian con un mayor riesgo de infección sintomática lo que desemboca a una enfermedad más grave (Hundfeld y cols., 2008; Brooks y cols., 2008; Hernández, 2006).

Babesiosis necesita ser tomada en consideración en áreas en las que la Borreliosis de Lyme y la Ehrlichiosis humana se producen, pero la enfermedad también se puede confundir con la Malaria (Centeno y cols., 2003; Ríos y cols., 2006), por lo que puede pasar desapercibida y en muchas ocasiones no ser diagnosticada, siendo entonces una enfermedad poco estudiada y conocida (Delmoral y cols., 2009)

Síndrome Febril Inespecífico

El síndrome febril es “la elevación térmica del cuerpo como una respuesta específica, mediada por el control central, ante una agresión determinada”. La fiebre es provocada por procesos infecciosos, inflamatorios, neoplásicos o inmunológicos. Se ha llegado al consenso internacional para considerar fiebre a la temperatura corporal central sobre 37.5°C (Ruíz y cols., 2010).

El síndrome febril es el más frecuente e inespecífico, y está definido como todo paciente que tenga entre 5 y 65 años con inicio brusco de fiebre y con menos de siete días de evolución en el cual no se ha identificado signos o síntomas relacionados con un foco infeccioso, siendo necesaria su notificación obligatoria cuando afecta conglomerados (Troyes y cols., 2006).

Además de la fiebre el síndrome febril incluye varias manifestaciones clínicas asociadas (Pérez, 2013). Este signo clínico se acompaña, casi siempre, de: taquicardia, hipotensión, polipnea, ocasionalmente anorexia, sed, retraso en el vaciamiento gástrico, cefalalgia, astenia, adinamia, insomnio o sueño intranquilo, aumento de la excitabilidad neuronal, convulsiones, delirio, enrojecimiento facial, diaforesis, escalofríos, mialgias, artralgias, disuria, entre otros (Palafox y Del Campo, 2011). Se reporta por los autores que los signos y síntomas que acompañan a la fiebre son variados e inconstantes y dependen del subjetivismo de cada individuo en particular (Guevara y Espinosa, 2008).

En 1998, la Organización Mundial de la Salud (OMS), propuso modificar el sistema de vigilancia internacional de enfermedades de reporte obligatorio, bajo el concepto de vigilancia sindrómica.

Patogenicidad

La hemólisis de los eritrocitos infectados es principalmente responsable de muchas manifestaciones clínicas ver Tabla 4. Hay acumulación de parásitos en los capilares del hígado, bazo y riñones, lo que conduce a la degeneración celular y necrosis (Paniker, 2013).

La gravedad de las infecciones por *Babesia* varía en los diferentes individuos; la filtración de la sangre en el bazo desempeña una función importante en el control de la infección al eliminar muchos de los parásitos conforme la sangre fluye a través del bazo (Crowley, 2014).

El período de incubación de la enfermedad varía de 1 a 6 semanas (Paniker, 2013; Vannier y cols., 2008; Izquierdo y Avellaneda, 2004; Homer y cols., 2000). La infección post transfusión el período de incubación puede ser el doble de tiempo (Hernández, 2006).

Síntomas y Signos Clínicos

La presentación de la enfermedad Babesiosis puede ser desde un cuadro asintomático que por lo general es autolimitado hasta una infección fulminante que puede ocasionar la muerte, principalmente en personas con alguna inmunodeficiencia (Hernández, 2006).

En las personas sintomáticas el cuadro comienza con fiebre moderada e intensa, cefalea, escalofríos y diaforesis, más tarde pueden aparecer otras manifestaciones clínicas como son mialgias, artralgias, náuseas entre otras, ver Tabla 4. Los signos clínicos suelen ser mínimos, a menudo sólo aparece fiebre, aunque puede observarse también esplenomegalia y hepatomegalia (Baker, 2007).

Tabla 4. Manifestaciones clínicas de la Babesiosis, signos y síntomas frecuentes (Vannier y Krause, 2012; Hunfeld y cols., 2008; Hernández, 2006).

Síntomas frecuentes:	Signos físicos:
<ul style="list-style-type: none"> ↓ Fiebre moderada e intensa 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Hepatomegalia ↓ Esplenomegalia
<ul style="list-style-type: none"> ↓ Cefalea 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Palidez
<ul style="list-style-type: none"> ↓ Escalofríos 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Debilidad general
<ul style="list-style-type: none"> ↓ Diaforesis 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Anorexia
<p style="text-align: center;">Posteriormente puede aparecer:</p>	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Ictericia (algunos casos)
<ul style="list-style-type: none"> ↓ Mialgias 	<p style="text-align: center;">Signos neurológicos:</p>
<ul style="list-style-type: none"> ↓ Artralgias 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Fotofobia
<ul style="list-style-type: none"> ↓ Náuseas 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Alteraciones del sensorio y labilidad emocional
<ul style="list-style-type: none"> ↓ Tos 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Depresión
<ul style="list-style-type: none"> ↓ Vómito 	<p style="text-align: center;">Síntomas graves:</p>
<ul style="list-style-type: none"> ↓ Dolor abdominal 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Insuficiencia y falla cardíaca
<ul style="list-style-type: none"> ↓ Sudoración nocturna 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Falla renal
<ul style="list-style-type: none"> ↓ Anemia hemolítica 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Falla respiratoria
<ul style="list-style-type: none"> ↓ Hematuria (orina oscura) 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Edema pulmonar
<ul style="list-style-type: none"> ↓ Hiperestesia 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Coagulación intravascular
<ul style="list-style-type: none"> ↓ Conjuntivitis 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ diseminada
	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Infarto del miocardio

Epidemiología

La enfermedad de babesiosis humana es causada por la picadura de garrapatas y raramente por transfusiones de sangre o infecciones transparentarias (Rodríguez, 2007). Han ocurrido varios casos de Babesiosis adquirida por transfusión en los Estados Unidos y ninguno reportado hasta el momento en Europa o en otro lugar (Homer y cols., 2000).

La mayoría de los casos de Babesiosis son debidos a *Babesia bovis*, *B. divergens* o *B. microti* (Rodríguez, 2007).

Actualmente la Babesiosis ha reemergido como una infección de amplia distribución global, si bien los casos se han reportado con mayor importancia en Europa y en Norte América (Rodríguez, 2007; Homer y cols., 2000).

En América del Norte, la Babesiosis es causada predominantemente por *Babesia microti*, Estados Unidos de América (EUA) es el país donde se han reportado un mayor número de casos, siendo registrados consistentemente en la región norte de la costa este del país con casos esporádicos en Wisconsin, California, Georgia, Missouri, y Nueva York (Rodríguez, 2007).

En Europa, la Babesiosis es mucho menos común pero más letal; es causada por el patógeno de la especie bovina *Babesia divergens* (Homer y cols., 2000). En dicho continente también se han reportado pocos casos de infección por *B. microti* y *B. canis*.

En los países de Europa donde se ha reportado la Babesiosis incluyen: Inglaterra, Bélgica, Escocia, España, Francia, Irlanda, Rusia, Alemania, Suecia y Yugoslavia, entre otros. En Asia la babesiosis se ha reportado en Taiwán, India, China, Corea y Japón. En África ha sido reportada en Egipto y Sudáfrica (Rodríguez, 2007).

Osorno y colaboradores 1976 encontraron anticuerpos contra una especie indeterminada de *Babesia* en 38 de 101 muestras de residentes rurales de México y aislaron el parásito de tres muestras por inoculación en hamsters, en dicho país el estudio de esta parasitosis ha sido escaso hasta la fecha (Rodríguez, 2007).

Tratamiento

Los pacientes que experimentan Babesiosis sintomático deben recibir un curso de la terapia antimicrobiana después de la confirmación del diagnóstico. Dos regímenes antimicrobianos comúnmente usados son altamente eficaces para los pacientes con Babesiosis leve, se recomienda la administración de la combinación de atovacuona y azitromicina durante siete a diez días por vía oral en el caso de inmunodeficientes se administrara dosis de azitromicinas más alta que las dosis dadas en la Tabla 5. La combinación de clindamicina y quinina durante siete a diez días son utilizadas en pacientes que presentan un cuadro grave de la enfermedad, la clindamicina se administrara siempre que sea posible por vía intravenosa. También debe ser considerada para casos graves la exanguinotransfusión eritrocitaria parcial o completa (Fauci y cols., 2009; Vannier y Krause, 2012).

Prevención

Como medida de prevección, evitar los sitios donde se encuentran las garrapatas, ratones y ciervos. Es especialmente importante para las personas con mayor riesgo, como asplénicos u otras personas inmunodeprimidas que viven en o viajan a áreas donde la Babesiosis es endémica, las personas que no pueden evitar tales áreas deben usar ropa de protección (manga larga y pantalones) y aplicar repelentes en la ropa que contengan permetrina o N, N-diethylmeta- toluamida (DEET) (Vannier y Krause, 2012).

Tabla 5. Tratamiento de la Babesiosis causada por *Babesia microti* (Fauci y cols., 2009).

Agentes antimicrobianos	Dosis	Frecuencia
Azitromicina	Adulto: 500 a 1000 mg 250-1000 mg Niños: 10 mg/kg (máximo 500 mg/kg dosis) 5 mg/kg (máximo 250 mg/kg dosis)	En el día 1 En días posteriores En el día 1 En días posteriores
Atovacuna	Adulto: 750 mg Niños: 20 mg/kg(máximo 750 mg/dosis)	Cada 12 horas Cada 12 horas
La clindamicina	Adultos: 600 mg Niños: 7-10 mg/kg (máximo 600 mg/ dosis) La administración intravenosa Adultos: 300-600 mg Niños: 7-10 mg/kg (máximo 600 mg/ dosis)	Cada 8 horas Cada 6-8 horas Cada 6 horas Cada 6-8 horas
Quinina	Adultos: 650 mg Niño: 8 mg/kg (máximo 650 mg / dosis)	Cada 6-8 horas Cada 8 horas

DIAGNÓSTICO POR EL LABORATORIO

La principal técnica serológica para el diagnóstico de anticuerpos contra *Babesia microti* que infecta al humano es la Inmunofluorescencia Indirecta la cual no da reacción cruzada con *Plasmodium* ni con *Rickettsias* que ocasionan enfermedades febriles en humanos. En países desarrollados además se ha ensayado la técnica de ELISA y más recientemente a fin de identificar con precisión la especie de *Babesia* que infecta a humanos se ha usado la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Tinciones de Laboratorio

Tinción Wright

La tinción de Wright es una técnica que se emplea generalmente para la diferenciación de elementos celulares de la sangre y es clasificada como una tinción policromática, dado que puede teñir compuestos ácidos o básicos presentes en una célula (López y cols., 2014; Carr y Rodak, 2010). En casos clínicos donde hay presencia de Babesiosis, el estudio de sangre periférica grueso y fino teñido con Wright se utiliza para detectar los parásitos dentro del eritrocito (Ferri, 2006).

El resultado de la tinción puede ser influido por diferentes factores, como el valor del pH de los colorantes y de la solución amortiguadora, esto debido a que la tinción se fundamenta en la relación de las características ácido-base, y la variación de estos factores podría cambiar las características tintoriales de la muestra a teñir al verse favorecida por características más ácidas o básicas (López y cols., 2014).

En la tinciones Wright y Giemsa los extendidos de sangre periférica deben evaluarse empezando con el objetivo 10 x y terminando con el de inmersión en aceite 100 x (Rodak, 2004).

Tinción de Giemsa

Es una modificación de la coloración de Romanowsky, resulta de la combinación de eosina y azul de metileno en una misma solución. Esta técnica es utilizada en hematología para demostrar la diferencia entre el núcleo y el citoplasma de las distintas células sanguíneas y en microbiología para la diferenciación intracelular y extracelular de parásitos en sangre circulante, en particular de especies de *Plasmodium* y *Leishmania*, para la observación de formas levaduriformes de especies de *Candida*, *Histoplasma capsulatum* y *Pneumocystis jirovecii* para la visualización de inclusiones virales y para la observación de especies de *Mollicutes*, *Rickettsias* y cuerpos elementales de *Chlamydia* (Negroni, 2009).

Los parásitos de *Babesia* pueden observarse en los eritrocitos de extensiones sanguíneas con Giemsa (Lewis y cols., 2008).

Tinción Wright-Giemsa

Esta coloración suele observarse para observar elementos celulares en frotis de sangre periférica y de médula ósea. En microbiología, esta tinción se utiliza con mayor frecuencia para la detección de parásitos intraeritrocíticos (*Plasmodium*, *Babesia*) y exoeritrocíticos (*Trypanosoma*, *Microfilaria*), inclusiones de *Clamidas*, entre otros (Koneman y cols., 2006).

Enzimoimmunoanálisis de Absorción (ELISA)

La técnica ELISA es exquisitamente sensible para detectar antígenos y anticuerpos, además es extremadamente económica con respecto al uso de reactivos. El análisis de inmunoabsorción unida a enzimas utiliza transportadores, en algunos casos placas de poliestireno a las que se fijan los antígenos o los anticuerpos. Los fundamentos son similares a los de la inmunofluorescencia y radioinmunoensayo, de la que se

diferencia en que emplea anticuerpos (método directo) o antigammaglobulinas (método indirecto) marcados con una enzima capaz de desarrollar una reacción coloreada, en vez de hacerlo a una molécula fluorescente o un isótopo radiactivo (Siachoque, 2006).

El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) es la prueba más utilizada de un grupo de pruebas conocidas como enzimmunoensayos. Hay dos métodos básicos. El ELISA directo detecta antígenos y el ELISA indirecto detecta anticuerpos. En ambos procedimientos se utiliza una placa de microtitulación con numerosos pocillos poco profundos (Tortora, 2007).

ELISA directo

Es una prueba que se usa para detectar la presencia de antígenos en una muestra biológica. En esta prueba se absorbe anticuerpos específicos contra el antígeno a los pocillos de la placa de microtitulación. Cuando se agrega la muestra del paciente al pocillo cualquier antígeno que contenga se unirá al anticuerpo y será capturado. El pocillo se lava para eliminar el resto de antígeno no fijado. Luego, para poder visualizar la prueba se agregan más anticuerpos específicos contra el antígeno (estos anticuerpos tienen una enzima adherida a ellos, lo que explica el término ligado a enzimas) y reaccionarán con el antígeno ya capturado para formar un “sandwich” de anticuerpo/antígeno/anticuerpo ligado a enzimas. Esta prueba positiva se detecta por el agregado de un sustrato para la enzima ligada; se produce un color visible cuando la enzima reacciona con su sustrato (Tortora, 2007).

ELISA indirecto

Esta prueba detecta anticuerpos en una muestra del paciente. Para este propósito el pocillo de microtitulación contiene un antígeno, el cual dependerá del tipo de diagnóstico para el que está diseñada la prueba. Se agrega la muestra del paciente al pocillo, y si contiene anticuerpos contra el antígeno reaccionarán con él. El pocillo se

lava para eliminar los anticuerpos no fijados y se agrega el anticuerpo antiinmunoglobulina humana unido a enzima. Posteriormente, se adiciona la solución que contiene el sustrato-cromogénico específico de la enzima el cual cambiará de color en función de la cantidad de anticuerpos conjugados con la enzima y cuya cantidad depende de los anticuerpos del paciente que reconocieron al antígeno pegado a la placa ver Figura 6. En otras palabras, la intensidad de coloración es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo del paciente unido al antígeno (Hernández y Cabiedes, 2010).

Hay varias versiones de ELISA para la detección de varias especies de *Babesia* incluyendo *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. divergens*, *B. caballi*, *B. canis*, *B. gibsoni* y *B. microti*. Evalúa la presencia de anticuerpos anti-*Babesia* utilizando un conjugado anti-IgG 17 con una enzima, por lo general de peroxidasa. Con esta prueba, es posible detectar anticuerpos hasta cuatro años después de una infección simple (Vasco, 2013).

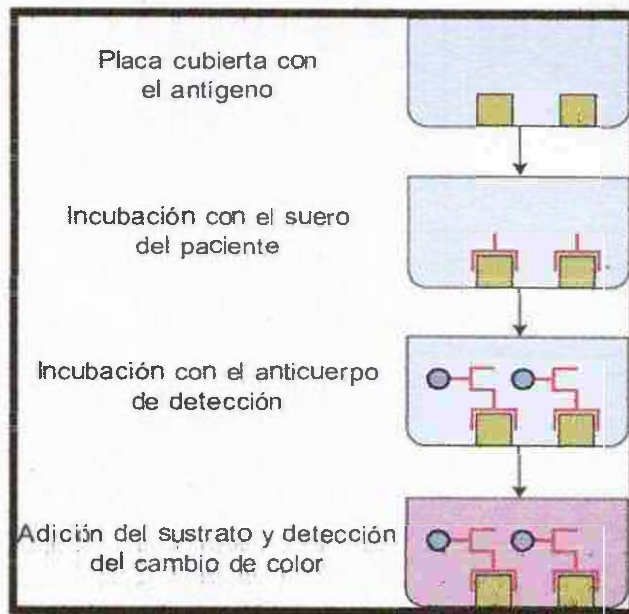


Figura 6. Técnica de ELISA (Hernández y Cabiedes, 2010).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR, siglas de reacción en cadena de la polimerasa, es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. La cantidad de material que hace falta para el inicio de la reacción es muy pequeña y solo es necesario la cantidad de ADN contenida en una sola célula, esto le ofrece una alta sensibilidad a la prueba (Izzeddin y cols., 2010). Se utilizan dos oligonucleótidos cebadores (primers), situados en las proximidades de la secuencia diana que se quiere amplificar, que deben ser complementarios a la región de interés y generalmente únicos para el microorganismo de estudio, gracias a la acción de la ADN-polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células, formando así nuevas moléculas de interés en cuestión de horas (Teijón y Garrido, 2006; Voet y cols., 2009; Tamay de Dios y cols., 2013).

Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (ADN o ADNc), la enzima, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio (Mg⁺), una solución amortiguadora o buffer y H₂O. Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión. (Tamay de Dios y cols., 2013).

1. Desnaturalización: En esta el ADN blanco de doble cadena se somete a una temperatura de 90° a 95°C durante 30 segundos; permitiendo la separación de las dos cadenas.

2. Hibridización: En esta la temperatura de la mezcla se disminuye hasta alcanzar la temperatura adecuada para favorecer el apareamiento de los primers con la secuencia blanco, lo cual generalmente ocurre entre 45 a 55°C (dependiendo de la temperatura de Fusión o T_m de los primers) durante 20 a 30 segundos

3. Elongación o extensión: En este la temperatura de la mezcla se eleva hasta 72 °C para que la Taq polimerasa (DNA polimerasa) comience el proceso de extensión en dirección 5' a 3' agregando los nucleótidos correspondientes, obteniéndose la hebra complementaria de DNA. En cada ciclo de PCR se duplica todo el ADN presente en la reacción, de manera que en unas pocas horas se obtienen millones de copias de un solo fragmento.

La técnica de PCR ha demostrado ser muy útil en el diagnóstico de virus, parásitos y bacterias de difícil cultivo; porque ofrece un diagnóstico confiable, más rápido y menos laborioso que los cultivos normales de este tipo de microorganismos, además de que cada una de estos grupos posee ADN o ARN, como material genético (Izzeddin y cols., 2010).

Una técnica de Biología molecular como la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) es útil para el diagnóstico de *Babesia microti*, la cual permite confirmar la parasitosis (Apt y Werner, 2013; Wójcik y cols., 2006).

Cultivo In Vitro

El éxito continuo in vitro de *Plasmodium falciparum* por Trager y Jensen, proporcionó una gran ayuda para el cultivo in vitro de protozoarios. Sin embargo muchas especies de *Babesia* no fueron realmente adaptables a las condiciones definidas para el parásito malarial, y solamente *B. microti* pudo ser cultivada bajo las mismas condiciones de *P. falciparum* (Viera, 2004).

Los eritrocitos son las células blanco de *Babesia*, que proporcionan los requerimientos metabólicos adecuados para su crecimiento y reproducción del parásito. La importancia y aplicaciones del cultivo in vitro de *Babesia* además de la obtención de cepas atenuadas para la inmunoprofilaxis permiten realizar estudios para: la obtención de clones, de comportamiento metabólico y reproductivo de las *Babesias*, de

ultraestructura, y obtención del antígeno para diagnóstico y pruebas de sensibilidad de drogas entre muchas otras aplicaciones (Rojas y cols., 2009; Fraga, 2010).

Inmunotransferencia (Western Blot)

La principal ventaja de esta técnica es la posibilidad de separar el o los antígenos proteicos de una mezcla compleja de acuerdo a su peso molecular (Gómez y cols., 2007). La técnica de inmunotransferencia o Western blot es un sistema rápido y muy sensible para la detección y caracterización de proteínas que se basa en la especificidad de reconocimiento entre antígeno y anticuerpo. Implica la separación por electroforesis por el sistema SDS-PAGE y una transferencia cuantitativa e irreversible a una membrana de PVDF de las proteínas de una mezcla compleja (lisado total celular). Los antígenos que se han transferido a la membrana son reconocidos por anticuerpos monoclonales o policlonales específicos de ellos (De la fuente y cols., 2007).

El procedimiento de la técnica está marcado por tres etapas como lo muestra la imagen: separación de proteínas por electroforesis, transferencia de papel de nitrocelulosa e Inmunodetección, ver Figura 7.

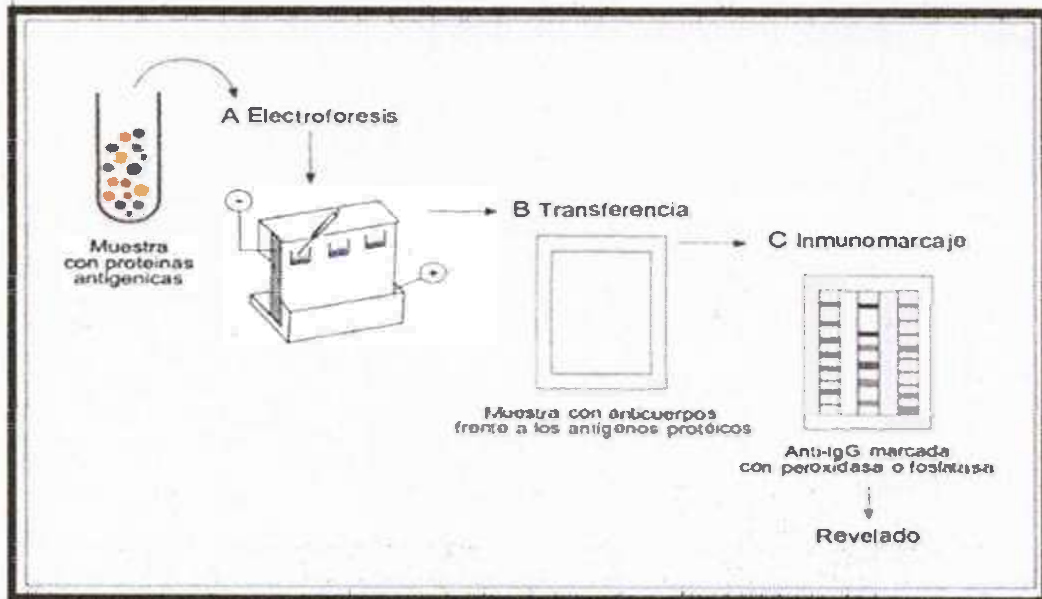


Figura 7. Inmunodetección (Gómez y cols., 2006).

Microscopía de Campo Oscuro

El microscopio de campo oscuro es una técnica de contraste que emplea un condensador especial que es prácticamente opaco, excepto una pupila circular en la periferia del lente frontal y que ésta proyecta un cono hueco de luz sobre la muestra. Como resultado de ello los únicos rayos que llegan al objetivo son aquellos que hayan sido difractados al incidir sobre la muestra. Sin la muestra en el lugar el campo aparecería negro debido a la ausencia de luz. Sin embargo donde hay detalles finos en la muestra se produce la difracción de la luz en todas las direcciones. El objetivo recoge esta luz y se observan detalles luminosos sobre un fondo negro como se observa en la Figura 8 (Rodak, 2002; Gamazo y cols., 2005).

Microscopía de Fluorescencia

El microscopio de fluorescencia es un microscopio óptico capaz de iluminar la muestra con una luz cuya longitud de onda puede variar debido a su paso por un filtro de excitación. Este filtro transmite exclusivamente la luz de excitación de la muestra que presenta la longitud de onda seleccionada (Vázquez y cols., 2010). Las técnicas de inmunofluorescencia permiten identificar microorganismos en muestras clínicas y detectar la presencia de un anticuerpo específico en el suero, estas técnicas combinan colorantes fluorescentes como el isocianato de fluoresceína con anticuerpos para conferirles fluorescencia cuando se exponen a la luz ultravioleta estos procedimientos son rápidos sensibles y muy específicos, hay pruebas de Inmunofluorescencia directa e indirecta (Tortora y cols., 2007).

Inmunofluorescencia directa

Este método serológico suele utilizarse para identificar un microorganismo en una muestra clínica durante este procedimiento la muestra que contiene el antígeno por identificar se fija sobre un portaobjetos. A continuación se agregan anticuerpos marcados con fluoresceína y tras una breve incubación del portaobjetos se lava para eliminar todo el anticuerpo no unido al antígeno, luego se examina con un microscopio de fluorescencia a fin de determinar la fluorescencia amarillo verdosa, ver Figura 8 (Tortora y cols., 2007).

Inmunofluorescencia indirecta

Esta prueba se utiliza para detectar la presencia de un anticuerpo específico en el suero tras la exposición a un microorganismo. A menudo son más sensibles que las pruebas directas. Durante este procedimiento se fija un antígeno conocido sobre un portaobjetos, a continuación se agrega el suero de prueba que si está presente el anticuerpo específico contra ese microbio, reaccionara con el antígeno hasta formar un complejo. Para que este complejo antígeno-anticuerpo pueda verse se agrega al portaobjetos una anti-inmunoglobulina sérica humana. Un anticuerpo que reacciona específicamente con un anticuerpo humano marcado con fluoresceína. La anti-IgSH solo estará presente si el anticuerpo específico ha reaccionado con su antígeno y por consiguiente también está presente. Tras la incubación y el lavado, el portaobjetos se examina con un microscopio de fluorescencia, ver Figura 9. Si el antígeno conocido fijado al portaobjetos aparece fluorescente significa que hay anticuerpos específicos contra el antígeno de prueba (Tortora y cols., 2007).

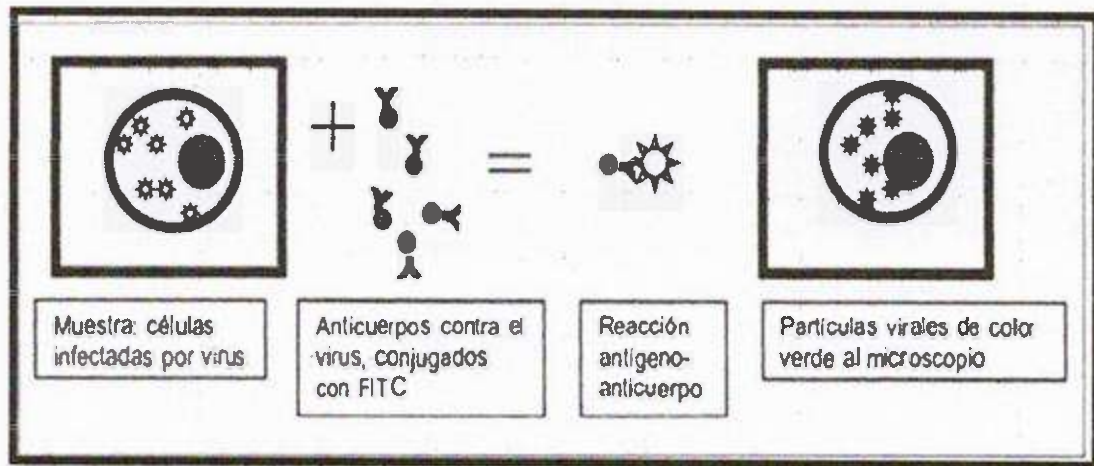


Figura 8. Detección de anticuerpos por la técnica de Inmunofluorescencia directa (Gómez y cols., 2007).

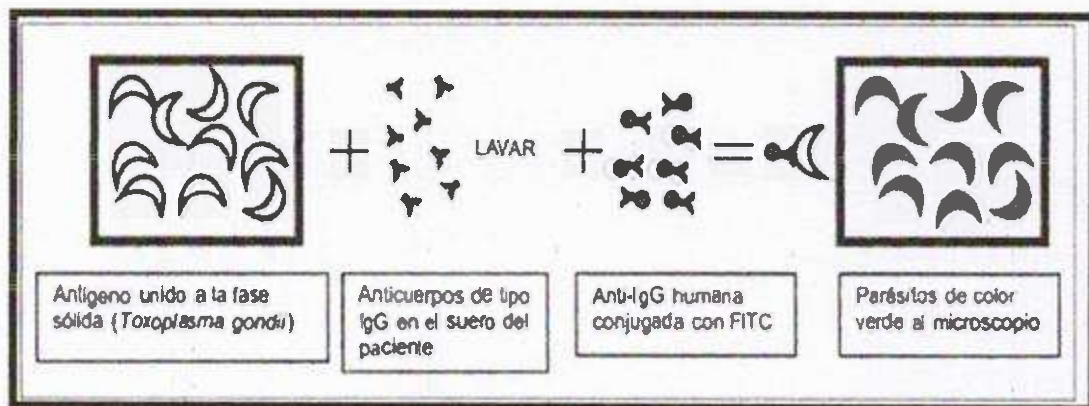


Figura 9. Detección de anticuerpos por la técnica de Inmunofluorescencia indirecta (Gómez y cols., 2007).

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de Estudio y Población de Muestra

Esta investigación comprendió la población de la Región Sur de Sonora, Figura 10. En habitantes provenientes de los municipios de Huatabampo, Etchojoa, Navojoa, Álamos, Obregón y Hermosillo, además se incluyeron comunidades colindantes a estos sectores como son Yavaros, Tocarobampo, Las Guayabas, El Recodo, entre otros. Se estudiaron un total de 117 pacientes que presentaron Síndrome Febril Inespecífico que acudieron al Laboratorio de Investigación de Zoonosis y Enfermedades Tropicales de la Universidad de Sonora Unidad Regional Sur.

Criterios de Inclusión

Selección de todos aquellos pacientes que al ser evaluados mediante atención médica especializada se les diagnosticó un cuadro clínico de Síndrome Febril Inespecífico.

Criterios de Exclusión

Selección de todos aquellos pacientes que al recibir atención médica no presentaban la sintomatología de un cuadro clínico de Síndrome Febril Inespecífico.



Figura 10. Representación del Sur del Estado de Sonora (Instituto Nacional de Estadística y Geografía INEGI).

Diagnóstico de Síndrome Febril Inespecífico

La selección de los pacientes fue a aquellos individuos que presentaron un cuadro de Síndrome Febril Inespecífico. Por lo tanto, el médico realizó una exploración física, así como también se le hizo un formulario epidemiológico como el representado en la Figura 11, que indagó en aspectos como la edad, sexo, domicilio, antecedentes familiares, antecedentes clínicos, ocupación, aspectos asociados al riesgo de infección por vectores transmisores como la convivencia con animales domésticos y síntomas clínicos presentados en los días hábiles en los que se le realizó el test.

Toma de Muestra

Posterior a la aplicación del formato de pacientes con Síndrome Febril Inespecífico en el Laboratorio de Investigación de Zoonosis y Enfermedades Tropicales (LIZET, JL-302 de la Universidad de Sonora, Unidad Regional Sur) se extrajo una muestra sanguínea en ayunas; recolectando el espécimen en tubos con y sin anticoagulante EDTA. Diversas muestras hemáticas, fueron recolectadas y transportadas por otras instituciones al laboratorio con el interés de formar parte de este estudio.



LABORATORIO DE INVESTIGACION
ZONOSIS Y ENFERMEDADES TROPICALES
DE LA REGION DEL MAYO



EL SABER P DE NOS PROPOS
HARÁ MI GRAN DIFERENCIA

FECHA _____ Nº DE MUESTRA _____

NOMBRE:	OCCUPACION:
SEXO:	DOMICILIO:
EDAD:	TEL:
	LUGAR DE NACIMIENTO:

ANTECEDENTES HEREDO-FAMILIARES _____

ANTECEDENTES PATOLÓGICOS: _____

ANTECEDENTES FAMILIARES NO PATOLÓGICOS: _____

VIVIENDA: _____

CONTACTO C/ ANIMALES: PERROS, GATOS, RATONES, GANADO: _____ CERDOS, AVES: _____

PRESENCIA DE ANIMALES SILVESTRES: _____

AGUA: ENTUBADA TINACO CISTERNA BOTES OTROS: _____

CUADRO CLINICO

FIÉBRE	MIALGIA	NEURITIS
FEBRICULA	DOLOR EN PIERNAS	DISESTESIAS
ESCALOFRIOS	SUDORACIONES NOCTURNAS	CAMBIO DE CARÁCTER
DIÁFORESIS	METEORISMO	PÉRDIDA DE LA MEMORIA
ASTENIA	DISTENCIÓN ABDOMINAL	CONFUSIÓN MENTAL
ADINAMIA	DOLOR ABDOMINAL	ACOLIA
CEFALEA	ANOREXIA	DISURIA
DOLOR OCULAR	HIPERESTESIA CUTÁNEA	EDEMAS
FOTOFOBIA	FATIGA FÁCIL	SOMNOLENCIA DIURNA
CONGESTIÓN CONJUNTIVAL	DISNEA DE ESFUERZO	INSOMNIO
DISMINUCIÓN AGUDA VISUAL	ICTERICIA	ORQUITIS
ACUFENOS	EXÁNTEMA	ANSIEDAD
VERTIGO	PETEQUIA	DEPRESIÓN
PALPITACIONES	EQUIMOSIS	CUADRO PSICÓTICO
ARTRALGIA	SANGRADO	TIPO MEDICAMENTO
DOLOR DE ESPALDA ALTA MEDIA BAJA		

Figura 11. Formato para pacientes.

Extracción de Muestra de Sangre Periférica

Primeramente se examinaron los datos del paciente para constatar que el formato había sido correctamente cumplido y que contenía los datos necesarios para una inequívoca identificación del paciente.

Se rotuló el tubo con el nombre del paciente.

Se le indicó al paciente que se sentara en la silla de toma de muestra.

Se posicionó al paciente con el brazo extendido recargado a una superficie fija.

Se aplicó el torniquete en el brazo a una distancia entre 8-10 cm de la zona de punción.

Se preparó el material necesario cercano para la toma de muestra (sistema vacutainer, torundas de alcohol, tubos rojos y lilas, es decir, con y sin anticoagulate EDTA).

Se desinfectó el lugar de flebotomía con alcohol al 70%.

Se realizó la punción venosa cerciorándose de que el bisel estuviese hacia arriba, introduciendo la aguja en medio de la vena y se recolecto la muestra en los tubos vacutainer.

Se retiró el torniquete y después la aguja colocando inmediatamente una torunda con alcohol en el lugar de punción indicándole al paciente que doblara el brazo por aproximadamente 5 minutos para prevenir hemorragia.

Se desechó el material infeccioso según la Norma Oficial Mexicana “NOM-087-ECOL-SSA1-2002”.

Separación de la Muestra

Para llevar a cabo la separación de los componentes se dejaron reposar las muestras de 10 a 15 minutos, hasta formarse el coágulo en el tubo de ensaye si anticoagulante EDTA (tapón color rojo); fueron centrifugadas a 3500 rpm durante 10 minutos (Fisher Scientific Modelo 225). Se colocó el suero separado en tubos eppendford con micropipetas (Pipet-lite XLS CAPP DENMARK), posteriormente las muestras se conservaron a una temperatura de -80°C en un ultracongelador (Sanyo Scientific MDF-U54VC).

Traslado de Muestras y Material

Las muestras serológicas de los pacientes y los reactivos para realizar la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) fueron llevados dentro de hieleras selladas con refrigerantes para controlar la temperatura a la que deben mantenerse en condiciones adecuadas. Se desinfectó y después se colocó en cajas el material necesario para su posterior traslado del Laboratorio de Investigación de Zoonosis y Enfermedades Tropicales ubicado en la Universidad de Sonora Unidad Regional Sur Navojoa con destino al Laboratorio Sonora Labs S.C. localizado en la Ciudad de Hermosillo, ver Figura 12.

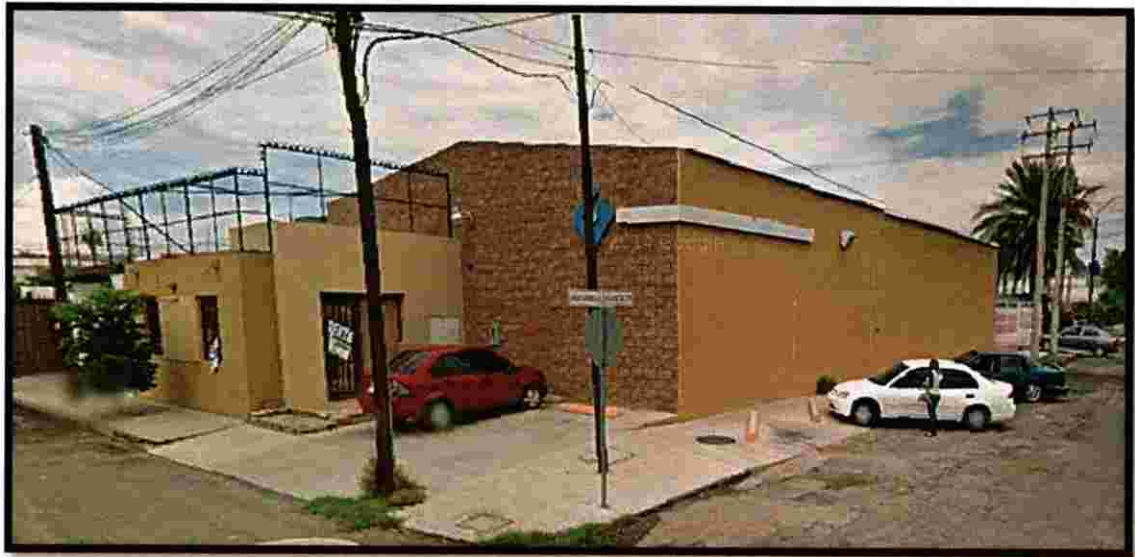


Figura 12. Instalaciones del laboratorio Sonora Labs S.C., Hermosillo, Sonora.

Detección de Anticuerpos contra *Babesia microti*

En el desarrollo del ensayo se utilizaron dos Kit de Inmunofluorescencia Indirecta (marca Fuller Laboratories, Fullerton, California, USA), Figura 13, para la detección de anticuerpos de clase IgG en IgM contra *Babesia microti* en suero, para 120 determinaciones. Se incluyeron controles positivos y negativos, se anexa la Tablas 6 y 7 para detectar errores analíticos dentro de la técnica y asegurar fiabilidad y exactitud de los resultados.

Preparación de la muestra y reactivos

Los sueros de los pacientes fueron expuestos a temperatura ambiente antes de iniciar el ensayo.

Se centrifugaron los suero a 3500 rpm durante 5 minutos (Centrifuga Micro 5417 R Refrigerada Eppendorf).

Después de centrifugar las muestras se rotularon tubos eppendorf nuevos para agregar la cantidad de suero requerido por las diluciones que indica la prueba.



Figura 13. Kit comercial de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para anticuerpos de clase IgG, marca Fuller.

Tabla 6. Reactivos kit IFI para anticuerpos *Babesia microti* de clase IgG.

Reactivos	Contenido
Portaobjetos de sustrato: 10 portaobjetos	10 portaobjetos con 12 pocillos cada uno, cada pocillo contiene como sustrato eritrocitos de hámster ó ratón infectados por <i>Babesia microti</i> , envasados al vacío.
Conjugado IgG: 2.5 ml	Frasco gotero tapón amarillo contiene purificado alín DyLight-488 anti-humano con albúmina de suero bovino y contratinción de azul de Evans.
Control positivo: 0.5 ml	Frasco gotero tapón azul contiene suero humano reactivo, proporcionado a una dilución 1:64. Punto final del título es de 1:512.
Control negativo: 0.5 ml	Frasco gotero tapón rojo contiene suero humano no reactivo a una dilución 1:50.
Medio de montaje: 1 ml	Frasco gotero tapón blanco contiene 50% de glicerol en PBS.
Buffer para lavado PBS: 1 litro	Agregar el polvo a 1 litro de agua destilada para producir una solución salina tamponada eón fosfato a pH 7.2.

Tabla 7. Reactivos kit IFI para anticuerpos *Babesia microti* de clase IgM.

Reactivos	Contenido
Portaobjetos de sustrato: 10 portaobjetos	10 portaobjetos con 12 pocillos cada uno, cada pocillo contiene como sustrato eritrocitos de hámster ó ratón infectados por <i>Babesia microti</i> , envasados al vacío.
Conjugado IgM: 2.5 ml	Frasco gotero tapón amarillo contiene purificado afín DyLight-488 anti-humano con albúmina de suero bovino y contratinción de azul de Evans.
Control positivo: 0.5 ml	Frasco gotero tapón azul contiene suero humano reactivo, proporcionado a una dilución 1:16. Punto final del título es de 1:128.
Control negativo: 0.5 ml	Frasco gotero tapón rojo contiene suero humano no reactivo, pretratado a una dilución 1:16.
IgM Diluyente de muestra: 15 ml	Contiene anticuerpos de cabra anti humanos en solución de PBS
Medio de montaje: 1 ml	Frasco gotero tapón blanco contiene 50% de glicerol en PBS.
Buffer para lavado PBS: 1 litro	Agregar el polvo a 1 litro de agua destilada para producir una solución salina tamponada con fosfato a pH 7.2.

Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para la Detección de Anticuerpos
IgG contra *Babesia microti*

1. Se prepararon diluciones 1:64 en PBS con el suero de los pacientes ($5:320 = 5\mu$ del suero y 315μ de la solución PBS).
2. Se prepararon diluciones del control positivo. Por lo tanto se realizaron diluciones 1:4 (100μ de control positivo y 400μ de PBS) y 1:8 (100μ de control y 800μ de PBS), también se corrió un control directo sin ninguna dilución.
3. Con una micropipeta se añadieron $10\mu\text{l}$ de las diluciones del suero paciente en cada pocillo de la placa (la placa contenía 12 pocillos). Para cada ensayo se incluyó el control negativo y las diluciones del control positivo preparados anteriormente.
4. Se colocaron los portaobjetos en una cámara húmeda y se incubaron durante 30 minutos a $37\text{ }^{\circ}\pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$
5. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se realizó el lavado de los pocillos deslizando una corriente suave de PBS embotellado previamente en una piseta. Se realizaron toqueteos y se sacudió ligeramente la placa para eliminar el exceso de líquido restante. Este paso se repitió tres veces sin permitir que los pocillos se secaran.
6. Para cada uno de los pocillo se agregaron 1 gota ($10\mu\text{l}$) conjugado, a continuación, se incubaron los portaobjetos en cámara húmeda durante otros 30 minutos a $37\text{ }^{\circ}\pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cuidando que la incubación debe estar en la oscuridad para proteger el conjugado fotosensible.
7. Se realizó un segundo lavado de los portaobjetos como en el paso 5.
8. Se añadieron de 3 a 4 gotas de medio de montaje para cada una de los portaobjetos.
9. Una vez añadido el medio de montaje a los pocillos, se realizó la lectura al microscopio de inmunofluorescencia (LEICA-DMLS) con el objetivo 100x. primero se observaron los controles Positivo y Negativo después se procedió a

realizar la lectura de todos los pocillos. Una vez terminado el ensayo se almacenaron las placas a 2°-8° C en la oscuridad para un máximo de 24 horas, Figuras 14 y 15.

**Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para la detección de anticuerpos
IgM contra *Babesia microti***

1. Se prepararon diluciones 1:16 con el suero de los pacientes (5:80 = 5µ suero y 75µ del diluyente de la muestra).
2. Se prepararon diluciones del control positivo. Por lo tanto se realizaron diluciones 1:4 (100µ de control positivo y 400µ de PBS) y 1:8 (100 µ de control y 800µ de PBS), también se corrió un control directo sin ninguna dilución, para comparar las reacciones positivas a diferentes títulos.
3. Con una micropipeta se añadieron 10 µl de las diluciones del suero paciente en cada pocillo de la placa (la placa contenía 12 pocillos). Para cada ensayo se incluyó el control negativo y las diluciones del control positivo preparados anteriormente.
4. Se colocaron los portaobjetos en una cámara húmeda y se incubaron durante 90 minutos a 37 ° ± 0,5 °C.
5. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se realizó el lavado de los pocillos deslizando una corriente suave de PBS embotellado previamente en una pizeta. Se realizaron toqueteos y se sacudió ligeramente la placa para eliminar el exceso de líquido restante. Este paso se repitió tres veces sin permitir que los pocillos se secaran.
6. Para cada uno de los pocillo se agregaron 1 gota (10 µl) conjugado, a continuación, se incubaron los portaobjetos en cámara húmeda durante otros 30 minutos a 37 ° ± 0,5 °C. Cuidando que la incubación debe estar en la oscuridad para proteger el conjugado fotosensible.

7. Se realizó un segundo lavado de los portaobjetos como en el paso 5.
8. Se añadieron de 3 a 4 gotas de medio de montaje para cada una de los portaobjetos.
9. Una vez añadido el medio de montaje a los pocillos, se realizó la lectura al microscopio de inmunofluorescencia (LEICA-DMLS) Figura 16, con el objetivo 100x. primero se observaron los controles Positivo y Negativo después se procedió a realizar la lectura de todos los pocillos. Una vez terminado el ensayo se almacenaron las placas a 2°-8° C en la oscuridad para un máximo de 24 horas.

Interpretación de Resultados para IgG e IgM

Una reacción positiva aparece como grupos de distintos cuerpos de inclusión periféricos verde-manzana dentro de los eritrocitos infectados. Una reacción negativa habrá ausencia de inmunofluorescencia ó también se puede observar como una contra tinción de tonalidad rojiza, El tamaño, apariencia y la densidad de la reacción debe ser en comparadas con el control positivo y negativo.

En muestras de pacientes Positivos en diluciones 1:16: títulos de IgM 1:16 o mayor se considera que reflejan infección activa por *Babesia microti*. Elevados títulos de IgG, cuando están presentes, son un indicador de infección en un tiempo indeterminado.

En muestras de pacientes positivos en diluciones 1:64: títulos de IgG de 1:64 o mayor se considera que reflejan infección en un tiempo indeterminado por *Babesia microti*. Títulos de IgM, cuando están presentes, son también un indicador fiable de infección reciente.

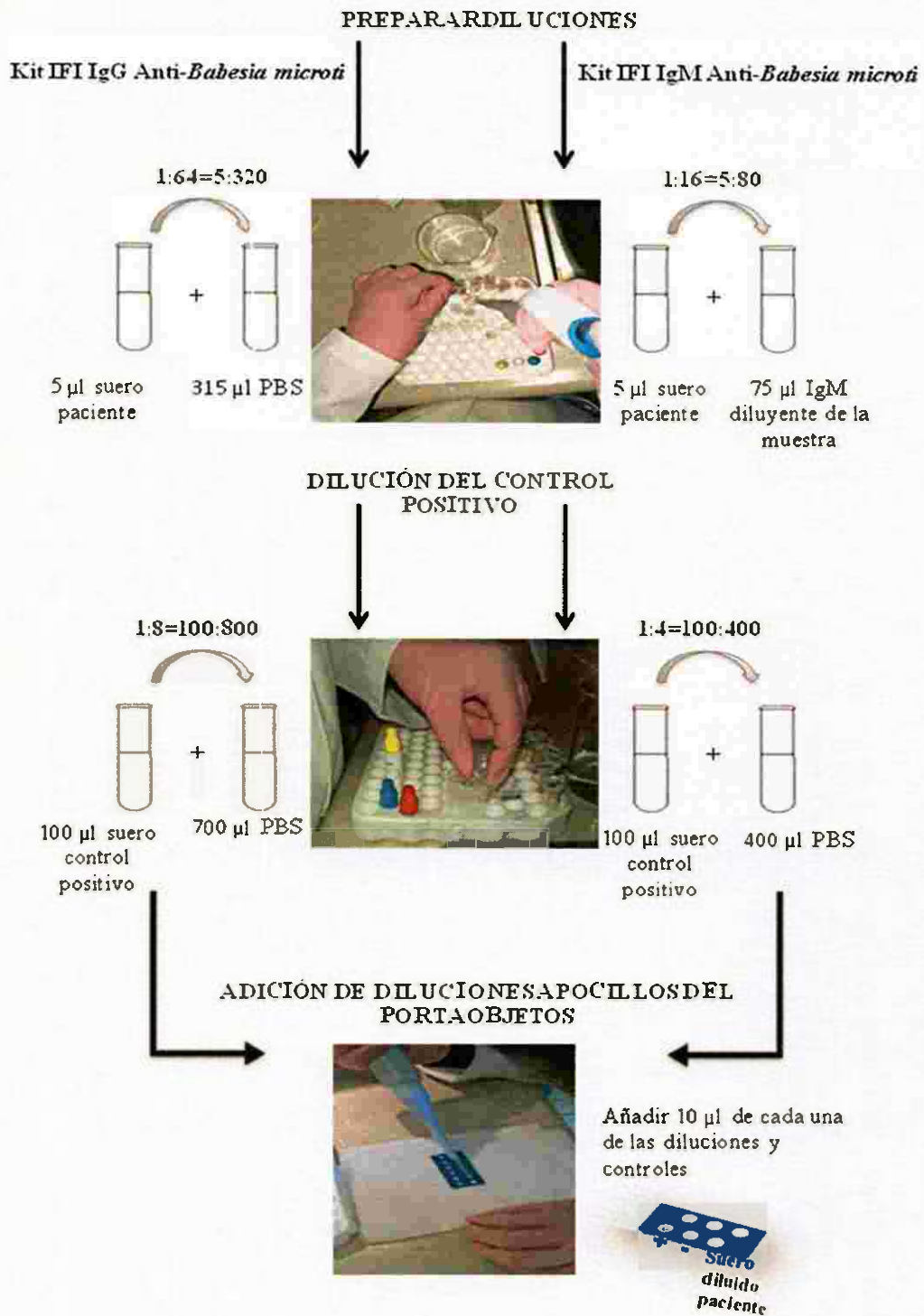


Figura 14. Diagrama del método de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) parte I.

INCUBACIÓN DE PORTAOBJETOS EN CÁMARA



Para anticuerpos de clase IgG
30 min-37°C±0.5°C en
oscuridad.

Para anticuerpos de clase IgM
90 min-37°C±0.5°C

PRIMER LAVADO CON PBS



Tres veces a presión
suave de corriente
PBS

ADICIÓN DE CONJUGADO



Añadir 10 µl de
conjugado a cada
pocillo

SE REPITE INCUBACIÓN PARA IgG E IgM POR 30
MIN-37°C Y LAVADOS 3 VECES CON PBS

ADICIÓN DE MEDIO DE MONTAJE



Añadir 3 ó 4 gotas a el
portaobjetos.

LECTURA EN MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA



Con objetivo 100X.
Comparación de
controles con los
sueros de pacientes.

Figura 15. Diagrama del método de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) parte II.

R-T170065



Figura 16. Microscopio de fluorescencia (LEICA-MDLS).

RESULTADOS

Se analizaron 117 muestras de pacientes que presentaban síndrome febril inespecífico para llevar a cabo el estudio serológico mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta. La procedencia de los pacientes fue de los municipios de Navojoa (61/117), Huatabampo (23/117), Etchojoa (6/117), Álamos (5/117), Hermosillo (3/117) y Obregón (2/117). De las 117 personas a estudio 76 fueron mujeres (64.95%) y 41 hombres (35.04%). El rango de edad estuvo entre 4 y 73 años con una media de 29.32.

La determinación de anticuerpos tanto para IgG e IgM anti *Babesia microti* arrojó un 83.26% (98 personas) en total de casos positivos, ver Figura 17. La seroprevalencia encontrada en hombres fue 36.73% (36 personas) y en mujeres fue de un 63.26% (62 personas).

Para *Babesia microti* se encontró una seroprevalencia total de anticuerpos IgG anti-*Babesia microti* de 22% (25 personas) de los cuales 68% mujeres (17 personas) y 32% hombres (8 individuos). Mientras que en la detección de seroprevalencia de anticuerpos IgM anti-*Babesia* de 81% (94 pacientes) de ellos fueron mujeres 62.7% (60 personas) y hombres 36.17% (34 sujetos). En la Tabla 8 se describen los Grupos de edades y seropositivos detectados para anticuerpos de clase IgG e IgM en habitantes de la Región Sur del Estado de Sonora, se observó que en el rango de edad de 4 a 25 años fue mayor el número de casos positivos indicando esto que el contacto con el parásito se inicia en la infancia antes o a partir de los 4 años de edad y el contacto continua hasta la edad adulta.

Un 17.98 % (21 personas) resultó positivo simultáneamente para anticuerpos IgG e IgM anti-*Babesia microti*, presentando un 23.80% (5 personas) los hombres y un 76.19% (16 personas) las mujeres.

En la Tabla 9 aparecen las características sociodemográficas de los pacientes que resultaron seropositivos al estudio, detectando la mayor frecuencia en el grupo de estudiantes 24.48% (24 individuos), seguido por el grupo de personas que se dedican al hogar 18.39% (18 personas), el ámbito rural presentó un número mayor de casos positivos con un 68.36% (67 sujetos). El 24.48% (24 personas) de los seropositivos describe haber estado en contacto con ratones, uno de los vectores de la enfermedad.

Las manifestaciones clínicas más frecuentes en los individuos infectados fueron cefalea, dolor de espalda, fiebre, escalofríos, mialgia y artralgia, ver Tabla 10.

Se efectuaron estudios de Factor Reumatoide (FAR) en donde solo se observó aglutinación en el suero de dos pacientes, también se realizaron reacciones febriles como estudios complementarios, ver Tabla 11.

Tabla 8. Grupos de edades y seropositivos detectados para anticuerpos de clase IgG e IgM en habitantes de la Región Sur del Estado de Sonora.

Edad	IgG			IgM		
	Estudiados	Positivos	%	Estudiados	Positivos	%
4 a 14	23	2	1.7	23	22	18.96
15 a 25	30	9	7.8	29	26	22.41
26 a 36	19	6	5.2	19	13	12.20
37 a 47	21	5	4.34	21	13	12.20
48 a 58	12	2	1.73	13	11	9.48
59 a 69	6	1	0.86	7	5	4.31
70 a 80	1	-	-	1	1	0.86
Edad desconocida	3	-	-	3	3	2.58
Total	115	25	22	116	94	81

Tabla 9. Características Sociodemográficas de Pacientes Seropositivos para *Babesia microti*.

Característica	Frecuencia	Porcentaje
<u>Ocupaciones</u>		
Estudiantes	24	24.48
Ama de casa	18	18.39
Jornalero	8	8.16
Profesionistas	5	5.10
<u>Procedencia</u>		
Urbano	29	29.59
Mujeres	21	72.41
Hombres	8	27.58
Rural	67	68.36
Mujeres	41	61.19
Hombres	26	38.80
<u>Exposición al vector</u>		
Animales domésticos	54	55.10
Ratones	24	24.48

Tabla 10. Demostración sintomatológica de los pacientes seropositivos a *Babesia microti*.

Signos y síntomas	Frecuencia	Valores%
Cefalea	60	61.22
Dolor de espalda	54	55.09
Escalofríos	48	48.97
Fiebre	47	47.95
Mialgia	46	46.93
Artralgia	45	45.91
Fatiga fácil	38	38.77
Adinamia	37	37.75
Astenia	35	35.71
Somnolencia diurna	32	32.65
Insomnio	32	32.65
Sudoración nocturna	32	32.65
Diaforesis	30	30.61
Congestión conjuntival	26	26.53

Tabla 11. Títulos de Reacciones Febriles en Individuos Seropositivos.

Antígenos febriles	Títulos											
	1:40		1:80		1:160		1:320					
	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%
Typhi O	39	39.7	25	5.10	5	5.10	1	1.02				
Typhi H	9	9.18	4	4.08	6	6.12	2	2.04				
Paratyphi A	10	10.20	4	4.08	2	2.04	2	2.04				
Paratyphi B	14	14.28	6	6.12	0	0	1	1.02				
Brucella abortus	17	17.34	7	7.14	2	2.04	2	2.04				
Proteus OX-19	23	23.46	36	36.73	7	7.14	5	5.10				

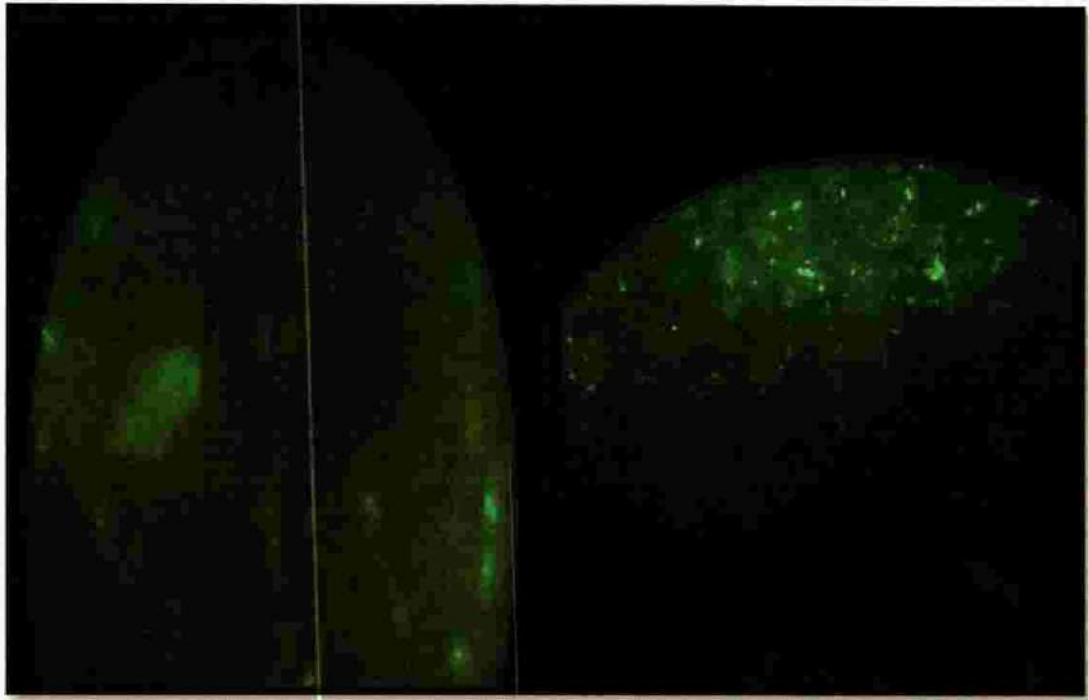


Figura 17. *Babesia microti* observada en microscopio de fluorescencia con objetivo de 100X.

DISCUSIÓN

En México Babesiosis no es una enfermedad de carácter notable, además de carecer de datos en investigación y prevalencia en los seres humanos. En nuestro país se tiene referencia de un estudio realizado en 1976 por Osorno y colaboradores donde encontraron anticuerpos contra una especie indeterminada de *Babesia* en 38 de las 101 muestras de residentes rurales de México, aislaron el parásito de tres muestras por subinoculación en hímsters (Acha y cols., 2003) por lo cual se desconoce la incidencia de la Babesiosis humana, y a consecuencia de evidencias en la Región del Sur de Sonora. Por ende no se ha determinado la importancia de esta infección en salud pública, junto con la falta de experiencia clínica acerca de la enfermedad.

Las *Babesias* humanas son pocos frecuentes ó tal vez son poco estudiadas a nivel mundial; Estados Unidos es uno de los lugares donde se han reportado más casos de *Babesias* con 100 casos; en Europa se han identificado 22 casos aproximadamente y un caso en Taiwan, en total la cifra de casos de *Babesias* en el hombre es menor a 200 casos en todo el mundo.

En la ciudad de Khutul de Selenge, Mongolia se investigó la frecuencia de *Babesia microti* mediante el uso de Inmunofluorescencia Indirecta en muestras de sangre que fueron recolectadas de ganaderos residentes (Hong y cols., 2014). En nuestro estudio hemos utilizado Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para la detección de anticuerpos *anti-Babesia microti* de clase IgG e IgM para diagnóstico. Las pruebas de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) son conocidos por ser sensible, específico y reproducible para el diagnóstico de anticuerpos específicos para *B. microti* en humanos (Hundfeld y cols., 2002).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio fueron de un 22% (25 personas) anticuerpos de clase IgG para *Babesia microti* los cuales son comparables con los estudios serológicos realizados por Buelvas y colaboradores en 2008 en Colombia, estudio realizado en habitantes de poblaciones rurales y urbanas obteniendo un 30.6%

(23/80). Los anticuerpos de clase IgG *anti-Babesia microti* encontrados en el estudio significan que los individuos superaron la infección (Seelling y Meiners, 2011). Esto indica que en la Región del Sur de Sonora se han presentado casos de Babesiosis.

En este estudio el porcentaje para los títulos de anticuerpos de clase IgM obtenido en los individuos 81% fue significativamente mayor que el obtenido en Suiza Oriental por Foppa y colaboradores en 2002, donde se reclutaron 400 sueros de los residentes que vivían cerca del campo donde la seroreactividad para anticuerpos IgM no se encontró para ninguno de los sueros debido a la época en la que se habían recolectado. La clase de anticuerpos IgM, que se sintetizan en una mayor velocidad se asocia con el antígeno, siendo este anticuerpo la primera línea de defensa (Devlin, 2004). Teniendo en claro este indicio, se deduce la posibilidad que el 81% de seropositividad presentada en los pacientes correspondió a que la enfermedad está presentándose por primera vez en el organismo del individuo.

La sintomatología reportada por los sujetos en el estudio que presentaron una seropositividad para anticuerpos de clase IgG e IgM *anti-Babesia*. Se mostró que el 61.22% (60/98) sujetos reportaron cefalea, otros síntomas fueron fiebre 47.95% (47/98), acompañado de mialgia 46.93% (46/98) y artralgia 45.91% (45/98), fatiga 38.77% (38/98). Todos los pacientes presentaron un cuadro clínico característico de Babesiosis como el que han reportado otros autores (Paniker, 2013; Vanniery Krause, 2012; Leiby, 2011; Delmoral y cols., 2009). Estos valores sugieren relación con el síndrome febril inespecífico al descrito por Belongia en Wisconsin, donde los pacientes presentaron características clínicas similares, tales como fatiga 15 (88.2), dolor de cabeza 14 (87.5), mialgia 16 (94.1), artralgia 16 (94.1) en su investigación *Las infecciones transmitidas por garrapatas como causa de una enfermedad febril inespecífica en Wisconsin* (Belongia y cols., 2001).

Entre los factores de riesgo asociados a Babesiosis están las mordeduras de garrapatas, en específico las del género *Ixodes scapularis*. Koneman y Allen describen que la distribución geográfica de las garrapatas parece estar en expansión. La

distribución del venado cola blanca en las zonas de población humana puede ser una razón, además el huésped preferido para las larvas y ninfas de *Ixodes scapularis* es el ratón de patas blancas (*Peromyscus leucosis*), uno de los reservorios principales de *B. microti* y *B. Burgdoferi* en las zonas endémicas (Koneman y Allen, 2008). En nuestra situación la población de ésta región vive en áreas rurales y semi-urbanas por ser una zona de gran actividad agropecuaria y el contacto a los reservorios y vectores es cotidiano. Como consecuencia seroepidemiológica es idóneo llevar a cabo investigaciones para determinar la verdadera distribución del patógeno *Babesia microti* no solamente en esta región sino a nivel nacional y debido a la alta prevalencia encontrada sería de gran ayuda investigar otros posibles vectores de esta enfermedad aparte de la garrapata.

Cabe mencionar que los sueros fueron tratados mediante otras técnicas de respaldo para corroborar que entonces en el análisis no existía reacción cruzada con algún otro padecimiento; pruebas de Factor Reumatoide (FAR) la cual inicialmente se asoció a la Artritis Reumatoide, pero también puede aparecer en personas sanas marcando otras patologías y teniendo como principal marcador al anticuerpo IgM (Prats, 2005). De esta técnica los sueros de dos pacientes positivos a Inmunofluorescencia Indirecta en anticuerpos de clase IgM microaglutinaron. Descartando la idea de que la mayoría de los sujetos estudiados hubiesen dado falsos positivos.

Al realizar los títulos de reacciones febriles se dedujo que pudiera haber una correlación de Typhi O y Proteus-OX19 en dilución de 1:40 dando estos falsos positivos, pero no es suficiente evidencia para implementarla como prueba de filtro, aunado que existe fiebre tifoidea en forma endémica en esta región y que ésta no da reacción cruzada con Rickettsiosis (Proteus-OX19).

CONCLUSIONES

El síndrome febril inespecífico está asociado a la enfermedad producida por el parásito *Babesia microti*.

La Babesiosis está siendo una enfermedad subestimada en el Sur del Estado de Sonora y consecuentemente confundida con otros padecimientos, por lo tanto la incidencia de la enfermedad en nuestra región es nula. Por lo contrario al juzgar los altos porcentajes de anticuerpos de clase IgM *anti-Babesia* con un 81% e IgG *anti-Babesia* con un 22% de seropositividad obtenidos en nuestro estudio indican que *Babesia microti* está presente en el Sur del Estado de Sonora.

Es necesario hacer de conocimiento público esta enfermedad a las instituciones médicas, para que así se tomen medidas preventivas necesarias y evitar el posible deterioro de la salud de la población.

Se comprobó que la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) es un método sensible eficaz y posee un alto grado de especificidad para el diagnóstico de *Babesia microti*.

Los exámenes de Factor Reumatoide (FAR) y Reacciones Febriles no aportan suficiente evidencia para tomarlas como prueba filtro en la búsqueda de Babesiosis.

RECOMENDACIONES

- ✓ Es importante establecer métodos para el diagnóstico de *Babesia microti*.
- ✓ Se recomienda realizar estudios sobre la incidencia de Babesiosis humana en México.
- ✓ Dentro de los aspectos preventivos se recomienda evitar las áreas donde se haya determinado la presencia de garrapatas como zonas de campos abiertos y bosques donde existe la fauna portadora de esta enfermedad.
- ✓ Es necesario investigar a otros posibles vectores de esta enfermedad principalmente artrópodos, existentes en ésta región que podrían explicar la alta prevalencia de Babesiosis encontrada en este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, A., Agudelo, C., Barrientos, S., Chávez, M., Cuellar, A., y Durán, C. (2006). *Fundamentos de Ciencias Básicas Aplicadas a la Odontología* (Primera edición ed.). Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
- Agudelo, P. (2008). Diagnóstico de Leptospirosis de muestras de sangre y cultivo. *Biomedicina* (28), 7-9.
- Apt, B., y Werner, L. (2013). *Parasitología humana* (Primera edición ed.). D.F., México: McGraw-Hill Education.
- Bajer, A., Alsarraf, M., Bednarska, M., Mohallal, E., y Mierzejewska, E. (2014). *Babesia behnkei* sp. nov., a novel *Babesia* species infecting isolated populations of Wagner's gerbil, *Dipodillus dasyurus*, from the Sinai Mountains, Egypt. *BioMed Central*, 1-12.
- Baker, C. (2007). *Red Book Atlas de enfermedades infecciosas en pediatría* (Primera edición ed.). Buenos Aires, Argentina: Editorial Medica Panamericana.
- Berenguer, J. (2006). *Manual de parasitología: morfología y biología de los parásitos de interés sanitario*. España: Ediciones de la Universidad de Barcelona.
- Brooks, G., Carroll, K., Butel, J., y Morse, S. (2008). *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg* (Decimo-novena edición ed.). México: El Manual Moderno.
- Buelvas, F., Alvis, N., Buelvas, I., Miranda, G., y Gattar, S. (2008). Alta prevalencia de anticuerpos contra *Bartonella* y *Babesia microti* en poblaciones rurales y urbanas en dos provincias de Córdoba. *Revista salud pública*, X(1), 168-177.
- Calderón, O. (2004). *Parasitología general: elementos y actividades* (Primera edición ed.). Editorial de la Universidad de Costa Rica.

- Carr, J., y Rodak, B. (2010). *Atlas de Hematología Clínica* (Tercera edición ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Centeno, S., do Rosario, V., Parreira, R., Maia, A. J., Freudenthal, A. M., Nijhof, A. M., y otros. (2003). A fatal case of human babesiosis in Portugal: molecular and phylogenetic analysis. *Tropical Medicine and International Health*, VIII (8), 760–764.
- Chauvin, A., y ET., M. (2009). Babesia and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Revista veterinaria*, XL (2), 37.
- Crowley, L. (2014). *Una introducción a la enfermedad humana: correlaciones en patología y fisiopatología* (Novena edición ed.). Minnesota: McGraw-Hill Interamericana Editores.
- De la Fuente, A., Rodríguez, J., y Fonseca, E. (2007). Análisis de proteínas mediante electroforesis e inmunotransferencia (Western Blot). *Servicio de Dermatología*, XXII (5), 252-8.
- Delmoral, J., Traviezo, L., Cárdenas, E., y Kompalic, A. (2009). Babesiosis humana por Babesia sp. (Piroplasmorida: Babesiidae). Reporte de un caso en el Estado Lara. *La revista de Enfermería y Otras Ciencias de la Salud*, II (2), 34-36.
- Ellis, R., Fukuda, P., Welch, K., y Nisalak, A. (2006). Causes of fever in adults on the Thai-Myanmar Border. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, LXXIV(1), 108–113.
- Fauci, A. (2009). *Harrison Principios De Medicina Interna* (Decimo séptima edición ed.). Mc Graw-Hill Intreamericana Editores, S.A de C.V.
- Ferri, F. (2006). *Consultor clínico claves diagnósticas y tratamiento*. Madrid: Elsevier.
- Foppa, I., Krause, P., y Spielman. (2008). Entomologic and serologic evidence of zoonotic transmission of Babesia microti, Eastern Switzerland. *Emerg Infect Dis*, VIII (7), 722–726.

- Fraga, E. (2010). *Estudio clínico, laboratorial y ecográfico de la Babesiosis canina en Galicia*. Galicia: Universidad de Santiago Compostela.
- Gamazo, C., Lopez, I., y Diaz, R. (2005). *Manual Practico de Microbiologia* (Tercera edición ed.). España: El sevier.
- Guevara, V., y Espinosa, E. (2008). Consideraciones en el manejo del síndrome febril prolongado en niños. *Artículo de revisión*, 1-9.
- Hernández, D., y Cabiedes, J. (2010). Técnicas inmunológicas que apoyan el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes. *EL Selvier*, VI (3), 173-177.
- Hernández, J. (2006). Babesiosis humana. *Medicina UPB*, XXV (2), 135-145.
- Homer, M., Aguilar, I., Teleford, Krause, P., y Persing, D. (2000). Babesiosis. *Clinical microbiology reviews*, XIII (3), 451-469.
- Hong, S., Anu, D., Jeong, Y., Abmed, D., Cho, S., y Lee, W. (2014). *Molecular Detection and Seroprevalence of Babesia microti among Stock Farmers in Khutul City, Selenge Province, Mongolia*. Mongolia: Korean Journal Parasitology.
- Hunfeld, K., Lambert, A., Kampen, H., Albert, S., Epe, C., Brade, V., y otros. (2002). Seroprevalence of Babesia Infections in Humans Exposed to Ticks in Midwestern Germany. *American Society for Microbiology*, XL (7), 2431-2436.
- Hunfeld, K., Hildebrandt, A., y Gray, J. (2008). Babesiosis: Recent insights into an ancient disease. *International Journal for Parasitology*, 1219-1237.
- Izquierdo, M., y Avellaneda, A. (2004). *Enfermedades raras un enfoque práctico* (Primera edición ed.). Madrid: Instituto de Investigación de Enfermedades Raras.

- Izzeddin, R., Toro, R., y Izzeddin, R. (2010). Técnica de PCR Como Estrategia biotecnológica para detección de *Helicobacter pylori* en placa dental. *Biotecnología*. *Biotecnología*, *XIV* (1), 25-36.
- Kjemtrup, A. y Conrad, P. (2006). A review of the small canine piroplasms from California: *Babesia conradae* in the literature, *Vet Parasitol Review*, *CXXXVIII* (1-2), 112-117.
- Koneman, E., Winn, Janda, Allen, Procop, Schreckenber, y otros. (2006). *Koneman Diagnóstico microbiológico Texto y Atlas en color*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Leiby, D. A. (2011). Transfusion-Transmitted *Babesia* spp.: Bull's-Eye on *Babesia microti*. *Clinical Microbiology Review*, *XXIV*(1), 14-28.
- Lewis, S., Bain, B., y Bates, I. (2008). *Dacie y Lewis Hematología práctica* (Décima edición ed.). Madrid: El sevier.
- López, E., y Serrano, G. (2005). El maravilloso mundo de los protozoarios. *Rev. Soc. Méx. Hist. Nat.*, *II*(1), 231-237.
- López, L. E., Hernández, M., y Colín, C. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio. *Medigraphic*, 14-15.
- Martínez, E. (2013). *Fisiopatología básica*. San José: EUNED.
- Meléndez, R. (2000). Babesiosis: una zoonosis emergente en regiones templadas y tropicales. Una revisión. *Revista científica*, *X*(1), 13-18.
- Méndez, C. (2002). *Patología humana básica aplicada a rehabilitación*. Colombia: Centro Editorial Universidad del Rosario.
- Montes, J. (2012). Coinfección de Babesiosis En Ehrlichiosis: un Caso De Cartagena En Indianas Colombia. *Revistas Ciencias Biomedicas*, *III* (2), 339-345.
- Morales, A. J. (2007). Epidemiología de la Babesiosis: Zoonosis emergente. *Acta Científica Estudiantil*, *V* (4), 132-138.

- Moro, M. H., Zegarra-Moro, O. L., Bjornsson, J., y Hofmeister, E. K. (2002). Increased Arthritis Severity in Mice Coinfected with *Borrelia burgdorferi*. *The Infectious Diseases Society of America*, CLXXXVI (1), 428-431.
- Negróni, M. (2009). *Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica* (Segunda edición ed.). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Osorno, B., Vega, R.M., Robles, C., y Ibarra, S. (1976). Isolation of *Babesia* spp. from asymptomatic human beings. *Vet Parasitol*, II (1), 11-120.
- Palafox, G., y Del Campo, M. (2011). Fiebre de origen desconocido. El reto de la Medicina Interna. *Medicina Interna de México*, XXVII (6), 573-585.
- Paniker, C. J. (2013). *Paniker's Textbook of Medical Parasitology* (Séptima edición ed.). Jaypee Brothers Medical Publishers.
- Pérez, J. (2013). *Manual de patología general* (Séptima edición ed.). Barcelona, España: Publicación MASSON.
- Prats, G. (2007). *Microbiología clínica* (Primera edición ed.). España: Editorial médica Panamericana.
- Quiroz, H. (2005). *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*. D.F., México: Editorial LIMUSA.
- Ríos, L., Alvarez, G., y Blair, S. (2003). Serological and parasitological study and report of the first case of human babesiosis in Colombia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, XXXVI (4), 493-498.
- Rodak, B. (2005). *Hematología Fundamentos y Aplicaciones Clínicas* (Segunda edición ed.). Philadelphia: Editorial Médica Panamericana.
- Rodríguez, A. (2007). Epidemiología de la Babesiosis: Zoonosis emergente. *Acta científica estudiantil*, V(4), 132-138.

- Rojas, C. F., y Álvarez, J. (2009). *Cultivo in vitro de Babesia bovis y Babesia bigemia* (Primera edición ed.). México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.
- Rovid, A., Roth, J., Galyon, J., Lofstedt, J., y Leonardón, M. (2010). *Enfermedades emergentes y exóticas de los animales* (Primera edición ed.). Ames: Iowa State University.
- Rubio, F., García, B., y Carrasco, M. (2004). *Fundamentos y técnicas de análisis hematológicos y citológicos* (Primera edición ed.). Madrid: Ediciones Paraninfo.
- Ruiz, R., Cerón, M., Ruíz, L., García, F., Valle, G., y Elizondo, J. (2010). Fiebre en pediatría. *Revista mexicana de pediatría*, 3-8.
- Sarmiento, J. M. (2006). Babesiosis Humana. *Medicina UPB, XXV* (2), 135-145.
- Siachoque, H. (2006). *Inmunología diagnóstico e interpretación de pruebas de laboratorio*. Bogotá: Universidad Colegio Mayor de Nuestra Señora del Rosario.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., y Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Medigraphic, II* (2), 70-78.
- Teijón, J., y Garrido, A. (2006). *Fundamentos de Bioquímica Estructural* (Segunda edición ed.). Madrid: Editorial Tébar.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., y Case, C. L. (2007). *Introducción a la microbiología* (Novena edición ed.). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Troyes, L., Fuentes, L., Troyes, M., Canelo, L., y García, M. (2006). Etiología del síndrome febril agudo en la Provincia de Jaén, Perú 2004-2005. *Rev Peru Med Exp Salud Publica, XXIII* (1), 5-11.

- Vannier, E., Gewurz, B., y Krause, P. (2008). Human babesiosis . *Infectious Disease Clinics of North America*, XXII, 469-488.
- Vannier, E., y Krause, P. (2012). Current concepts human Babesiosis. *The New England Journal of Medicine*, 2397-2407.
- Vasco, K. (2013). *Estandarización de la técnica de análisis de fusión de alta resolución para la detección de Babesia en garrapatas utilizando polimorfismos de nucleótidos*. Ecuador: Universidad Central de Ecuador.
- Viera, F. (2004). *Técnicas diagnósticas en parasitología veterinaria* (Segunda edición ed.). Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán.
- Viñafane, H. H. (2008). *Microbiología básica para el área de la salud y afines* (Segunda edición ed.). Colombia: Editorial Universidad de Antioquia.
- Voet, D., Voet, J., y Pratt, C. (2009). *Fundamentos de bioquímica: la vida a nivel molecular* (Segunda edición ed.). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Wójcik, A., Cisak, E., Chmielewska, J., Zwoliński, J., Buczek, A., y Dutkiewicz, J. (2006). Prevalence of Babesia microti in Ixodes Ricinus ticks from Lublin Region (Eastern Poland). *Ann Agric Environ Med*, 319–322.

ANEXOS

Glosario

Adinamia: es la disminución de la iniciativa física (movimiento) por extrema debilidad muscular.

Alteraciones sensoriales: se caracteriza por una dificultad en la interpretación y organización de la información captada por los órganos sensoriales del cuerpo (gusto, vista, tacto, olfato).

Anemia: reducción de más del valor normal en el número total de glóbulos rojos.

Anticuerpos: también denominados inmunoglobulinas (A, D, E, G y M), son herramientas que el sistema inmunológico utiliza para combatir agentes patógenos.

Antígeno: un antígeno es una sustancia ajena al cuerpo que el sistema inmunológico reconoce como una amenaza.

Artralgia: dolor en las articulaciones.

Astenia: sensación de cansancio o debilidad.

Cefalea: dolor de cabeza

Coagulación extravascular diseminada: es un estado trombohemorrágico cuyas manifestaciones clínicas pueden derivarse tanto de fenómenos hemorrágicos como trombóticos.

Congestión conjuntival: hinchazón (inflamación) de la conjuntiva, la membrana delgada y transparente que recubre el interior de los párpados y la parte blanca del ojo (conocida como esclerótica). Se conoce como ojo rojo.

Diaforesis: una excesiva sudoración y profusa.

Esplenomegalia: incremento del tamaño de bazo mayor a sus dimensiones normales.

Esporogonia: fase sexual del ciclo de algunos protozoarios. En el género *Babesia* tiene lugar en la garrapata vector.

Esporozoíto: etapa infecciosa transmitida por la saliva de la garrapata, formado por el proceso de esporogonia.

Fotofobia: malestar ocular en presencia de luz brillante.

Hematuria: presencia de sangre en la orina en cantidades superiores a la normal. Se manifiesta por cambios en el color en la orina.

Hemólisis: proceso de destrucción de los glóbulos rojos, que conlleva la liberación del contenido intraeritrocitario en el plasma alterando su composición.

Hemoparásitos: son parásitos que están en el torrente sanguíneo y órganos hematopoyéticos.

Hepatomegalia: aumento del tamaño del hígado.

Hiperestesia: aumento de la sensibilidad a la estimulación, principalmente de los receptores del dolor y del tacto.

Huésped: organismo (animal o vegetal) en donde se alberga y nutre otro organismo.

Ictericia: es la coloración amarillenta de la piel y las mucosas debido al aumento de la concentración de la bilirrubina en sangre.

Labilidad emocional: estado psicológico caracterizado por cambios frecuentes de humor, reacciones emocionales excesivas y variaciones contrapuestas en el estado de ánimo

Merogonia: proceso de división múltiple en el que el estadio inicial es un trofozoito la merogonia da lugar a una forma de nominada esquizonte.

Mialgia: dolor y sensibilidad dolorosa al tacto en un musculo que suele darse después de un ejercicio agotador.

Postración: abatimiento, agotamiento e incapacidad extrema para realizar las actividades cotidianas.

Somnolencia diurna: incapacidad de permanecer despierto y alerta durante el período del día, con episodios no intencionados de somnolencia y/o sueño.

Trofozoíto: cualquier etapa en el ciclo vital de un protozooario que puede ingerir alimento. En la práctica se refiere a la forma móvil, que en algunos casos es capaz de invadir a los tejidos.

Vector: se refiere al organismo, generalmente animal, que transfiere un agente infeccioso de un huésped a otro.

Inserto para la detección de anticuerpos IgG contra *Babesia microti*

INSTRUCTIONS FOR USE

***Babesia microti* IFA IgG Antibody Kit**

Catalog Number: BMG-120
Size: 120 test
Storage: 2-8°C

An indirect fluorescence immunoassay for the detection of IgG class antibody against *Babesia microti* in human serum or plasma

For in-vitro diagnostic use only



1135 E. Truslow Ave. Fullerton, California 92831 USA
Phone: +1-714-525-7660 Fax: +1-714-525-7614
Email: info@fullertabs.com
URL: www.fullertabs.com



MediMark Europe Sarl
11, rue Émile Zola - BP 2332
F-38033 Grenoble Cedex 2 - France

INTENDED USE

The *Babesia microti* IgG Antibody kit is intended for the detection and semi-quantitation of IgG class human antibody to *Babesia microti*.

SUMMARY AND EXPLANATION OF TEST

Babesiosis in North America is caused by the protozoan *Babesia microti*. It is transmitted by the bite of infected ticks and it is recognized that babesiosis can be co-transmitted with *Anaplasma phagocytophila* (HGE) and/or *Borrelia burgdorferi*. Historically, diagnosis is made by the demonstration of characteristic intra-erythrocytic inclusions in thin-smear preparations of peripheral blood. The IFA test utilizes *Babesia microti*-infected hamster or mouse erythrocytes as a source of characteristic inclusions for specific antibody detection.

Patient sera are diluted in buffered saline and incubated in the individual slide wells to allow reaction of patient antibody with the *Babesia microti* antigens. Slides are then washed to remove unreacted serum proteins, and fluorescence-labeled anti-human IgG (Conjugate) is added. This conjugate is allowed time to react with antigen-antibody complexes. The slides are washed again to remove unreacted Conjugate. The resulting reactions can be visualized using standard fluorescence microscopy, where a positive reaction is seen as sharply defined apple-green fluorescent inclusions within the infected erythrocytes. A negative reaction is seen as either no fluorescence or fluorescence unlike that seen in the Positive Control wells. Positive reactions may then be retested at higher dilutions to determine the highest reactive or endpoint dilution.

REAGENTS

FA Ag x12

Substrate Slides (10)
10x12-well masked slides containing fixed *Babesia microti*-infected hamster or mouse erythrocytes, packaged under vacuum.

CONJ FITC

IgG Conjugate, 2.5 mL
Dropper bottle with a yellow cap contains affinity-purified DyLight-488-labeled goat anti-human IgM (heavy chain) with bovine serum albumin and Evans' blue counterstain.

CONT +

Positive Control, 0.5 mL
Dropper bottle with a blue cap contains reactive human serum, provided at a 1:64 screening dilution. Endpoint titer is 1:512.

CONT -

Negative Control, 0.5 mL
Dropper bottle with a red cap contains non-reactive human serum at a 1:50 dilution.

MM

Mounting Medium, 1 mL
Dropper bottle with white cap contains 50% glycerol in PBS.

BUF WASH PBS

PBS, 1 liter
Add supplied powder to 1 liter purified water to produce phosphate-buffered saline at pH 7.2.

Warnings

1. The control sera have been screened for infectious agents by FDA required testing. Since no testing can assure the absence of infectious agents, however, these reagents, as well as all serum specimens and equipment coming in contact with these specimens, should be handled with good laboratory practices to avoid skin contact and ingestion.
2. The substrate slides are prepared with chemically inactivated antigens. However, the slides should be considered potentially infectious and handled accordingly.

Storage and Handling

Kit components should be stored at 2-8°C. Bring to room temperature (20°-25°C) before opening bottles or slide envelopes.

SPECIMEN COLLECTION

Allow blood samples to clot and separate sera by centrifugation. Transfer sera aseptically to tightly closing sterile containers. Store at 2-8°C. If testing is to be delayed longer than 5 days, freeze samples at or below -20°C. Acute specimens should be drawn at the onset of illness; convalescent specimens should be obtained at intervals to check for titer changes.

PROCEDURE

The kit supplies sufficient materials for 120 determinations.

Materials Required But Not Supplied

- Distilled or deionized water
- Clean 250 or 500 mL wash bottle for PBS
- Test tubes or microtiter plate for serum dilutions
- Precision pipette(s)
- 24 x 50 mm glass coverslips
- Fluorescence microscope with filter system for FITC (maximum excitation wavelength 490 nm, mean emission wavelength 530 nm) and 400X magnification.
- 37° water bath or incubator
- Humid chamber for slide incubation steps.

Precautions

- Do not use components past expiration date.
- Conjugate is photosensitive and is packaged in opaque plastic for protection. Store in the dark and return to storage after use.
- Conjugate contains Evans blue dye, which may be carcinogenic. Avoid contact with skin.
- Liquid reagents contain thimerosal at 0.001%, which may be toxic if ingested.

Preparation of Reagents

PBS: Add contents of packet to 1 liter purified water. Mix until all salt crystals are dissolved.

ASSAY PROCEDURE

Allow all reagents and sera to reach ambient temperature before starting timed assay procedure.

1. Prepare 1:64 screening dilutions in PBS for all untested patient sera. For sera found positive on a previous assay run, prepare serial dilutions in PBS, starting with 1:64.
2. Prepare dilutions of the Positive Control to include 1 dilution above the stated endpoint and one dilution below (i.e. 1:256-1:1024). Note that this Control is bottled at a dilution of 1:64.

3. For each serum dilution, add 10 µL to one slide well and record the location for later reference. For each assay run include the Negative Control and dilutions of the Positive Control prepared above.

4. Place slides in a humid chamber and incubate for 30 minutes at 37±0.5°C.

5. Remove humid chamber from incubator. Also remove conjugate from storage. Rinse slide wells with gentle stream of PBS from wash bottle. Shake or tap beaded PBS from slides into a sink, then repeat this wash step 3X without allowing the wells to dry.

6. To each slide well add 1 drop (10 µL) Conjugate, then return slides to the humid chamber for another 30 minutes incubation at 37±0.5°C. Incubation should be in the dark to protect the photosensitive conjugate.

7. Wash slides as in step 5, above.

8. Add 2-3 drops of Mounting Medium to each slide and apply coverglass.

9. Read the stained substrate slides at 400X magnification, comparing each well to the visual intensity and appearance of Positive and Negative Control wells. Slides may be stored at 2-8°C in the dark for up to 24 hours.

QUALITY CONTROL

The Negative Control serum and dilutions of the Positive Control serum should be assayed with each daily run. The Negative Control well is an example of a non-reactive serum, with either uniform red counterstain or slight, but uniform greenish staining. The Positive Control wells should give an endpoint titer from 1:256 to 1:1024. The fluorescence intensity at 1:512 may be used as the cut-off level required for a patient reaction to be called positive. If either of the Controls does not react as specified, the assay run should be considered void, reagent components and procedural steps should be rechecked, and the assay repeated from step #1.

The Negative Control well is an example of fluorescence patterns that are to be considered negative. If characteristic inclusions are seen in this well, similar to that seen in the Positive Control wells, there has been a breakdown in technique and the assay must be repeated.

INTERPRETATION OF RESULTS

A positive reaction appears as peripheral clusters of distinct apple-green inclusion bodies within the infected erythrocytes. The size, appearance and density of the reaction must be compared with the Positive and Negative Control reactions.

Patient Specimens

Positive at 1:64 screening dilution: IgG titers of 1:64 and greater are considered to reflect infection at an undetermined time by *Babesia microti*. Sera positive at the 1:64 screening dilution should be rerun to determine their endpoint titer for comparison with earlier or later specimens from the same patient. IgM titers, when present, are also a reliable indicator of recent infection.

Negative at 1:64: Report as negative for *Babesia* antibody. Further serum specimens should be drawn if the original was taken soon after onset and this etiology is still suspected.

Paired Sera: A four-fold increase in titer between acute and convalescent serum specimens supports the diagnosis of recent infection.

Inserto para la detección de anticuerpos IgM contra *Babesia microti*

INSTRUCTIONS FOR USE

***Babesia microti* IFA IgM Antibody Kit**

Catalog Number: BMM-120
Size: 120 test
Storage: 2-8°C

An indirect fluorescence immunoassay for the detection of IgM class antibody against *Babesia microti* in human serum or plasma

For in-vitro diagnostic use only



1135 E. Truslow Avenue
Fullerton, California 92831 USA
Phone: +1-714-525-7660
Fax: +1-714-525-7614
Email: info@fullerlabs.com
URL: www.fullerlabs.com



MediMark Europe Sari
11, rue Émile Zola - BP 2332
F-38033 Grenoble Cedex 2 - France

INTENDED USE

The *Babesia microti* IgM Antibody kit is intended for the detection and semi-quantitation of IgM class human antibody to *Babesia microti*.

SUMMARY AND EXPLANATION OF TEST

One of the known causes of human babesiosis is the protozoan *Babesia microti*. It is transmitted by the bite of infected ticks and it is recognized that babesiosis can be co-transmitted with *Anaplasma phagocytophila* (HGE) and/or *Borrelia burgdorferi*. Historically diagnosis is made by the demonstration of characteristic intra-erythrocytic inclusions in thin-smear preparations of peripheral blood. The serologic response of these patients is specific for *Babesia microti*. The IFA assay utilizes infected mouse erythrocytes as a source of characteristic inclusions.

Patient sera are diluted in an IgM Sample Diluent containing antiserum to human IgG-class antibody. This reaction (precipitin) removes competing IgG-class antibody and the source of rheumatoid factor interference. Treated sera are incubated in the individual slide wells to allow reaction of patient IgM class antibody with the *Babesia microti* antigens. Slides are then washed to remove unreacted serum proteins, and DyLight 488-labeled anti-human IgM (Conjugate) is added. This conjugate is allowed time to react with antigen-antibody complexes, then washed off. The resulting reactions can be visualized using standard fluorescence microscopy, where a positive reaction is seen as sharply defined apple-green fluorescent inclusions within the infected erythrocytes. Positive reactions may then be retested at higher dilutions to determine the highest reactive or endpoint dilution.

REAGENTS

IFA Ag x 12

Substrate Slides (10)

10 x 12-well masked slides containing fixed *Babesia microti*-infected mouse erythrocytes, packaged under vacuum.

CONJ FITC

IgM Conjugate, 2.5 mL

Dropper bottle with a yellow cap contains affinity-purified DyLight 488-labeled donkey anti-human IgM (heavy chain) with bovine serum albumin and Evans' blue counterstain.

CONT +

Positive Control, 0.5 mL

Dropper bottle with a blue cap contains reactive human serum, pre-treated at a 1:16 screening dilution. Endpoint titer is 1:128.

CONT -

Negative Control, 0.5 mL

Dropper bottle with a red cap contains non-reactive human serum, pre-treated at a 1:16 dilution.

IgM DIL

IgM Sample Diluent, 15 mL

Buffer contains goat anti-human IgG antibody in PBS.

MM

Mounting Medium, 1 mL

Dropper bottle with white cap contains 50% glycerol in PBS.

BUF WASH PBS

PBS, 1 liter

Add supplied powder to 1 liter purified water to produce phosphate-buffered saline at pH 7.2.

Warnings

1. The control sera have been screened for infectious agents by FDA required testing. Since no testing can assure the absence of infectious agents, however, these reagents, as well as all serum specimens and equipment coming in contact with these specimens, should be handled with good laboratory practices to avoid skin contact and ingestion.
2. The substrate slides are prepared with chemically inactivated antigens. However, the slides should be considered potentially infectious and handled accordingly.

Storage and Handling

Kit components should be stored at 2-8°C. Bring them to room temperature (20°-25°C) before opening bottles or slide envelopes.

SPECIMEN COLLECTION

Allow blood samples to clot and separate sera by centrifugation. Transfer sera aseptically to tightly closing sterile containers. Store at 2-8°C. If testing is to be delayed longer than 5 days, freeze samples at or below -20°C. Acute specimens should be drawn at the onset of illness; convalescent specimens should be obtained at intervals to check for titer changes.

PROCEDURE

The kit supplies sufficient materials for 120 determinations.

Materials Required But Not Supplied

- Distilled or deionized water
- Clean 250 or 500 mL wash bottle for PBS
- Test tubes or microtiter plate for serum dilutions
- Precision pipette(s)
- 24 x 50 mm glass coverslips
- Fluorescence microscope with filter system for FITC (maximum excitation wavelength 490 nm, mean emission wavelength 530 nm) and 400X magnification.
- 37° water bath or incubator
- Humid chamber for slide incubation steps.

Precautions

- Do not use components past expiration date.
- Conjugate is photosensitive.
- Conjugate contains Evans' blue dye, which may be carcinogenic. Avoid contact with skin.
- Liquid reagents contain thimerosal at 0.001%, which may be toxic if ingested.

ASSAY PROCEDURE

1. Prepare 1:16 screening dilutions (1 part patient serum with 15 parts IgM Sample Diluent) for all untested patient sera. For sera found positive on a previous assay run, prepare serial two-fold dilutions in PBS, starting with 1:16.
2. Prepare dilutions of the Positive Control in PBS to include 1 dilution above the stated endpoint and one dilution below (i.e. Dilute bottled serum 1:4 - 1:16).
3. For each serum dilution apply 10 µL to one slide well. For each assay include the Negative Control, Positive Control and dilutions of the Positive Control prepared above.
4. Place slides in a humid chamber and incubate for 90 minutes at 37±0.5°C.

5. Rinse slide wells with gentle stream of PBS from wash bottle. Shake or tap beaded PBS from slides into a sink, then repeat this wash step 3X without allowing the wells to dry.

6. To each slide well add 1 drop (10 µL) Conjugate, then return slides to the humid chamber for 30 minutes incubation at 37±0.5°C. Incubation should be in the dark to protect the photosensitive conjugate.

7. Wash slides as in step 5, above.

8. Add 2-3 drops of Mounting Medium to each slide and apply cover glass.

9. Read the stained substrate slides at 400X magnification, comparing each well to the visual intensity and appearance of Positive and Negative Control wells. Slides may be stored at 2-8°C in the dark for up to 24 hours.

QUALITY CONTROL

The Negative Control serum and dilutions of the Positive Control serum should be assayed with each daily run. The Negative Control well is an example of a non-reactive serum, with either uniform red counterstain or slight, but uniform greenish staining. The Positive Control wells should give an endpoint titer from 1:64 to 1:256. The fluorescence intensity at 1:128 may be used as the cut-off level required for a patient reaction to be called positive. If either of the Controls does not react as specified, the assay run should be considered void, reagent components and procedural steps should be rechecked, and the assay repeated from step #1.

The Negative Control well is an example of fluorescence patterns that are to be considered negative. If characteristic inclusions are seen in this well, similar to that seen in the Positive Control wells, there has been a breakdown in technique and the assay must be repeated.

INTERPRETATION OF RESULTS

A positive reaction appears as peripheral clusters of distinct apple-green inclusion bodies within the infected erythrocytes. The size, appearance and density of the reaction must be compared with the Positive and Negative Control reactions.

Patient Specimens

Positive at 1:16 screening dilution: IgM titers of 1:16 and greater are considered to reflect recent or active infection by *Babesia microti*. Sera positive at the 1:16 screening dilution should be rerun to determine their endpoint titer for comparison with earlier or later specimens from the same patient. Elevated IgG titers, when present, are an indicator of infection at an undetermined time.

Negative at 1:16: Report as negative for *Babesia* IgM antibody. Further serum specimens should be drawn if the original was taken soon after onset and this etiology is still suspected.

LIMITATIONS

Crossreaction with *Plasmodium* spp has been documented. Crossreactivity with *Babesia divergens*, which causes a more severe infection in European patients, is currently under investigation.

Revised 8/99

Laboratorio Clínico Sonora LABS

