



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Licenciatura en Microbiología

**Tesis individual**



“Validación de la prueba LAMP para el diagnóstico de *Babesia bovis*”.

Que como parte de los requisitos para obtener el título de Licenciado en Microbiología presenta:

---

Roxanna Marisol Layseca Gress

**Dirigido por:**

---

Dra. Bertha Isabel Carvajal Gámez



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales  
de Información



Validación de la prueba LAMP para el diagnóstico de  
*Babesia bovis*.

**por**

Roxana Marisol Layseca Gress

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons  
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0  
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

**Clave RI:** CNLIN-196579



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Licenciatura en Microbiología

**NOMBRE DEL TRABAJO:**

“Validación de la prueba LAMP para el diagnóstico de *Babesia bovis*”

**Tesis Individual.**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Licenciado en Microbiología

**Presenta:**

Roxanna Marisol Layseca Gress

**Dirigido por:**

Dra. Bertha Isabel Carvajal Gamez

**SINODALES**

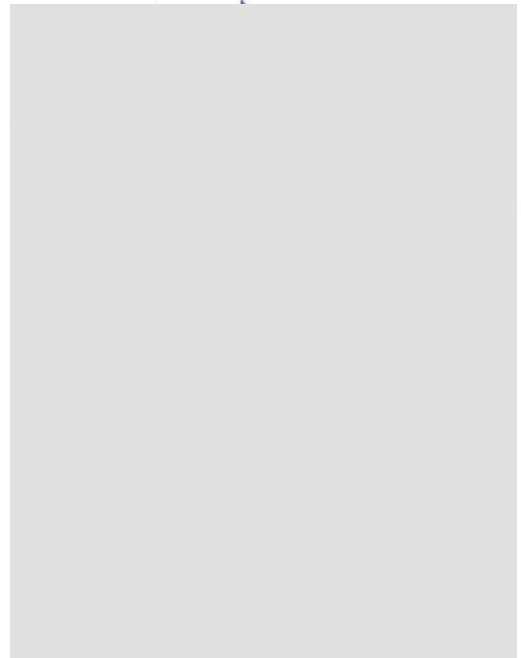
Dra. Bertha Isabel Carvajal Gamez  
Presidente

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito  
Secretario

Dra. Karina Alethya Acevedo Whitehouse  
Vocal

Dra. Juana Elizabeth Elton Puente  
Vocal

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
12 de abril de 2019  
**México**





## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

### Facultad de Ciencias Naturales

#### RESUMEN

La babesiosis bovina es una enfermedad parasitaria del ganado bovino transmitida por garrapatas y causada por protozoarios del género *Babesia*. Esta enfermedad causa pérdidas económicas significativas al afectar a más del 65% del ganado bovino en México. Actualmente existen diversas técnicas desarrolladas para el diagnóstico de diferentes enfermedades, tanto de importancia médica como veterinaria. Una buena técnica de diagnóstico debe ser altamente específica y sensible para la obtención de resultados lo suficientemente certeros para discernir entre un individuo verdaderamente enfermo y un individuo verdaderamente sano. Muchas de las técnicas de diagnóstico para la babesiosis presentan diferentes desventajas tales como el uso de equipo sofisticado y la necesidad de personal calificado para el empleo de la prueba. Así como también dependen del nivel de parasitemia presentado en el bovino. En los últimos años se han desarrollado técnicas cada vez más eficientes para la detección de agentes infecciosos, tal es el caso de las técnicas de amplificación isotérmicas. Estas pruebas tienen la ventaja de que por su diseño y dinámica pueden realizar una detección del gen blanco en poco tiempo, a temperatura constante y con equipo poco sofisticado. La técnica de LAMP es una prueba isotérmica que depende de un buen análisis bioinformático para el diseño de sus cebadores y así aumentar la especificidad de la reacción y ofrece un diagnóstico sensible. El objetivo del presente trabajo fue el desarrollar y estandarizar la técnica de LAMP para la detección de *Babesia bovis*. La metodología empleada incluyó: 1) el diseño de cebadores; 2) la estandarización de las condiciones de amplificación y, 3) la evaluación de la sensibilidad y especificidad analítica de la prueba. Los resultados mostraron que, a 64°C en una hora, la técnica amplifica ADN de *B. bovis* logrando la obtención de concatámeros característicos de la prueba visualizados en un gel de agarosa. La evaluación de la sensibilidad indicó que se logra amplificar ADN en una dilución de  $1 \times 10^{10}$  y se demostró que esta técnica amplifica ADN de *B. bovis* de manera específica. La técnica es una alternativa rápida y económica para el diagnóstico de la enfermedad causada por *B. bovis*.



## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

Facultad de Ciencias Naturales

### **DEDICATORIAS**

Dedico esta tesis a mis padres Liliana Gress y Eduardo Layseca quienes suponen para mí un gran pilar en mi educación. Que me brindaron de todo su apoyo, sustento y trabajo duro, los amo muchísimo.

También dedico esta tesis a mi novio César Ramírez quien me apoyó y alentó aun cuando los días parecían oscuro y sin salida, que me brindo un amor incondicional y siempre creyó en mí.

### **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Universidad Autónoma de Querétaro por proporcionarme las instalaciones a lo largo de la carrera y durante la realización de este trabajo.

A mi directora de tesis la Dra. Bertha Isabel Carvajal Gamez, por haberme aceptado en su grupo de trabajo, por toda su ayuda brindada, y compartirme su conocimiento. También por todo el tiempo y paciencia que me dedico a lo largo de todo este proceso, por haberme guiado e instruido y sobre todo por su comprensión.

A mis sinodales:

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito por haberme aconsejado en las experimentaciones, por brindarme de su experiencia y guiarme en el área de veterinaria.

Dra. Karina Acevedo y Dra. Elizabeth Elton-Puente por asesorarme en éste trabajo y por darle seguimiento a mi actividad académica desde el primer semestre de la carrera.



## ÍNDICE

RESUMEN.....	3
DEDICATORIAS.....	4
AGRADECIMIENTOS.....	4
ÍNDICE .....	5
INDICE DE FIGURAS.....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
ANTECEDENTES.....	9
Babesiosis bovina .....	9
Generalidades del género <i>Babesia</i> .....	10
<i>Babesia bovis</i> .....	13
Transmisión y proceso infectivo .....	18
Signología de la enfermedad.....	20
Protección inmunológica ante la enfermedad.....	22
Hospedero invertebrado.....	27
Epidemiología de la enfermedad.....	31
Diagnóstico del parásito .....	34
Microscopía .....	35
Métodos de diagnóstico inmunológicos .....	37
Métodos moleculares.....	39
Sondas de ADN.....	40
Reacción en cadena de la polimerasa .....	40
PCR en tiempo real (qPCR).....	41
Hibridación de línea reversa (RLB) .....	42
Prueba de amplificación isotérmica mediada por horquillas.....	42



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
Facultad de Ciencias Naturales

JUSTIFICACIÓN.....	45
HIPÓTESIS .....	46
OBJETIVOS .....	46
General. ....	46
Específicos.....	46
METODOLOGÍA.....	46
Diseño de los oligonucleótidos para la detección de <i>B. bovis</i> por el método de LAMP .....	46
Extracción y cuantificación del ADN genómico de <i>B. bovis</i> .....	47
Estandarización de la prueba LAMP .....	47
Prueba de especificidad de los oligonucleótidos para la detección de <i>B. bovis</i> . ....	48
Prueba de sensibilidad de LAMP para la detección de <i>B. bovis</i> . ....	49
Prueba de sensibilidad de la PCR anidado para la detección de <i>B. bovis</i> .....	49
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	49
CONCLUSIÓN.....	57
REFERENCIAS .....	57



## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Filogenia de los piroplasmas.....	12
Figura 2. Morfología de <i>Babesia bovis</i> .....	16
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Babesia</i> spp. ....	18
Figura 4. Modelo de proceso de invasión del parásito en el eritrocito .....	20
Figura 5. Eritrocitos acumulados en la microvasculatura .....	23
Figura 6. Componentes de la respuesta inmune.....	26
Figura 7. Disitribución global del vector.....	29
Figura 8. Garrapatas hembras adultas.....	30
Figura 9. Campaña nacional para el control de la garrapata .....	33
Figura 10. Frotis sanguíneo .....	36
Figura 11. Zonas del ADN blanco y oligonucleótidos utilizados en la técnica de LAMP .....	44
Figura 12. Alineamiento de las secuencias .....	47
Figura 13. Integridad del ADNg.....	50
Figura 14. Estandarización de temperatura para la técnica de LAMP.. ..	52
Figura 15. Especificidad de la técnica LAMP.. ..	53
Figura 16. Sensibilidad de la técnica LAMP.. ..	55



## INTRODUCCIÓN

En las últimas dos décadas se han desarrollado diferentes técnicas de amplificación usando diferentes mecanismos alternativos a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), técnicas que por su alta eficiencia son aplicables al diagnóstico de diferentes enfermedades infecciosas, tanto de importancia médica como veterinaria. La amplificación isotérmica de ácidos nucleicos es un simple proceso en el cual se acumulan secuencias de ácidos nucleicos rápida y eficazmente a una temperatura constante. Éstas mismas técnicas han sido mejoradas para detectar un amplio espectro de blancos moleculares tales como ADN, ARN, proteínas, células, iones y moléculas pequeñas. Muchas de estas técnicas están basadas en la replicación del ADN, tales como la amplificación exponencial por medio del desplazamiento de cadena (SDA por sus siglas en inglés) y la amplificación por medio del círculo rodante hiperramificado (HRCA). La técnica molecular de amplificación isotérmica basada en horquillas (LAMP) fue desarrollada en el año 2009 por Notomi y colaboradores y es una reacción basada en la técnica SDA debido a que emplea la enzima *Bst* polimerasa que realiza esa actividad. Esta prueba presenta una alta especificidad, simplifica el sistema de amplificación, tarda una hora en realizarse, es una reacción de un solo paso, que no requiere de equipos especiales y los resultados pueden ser observados con diferentes técnicas de visualización.

La babesiosis bovina es una enfermedad causada por protozoarios intraeritrocíticos del género *Babesia* y es transmitida por garrapatas *Rhipicephalus* spp. Esta enfermedad puede encontrarse con diversas sinonimias tales como; fiebre de texas, piroplasmosis, aguas rojas, ranilla o tristeza. Se caracteriza por ocasionar alta morbilidad y mortalidad a nivel mundial. La importancia que tiene la babesiosis para la ganadería mexicana radica en que ocasiona pérdidas económicas serias ya que se disminuye la producción de carne y leche, existe pérdida de peso en los animales enfermos y se producen abortos en las hembras gestantes; así como produce una baja económica debido a los gastos invertidos para el uso de los medicamentos utilizados en el tratamiento del animal y la atención médica. De las especies de *Babesia* que afectan a los bovinos, *B. bovis* y *B. bigemina* son las especies con mayor prevalencia en Latinoamérica siendo *Babesia bovis* la especie de *Babesia* más patógena, ocasionando cuadros clínicos severos asociados con signos neurológicos hasta la muerte si no se diagnostica oportunamente. Es por esto que se necesitan de nuevas estrategias de diagnóstico rápidas que brinden una detección temprana y específica del parásito para controlar la enfermedad de la mejor manera. El objetivo de este trabajo fue desarrollar y estandarizar la técnica de LAMP para la detección de *Babesia bovis*. En esta investigación se desarrollaron los

oligonucleótidos especie específicos mediante un análisis bioinformático minucioso, además se realizó la estandarización de las condiciones de amplificación y se evaluó la sensibilidad de la misma comparándola con la técnica de PCR anidado, misma técnica que se usa actualmente en los laboratorios para detectar al parásito en animales infectados.

## ANTECEDENTES

### Babesiosis bovina

La babesiosis bovina es la enfermedad de transmisión por vectores más importante en el ámbito económico de las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Bock y col., 2004). Es caracterizada por infectar los eritrocitos de los animales, provocando diversas patologías y tiene un alto impacto en la industria ganadera ya que se afectan principalmente la producción de carne, leche y piel (Pérez De León y col., 2010).

Se define como una enfermedad transmitida por garrapatas causada por parásitos protozoarios apicomplexos del género *Babesia* (Schnittger y col., 2012). *Babesia* es considerado el segundo patógeno más común que se encuentra en la sangre de los mamíferos después de *Trypanosoma* y se estima que aproximadamente el 80% de los bovinos en el mundo están en potencial riesgo de contraer la enfermedad (Benavides y col., 2007; Ghosh y Bansal, 2007). Los agentes etiológicos de esta enfermedad son *Babesia bovis* y *B. bigemina* y el grado de patogenicidad de la enfermedad depende de la especie y de la cepa infectante (Wagner y col., 2002). La enfermedad clínica causada por *B. bigemina* es caracterizada por fiebre, hemaglobinuria, y anemia aguda. En contraste una infección causada por *B. bovis* es más severa y fatal, ya que además de ocasionar una fiebre alta y hemaglobinuria también se ocasiona signos neurológicos, tales como incoordinación, salivación anormal, bruxismo y letargia (Bock y col., 2004).

Esta enfermedad fue descrita por primera vez en el año de 1888 por Viktor Babes en Rumania. El detectó formas casi redondas dentro de un eritrocito perteneciente a la sangre de un bovino infectado, llamando al patógeno por primera vez como *Hematococeus bovis* (actualmente *Babesia bovis*) (Babes, 1888). Sin embargo, Babes no reportó presencia alguna de garrapatas en el ganado enfermo o algún indicio de su propagación. En 1893, Smith y Kilborne demostraron con su trabajo que las responsables de transmitir la enfermedad eran las garrapatas del género *Rhipicephalus* (antes *Boophilus*) (Smith y col., 1893) y de que esta enfermedad se trataba de una fiebre causada por garrapatas que afectaba al ganado. También descubrieron una nueva especie de *Babesia* que en su tiempo llamaron *Pyrosoma bigeminum* (actualmente conocida como *B. bigemina*) (Mosqueda



y col., 2012; Schnittger y col., 2012). Después de todas estas investigaciones la enfermedad fue descrita en otros países, tal es el caso de la confirmación de la enfermedad en Australia por el Doctor Sidney Hunt. En Argentina en 1903 también se registran casos de dos formas de babesiosis. En esta investigación confirmaron que los patógenos se trataban de *B. bigemina* y *B. argentina* (*B. bovis*) (Angus, 1996). Esta enfermedad es considerada una de las enfermedades más importantes en la industria del ganado a nivel mundial, debido a que causa una significativa tasa de morbilidad y mortalidad en bovinos infectados (Ghosh y Bansal, 2007).

### **Generalidades del género *Babesia***

*Babesia* spp es un hemoprotozoario apicomplejo transmitido por garrapatas que infecta y causa enfermedades en varios hospederos incluyendo ganado, caballos, perros, aves, murciélagos y humanos (Schnittger y col., 2012). El parásito está específicamente adaptado a su vector y es reconocido como el primer agente protozoario transmitido por un vector artrópodo. El género de *Babesia* pertenece al orden *Piroplasmida* dentro del *phylum Apicomplexa*. Éste *phylum* se caracteriza por la presencia de un complejo apical y un citoesqueleto único distinto de otros eucariontes. Desde el descubrimiento del género al final del siglo XIX muchas especies diferentes asociadas con varios animales domésticos y salvajes han sido descritas. Actualmente la clasificación taxonómica de *Babesia* es la siguiente:

**Reino:** *Protista*

**Subreino:** *Protozoa*

**Phylum:** *Apicomplexa*

**Clase:** *Sporozoa*

**Subclase:** *Piroplasmida*

**Familia:** *Babesiidae*

**Género:** *Babesia*

(Levine y col., 1980)

El *phylum Apicomplexa* se denomina de esa manera porque los miembros de éste grupo taxonómico poseen una terminación apical especializada que se requiere para la motilidad entre las células del

huésped (Gubbels y Duraisingh, 2012). Es el único grupo taxonómico que contiene miembros enteramente parásitos y se reconoce que está estrechamente relacionado con los dinoflagelados y ciliados debido a que ambos presentan una membrana interna compleja (IMC) o un sistema de membrana alveolar formando un grupo taxonómico conocido como el Alveolata (Keeling y col., 2005) (Morrison, 2009). Éste *phylum* forma un grupo diverso de protistas unicelulares con una amplia distribución ambiental, dentro de él se encuentran cuatro grupos definidos: coccidios, gregarinos, hemosporideos y piroplasmas. Todos estos son parásitos intracelulares obligados y poseen estados invasivos motiles los cuales están caracterizados por la presencia de un complejo apical único. Actualmente se reconocen a 300 géneros de apicomplexos y al menos 60 familias. Las dos familias más importantes dentro del *phylum* son la *Babesiidae* y la *Theileriidae* las cuales son transmitidas por garrapatas y parasitan mayormente a mamíferos. Los dos géneros *Theileria* y *Babesia* contienen miembros que causan enfermedades severas en animales domésticos (Allsopp y col., 1994).

Se cree que los parásitos apicomplexos evolucionaron de un organismo de vida libre fotosintético a un parásito intracelular obligado ya que muchos de ellos poseen remanentes de un plástido de origen algal, el apicoplasto que heredaron de un ancestro común, el cual se cree que se derivó por un evento secundario endosimbiótico (Fichera y Roos, 1997). Los estudios de Wegener y colaboradores elaborados en el año del 2011 ubican el origen de los apicomplexos alrededor de los 1100 millones de años atrás (Wegener y col., 2011).

En el 2003 Criado-Fornelio y colaboradores dividieron a los piroplasmas en cinco grupos que evolucionaron de un mismo ancestro en común: 1) El primer grupo lleva por nombre *Archaeiropiasmidos* en el cual se incluyen a *B. microti*, *B. rodhaini*, *B. felis*, *B. leo* y *Theileria annae*; 2) El segundo grupo se llama *Prototheileridos* que incluye *Theilerias* del oeste de E.E.U.U; 3) El tercer grupo se conforma por los *Theileridos* y se incluyen las especies de *Theileria* que infectan a los bovinos; 4) El cuarto grupo lleva por nombre *Babesidos* y este se encuentra compuesto de algunas especies de *Babesia* incluidos *B. canis* y *B. gibsoni* junto con *B. divergens* y *B. odocoilei*; 5) El quinto grupo se forma principalmente por especies de *Babesia* que infectan a los ungulados, su nombre taxonómico es *Ungulibabesidos*, dentro de estos se incluyen a *B. caballi*, *B. bigemina*, *B. ovis*, *B. bovis* y *Babesia spp* del ganado. (Figura 1) (Criado-Fornelio y col., 2003).

En el 2001 Penzhorn y colaboradores especularon que el origen de los piroplasmas se remontaba hasta África con la primera aparición de la garrapata en el periodo Mesozoico (Penzhorn y col., 2001).

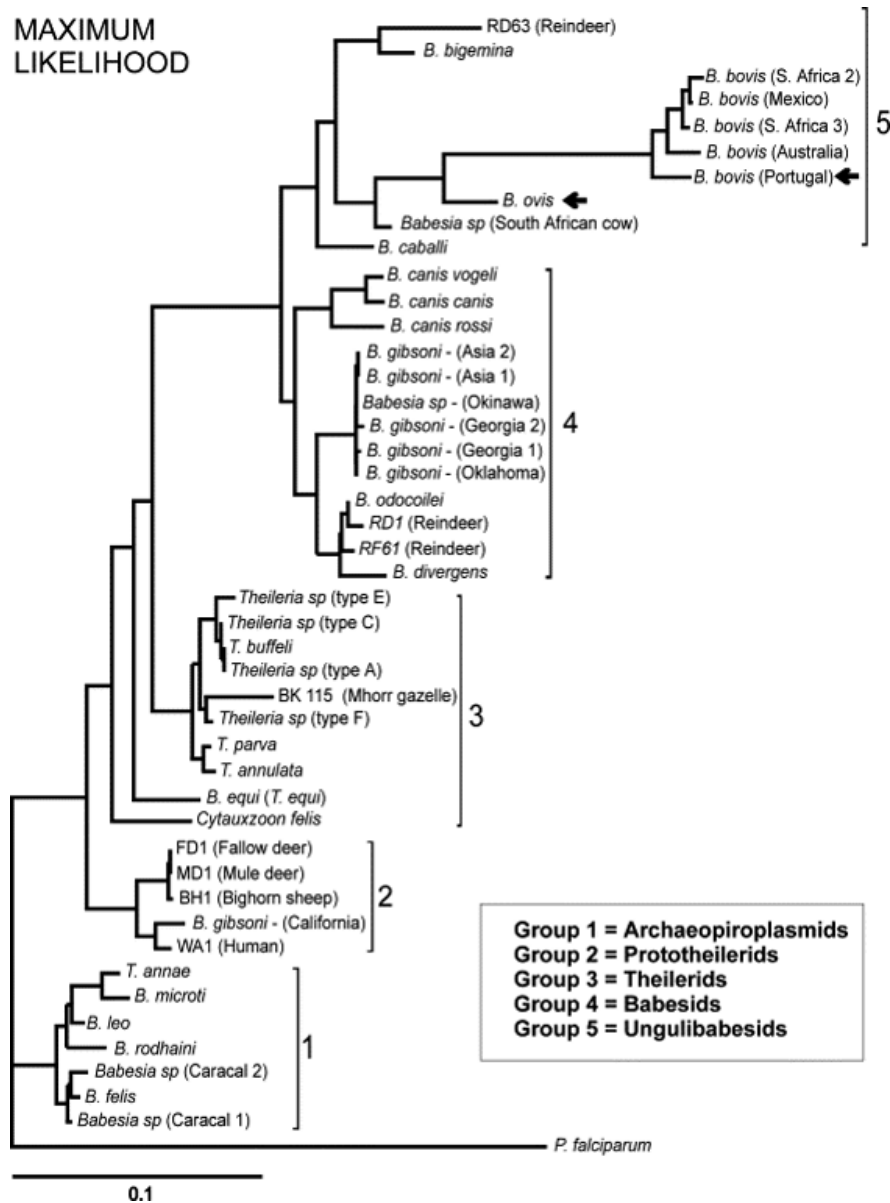


Figura 1. Filogenia de los piroplasmas. Tomada de Criado-Fornelio y col., 2003.

La subclase *piroplasmida* recibió su nombre debido a la forma de pera que se presenta en el estado de multiplicación del parásito una vez dentro de la sangre del huésped vertebrado. El género se definió por medio de los sitios de multiplicación en el huésped vertebrado y la forma de transmisión dentro de la garrapata. Antes de las aplicaciones de las metodologías moleculares no menos de 11 especies válidas de *Babesia* y *Theileria* fueron descritas y hasta ahora la clasificación taxonómica de los piroplasmas han sido basadas casi enteramente en características morfológicas y biológicas. La descripción y la clasificación de *Babesia* spp fueron inicialmente basados en sus características morfológicas, tales como el patrón de ensamblaje del merozoito dentro del eritrocito y su ciclo

biológico. Esto permitió la diferenciación de *Babesia* de otros organismos similares como *Theileria* (Criado- Fornelio y col., 2003; Bock y col., 2004).

Las características fenotípicas que se añaden a la identificación y diferenciación de especies durante inspección microscópica que están mejor validados respecto a taxonomía son el tamaño de los piroplasmas y el número de células hijas que se han formado por la división del merozoito. Una característica fenotípica importante que se ha usado para diferenciar a *Babesia sensu strictu* de *Theileria* ha sido la forma de transmisión y la existencia o ausencia de esquizontes. *Babesia sensu strictu* carece de esquizogonia pero puede transmitirse transovaricamente tal es el caso de *B. bigemina*, *B. bovis* y *B. divergens*. Existe un tercer grupo de *Babesia* al cual se le llama *Babesia sensu lato*, el cual es de origen antiguo y comprende a todos los piroplasmas que no pudieron clasificarse en el grupo de *Babesia s.s* o en grupos de *Theileria*. Este grupo muestra transmisión trans-estadio (Hunfeld y col., 2008 ; Schnittger y col., 2012; Florin-Christensen y col., 2014)

Los piroplasmas pueden clasificarse en dos grupos importantes por medio de su diámetro: *Theileria* y las babesias pequeñas que van de un tamaño de  $< 2.5 - 5 \mu\text{m}$  y las babesias grandes que van de un tamaño de  $> 1 - 2.5 \mu$ . Sin embargo, la identificación de las especies puede verse obstaculizada debido al pleomorfismo presentado. Un pleomorfismo se considera como cambios en el desarrollo de la forma y talla cuando el parásito se encuentra infectando diferentes huéspedes. (Laha y col., 2015; Muraleedharan, 2015).

### ***Babesia bovis***

De los hemoparásitos que infectan animales, *Babesia bovis* resulta el más importante debido a su alta patógenesis en el hospedero ya que describe una alta capacidad de desarrollar con mayor frecuencia un cuadro infeccioso fatal y severo. Esto se ve reflejado en pérdidas económicas importantes en donde se pueden estimar costos globales de aproximadamente de 18.7 billones de dólares al año. Por ejemplo, en México el costo estimado por la infestación del vector (*R. microplus*) es de 573.61 millones de dólares anuales (Rodríguez-Vivas y col., 2017), sin considerar los costos por las enfermedades que transmiten y en donde se ven afectadas las familias más pobres debido a los métodos actuales de control del vector. Finalmente estas pérdidas económicas van en incremento debido a la alta mortalidad del ganado, presencia de abortos, bajas en la producción de leche y en la calidad de la carne, medidas de control y pérdidas en el potencial de producción y restricciones en la exportación de ganado (Schnittger y col., 2012).

### **Biología de *Babesia bovis*.**

La forma que puede llegar a adquirir el parásito es variable según el estadio de desarrollo dentro del eritrocito. Posee una forma típica de corpúsculo único o en pares, con forma ovalada. *Babesia bovis* es considerada una especie de *Babesia* pequeña, con medidas aproximadas de 1.8 x 1.2  $\mu\text{m}$ . Frecuentemente se encuentra en una forma única o de anillo con una vacuola central y el núcleo en uno de los polos. Cuando se encuentran dos parásitos infectando el mismo eritrocito éstos frecuentemente se observan unidos formando un ángulo obtuso. Dentro de los orgánulos que conforman la biología de *Babesia* se encuentran; la vacuola parasitofora, que es una vacuola formada por la invaginación del plasma de la membrana de la célula huésped durante la invasión; los cuerpos esféricos, que liberan proteínas en la célula del huésped, aunque la función de dichas proteínas siguen sin ser claras; y el complejo apical (Gohil y col., 2010). Éste complejo se encuentra conformado por las roptrias, las cuales juegan un papel indispensable en la formación de la vacuola parasitofora por medio de membranas lamelares y tienen un tamaño mayor al de los micronemas con una forma de pera con un final unido al final apical del parásito. Y por último se encuentran los micronemas que son los organanelos secretores más pequeños. (Figura 2) (Blackman y Bannister, 2001)

Todos los orgánulos se encuentran dispuestos en el final anterior del parásito y secretan diferentes proteínas que ayudarán posteriormente a que el parásito se pueda unir al eritrocito (Tomley & Soldati, 2001). Se cree que principalmente las proteínas secretadas por las roptrias y los micronemas juegan un rol central en los eventos de invasión de los eritrocitos y que son únicas los parásitos apicomplexos (Gubbels y Duraisingh, 2012).

Los contenidos de las roptrias se liberan siguiendo la liberación de las proteínas del micronema, siempre acompañadas con la interacción cercana entre el parásito y las membranas de la célula del huésped. Las roptrias se conforman por el cuello y los bulbos, esos son dos compartimentos que salvaguardan diferentes proteínas secretoras, las cuales son liberadas en diferente tiempo. Las proteínas del cuello de las roptrias (RON) que se encuentran en el cuello son de vital importancia para la estrecha unión entre el parásito y la célula del huésped. Las proteínas RON son secretadas antes que las proteínas de los bulbos las cuales modifican la membrana vacuolar y la célula del huésped. Éstas proteínas solo se secretan después de que se liberan las proteínas de los micronemas, aunque aún no se sabe qué vía de señalización o qué desencadenantes son los que dictan este orden (Gohil y col., 2010)

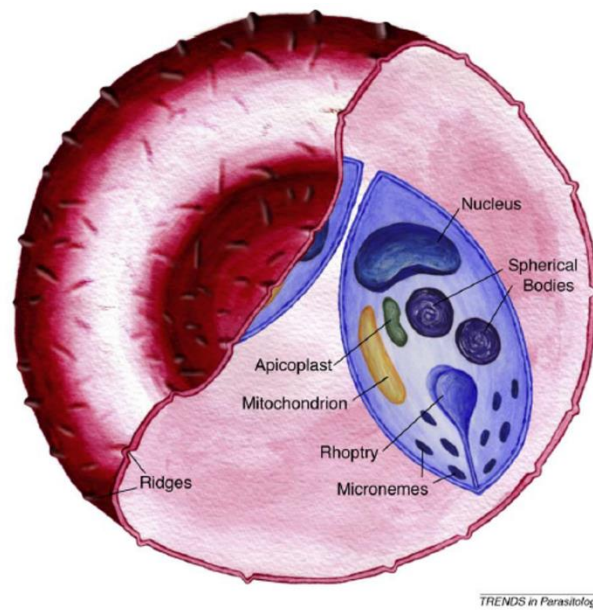
Dentro de las moléculas que secretan los micronemas se identificaron dos. La primera es el homólogo del antígeno 1 de la membrana apical (BbAMA-1) y la segunda es la proteína homóloga anónima relacionada con la trombospondina (BbTRAP). La proteína AMA-1 se secreta desde el micronema hasta la superficie extracelular de los merozoitos y se cree que está involucrada en el acoplamiento e invasión de las eritrocitos del huésped. Mientras que la proteína TRAP está involucrada en el reconocimiento, posible acoplamiento e invasión de los eritrocitos (Gaffar y col., 2004a; Gaffar y col., 2004b).

Los cuerpos esféricos son orgánulos análogos a los gránulos densos de otros parásitos apicomplexos. Se encuentran subyacentes a las roptrias y los micronemas ( Hines y col., 1995; Ruef y col., 2000). Estos resguardan a cuatro proteínas de los cuerpos esféricos (o por sus siglas en inglés SBP) SBP1, SBP2, SBP3 y SBP4. Estas proteínas son desplegadas de estos orgánulos una vez que se produjo la invasión al eritrocito y después estas interactúan en la cara citoplasmática del eritrocito (Dowling y Perryman, 2014).

### **Genoma de *B. bovis***

El genoma de *Babesia bovis* mide 8.2 Mbp y consiste en un genoma nuclear que se conforma de cuatro cromosomas principales, los cuales miden 2.63, 2.59, 1.73 y 1.25 Mbp en tamaño respectivamente (Jones y col., 1997). Cada uno de estos cromosomas contienen regiones ricas en A + T que se localizan el centrómero, ya que se comparó con regiones similares supuestas del centrómero 3 de *Plasmodium falciparum*, el cual mide alrededor de 3 kbp en tamaño (Bowman y col., 1999). Tres de estos cromosomas se consideran acrocéntricos mientras que el cuarto es submetacéntrico. El genoma de *B. bovis* contiene tres unidades de rRNA, dos en el cromosoma 3 y uno en el cromosoma 4, también contiene 44 genes tRNA distribuidos a través de los cuatro cromosomas. Dentro de toda esta información molecular alrededor de 3,671 genes de proteínas nucleares son codificadas. El 61.5% de sus genes posee intrones. Aparte de todo esto el parásito también resguarda dentro de su información dos genomas extracromosomales ricos en A + T, uno contiene el genoma del apicoplasto que es circular y mide 33 kbp, y uno lineal el cual pertenece al genoma mitocondrial del parásito que mide alrededor de 6 kbp. El genoma del apicoplasto de *B. bovis* mide aproximadamente 33 kbp y codifica 32 genes que codifican proteínas putativas, un set completo de genes tRNA y una unidad grande y pequeña del gen rRNA, el cual posee un porcentaje altamente rico en A + T (cerca de un 78.2%) (Brayton y col., 2007).





**Figura 2.** Morfología de *Babesia bovis* dentro de un eritrocito. Tomado de Gohil y col., 2010

*Babesia bovis* también contiene un genoma mitocondrial lineal de 6 kbp, éste codifica tres genes de proteínas putativas incluyendo la subunidad I y III de la citocromo c oxidasa y el citocromo b. Las subunidades III de citocromo b y c están codificadas en la misma cadena, mientras que la subunidad I del citocromo c está codificada en la cadena opuesta. Adicional a estos tres genes el genoma mitocondrial de *B. bovis* incluye al menos cinco secuencias de genes parciales de rRNA que van de los tamaños de 34 a 301 bp. Todas estas cinco secuencias de rRNA son partes homólogas de la subunidad ribosomal larga del rRNA y son codificadas en ambas cadenas del genoma mitocondrial con el rRNA 1 y 5 en la misma cadena y el 2, 3 y 4 en la cadena opuesta (Brayton y col., 2007).

### **Ciclo de vida de *B. bovis***

*Babesia* spp exhibe un ciclo de vida indirecto y para que pueda darse y se transmita entre bovinos siempre debe de presentarse una fase de reproducción y multiplicación en la garrapata. Éste ciclo es típico de los Apicomplexa y es caracterizado por tres etapas principales, las cuales son merogonia, gametogonia y esporogonia (Figura 3). La merogonia se define como la fase de reproducción asexual en donde se desarrolla la fisión binaria dentro de los eritrocitos del hospedero vertebrado. Durante la gametogonia se da la formación y fusión de los gametos masculino y femenino en el intestino de la garrapata y la esporogonia se lleva a cabo en las glándulas salivales del hospedero invertebrado (Hunfeldt y col., 2008; Suarez y Noh, 2011).

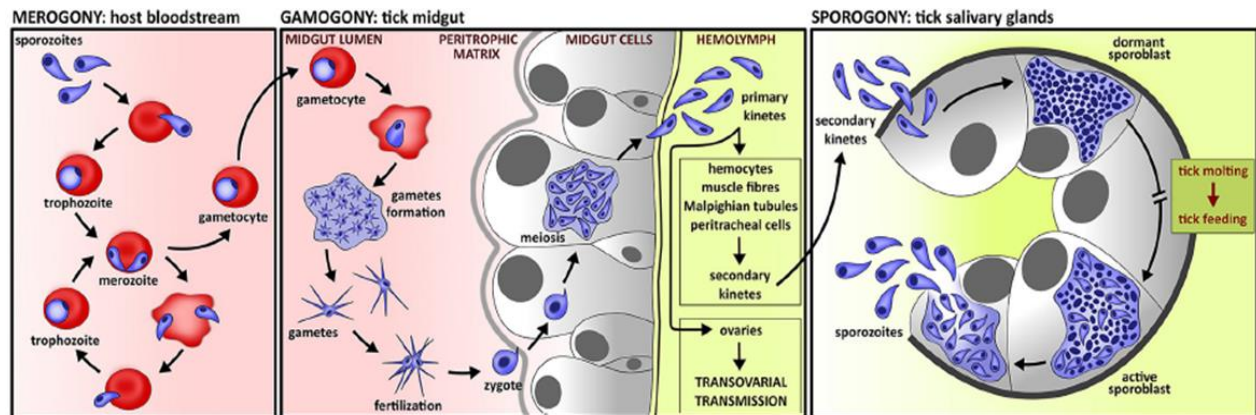


## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

### Facultad de Ciencias Naturales

El ciclo comienza cuando los esporozoitos de *Babesia* (la forma infectiva) entran en el huésped por medio de la saliva de garrapatas infectadas que se alimentan previamente de la sangre del bovino infectado (Yokoyama y col., 2006). Los esporozoitos invaden a los eritrocitos y se transforman en trofozoitos que a su vez adquirirán una forma de anillo. Los trofozoitos se dividirán asexualmente por fisión binaria para generar dos merozoitos los cuales estarán unidos entre sí generando un ángulo obtuso (Mosqueda y col., 2012). Actualmente no se saben los mecanismos específicos por los cuales el esporozoito puede infectar al eritrocito, pero se saben que hay moléculas clave para que esto pueda suceder las cuales son: MSA-1, MSA-2 y RAP-1 las cuales se expresan en la superficie del esporozoito. Una vez que los merozoitos maduran dentro del eritrocito, estos son liberados de la célula y pueden invadir nuevos eritrocitos en donde se transformaran nuevamente en trofozoitos que se dividen por fisión binaria y tiene como objetivo principal la infección de eritrocitos circulantes del torrente sanguíneo de los bovinos susceptibles (Yokoyama y col., 2006; Jalovecka y col., 2018).

Algunos de esos merozoitos generados podrán ser ingeridos por garrapatas no infectadas que se encuentren alimentándose de ese bovino. En el intestino medio de la garrapata se desarrolla la gametogonia, y es donde los gametos sexuales masculino y femenino del protozoario son liberados del eritrocito y se fusionan para formar un cigoto diploide. El cigoto se desarrolla en una fase infectiva que penetrará las células intestinales de la garrapata. Una vez dentro de las células intestinales se genera un cuerpo de fisión que da lugar a quinetos motiles poliploides. Estos destruirán las células intestinales escaparán a la hemolinfa y se distribuirán a los diferentes tipos de células y tejidos incluyendo los ovarios. En los ovarios de las garrapatas las células embrionarias se infectan por los quinetos a lo que se denomina transmisión transovárica. Una vez que la garrapata hembra se termina de alimentar y se encuentra repleta de sangre, ésta se desprende del bovino y una vez en el suelo oviposita a los huevos infectados. Una vez que las larvas eclosionan, se suben al bovino para alimentarse (Howell y col., 2007). Dentro de ellas los quinetos migran a las glándulas salivales donde se forma el esporoblasto, del cual miles de esporozoitos se desarrollarán. Una vez que esta larva de garrapata muerde al bovino esos esporozoitos se liberan con la saliva al sistema circulatorio del animal (Homer y col., 2000; Mosqueda y col., 2012).



**Figura 3.** Ciclo de vida de *Babesia* spp. Se presentan las tres etapas principales del ciclo de vida; merogonia (flujo sanguíneo del huésped), gametogonia (intestino medio de la garrapata) y esporogonia (glándulas salivales de la garrapata). Tomada y modificada de Jalovecka y col., 2018

### Transmisión y proceso infeccioso.

La transmisión de este parásito es un proceso complejo que está formado por tres componentes fundamentales: el protozooario, el vector y el hospedero. Usualmente *B. bovis* se transmite durante el periodo de alimentación de la larva de la garrapata, sin embargo, no persiste en una forma infecciosa más allá del estadio de larva. Las garrapatas se re infectan con *B. bovis* durante el periodo de alimentación de ninfa y adulto ya que se piensa que en estos estadios de desarrollo de la garrapata la infección obtenida por una generación previa de garrapatas se pierde, mientras que las garrapatas que se infectan con *B. bigemina* pueden quedar con la infección remanente por más de una generación de las mismas sin reinfectarse (Wright y Goodger, 1988 ; Bock y col., 2004). Otro ámbito importante respecto a la transmisión de *B. bovis* es que ésta se facilita si se estimulan a las larvas con calor (ya sean 37°C por tres días o a 30°C por 8 días) antes de que las larvas se adhieran al bovino. Ésta característica puede alterar los periodos de pre patencia acortándolos particularmente es el verano (Bock y col., 2004).

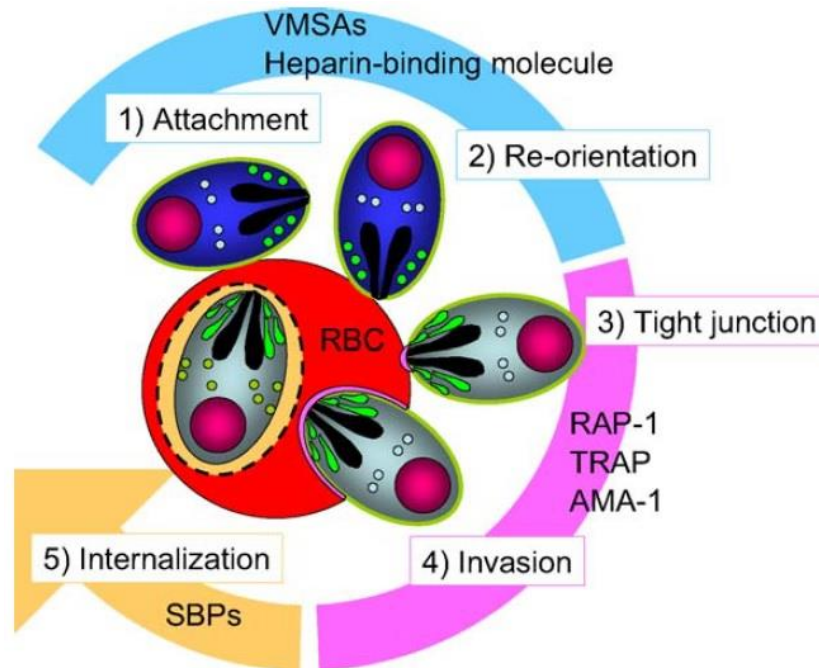
*Babesia. bovis* se transmite entre el ganado por el vector principal que es *R. microplus*, aunque también existe la transmisión del parásito por medio de fomites. La infección inicia por la inoculación del esporozoito del parásito en el flujo sanguíneo del huésped vertebrado. Una vez dentro de su huésped el parásito posee un ciclo de vida relativamente simple. Sin embargo, presenta tres etapas importantes que consisten en: 1) mantener la integridad mecánica del eritrocito del huésped bajo el

## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

## Facultad de Ciencias Naturales

complicado estrés hemodinámico del sistema circulatorio, 2) conseguir nutrientes del ambiente extracelular, 3) evadir el sistema inmune del hospedero así como también escapar de la destrucción en el bazo. Éstas etapas se presentan debido a que el eritrocito es incapaz de sintetizar lípidos y proteínas *de novo* por lo que el protozoo deberá compensar esto usando sus propias herramientas bioquímicas (Allred, 2003; Gohil y col., 2010).

Una vez dentro del flujo sanguíneo, los parásitos invaden directamente las células rojas de la sangre sin la necesidad de pasar primero a través de otros tipos celulares u órganos como en el caso de *Plasmodium* que infecta células hepáticas antes de infectar eritrocitos (Cowman y Crabb., 2006). El primer paso de la invasión es la interacción aparentemente al azar entre el merozoito y la célula hospedera. La unión inicial es de baja afinidad y reversible, seguida de la reorientación en la superficie del eritrocito, trayendo la prominencia apical en la zona de contacto con la célula hospedadora (Rudzinska y col., 1976). La adhesión entre el parásito y la célula es ahora fuerte e irreversible. Los organelos apicales que también se localizaban en la parte anterior final del parásito expulsarán sus contenidos, secretándose también los de los micronemas. Se formará una zona de unión denominada zona de unión móvil, donde la célula se invaginará. Ésta se va a caracterizar por tener una membrana más gruesa de la célula hospedera con una densidad de electrones incrementada. El parásito entra a la célula hospedera jalando la zona de unión móvil conforme va penetrando dentro de la célula, en este proceso el contenido de las roptrías se vaciará. Una vez dentro de la célula, la membrana del eritrocito en donde ocurrió la invaginación se sellará y se formará la vacuola parasitofora y se descargará el contenido de los gránulos densos (Figura 4). El parásito sale de la vacuola parasitofora que se forma por la invaginación de la membrana del mismo durante la invasión y habita en el citoplasma del eritrocito. Los parásitos se dividen por fisión binaria dentro de unas horas una vez que habitan el citoplasma del eritrocito y luego lisan a la célula, liberando dos parásitos a la circulación, los cuales invaden a más eritrocitos del flujo sanguíneo; Bannister y col., 1986; Cowman y col., 2012)



**Figura 4.** Modelo de proceso de invasión del parásito en el eritrocito. 1) Primer contacto o unión inicial; 2) Reorientación apical; 3) En la interacción con el eritrocito ocurre la tensión de membrana; 4) Proceso de invaginación del parásito, los micronemas vacían su contenido, formación de la zona de unión móvil y comienzo de la invaginación de la membrana, vaciamiento del contenido de las roptrias; 5) Sellado de la membrana del eritrocito, formación de la vacuola parasitofora y la descarga de los granulos densos. Tomada de Yokoyama y col., 2006.

### Signología de la enfermedad.

El periodo prepatente de una infección por *Babesia bovis* es generalmente de 6 a 12 días y se alcanzan picos de parasitemias en 3 a 5 días después de iniciada la infección (Bock y col., 2004). Los primeros signos que se presentan después de un periodo de incubación que varía entre los 8 y 14 días dependiendo de la especie del parásito. Durante la infección aguda el huésped puede caer severamente enfermo. Típicamente la enfermedad comienza con altas fiebres, anemias severas, hemoglobinuria causada por hemólisis intravascular, letargia, inapetencia, y en algunas ocasiones se presenta hidrofobia. También pueden ocurrir problemas de coagulación (Wright y Goodger, 1988 a).

Las citosinas y otros agentes activos tienen una función importante en la respuesta inmune contra el parásito. Cuando estas citosinas se sobre expresan, contribuyen al progreso de la enfermedad causando vasodilatación, hipotensión, alta permeabilidad capilar, edemas, colapso vascular, daño



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
Facultad de Ciencias Naturales

endotelial y estasis circulatorio. La estasis presentada es inducida por la agregación de eritrocitos infectados en los capilares de la microcirculación. Debido a esto las lesiones más perjudiciales se presentan en los pulmones y el cerebro (Wright, 1979). Lo que ocasiona que se desarrolle en el bovino el síndrome de dificultad respiratoria y la babesiosis cerebral, los cuales se forman en conjunto con la infiltración de neutrófilos, la permeabilidad vascular y el edema desarrollado (Ahmed, 2002).

En el curso de la infección por *B. bovis* se desarrolla anemia hemolítica, pero en la fase aguda de la enfermedad no es un factor principal, sin embargo contribuye en el proceso de la enfermedad en los casos más prolongados. La fase aguda de la enfermedad se presenta en un curso de 3 a 7 días y la fiebre mayor a 40 °C se exhibe por varios días antes de que otros signos se aparezcan. Seguido a esto se presenta inapetencia, depresión, frecuencia respiratoria elevada, debilidad y el animal se presenta renuente al movimiento. Existe hemoglobinuria y en los casos más prolongados se desarrolla anemia e ictericia. También se presentan signos como pérdida muscular, temblores, postramiento y en casos terminales el animal cae en coma. Cuando la fiebre se presenta en ganado gestante, ésta puede producir abortos y en toros se reduce la fertilidad durando de seis a ocho semanas (Bock y col., 2004).

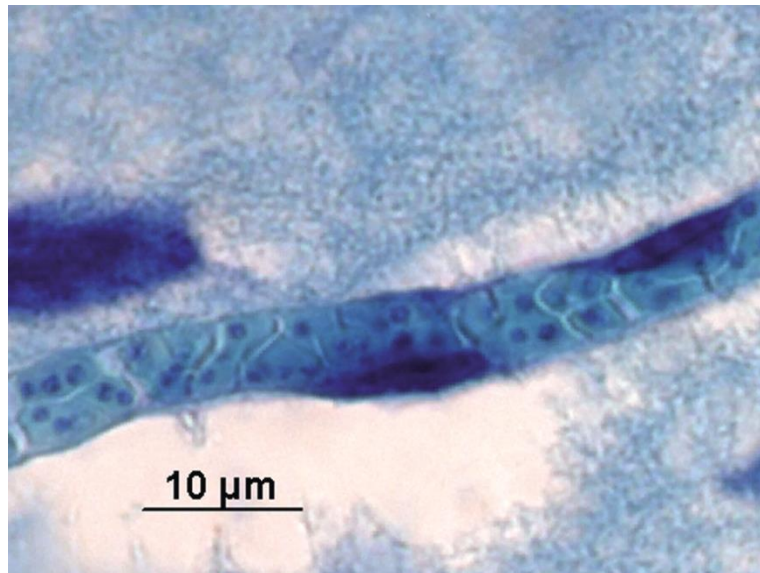
La babesiosis cerebral se manifiesta en diferentes variedades de signos de afectación del sistema nervioso central y una vez que se presentan estos signos neurológicos el resultado es casi siempre fatal. Para que el parásito pueda sobrevivir dentro del eritrocito es de vital importancia que éste modifique las características de adhesión del eritrocito así como también sus características mecánicas en la membrana celular (Gohil y col., 2010) Los eritrocitos tienen la capacidad de constantemente deformarse y reformarse conforme transitan en la circulación sanguínea, esto es gracias a que se componen de una membrana altamente especializada y elástica la cual está compuesta de una red de espectrina y actina (Mohandas y Gallagher, 2018). Se ha observado que los eritrocitos infectados con *B. bovis* son más rígidos que los que no se encuentran infectados, esto reduce la capacidad de deformación del eritrocito al transitar por el sistema circulatorio, la adherencia de los eritrocitos se incrementa, lo que provoca que se empiecen a acumular en los capilares de la microvasculatura del sistema circulatorio llevando a varias patologías importantes en los órganos del bovino. Principalmente existen complicaciones en el cerebro observándose la materia gris en la superficie del cerebro de color rosa (Figura 5). Cuando se empiezan a acumular estos eritrocitos infectados el parásito permanece escondido de la respuesta inmune del bovino. Los eritrocitos

infectados con parásitos maduros son secuestrados en los capilares, es por esto que se reduce la destrucción de los mismos vía el bazo. (Hutchings y col., 2007; Canto y col., 2006; Connor y col., 1999) . Las lesiones en los órganos que se presentan por esta infección son agrandamiento del bazo, el cual también se observa como suave y pulposo, el hígado se presenta hinchado, la vesícula biliar se encuentra distendida con bilis gruesa y con gránulos, los riñones tienen un color oscuro y se encuentran congestionados y existe una anemia generalizada e ictericia (Mahoney, 1969). Otros órganos del bovino pueden presentar congestión o hemorragias petequiales y ocasionalmente puede observarse edema pulmonar. En los casos agudos se puede mostrar hemoglobinuria, pero esto puede no estar presente en casos crónicos y subagudos. En los casos no fatales se pueden llevar varias semanas para recuperar la condición del bovino, sin embargo, la recuperación es completa. Cuando existe una infección subaguda, los signos clínicos son menos pronunciados y a veces difíciles de detectar (Pearson, 1977). El ganado que se infecta antes de tener los nueve meses de edad a menudo desarrollan infecciones subclínicas. Cuando los bovinos se recuperan, estos se vuelven portadores asintomáticos de la enfermedad por años siendo esto dependiente de la raza del bovino (Bock y col., 2004). En el caso de los terneros jóvenes la respuesta febril, la letargia, la linfopenia y la anemia son de corta duración seguida de leucocitosis, regreso a un hematocrito normal y la mejoría de la respuesta febril (Goff y col., 1982).

### **Protección inmunológica ante la enfermedad.**

La respuesta inmune del ganado a la infección con *Babesia* involucra tanto a los mecanismos del sistema inmune innato como adaptativo (Bock y col., 2004). Las patologías asociadas con una infección aguda de *B. bovis* mencionadas anteriormente se cree que derivan de una producción desregulada de citocinas proinflamatorias incluyendo TNF- $\alpha$  (Clark y Jacobsen., 1998). También se ha demostrado que parte de las patologías presentadas por el protozoario se deben a la producción de NO (Gale y col., 1998).

Esencialmente el control de la infección primaria es mediada por varios eventos: 1) la destrucción de los eritrocitos infectados; 2) la activación de macrófagos en el bazo; 3) participación de



**Figura 5.** Eritrocitos acumulados en la microvasculatura en el cerebro de un bovino. Tomada de (Mosqueda y col, 2012).

anticuerpos neutralizantes dirigidos a los merozoitos extracelulares por los antígenos variables de la superficie del eritrocito, también conocidos como VESA (Allred y col., 2000). La eliminación de los eritrocitos infectados con *B. bovis* es llevada a cabo por el bazo. Los macrófagos juegan un papel crucial en remover los eritrocitos infectados de la circulación, y probablemente también son importantes para iniciar respuestas inmunes. Estos macrófagos presentarán directamente el antígeno a las células T cooperadoras (Th) o también podrán facilitar la presentación cruzada con el antígeno adquirido por las células dendríticas de los macrófagos. Estudios han demostrado la importancia del papel que juegan los macrófagos, mostrando que sus productos secretores pueden inhibir el crecimiento de *B. bovis* (Montealegre y col., 1985).

Es en los primeros estados de la infección parasitaria cuando se cree que el sistema inmune se prepara para combatir la infección. Las respuestas inmunes que se montan una vez habiendo una infección por éste parásito son provenientes tanto de factores humorales como celulares. La primera línea de defensa se le atribuye a la inmunidad innata. Se activan los monocitos, macrófagos y neutrófilos que se encuentran circulando en el torrente sanguíneo; estos emplearán agentes antimicrobianos como intermediarios del nitrógeno reactivo (RNI), intermediarios del óxido reactivo (ROI) y fagocitosis para combatir la infección, aunque también liberarán posteriormente citocinas para regular la respuesta inflamatoria. Los macrófagos estimulados por el parásito producirán también IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-12, factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y óxido nítrico (NO) (Shoda et al.,





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
Facultad de Ciencias Naturales

2000). La IL-12 activa a las células natural killer (NK) para que produzcan IFN- $\gamma$ , ayudará a preparar a células Th1 para que produzcan IFN- $\gamma$  sobre la estimulación antigénica y también estimulará la producción de IFN- $\gamma$  por las células Th1 y células T  $\gamma\delta$  (Brown y col., 1991). La molécula TNF- $\alpha$  en conjunto con IFN- $\gamma$  activan la producción de NO en los macrófagos. La IL-18 actúa sinérgicamente con la IL-12 para promover también la producción de IFN- $\gamma$  en respuesta a la infección (Goff y col., 2001).

Las células del sistema innato son las responsables de controlar la tasa de crecimiento del parásito y por lo tanto de la extensión de la parasitemia. Si existe alguna ausencia de macrófagos y de células NK se desarrolla una alta parasitemia en el sistema del bovino en un corto periodo de tiempo (Bock y col., 2004). La inhibición del protozooario se lleva a cabo por la producción de factores solubles como lo son IFN- $\gamma$ , por las células NK, el TNF- $\alpha$ , el óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno por los macrófagos. Sin embargo, aún no se sabe cómo estas moléculas pueden interferir en el desarrollo del parásito una vez dentro del eritrocito. Estudios en modelos murinos han sugerido que IFN- $\gamma$  es la molécula que se encarga de degradar al parásito una vez que este está dentro del eritrocito aunque no se ha probado esta interacción tan directa de la molécula con el parásito (Figura 6) (Aguilar-delfin y col., 2000). Cuando existe una infección primaria con *B. bovis* los monocitos que se encuentran en el torrente sanguíneo exhiben una habilidad fagocítica suprimida mientras que los neutrófilos muestran una habilidad fagocítica incrementada que coincide con un pico de la parasitemia alta (Court y col., 2001).

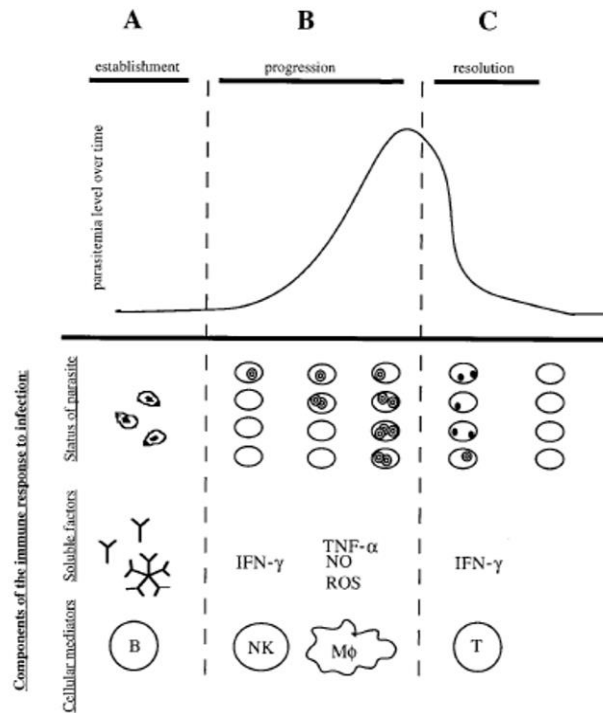
Un aspecto importante de recalcar es que la inmunidad en contra de las infecciones con *Babesia* spp. es influenciada por la especificidad entre el parásito y el animal, factores genéticos, raza, edad, la capacidad de respuesta de los fagocitos y los leucocitos polimorfonucleares, estado nutricional del animal y presencia o ausencia del bazo. Un bovino que se encuentra esplenectomizado desarrolla parasitemias primarias altas (Bock y col., 2004). El ganado maduro es completamente susceptible a la infección con *Babesia bovis* mientras que los terneros jóvenes son mayormente resistentes, mientras que los que tienen entre un año a dos años de edad se encuentran con una susceptibilidad intermedia. Estudios posteriores correlacionan la protección con la inmunidad pasiva debido a los anticuerpos colostrales provenientes de la madre (Trueman, 1978).

También se han observado a terneros jóvenes con inmunidad ante la infección que provienen de madres no inmunes. Se cree que estos bovinos poseen una reacción inmune que involucra diferentes factores tales como la inducción temprana de IL-2 e interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), existiendo



también la expresión de ARN mensajero de la enzima de la óxido nítrico sintasa (iNOS) (Goff y col., 2001). Existe otra explicación para poder entender la inmunidad en los terneros de no más de seis meses de edad, y es que se cree que en que esta resistencia a la infección se ve incrementada debido a que los linfocitos T circulantes en el flujo sanguíneo son en mayoría células T  $\gamma\delta$ . Los ruminantes neonatales se ven sometidos en gran medida a exposición de antígenos externos debido a la serie de actividades que estos realizan a tan corto tiempo después de su nacimiento. Cuando nacen, el suero de la sangre de estos bovinos no contiene anticuerpos protectores, sino que estos se adquieren después por medio del calostro materno y las células T  $\alpha\beta$  se encuentran inmaduras aún, es por esto que se encuentran en gran cantidad las células T  $\gamma\delta$ . Estas células conferirán la inmunidad celular que no se restringe al MHC hasta que las células T  $\alpha\beta$  maduren (Hein y Mackay, 1991). Se cree que las células T  $\gamma\delta$  son la fuente más importante de IFN- $\gamma$  y que poseen tanto características inmunes adaptativas como innatas. En estudios previos han demostrado que este tipo de células pueden reconocer antígenos no peptídicos, patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Se cree también que pueden desarrollar un nivel de memoria y que pueden expresar marcadores de activación y que esto puede promover una rápida inducción de funciones efectoras (Bonneville, Brien, & Born, 2010). Existen reportes de investigaciones en los cuales se sugiere que las células T  $\gamma\delta$  pueden ser preparadas en respuesta a los PAMPs, lo que resulta en una respuesta más robusta a las citosinas y/o a señales antigénicas (Sandbulte y col., 2004). También se cree que poseen papeles como células killer ya que expresan una moléculas como las granulinas y perforinas las cuales no dependen de estimulación con antígenos y es independiente de la expresión de IFN- $\gamma$ , aunque este fenotipo de natural killer presentado llega a desaparecer con el tiempo (Endsley y col., 2004; Alvarez y col, 2009; Graham y col., 2009).

La resolución de la infección aguda por *B. bovis* en animales que nunca han presentado infecciones con el protozooario (considerados inmunológicamente vírgenes o “naïve”) depende de que la respuesta inmune innata sea lo suficientemente fuerte, la cual lleva a la activación de los macrófagos vía IFN- $\gamma$ , lo que resulta en la eliminación del parásito por fagocitosis y la producción de metabolitos tóxicos incluyendo el óxido nítrico (Estes y Brown, 2002). El resultado de una infección aguda con este parásito en un animales susceptibles dependerá enteramente del balance entre las respuestas del huésped al proceso inflamatorio inducido por el parásito (Brown y col., 2006). La recuperación de la infección se correlaciona con la producción temprana de IFN- $\gamma$  e IL-12, seguido por la producción de IgG (Chen y col., 2000).



**Figura 6.** Componentes de la respuesta inmune contra la infección. Tomada de Homer y col., 2000

Existe un fenómeno llamado “inmunidad concomitante”. Éste fenómeno se da una vez que el ganado que sobrevivió a una infección con *B. bovis* (ya fuera naturalmente o por el uso de quimioterapias) permanece infectado, pero se encuentra resistente a una enfermedad clínica. Las respuestas inmunes son diferentes en un bovino que posee una parasitemia controlada y que por lo tanto tiene una infección persistente donde, básicamente se necesita una activación rápida de memoria (Brown y col., 2006). La inmunidad adaptativa es la respuesta inmune que se genera en los casos de animales con inmunidad concomitante y es dependiente de células T cooperadoras (Th) y de anticuerpos. Las células Th realizan un papel doble produciendo citocinas para respaldar la producción de diferentes subclases de anticuerpos de alta afinidad y para promover la activación de los macrófagos y potenciar la producción de anticuerpos por las células B (Bock y col., 2004).

Debido a que *Babesia* solo infecta eritrocitos, la respuesta inmune adaptativa que se presenta por la subsecuente infección es dependiente de la presentación de los antígenos del parásito por las células presentadoras de antígeno, principalmente por los linfocitos T CD4+(Brown, 2001). Los eritrocitos de los bovinos no expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)

por lo que se asume que se requiere del complejo inmune establecido entre el MHC de clase II dependiente de las células T CD4+. Éstas células también forman un papel en la respuesta inmune adaptativa a través de la producción de citocinas tales como IFN- $\gamma$ . Ésta citosina se necesita para la maduración e incrementación de la afinidad de los isotipos de las inmunoglobulinas y la activación de los macrófagos (Igarashi y col., 1999). El IFN- $\gamma$  también tiene diferentes funciones tales como activar a los macrófagos para una óptima actividad y mejorar la producción de anticuerpos IgG2 que al mezclarse con la IgG1 puedan proteger al ganado hasta de cepas homólogas al parásito (Estes y Brown, 2002).

Las inmunoglobulinas G (IgG) y las inmunoglobulinas M (IgM) son las primeras en entrar en acción una vez que se produce la infección en animales inmunizados. Las IgG son las responsables de fijar al complemento y actuar a su vez como opsoninas (Mcguire y col., 1979). Una vez que los esporozoitos del parásito se encuentran libres en el plasma del flujo sanguíneo se inducirá la proliferación de los leucocitos mononucleares y de células T cooperadoras en respuesta a la infección (Brown y Logan, 1992). Estas inmunoglobulinas previenen la infección ya que se unen y neutralizan a los esporozoitos antes que puedan invadir exitosamente al eritrocito. Una nueva etapa se presenta cuando los parásitos establecen la infección intraeritrocítica, y es durante esta progresión de la infección cuando la parasitemia sube y la enfermedad aguda puede llevarse a cabo (Homer y col., 2000).

La inmunidad protectora contra infecciones por *Babesia* spp. requiere también de anticuerpos fijadores de complemento como de anticuerpos opsonizantes tales como las IgG2. Una vez que se produce la infección por el parásito se producen anticuerpos dirigidos contra antígenos del patógeno (Goff y col., 1984). Se cree que estos anticuerpos funcionan como opsoninas para incrementar la actividad fagocítica y son estos mismos anticuerpos los que se piensan que son importantes en una infección secundaria. Se forman complejos de antígenos babesiales, inmunoglobulinas del bovino y el componente 3 de complemento (C3) y se cree que la citotoxicidad mediada por células dependientes de antígeno es el medio por el cual se resuelve la infección por *B. bovis* (Goodger y col., 1981).

#### Hospedero invertebrado.

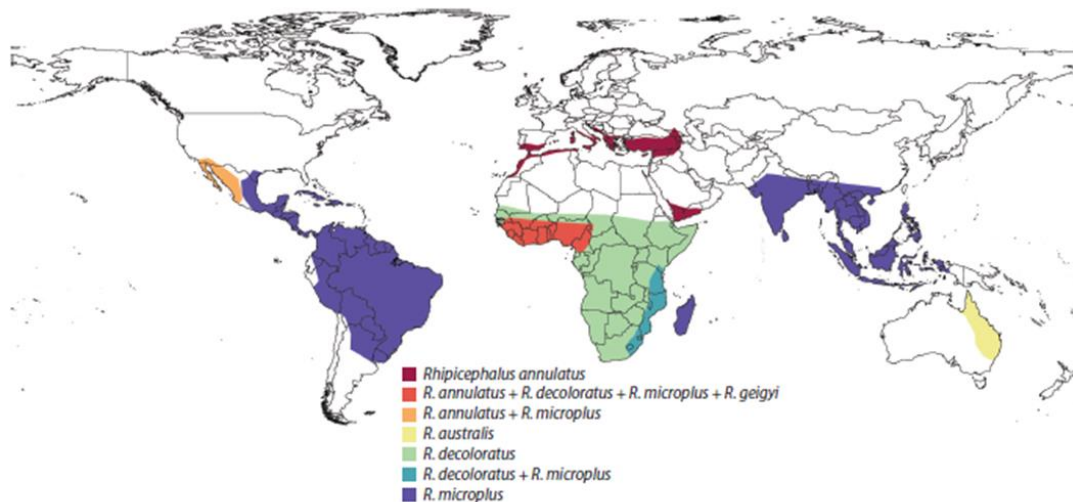
Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos de los vertebrados. Aproximadamente el 10% de las 900 especies hasta ahora conocidas son de alta importancia médica y veterinaria ya que además

de causar daño directo asociado con la alimentación de la sangre y, algunas veces, a través de la excreción de toxinas dentro de su saliva, éstas pueden transmitir innumerables microorganismos tales como; bacterias, virus, protozoarios y helmitos (Jongejan y Uilenberg, 2004). Se cree que su actividad parasítica se documentó alrededor del año 1550 a.C, sin embargo fue la investigación de Smith y Kilborne en el año de 1893 la que proporcionó la clave de la verdadera importancia de las garrapatas como vector de enfermedades (Anderson y Magnarelli, 2008).

Estos ectoparásitos se clasifican en el phylum *Arthropoda*, clase *Arachnida*, subclase *Acari*, orden de los *Parasitiformes* (Oliver, 1989). El suborden *Ixodida* contiene a su vez a cuatro familias importantes de garrapatas; *Argasidae*, *Ixodidae*, *Natalliellidae*, y *Lealaptidae*, pero solo de las dos primeras familias mencionadas existe más información y tienen alto grado de importancia debido a las enfermedades transmitidas por garrapatas (Krantz, 1978). La familia *Ixodidae* se conoce comúnmente como garrapatas duras debido a que presentan una coraza y se considera como la familia de garrapatas dominante ya que contiene más de 650 especies. La familia *Argasidae* se conoce como el grupo de garrapatas blandas ya que carecen de esta coraza y se considera como el grupo más pequeño de las garrapatas ya que contiene aproximadamente 170 especies (Cupp, 1991; Oliver, 1989). Las *Babesias* pueden encontrarse en ciertas especies de garrapatas, de las cuales al menos cuatro géneros de la familia *Ixodidae* son reconocidos como vectores de *Babesia*: *Rhipicephalus*, *Ixodes*, *Haemaphysalis* y *Hyalomma* (Antunes y col., 2017). Sin embargo, solo dos especies del género *Rhipicephalus* se consideran como vectores principales de la babesiosis bovina, y estos son *Rhipicephalus annulatus* y *Rhipicephalus microplus* antes conocidas como *Boophilus* (Bock y col., 2004). Entre los factores que afectan la transmisión de la babesiosis se deben considerar: 1) la edad de la garrapata y 2) las condiciones meteorológicas tales como temperatura y humedad relativa. Una garrapata que es sometida a 14°C y 95% de humedad relativa, han sido capaces de mantener viables a *B. bovis* durante 65 días y las larvas bajo esas condiciones pueden sobrevivir hasta 200 días. También se ha observado que la ovoposición a temperaturas de 30° a 37°C induce el desarrollo de estadios infectivos de *B. bovis* y *B. bigemina* en los huevos de la garrapata *R. microplus* y un nivel óptimo de 80% de humedad relativa es necesario para un eficiente desarrollo (Solorio-Rivera y Rodríguez-Vivas, 1997).

La distribución de estos artrópodos se remonta a áreas tropicales y subárticas pero en las regiones tropicales y subtropicales es donde existe gran diversidad de especies (Anderson & Magnarelli , 2008). Las garrapatas pueden estar presentes en cualquier parte del mundo, sin embargo los

hábitats donde se desarrollan son los que tienen mayor humedad y pastos o malezas altas, ya que pueden utilizarlas para llegar a su huésped y poder iniciar su ciclo de alimentación para después reproducirse. A nivel global las garrapatas que transmiten a *Babesia* spp se encuentran actualmente distribuidas a través de toda América Latina y en países como España, Turquía, Alemania, Polonia, República Checa, Rumania y Australia (Figura 7) (de la Fuente y col., 2017; Gray y Zintl, 2018). La especie más importante de garrapata que transmite la babesiosis bovina es *Rhipicephalus microplus*, la cual se cree que se originó en el sureste de Asia. Ésta especie se ha dispersado a los trópicos incluyendo a Australia, al este y sur de África, a América central y del sur. Por otra parte *R. annulatus* (que también es un importante vector de la enfermedad) está presente en las regiones mediterráneas, aunque también está presente en el sur de Rusia y en el Medio Oriente; esta especie también ha extendido su distribución al oeste de África y a Sudán central y del sur. *R. annulatus* fue introducido a México junto con *R. microplus*, las cuales se dispersaron después al sur de los Estados Unidos de América (Jongejan y Ullenberg, 2004).



**Figura 7.** Distribución global del vector de la babesiosis bovina. Tomada de Gray y col., 2018

*Rhipicephalus* e *Ixodes* pertenecen a la familia de las garrapatas duras (*Ixodidae*). Estas presentan en su ciclo de vida cuatro estados: huevos, larvas, ninfas y adultos. En contraste con la familia de las garrapatas blandas, la familia de las *Ixodidae* presenta solo un estadio de ninfa. Requieren de muchos días de alimentación para desarrollarse en cada estadio y considerarse repletas de sangre, así como también de una cantidad de alimento más grande que los individuos que pertenecen a la familia *Argasidae*. Las garrapatas hembras se alimentan una sola vez, producen hasta cinco mil huevos y mueren (Figura 8) (Oliver, 1989).

La mayoría de estas garrapatas requieren de hasta tres hospederos diferentes durante su ciclo de vida, sin embargo no todas requieren de tantos hospederos. Las larvas y las ninfas usualmente se alimentan una sola vez y mudan. Las que son de un solo hospedero mudan dos veces en el mismo animal, de larva a ninfa y de ninfa a adulto. Las que son de dos hospederos mudan una vez en el hospedero, de larva a ninfa; la ninfa repleta se suelta del hospedero (cae) muda fuera de él y la garrapata, una vez siendo adulta, tiene que buscar un segundo hospedero al cual parasitar para alimentarse (éste segundo hospedero puede no ser de la misma especie que el primero). En cambio las garrapatas que son de tres hospederos no mudan en el animal; las larvas repletas se caen del animal y mudan a ninfa, ésta tendrá que buscar un segundo hospedero animal del cual se repletará de sangre y se caerá de nuevo para mudar a adulto. La garrapata en estadio adulto tendrá que buscar a un tercer hospedero para seguir alimentándose. Las garrapatas adulto se aparean en el hospedero, las garrapatas femeninas se alimentan hasta estar repletas, se caen del hospedero y ovipositan una enorme cantidad de huevos para luego morir, mientras que los machos pueden quedarse en el hospedero hasta varios meses. Los conjuntos de huevos son diferentes en cantidad respecto a si los pone una garrapata de un hospedero a si los pone una garrapata de tres. Usualmente los huevos de una garrapata de un solo hospedero son menos (Figura 8) (Jongejan y Ullenberg, 2004).

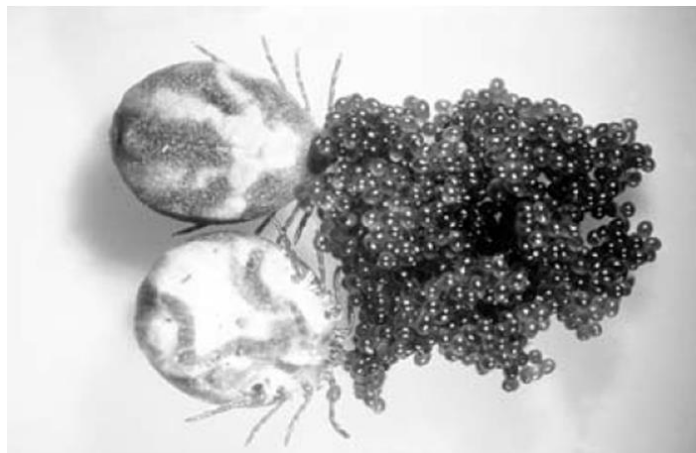


Figura 8. Garrapatas hembras adultas *Rhipicephalus microplus* ovipositando. Tomado de Bock y col., (2004).

Las garrapatas que transmiten la babesiosis bovina son de un solo hospedero y en tres semanas completan su ciclo de vida; desde larvas no alimentadas hasta garrapatas hembras repletas. Éste tipo de invertebrado posee partes de la boca más cortas y el daño que ocasiona en las pieles del ganado es considerable, perdiéndose la calidad del cuero que se pueda producir del bovino (Cupp 1991; Anderson y Magnarelli, 2008).

A pesar de ser clasificadas como de un solo hospedero, la garrapata *R. microplus*, en particular los machos, pueden transferirse entre el ganado que se encuentra en corta proximidad, lo que conlleva a acortar los periodos prepatentes de la enfermedad. Para *B. bigemina* los periodos de prepatencia cambian de seis a doce días, cuando usualmente es de 12 a 18 días después de que la garrapata se fije en el bovino. Ya que *Babesia bovis* no persiste en una forma infectiva en garrapatas más allá del estadio de larva, el periodo de prepatencia generalmente es de 6 a 12 días, donde se alcanzan picos de parasitemias de tres a cinco días después (Bock y col., 2004).

### **Epidemiología de la enfermedad.**

Al tratarse de una enfermedad transmitida por vectores, la epidemiología de la misma está determinada por la presencia del vector. Las zonas que mayor se encuentran en riesgo son las zonas tropicales y subtropicales del mundo ya que son las zonas con las condiciones favorables para que el vector pueda desarrollar su ciclo de vida. (Figura 7). Las especies tanto de *B. bigemina* y *B. bovis* se distribuyen entre los paralelos 40 Norte y 32 Sur abarcando África, Asia, Australia, Centro y sur de América y algunas partes del sur de Europa (Bock y col., 2004).

A nivel mundial existe una prevalencia de un 50 hasta un 90% de la enfermedad y se estima que alrededor 2 mil millones de bovinos en el mundo están expuestos a la babesiosis (Bock y col., 2004; Schnittger y col., 2012). En México, el 70% de la población ganadera se encuentra expuesta a infectarse con alguno de los agentes etiológicos causantes de la enfermedad (Solorio-Rivera y Rodríguez- Vivas, 1997). Actualmente el servicio nacional de sanidad, inocuidad y calidad agroalimentaria (SENASICA) reportó la situación de control del vector en el país, donde se considera solo al 3.44% del territorio nacional mexicano como zona de erradicación del vector. Los estados tales como Baja California Norte, Baja California Sur, Sonora, Chihuahua, Aguascalientes, y Tlaxcala se consideran como zonas libres del ectoparásito, lo que comprende el 30.60% del territorio nacional. El resto del país comparte regiones en proceso de control y zonas libres naturales (zonas en las que no se poseen las condiciones ambientales para el establecimiento de la garrapata)



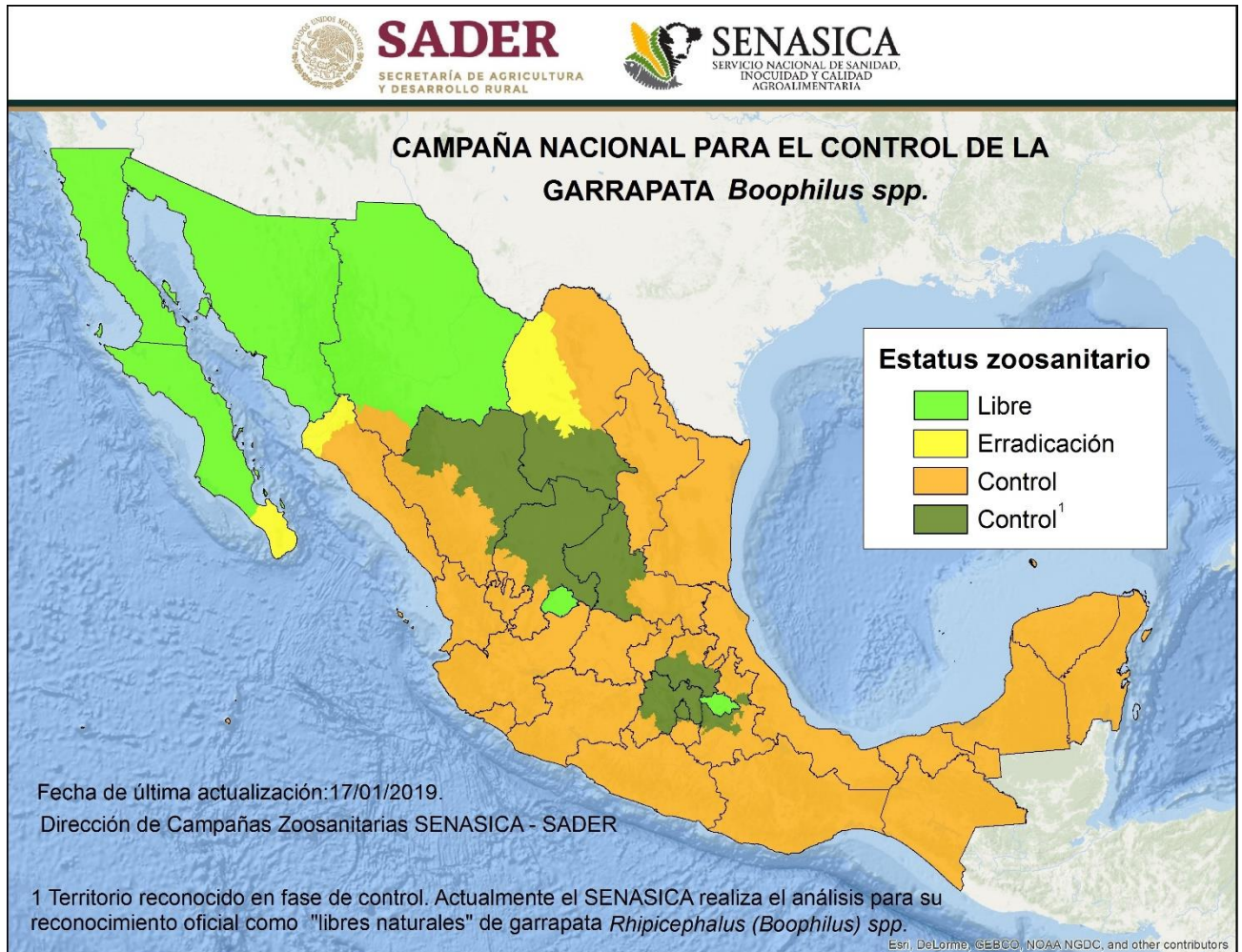


## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

### Facultad de Ciencias Naturales

tales como partes del estado de Durango, Coahuila, Zacatecas, Toluca y Puebla, abarcando un 65.96% del territorio nacional (Figura 9).

Al hablar de la epidemiología de la babesiosis se tiene que detallar el concepto de estabilidad enzootica. Éste concepto es definido como el estado en donde la relación entre el huésped, agente, vector y el ambiente es tal que la enfermedad clínica ocurre raramente o no ocurre. Actualmente esta concepto se describe como la situación epidemiológica de una población en la cual la presentación clínica de la enfermedad es escasa, a pesar de la alta velocidad de transmisión de la infección (Perry, 1996). Hablando puntualmente de la babesiosis, la estabilidad enzootica es muy difícil de predecir y ocurre cuando el número de garrapatas es alto y los bovinos son expuestos a la infección durante los primeros 9 meses de vida en donde los terneros adquieren la resistencia por medio del calostro materno el cual provee de protección hasta dos meses aproximadamente. Este suceso ocasiona que los animales sean resistentes a desarrollar una enfermedad clínica al generar inmunidad (Bock y col., 2004). Ésta dinámica puede desestabilizarse cuando el ambiente no favorece la infestación continua con un número suficiente de garrapatas necesarias para mantener el estado inmunitario en el hato lo que puede suceder por diversas vías : 1) por el uso de acaricidas; 2) cuando los animales inmunológicamente resistentes son reemplazados por animales adultos que no han tenido contacto previo con el parásito; 3) introducción a zonas endémicas de animales con genotipos susceptibles; 4) cuando los animales resistentes se someten a condiciones altas de estrés (Jonsson y col., 2008; Benavides y col., 2016)



**Figura 9.** Campaña nacional para el control de la garrapata *Rhipicephalus* spp. Identificación de los estados respecto al nivel de control de la garrapata. Tomado de SENASICA 2019 (<https://www.gob.mx/senasica>).

Existen reportes epidemiológicos en donde se detectó al agente etiológico de la babesiosis en el estado de Veracruz. En este estado, como se puede observar en la Figura 9, el vector se encuentra en un estatus de control y se considera una zona endémica de la enfermedad. En estas investigaciones se reporta que se obtuvo una prevalencia del 82.3% para *B. bovis* y de 94.1% para *B. bigemina* partiendo utilizando un número de muestra de 203 bovinos, lo que nos indica una tasa de infección alta entre los individuos, por lo que podría alterarse esta estabilidad enzootica si se introduce ganado susceptible en esta zona (Romero-Salas y col., 2016).

Otro aspecto importante respecto a la epidemiología de la enfermedad es el papel que juegan los animales silvestres en la transmisión del vector al ganado, como lo es el caso del venado de cola blanca. Desde el año de 1977 se ha documentado la posibilidad de que éste tipo de animales pueden ser hospederos de las garrapatas responsables de transmitir la fiebre del ganado bovino (Owen, 1977). Éstos animales y el ganado llegan a estar en contacto cuando se realiza la ganadería semi-intensiva, en donde al ganado se le deja pastando en zonas donde hay un nivel de vegetación óptimo para el pastoreo. En el 2007 Cantu y colaboradores evaluaron la posibilidad de que los venados de cola blanca pudieran estar infectados tanto de *B. bovis* como de *B. bigemina*, así como también evaluó si las garrapatas que estaban parasitandolos podrían encontrarse los mismos agentes etiológicos. Éste trabajo es el primero que reporta con datos moleculares la presencia del hemoparásito tanto en los venados como en las garrapatas, sin embargo no se pudo determinar en qué fase de la infección se encontraban estos animales, si en un fase temprana o en un estado de portador (Cantu y col., 2007). Existen más trabajos donde se identifican a dos tipos de parásitos babesiales en otro tipo de cervidos tales como el corzo y el ciervo rojo (Duh & Petrovec, 2005). En conjunto estos resultados sugieren que los venados pueden ser reservorios de especies de babesias bovinas (Cantu y col., 2007).

### **Diagnóstico del parásito.**

El diagnóstico de la babesiosis bovina es una herramienta importante para poder controlar y prevenir la diseminación de la enfermedad. Durante la etapa aguda de la enfermedad el número de parásitos dentro de los eritrocitos incrementa de tal manera que pueden ser detectados microscópicamente. Sin embargo, en animales infectados crónicamente donde las formas subclínicas de la enfermedad ocurren, este método es inservible y se deben implementar otro tipo de técnicas para poder detectarlo (Mosqueda y col., 2012). El uso de técnicas efectivas está dirigido a cubrir cinco premisas generales e importantes en el diagnóstico de esta enfermedad: 1) identificación de especies de hemoparásitos y cepas involucradas en la enfermedad; 2) determinación de la distribución y evaluación del riesgo de enfermedad en un hato, ya sea a nivel regional o nacional; 3) certificación del estado de infección de los animales por requerimientos comerciales o en programas de erradicación; 4) identificación o confirmación de la causa de brotes y muertes y 5) identificación de artrópodos específicos como vectores o de los estadios transmitidos por éstos (Böse y col., 1995) .

El desarrollo de técnicas sensibles y específicas para la detección del parásito provee de herramientas para la identificación de animales enfermos que requieren de una intervención y terapia

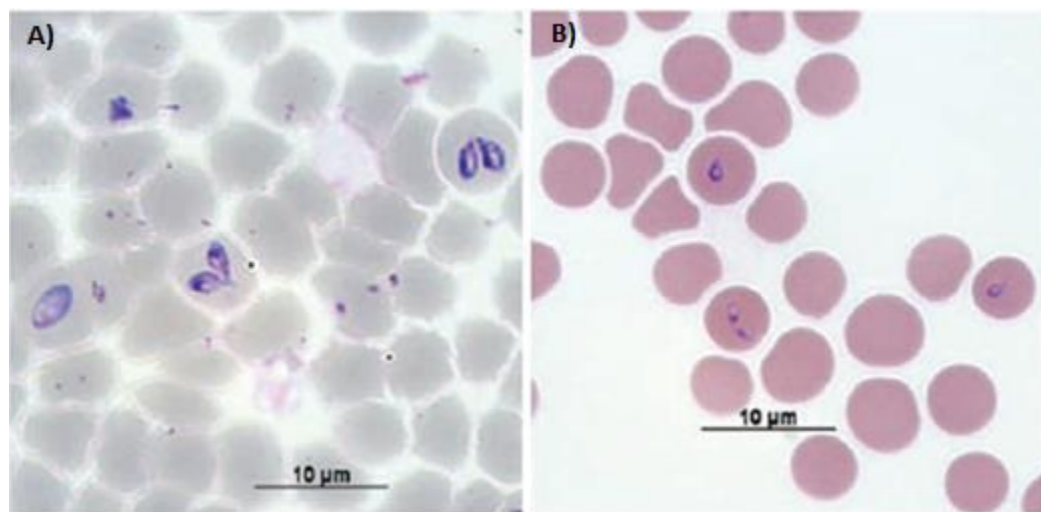
rápida y apropiada así como también para la prevención de la enfermedad mediante la regulación del movimiento de animales. En el caso de *B. bovis*, la infección puede llegar a confundirse con las patologías desarrolladas por otras enfermedades causadas por hemoparásitos e incluso virus por lo que un diagnóstico específico y eficaz es imprescindible para decidir el tratamiento y las medidas necesarias de control a mediano y largo plazo (Palmer, 1991; Benavides y col., 2007).

El diagnóstico de la enfermedad también depende mayormente del estado de la progresión de la infección, por lo que es de vital importancia desarrollar pruebas diagnósticas sensibles y específicas para el parásito. Cuando se habla de una infección aguda, la detección directa de los organismos intraeritrocíticos provee la identificación de los animales con infección activa y elimina las variables que confunden si se hace una prueba de diagnóstico serológica (Palmer 1991). Una de las pruebas que se usa como prueba de oro es la examinación de los frotis sanguíneos teñidos por Giemsa, pero esta solo es válida cuando la infección está en la fase aguda de la enfermedad, ya que el número de los parásitos dentro de los eritrocitos es lo bastante alto para poder detectarlos con facilidad por microscopía (Sse y col., 1995). Por lo anterior este tipo de diagnóstico no puede implementarse en bovinos con presencia de baja parasitemia o en estado crónico ya que la prueba es menos sensible, por lo que se recurren a métodos moleculares para realizar un diagnóstico óptimo.

### **Microscopía.**

Los frotis de sangre delgada fueron el primer método para detectar parásitos de *Babesia* en muestras clínicas y es un método que todavía se utiliza para realizar un diagnóstico efectivo en la mayoría de los laboratorios del mundo. Para este método de detección la sangre se colecta y se combina con anticoagulante, después se realiza el frotis en una laminilla de vidrio, se seca al aire, es fijada con metanol y se tiñe con Giemsa o un colorante similar por varios minutos. Después la laminilla es lavada y vuelta a secar. Los parásitos intraeritrocíticos se observan bajo el microscopio usando el objetivo 100x añadiendo una gota de aceite de inmersión. Ésta técnica provee una sensibilidad tal que permite detectar parasitemias de incluso un eritrocito infectado por cada diez mil células. Ésta técnica es fácil y no es cara pero requiere a personal con experiencia que pueda diferenciar entre las especies diferentes del parásito y de las diferentes formas que se llegan a presentar dentro del eritrocito (Figura 10) y solo es confiable el resultado cuando la cantidad de parásitos en la sangre es lo suficientemente alto para detectarse (Potgieter y Els, 1977; Mosqueda y col., 2012).

Cuando se realiza esta técnica también se tiene que prestar especial cuidado de la fuente de donde se obtuvo la muestra de sangre. Si es sangre periférica tomada de la yugular o de las venas caudales solo es posible usarla para determinar la presencia de *B. bigemina*, *B. divergens*, y *B. gibsoni*. En el puntual caso de *B. bovis* y *B. canis* la sangre debe ser recolectada directamente de los capilares sanguíneos de la oreja o de la piel de la cola del animal, ya que ahí se contiene un porcentaje alto de los eritrocitos infectados con estas especies del parásito (Jacobson y col., 2006 ; Mosqueda y col., 2012).



**Figura 10.** Frotis sanguíneo. En esta imagen se pueden observar las diferencias entre el tamaño de A) *Babesia bigemina* y B) *Babesia bovis* así como también la presencia de diferentes formas del desarrollo de *Babesia* una vez que están dentro del eritrocito. Tomada y modificada de Mosqueda y col., 2012.

Existe otra técnica de frotis sanguíneos para poder detectar bajos niveles de parasitemia o cuando una enfermedad subclínica ocurre, especialmente en casos donde la infección es causada por *B. bovis*. Ésta técnica se realiza por medio de frotis gruesos de sangre infectada teñida con Giemsa (Morzaria y col., 1992; Böse y col., 1995). Para poder desarrollarla se deposita en el centro de una laminilla una gota de sangre y se fija con calor pero no se extiende la muestra, después se tiñe de manera rutinaria lavándola con cuidado para evitar perder el tejido mientras el exceso del tinte se remueve. Una vez que seca es posible visualizar la muestra en un microscopio como en el caso de los frotis delgados y tiene como ventaja el que se pueden analizar un número grande de eritrocitos en un espacio reducido por lo que la probabilidad de encontrar células infectadas es diez veces mayor que en un frotis delgado (Böse y col., 1995; Mosqueda y col., 2012).

Existen variaciones de técnicas de frotis para la detección de *Babesia*, como lo son los frotis de tejido cerebral y los de hemolinfa. En el caso de los frotis de tejido cerebral, se trata de una técnica confirmatoria y no de una técnica aplicable para diagnosticar la enfermedad en una etapa temprana. La técnica se aplica cuando se sospecha de que la muerte de un animal fue causada por *B. bovis* ya que se presentaron signos clínicos neurológicos. Esta se desarrolla tomando una muestra de la materia gris del cortex cerebral y colocándola en la laminilla para después extender la misma junto con otra laminilla, el tejido se fija y se tiñe. El diagnóstico se basa en la observación de los capilares cerebrales y se estima que al menos un 100% de los eritrocitos presentes en esos capilares están infectados. Existen también técnicas donde se realizan frotis de otros órganos, como por ejemplo riñones e hígado (Ulienbergh, 1972; Mosqueda y col., 2012). Respecto a los frotis de hemolinfa estos se realizan a partir de la recolección de la hemolinfa tomada a partir de un corte de la pata de la garrapata adulta repleta. Una vez que se tiene la muestra, ésta se deposita en una laminilla; debido a que la muestra que se obtiene es muy poca, ésta no se puede extender a lo largo de la laminilla por lo que se deja secar, se fija y se tiñe como en cualquier técnica de frotis con sangre. El diagnóstico se basa en la observación de los quinetos con forma vermicular. Es importante mencionar que la microcopia basada en frotis de hemolinfa requiere de personal muy especializado ya que las garrapatas recolectadas de ganado en áreas endémicas tienen muy poca cantidad de quinetos (Mosqueda y col., 2012).

El diagnóstico usando estas diversas técnicas de frotis y microscopía directa a veces no es confirmado en el laboratorio ya que como se ha notado en párrafos anteriores, las técnicas deben fijarse correctamente y dejarse secar lo necesario para que puedan desempeñarse buenos diagnósticos. Existen ocasiones en las que el laboratorio no puede conformar los resultados debido a que los especímenes están mal preparados o las muestras son buenas pero la confirmación no es posible debido a factores propios de la enfermedad. *Babesia* puede ser difícil de detectar durante la etapa de recuperación cuando la parasitemia cae rápidamente, y cuando las muestras toman uno o dos días después de un tratamiento específico (Bock y col., 2004). Aunque este tipo de técnicas son más económicas y rápidas, se requiere de habilidad para la identificación de las diferentes formas del parásito, tiene baja sensibilidad y se necesita de un buen microscopio y de personal entrenado que sea capaz de diferenciar entre especies de *Babesia* (Demessie & Derso, 2015).

### **Métodos de diagnóstico inmunológicos.**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
Facultad de Ciencias Naturales

La técnicas de diagnóstico inmunológicos se utilizan cuando el número de parásitos de *Babesia* en la sangre es muy bajo para poderlo detectar por otros métodos. En estas técnicas se buscan puntualmente cierto tipo de anticuerpos contra proteínas de los estadios sanguíneos del parásito y ha probado ser altamente efectivo para detectar infecciones subclínicas y para evaluar la necesidad de vacunación, pero raramente se utiliza en animales portadores. Es fácil de notar con una alta frecuencia que en éstas técnicas las reacciones cruzadas se presentan entre diferentes especies de *Babesia* o respuestas inmunes específicas débiles que llegan a generar falsos negativos o falsos positivos (Araujo, 1998; Mosqueda y col., 2012).

Dentro de estos métodos de detección se incluye la inmunofluorescencia indirecta (IFAT) y el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA). La IFAT fue descrita por primera vez por los autores Ristic y Sibinovic en 1964 para detectar anticuerpos contra *B. caballi* en caballos infectados crónicamente. Desde ese entonces, la técnica ha sido adaptada para todas las especies de *Babesia* y ha mostrado un buen nivel de especificidad y sensibilidad (Mosqueda y col., 2012). Ésta técnica se basa en el reconocimiento de los antígenos del parásito por anticuerpos de suero en la sangre del animal. Los anticuerpos unidos son detectados con otro anticuerpo anti- Ig que tiene asociado un fluorocromo lo que genera una fluorescencia que se observa a través de un microscopio. Ésta técnica resulta no tan efectiva y tardada si se realiza el procesamiento de un gran número de muestras (Mosqueda y col., 2012).

En la técnica de ELISA una enzima se une covalentemente a una molécula de anticuerpo, creando una herramienta inmunológica con alta especificidad y sensibilidad. Se basa en un anticuerpo asociado a una enzima que es capaz de detectar un antígeno inmovilizado en una superficie. Las propiedades catalíticas de la enzima y la especificidad del anticuerpo siempre permanecen inalteradas. Las enzimas típicamente usadas son la peroxidasa, fosfatasa alcalina y  $\beta$ -galactosidasa, y cada una interacciona con su sustrato específico para formar un producto de reacción coloreado que puede ser detectado en cantidades muy bajas (Madigan y col., 2009). Ofrece ventajas sobre la técnica de IFAT tales como que es menos subjetiva en la interpretación de los resultados, se puede procesar un gran número de muestras y presenta una alta especificidad debido al uso de antígenos recombinantes y anticuerpos monoclonales, lo que disminuye significativamente la unión inespecífica (Böse y col., 1995). Existen diversas variaciones de ésta técnica que se han aplicado al diagnóstico de la babesiosis bovina, tal es el caso de la ELISA indirecta y la ELISA competitiva. En el protocolo de una ELISA indirecta se utilizan proteínas

recombinantes, sin embargo se ha observado en distintos ensayos de la técnica que cuando se purifican estas proteínas recombinantes expresadas en bacterias se llevan consigo proteínas residuales bacterianas. Estas proteínas residuales tienen una alta capacidad de reaccionar con el suero bovino, por lo que el resultado que se obtiene es una fuerte señal del entorno obteniendo una interpretación y estandarización afectada. Una ELISA competitiva, por otro lado, se desarrolla utilizando un anticuerpo monoclonal contra un epítipo conservado de una proteína. El antígeno que se encuentra sin unirse es reconocido por el anticuerpo monoclonal, ésta unión será detectada por un anticuerpo marcado anti-ratón IgG. La señal que ahora se observará es el resultado de la falta de anticuerpos bovinos específicos unidos a una proteína recombinante, lo que evita la señal inespecífica presentada por las uniones inespecíficas como en una ELISA indirecta (Goff y col., 2003; Goff y col., 2006).

Entre otros métodos de detección inmunológica se encuentra la inmunocromatografía o por sus siglas en inglés ICT. Éste proporciona un rápido diagnóstico, en donde se detectan anticuerpos contra antígenos específicos en una cantidad pequeña de suero. Es por medio de un anticuerpo específico y un antígeno recombinante que se encuentran ambos impregnados en una tira de membrana de nitrocelulosa que la prueba puede detectar a un animal enfermo. Éste tipo de técnicas tienen a su ventaja que son muy fáciles de aplicar y leer, por lo que un técnico especializado no se necesita, no utiliza equipo altamente sofisticado para poder desempeñarse por lo que puede ser implementada en campo, y es de bajo costo (Wongsrichanalai y col., 2007).

Los métodos moleculares para detectar parásitos como *Babesia* tienen una gran desventaja ya que solo se pueden aplicar si existe la presencia de anticuerpos específicos contra el organismo, lo que puede tomar días o inclusive semanas en desarrollarse en un animal infectado. Por otra parte también resultan desventajosas ya que estos anticuerpos desarrollados pueden mantenerse por meses circulando en el animal por lo que si se aplican en estos casos no se detectaría una infección en curso. Es por esto que son inútiles si se quieren utilizar para detectar una infección grave, en animales vacunados o animales que han sido exitosamente tratados en contra de la enfermedad (Mosqueda y col., 2012).

### **Métodos moleculares**

Los métodos moleculares tienen como objetivo detectar los ácidos nucleicos y es por esto mismo que se denominan indirectos, y han probado ser útiles cuando los métodos inmunológicos fallan en detectar al parásito. Sin embargo la sensibilidad y especificidad de estos métodos son muy altos y



a lo largo de estos años se han desarrollado diversas técnicas para detectar diferentes especies de *Babesia* en las garrapatas y los bovinos infectados (Mosqueda y col., 2012).

### **Sondas de ADN**

Éste tipo de técnica fue la primera desarrollada para la detección de ADN de *Babesia* a partir de sangre infectada. La técnica consiste en el aislamiento, purificación y clonación de ADN al cual se le agrega un marcador que es radioactivo. La cadena única de ADN marcada es usada para hibridar con el ADN presente ya sea en tejido o en una membrana. Después ocurre un alineamiento primario donde el ADN se hibridará con el ADN complementario. Es por este proceso por el cual la técnica posee una alta especificidad. El resultado de ese alineamiento e hibridación se puede observar bajo técnicas como autoradiografía, quimioluminiscencia, o con un sustrato colorimétrico (Mosqueda y col 2012).

En 1986 se desarrolló el uso de las sondas de ADN para el diagnóstico de *Babesia bovis*. Para este diagnóstico se diseñaron sondas marcadas radioactivamente, las cuales fueron utilizadas para una técnica de hibridación dot blot, en donde se pudieron detectar hasta 100 pg de ADN de *Babesia bovis*, ésta cantidad se puede estimar a ser igual al ADN presente en 50 microlitros de 1 en  $10^5$  eritrocitos infectados (McLaughlin y col., 1986). Ésta prueba también se ha desarrollado para detectar *Babesia* en tejidos de garrapata y debido a su alta sensibilidad se han usado para la detección de individuos portadores de la infección (Hodgson et al., 1992). Sin embargo esta técnica tarda varios días para completarse, requiere un técnico especializado y requiere de etiquetar las sondas (Mosqueda y col., 2012).

### **Reacción en cadena de la polimerasa.**

La primera descripción que existe de la reacción en cadena de la polimerasa se registró en 1992 para la detección de *Babesia bovis* (Figuroa y col., 1992). Las técnicas de PCR han demostrado ser muy sensibles en la detección del parásito en animales portadores o persistentemente infectados. Los niveles de detección son tan bajos como tres eritrocitos parasitados en 20  $\mu$ l de células empaquetadas (0 1 por cada  $10^9$  células). Otra ventaja que ofrece el PCR es que permite la identificación del parásito en etapas tempranas de la enfermedad ofreciendo la oportunidad de implementar de manera oportuna un tratamiento (Demessie y Derso, 2015).

Existen muchas variaciones de la técnica de PCR que pueden detectar y diferenciar especies de *Babesia* como lo es el PCR anidado, en donde se utilizan dos juegos de oligonucleótidos en dos

amplificaciones de PCR sucesivas. Los juegos de oligonucleótidos están diseñados de tal forma que el segundo juego amplifica al producto de la primera reacción de PCR, aumentando así la sensibilidad de la prueba y ha sido efectivo en detectar animales portadores de la infección. Se ha reportado que el PCR anidado desarrollado para la detección de *B. bovis* tiene la capacidad de detectar un parásito en  $10^6$  eritrocitos, y cuando la prueba se combina con sondas de ADN, la sensibilidad aumenta a detectar un parásito en  $10^9$  eritrocitos. El PCR anidado es una herramienta muy sensible, sin embargo es más cara, toma más tiempo y el riesgo de contaminación aumenta si se compara con una técnica de PCR de un solo paso (Figuroa y col., 1993).

A pesar de que tiene bajo número de copias en el genoma, la mayoría de genes utilizados como gen blanco para estas técnicas son los genes de la subunidad pequeña del ribosoma (gen 18s). El número de copias de los genes que se usan para la amplificación de ADN tiene un impacto en la sensibilidad de la técnica, pues la capacidad de detección es directamente proporcional al número de repeticiones de una secuencia. Esto también puede ser una limitante debido a la cantidad de secuencias génicas disponibles en las bases de datos actuales. Sin embargo, los datos obtenidos de muchas publicaciones demuestran que la PCR es mucho más sensible que el diagnóstico por microscopía y los niveles de parasitemia detectados oscilan entre 0.001 -0,0000001 % (Criado-Fornelio, 2007).

### **PCR en tiempo real (qPCR)**

La técnica de PCR en tiempo permite amplificar y cuantificar un fragmento específico de ADN. El ADN amplificado es cuantificado a la vez que se va generando, es por eso que recibe el nombre de tiempo real. Ésta técnica determina si la secuencia específica está presente en la muestra y también determina el número de copias de esa secuencia mediante detección de una señal de fluorescencia emitida durante la reacción de PCR. La señal emitida es generada por moléculas reporteras fluorescentes tales como las sondas TaqMan y el SyBR Green. Estas moléculas se intercalan en la doble cadena de ADN y sirven como indicador de la producción de la secuencia que ha sido generada en cada ciclo, así como también facilitan el monitoreo de la reacción y evitan un proceso posterior para la interpretación de resultados, lo que ahorra tiempo y recursos. La sensibilidad de la técnica es más alta que la reportada en un PCR convencional. Para la detección de *Babesia bovis* se ha reportado una detección de 0.75 copias de ADN por microlitro de sangre. La desventaja que presenta este tipo de método es que debido al equipo que se utiliza y las diferentes formas de

moléculas usadas para la prueba los costos se elevan hasta el doble o triple que un PCR convencional (Buling y col., 2007; Mosqueda y col., 2012).

### **Hibridación de línea reversa (RLB)**

La hibridación de línea reversa consiste en la hibridación de productos de PCR a sondas de oligonucleótidos específicas de especie las cuales se encuentran unidas a una membrana. Ésta técnica tiene como ventaja el que se permite la detección simultánea de varias especies, parásitos, cepas, y muestras. Así como también que en esta técnica la membrana usada para desarrollarla puede ser reusada hasta 20 veces. Existen desventajas con esta técnica ya que es un procedimiento costoso que requiere de mucho tiempo. Los primeros reportes que se hicieron sobre la técnica demuestran que es un método versátil y que permite la identificación simultánea de parásitos transmitidos por garrapatas en sangre de bovino (Gubbels y col., 1999; Mosqueda y col., 2012).

### **Prueba de amplificación isotérmica mediada por horquillas.**

Existe una prueba de diagnóstico molecular la cual es aún más sensible que el PCR anidado ya que es capaz de detectar hasta 6 copias del ADN (Notomi et al., 2000), concentraciones de ADN mayores a  $1 \times 10^{-2}$  fg (Besuschio et al., 2017) y porcentajes de parasitemia de hasta 0.000001% (Iseki et al., 2007). Se trata de la prueba de amplificación isotérmica mediada por horquillas (LAMP), la cual es un nuevo método desarrollado para la amplificación de genes y combina rapidez, simplicidad y una alta especificidad. Ésta prueba tiene un intervalo de tiempo de la reacción de 30 minutos a 1 hora y amplifica el gen en cuestión por medio de una ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de la cadena o helicasa proveniente de un fragmento grande de la ADN polimerasa I de la bacteria *Bacillus stearothermophilus*. Debido que esta enzima proviene de una bacteria termófila solo requiere una temperatura para poder realizar su actividad dentro de la reacción, evitando la necesidad de utilizar equipo de termociclado, que por lo generalmente, es caro. La reacción requiere de un juego de cuatro oligonucleótidos, es por esto que aumenta la especificidad de la prueba ya que se reconocen hasta seis diferentes regiones del ADN a analizar (Tanner y Evans, 2013).

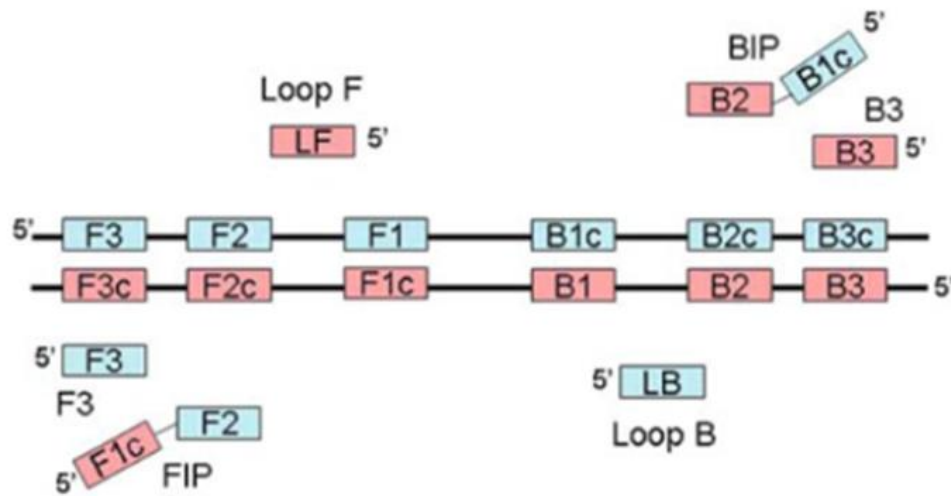
Estos oligonucleótidos están constituidos de dos oligonucleótidos internos diseñados especialmente para las regiones sentido y antisentido, y otros dos oligonucleótidos externos, aunque también pueden ser añadidos dos pares de oligonucleótidos extras, los cuales aceleran aún más el proceso de la reacción (Goto y col., 2009). Los oligonucleótidos internos tienen de longitud 23 a 24 nucleótidos y son llamados por sus siglas en inglés “Forward Inner Primer” (FIP) y “Backward Inner

Primer” (BIP), los cuales contienen dos secuencias distintas correspondientes a las secuencias sentido y antisentido del ADN blanco, uno para la hibridación en la primera etapa y el otro para la auto-hibridación en las etapas posteriores de la reacción. Los oligonucleótidos son diseñados respecto a diferentes zonas del mismo ADN a amplificar, éste se divide en diferentes zonas en donde los mismos oligonucleótidos hibridarán. Dentro de ambos extremos de la región blanco para la amplificación del ADN son llamadas F2c y B2, respectivamente. Dos secuencias internas, ubicadas a 40 nucleótidos del extremo de F2c y B2 son llamados F1c y B1 y dos secuencias (de 17 a 21 nucleótidos) fuera de los extremos de F2c y B2 son designados como F3C y B3 (Figura 11). Dada esta estructura, las secuencias FIP y BIP son diseñadas de manera en que FIP contiene a la región F1c, un espaciador de TTTT y la secuencia de F2 complementaria a F2c. BIP contiene la secuencia de B1c, un espaciador de TTTT y la secuencia complementaria a B2. Los dos cebadores externos son B3 y F3, esta última es complementaria a F3c (Notomi y col., 2000).

### **Diseño de los oligonucleótidos.**

Existen diferentes características que deben tomarse en cuenta para el diseño de estos oligonucleótidos.

1. La temperatura de fusión o  $T_m$ , la cual debe conservarse en ciertos rangos. Los oligos FIP y BIP deben elegirse con una  $T_m$  entre 60 y 65°C, y es a este rango de temperaturas en las cuales la polimerasa puede realizar su acción. Los valores de  $T_m$  de F1c y B1c son ligeramente superiores a los F2 y B2 ya que se tiene como objetivo el que se forme la estructura en forma de horquilla inmediatamente después de la liberación del ADN de cadena sencilla, esto es de 64°C a 66°C. El valor de  $T_m$  de los oligonucleótidos externos (F3 y B3) es menor que la de F2 y B2 para asegurar que la síntesis ocurra primero a partir de los oligonucleótidos internos que de los externos. Para los oligonucleótidos loop la temperatura ideal es de 64°C- 66°C (Notomi y col., 2000)

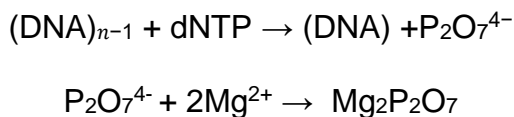


**Figura 11.** Zonas del ADN blanco y oligonucleótidos utilizados en la técnica de LAMP. (Mori y col., 2009)

- Estabilidad en el extremo de los oligonucleótidos. El extremo de los oligonucleótidos es de vital importancia ya que sirve como punto de inicio de la síntesis de ADN y por tanto debe tener cierto grado de estabilidad. El extremo 3' de F2/B2, F3/B3, LF/LB y el extremo F1c/B1c son diseñados de tal manera que la energía libre es igual o menor a  $-4$  Kcal/mol. El extremo 5' de F1c después de la amplificación corresponde al extremo 3' de F1, por lo que la estabilidad es importante. La reacción ocurre hacia un cambio negativo de energía libre ( $\Delta G$ ). El alineamiento entre el oligonucleótido y el gen blanco es una reacción equilibrada, y la reacción de alineamiento procede con un  $\Delta G$  menor.
- Contenido de GC. Los oligonucleótidos son diseñados con un contenido de GC de 40 a 65% o idealmente de 50-60%.

Durante éste proceso isotérmico se obtiene un producto que contendrá diferentes sitios para la síntesis de ADN, siendo las regiones finales de las horquillas formadas y sitios de alineamiento para los oligonucleótidos internos. Cuando hay hibridaciones en estos sitios los productos crecen y forman más estructuras llamadas concatámeros (moléculas de ADN que contienen copias múltiples de una misma secuencia de nucleótidos dispuestas en serie o múltiples repeticiones en tándem) con más sitios de hibridación (Notomi et al., 2000). El resultado final obtenido son estructuras de diferente talla molecular los cuales pueden ser detectados por varios métodos, tales como de colorimetría,

turbidez y fluorescencia, acortando así el tiempo en el cual se puede obtener el resultado (Goto et al., 2009). Estos métodos de observación pueden ser fluorocromos intercalantes tales como: marcadores de ácidos nucleicos como SYBR Green y bromuro de etidio. Otro método usualmente aplicado en la observación de los resultados es a través de la turbidez generada por la precipitación del pirofosfato de magnesio, lo cual es el resultado de la polimerización del ADN por medio de la enzima ADN polimerasa en donde los iones de los pirofosfatos son liberados de los dNTP's como producto. Cuando se produce una gran cantidad de iones pirofosfato, estos reaccionan con los iones de magnesio que se encuentra en el amortiguador usado para la reacción de LAMP, lo que nos lleva al producto de pirofosfato de magnesio:



También existen los métodos colorimétricos usando indicadores de iones de metal que utilizan un cambio de espectro tales como el azul de hidroxinaftol (HNB) o la calceína, (Mosqueda y col., 2012) 4) sondas acopladas a nanopartículas (Seetang-nun y col., 2013), 5) dispositivos de flujo lateral (Murray et al., 2013).

La eficiencia de amplificación del método de LAMP es extremadamente alta debido a que no hay pérdida de tiempo en cambios térmicos al ser una reacción isotérmica y es poco probable que ocurra la inhibición de la reacción en la última etapa de amplificación (Mori y col., 2001).

## JUSTIFICACIÓN

La babesiosis bovina es una enfermedad ocasionada por el hemoparásito *B. bovis*. Esta enfermedad ocasiona grandes pérdidas tanto económicas como de cabezas de ganado bovino, siendo las más afectadas la producción de leche, carne y pieles. El uso de métodos de diagnóstico es importante para dar un tratamiento oportuno y dar seguimiento a la población infecta, así como al ganado que introducido a un nuevo hato. Sin embargo, se requiere de equipo especializado, costoso y personal altamente capacitado. El método de LAMP ha sido propuesto para ser aplicado en el diagnóstico rápido, económico, sensible y específico de una gran cantidad de patógenos. El principal reto del diseño de la técnica de LAMP es el riguroso diseño de oligonucleótidos. La técnica de LAMP



publicada actualmente y desarrollada para *B. bigemina* y *B. bovis* presenta limitantes en el diseño de oligonucleótidos al detectar únicamente cepas de China.

### HIPÓTESIS

El método de diagnóstico molecular LAMP es una alternativa más sensible y específica para la detección de *Babesia bovis* en comparación con la PCR anidada.

### OBJETIVOS

#### General

Diseñar el método LAMP para el diagnóstico molecular del parásito *Babesia bovis*.

#### Específicos

Estandarizar la técnica LAMP para detectar a *B. bovis*.

Determinar la sensibilidad y especificidad de la técnica LAMP para la detección de *B. bovis*.

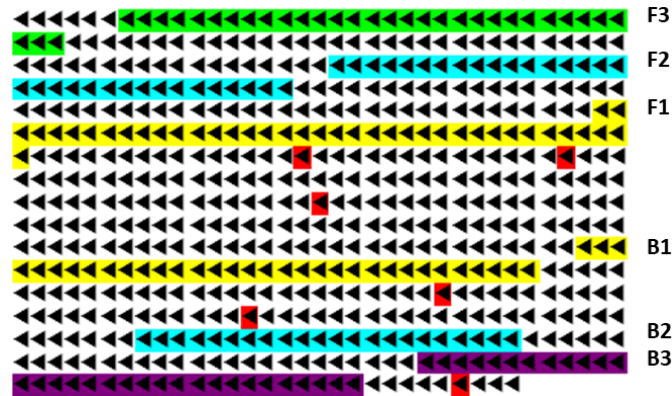
Comparar la sensibilidad de las técnicas moleculares LAMP y PCR anidada para la detección de *B. bovis*.

### METODOLOGÍA

#### Diseño de los oligonucleótidos para la detección de *B. bovis* por el método de LAMP

Los oligonucleótidos utilizados en este estudio se realizaron de la siguiente manera. Para elegir la secuencia que se utilizó en el diseño de los oligonucleótidos primero se realizó una búsqueda de secuencias similares en el programa BLAST (National Center for Biotechnology Information), de las secuencias de interés. Posteriormente se realizó un alineamiento múltiple en el programa MUSCLE utilizando la secuencia del gen elegido para el diseño de oligonucleótido. En este alineamiento se consideraron todas las cepas de *B. bovis* reportadas en Genbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)). En esta tesis no se indica el nombre del gen ni la secuencia debido a que está en proceso de patente. Una vez realizado el alineamiento múltiple se determinó la secuencia consenso, es decir se realizó el análisis para identificar las bases conservadas y variables entre cepas, las regiones con bases variables no fueron tomadas en cuenta para este estudio. El diseño de oligonucleótidos se basó en considerar las condiciones reportadas por Notomi y colaboradores en el 2000, las cuales incluyen analizar el contenido de G+C, formación de hairpins, homodímero y heterodímeros. Para comprobar la especificidad de los oligonucleótidos se utilizó el programa bioinformático Megablast de NCBI

(National Center for Biotechnology Information).



**Figura 12.** Alineamiento de las secuencias y representación esquemática de las zonas donde se diseñaron los oligonucleótidos para la técnica de LAMP.

### Extracción y cuantificación del ADN genómico de *B. bovis*

Para la extracción de ADN genómico (ADNg) de *Babesia bovis* cepa Colima, se utilizó sangre de bovino con una parasitemia de 1.5%. La extracción se realizó por medio del kit DNAeasy Blood & Tissue de QIAGEN según las especificaciones del fabricante y con modificaciones. La modificación hecha a la técnica fue resuspender el paquete de eritrocitos con PBS pH 7.3 y se añadió un paso de lavado con etanol al 70 % al final del método con la intención de eliminar contaminantes como el hierro. El ADNg de *B. bovis* se cuantificó en un nanodrop 2000 (Thermo Scientific) a 260 nm, adicionalmente se evaluaron los rangos 260/280 y 260/230. La integridad del ADNg se analizó en un gel de agarosa al 0.8 % teñido con red gel.

### Estandarización de la prueba LAMP.

Para estandarizar la prueba de LAMP utilizando el ADNg de la cepa de campo se realizó la siguiente mezcla de reacción:



Tabla 1. Mezcla de reacción utilizada para el desarrollo de LAMP

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final
Oligonucleótido FIP	20 $\mu$ M	0.4 $\mu$ M
Oligonucleótido BIP	20 $\mu$ M	0.4 $\mu$ M
Oligonucleótido F3	20 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M
Oligonucleótido B3	20 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M
Desoxirriboucleótidos trifosfato (nNTPs)	10 mM	1.4 $\mu$ M
Betaina	10 mM	0.8 mM
Thermo buffer	10 X	1 X
MgSO <sub>4</sub>	100 mM	6mM
<i>Bst</i> polimerasa	8000 u/ $\mu$ l	320 U/ $\mu$ l
Agua grado biología molecular	-	
ADN blanco	11.2 ng	1.2 ng

Con la finalidad de estandarizar la temperatura de incubación, la mezcla de reacción se incubó por 1 h en un rango de temperatura de 60-65 ° C seguida de una incubación a 83°C por 3 min para inactivar la enzima *Bst* pol. Para cada ensayo de LAMP se incluyó un control negativo, en el cual se adicionó 1  $\mu$ l de agua libre de nucleasa en sustitución del ADNg. El resultado fue analizado utilizando gel de agarosa al 1.5 % teñido con gel red. El gel fue visualizado utilizando el fotodocumentador Biorad®.

#### **Prueba de especificidad de los oligonucleótidos para la detección de *B. bovis*.**

La especificidad de la técnica fue evaluada utilizando la mezcla de reacción de la Tabla 1. Para cada reacción se adicionó 30 ng del DNAg de las siguientes especies; *B. bovis*, *B. bigemina*, *Anaplasma marginale*, *Homo sapiens*, *Rhipicephalus microplus* y *Bos Taurus* en tubos separados. La mezcla de

reacción se incubó a 63°C por 1h y a 83°C por 3 min. Los resultados fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5 % teñido con red gel y analizado en un fotodocumentador (Biorad®).

#### **Prueba de sensibilidad de LAMP para la detección de *B. bovis*.**

Para determinar la sensibilidad de la técnica LAMP para la detección de la secuencia blanco de *B. bovis*, se realizó una dilución seriada de  $1 \times 10^2$ - $1 \times 10^{10}$ , utilizando 30 ng de ADNg de *B. bovis*. La reacción de LAMP fue hecha para cada dilución utilizando la mezcla de reacción mostrada en la Tabla 1. Para el control negativo se utilizó 1 µl de agua libre de nucleasas en sustitución del ADNg. Cada una de las reacciones se incubó a 63°C por 1 h y 3 min a 83°C. Las reacciones se analizaron en un gel de agarosa al 1.5 % teñido con red gel y visualizado en un fotodocumentador (Biorad®).

#### **Prueba de sensibilidad de la PCR anidado para la detección de *B. bovis*.**

La PCR anidada se realizó utilizando 12.5 µl de master mix (My Taq Mix, Bioline), 10 pM de primer BOF, 10 pM de BOR, 9.5 µl de agua libre de nucleasas, 11.7 ng de ADNg. El programa utilizado fue el publicado por Figueroa y col en 1994, que consistió en un ciclo de 95°C por 3 min; 35 ciclos de 95°C por 30 seg; 55°C por 45 seg y 72°C por 1 min, la extensión final fue de un ciclo a 72°C por 10 min. La segunda PCR fue utilizando 12.5 µl de master mix (My Taq Mix, Bioline), 10 pM de primer BOFN, 10 pM y 10 pM de BORN, 5.5 µl de agua libre de nucleasas por último se adicionaron 5 µl del producto de PCR de la primer reacción. El programa utilizado fue el mismo utilizado en la primer reacción con 25 ciclos. Las reacciones se analizaron en un gel de agarosa al 1.5 % teñido con red gel y visualizado en el fotodocumentados (Biorad®).

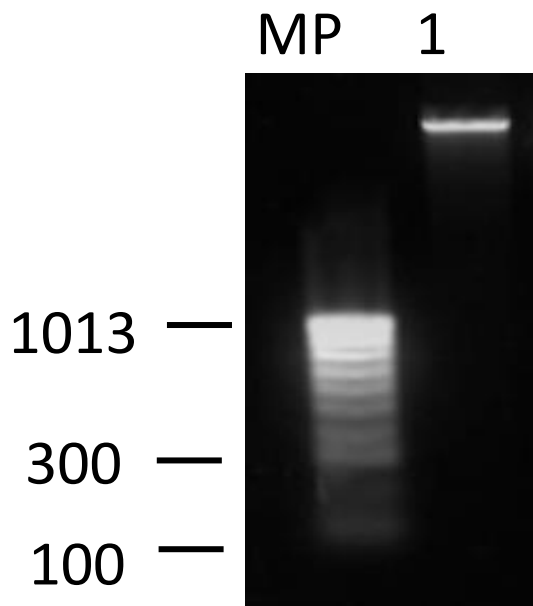
### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Una de las principales consideraciones para realizar un buen diagnóstico es la calidad y cantidad de ADN obtenido. En cuanto a la extracción de ADNg se pudo observar que el ADNg extraído posee las características óptimas para realizar pruebas moleculares tales como el LAMP y la PCR anidada. Se pudo considerar la pureza de la muestra como óptima, ya que no se encontró contaminado con proteínas. Cabe resaltar que una contaminación por proteínas puede interferir con la dinámica de reacción con pruebas moleculares como la PCR, sin embargo la prueba de LAMP posee una tolerancia más alta a los inhibidores para un diagnóstico típico realizado por PCR (Kaneko y col., 2007).

La espectrofotometría permite valorar la cantidad de ácidos nucleicos, así como la pureza, pero no informa acerca de la integridad de los mismos. En cuanto a la concentración de ADN para la

realización de la PCR anidada se sugiere una concentración inicial de 10 ng (Figuroa y col., 1992). La cantidad obtenida en la extracción de ADN fue de 11.7 ng y fue la cantidad óptima para realizar las pruebas sin ajustar la concentración en un volumen final, demostrando así que esta cantidad es suficiente para realizar una PCR anidada.

Para evaluar la integridad del ADNg, la muestra obtenida se analizó en un gel de agarosa al 1% teñido con el agente intercalante GelRed®. En la Figura 13 se puede observar en el carril 2 en ADNg obtenido, observándose una sola banda de alta talla molecular y además se observa que no hay manchas difuminadas en relación a las bandas presentes, por lo que se puede inferir que la muestra de ADN posee la integridad deseada.



**Figura 13.** Integridad del ADNg obtenido de una muestra de sangre de bovino infectado con *B. bovis*. Gel de agarosa al 1.5 % teñido con red. Carril 1. Marcador de talla molecular de 100 pb (Bioline); Carril 2. ADN g Figura 1. Integridad del ADNg

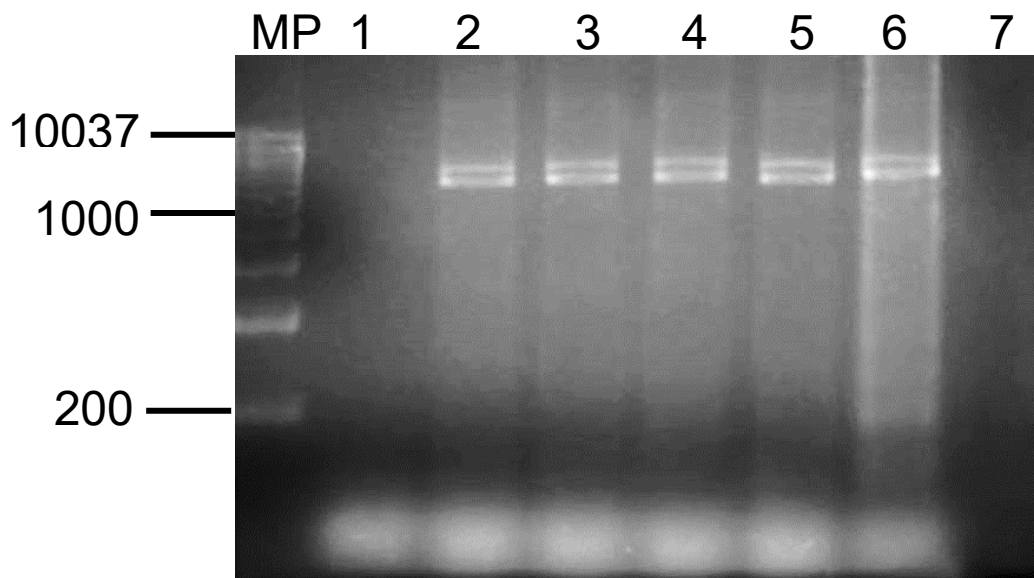
Una vez obtenido el ADNg con las condiciones adecuadas para ser utilizado en el método de LAMP, se realizó el ensayo de LAMP como está indicado en la metodología. Para determinar la temperatura



## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

### Facultad de Ciencias Naturales

ideal de amplificación con los oligonucleótidos diseñados las muestras se sometieron al análisis de gradiente de temperatura sin alterar las concentraciones de los demás reactivos involucrados en la reacción y valorar así la estandarización de la técnica de LAMP, los cuales se mencionan en la Tabla 1 (Tanner & Evans, 2013). Para la obtención de los resultados se utilizaron geles de electroforesis de agarosa a una concentración de 1.5% debido a la naturaleza de la técnica y a la obtención de isoformas de los amplicones generados en la reacción; cabe resaltar que una amplificación típica de la técnica LAMP se observa como un barrido en una muestra positiva. Adicionalmente, se evaluó el rango de temperaturas que van de 60°C a 65°C, debido a que la enzima *Bst* polimerasa utilizada en el método de LAMP se activa en un rango de temperatura que va de los 60 a los 65 °C. Se observó que la temperatura óptima de amplificación para la reacción de LAMP fue menor a los 65°C, donde no se observa el producto amplificado (Figura 14). Este resultado nos sugiere que la técnica puede llevarse a cabo en un rango de temperatura de 60°C a los 64°C, por lo que si la técnica se llega a utilizar como prueba de campo o en un laboratorio de bajos recursos utilizando un calentador o baño María con ese rango de temperatura obtendríamos un resultado positivo.

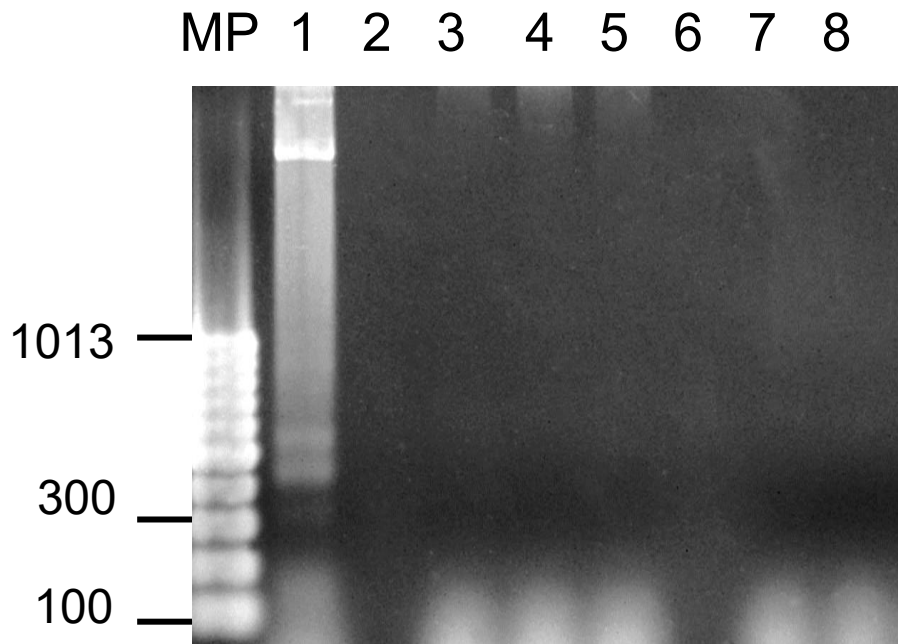


**Figura 14.** Estandarización de temperatura para el desarrollo de la técnica de LAMP. Gel de agarosa teñido 1.5% teñido con red gel. Carriles: MP. Marcador de talla molecular de 1 kb (Bioline); 1. Control negativo; 2. 60°C; 3. 61°C; 4. 62; 5. 63°C; 6. 64°C; 7. 65°C.

Para la realización de las siguientes pruebas del experimento, se seleccionó la temperatura de 64°C como la óptima debido a la intensidad de la amplificación presentada en el gel. A su vez es necesario hacer notar que la prueba requiere de un proceso de inhibición de la enzima como paso final, el cual requiere de una temperatura de 80 °C por 3 minutos y el tiempo de reacción se estableció siguiendo la investigación de XiaoBo y col., 2016, quienes determinaron respecto a un rango de tiempo desde los 10 a 60 minutos que el tiempo adecuado de la reacción es de 60 minutos. El resultado de esta estandarización es de un programa de 64°C por 60 minutos y 3 minutos de inactivación de la enzima a 80°C.

El análisis para evaluar la especificidad de los oligonucleótidos empleados se desarrolló por medio de pruebas de LAMP que contenían la misma concentración de reactivos pero cambiando el tipo de ADN blanco para analizar. Debido a que es muy común encontrar co-infecciones en las muestras de campo, se utilizaron extracciones de ADN de bovino no infectado, muestra de ADN de garrapata *R. microplus*, ADN humano, ADN de *Babesia bovis*, ADN de *Babesia bigemina*, y ADN de *Anaplasma marginale*, con la finalidad de comprobar que no se obtienen amplificaciones inespecíficas con los oligonucleótidos diseñados con material genético que pudiera ocasionar alguna prueba cruzada por manipulación o coinfección. Se observó que los oligonucleótidos son específicos

a especies ya que solo se obtuvo amplificación en la muestra que contenía el ADNg de *B. bovis* (Figura 15).



**Figura 15.** Análisis de especificidad de la prueba de LAMP para la detección de *B. bovis*. Gel de agarosa teñido con red gel al 1.5 %. Carriles: MP. Marcador de talla molecular de 100 pb (Bioline); 1. ADNg de *Babesia bovis* cepa Chiapas; 3. ADNg de *Babesia bigemina*; 4. ADNg *Anaplasma marginale*; 5. ADNg de bovino no infectado; 7. ADNg humano; 8. ADNg de garrapata *R. microplus*

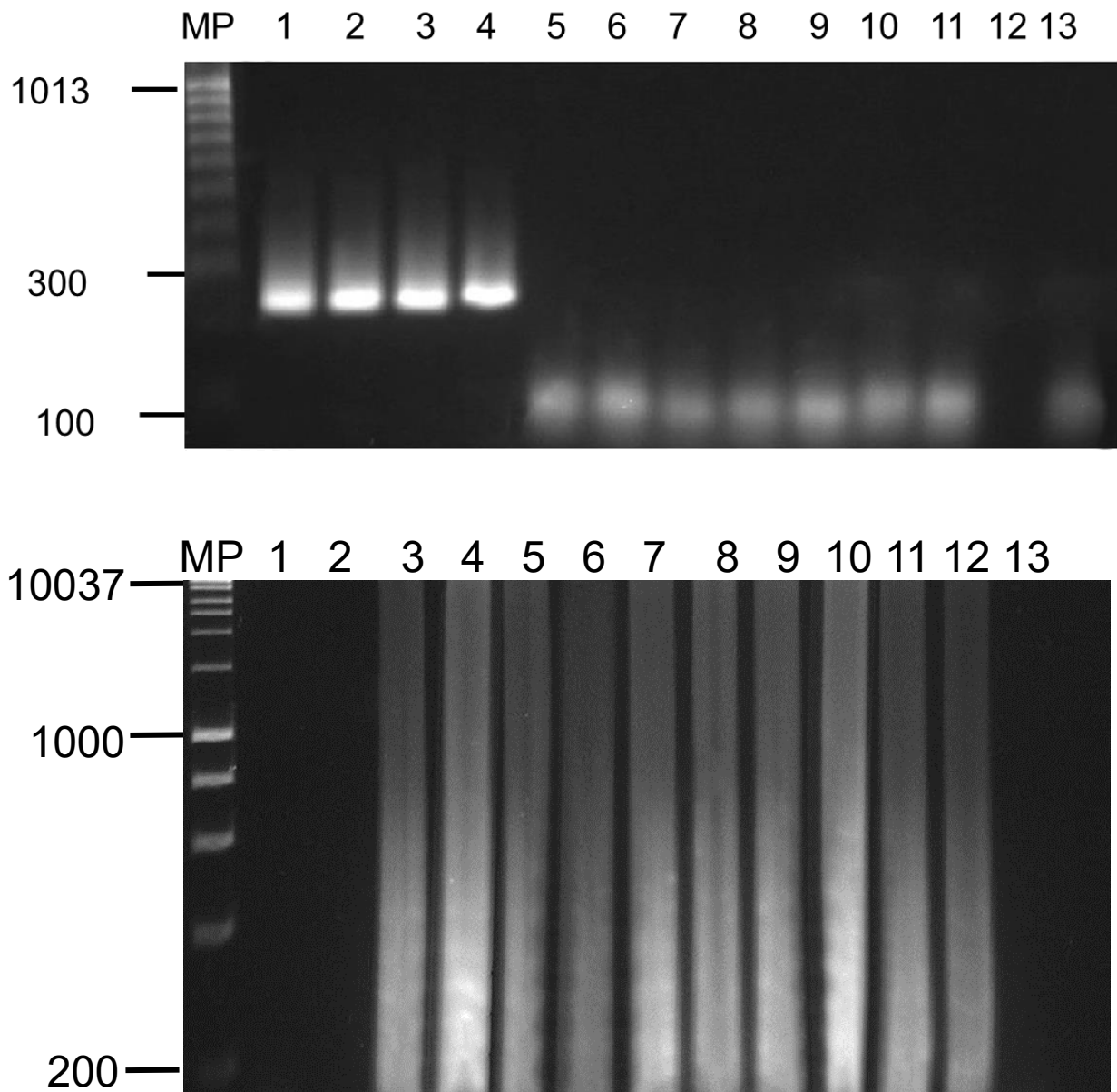
Para comparar la técnica molecular las técnicas moleculares utilizada para el diagnóstico de *B. bovis*, primero se realizaron diluciones seriadas de  $10^2$ - $10^9$  con la finalidad de diluir exponencialmente la muestra de ADNg de *B. bovis* cepa Colima. Las diferentes diluciones realizadas fueron sometidas a la técnica de PCR anidada y a la prueba de LAMP al mismo tiempo y por triplicado. La técnica de PCR anidada detecto una concentración mínima de 0.0112 ng, mientras que la prueba de LAMP detecta una concentración mínima de  $1.12 \times 10^{-8}$  ng. La diferencia de sensibilidad de ambas pruebas fue de  $1 \times 10^6$  ng, siendo la prueba de LAMP más sensible en comparación a la prueba de PCR anidada (Figura 16).



## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

### Facultad de Ciencias Naturales

La técnica de PCR anidada publicada por Figueroa y colaboradores en 1992, tiene muchas limitantes debido a que las secuencias que utilizaron para el diseño de los oligonucleótidos en ese momento no fueron confirmadas por secuenciación para ser específicas en la detección de *B. bovis*. Las bases de datos y programas actuales han permitido mejorar el diseño de los oligonucleótidos para la detección género y especie específicos. En este caso los oligonucleótidos diseñados para la técnica de PCR anidada carecían de una base de datos más robusta y de información para el diseño de estos oligonucleótidos. El diseño de oligonucleótidos para la técnica de LAMP presentada en este trabajo fueron hechos bajo estrictos análisis bioinformáticos, tomando en consideración todas las secuencias genómicas reportadas a nivel mundial en el Genbank. En el caso de la prueba de LAMP, se utilizó una secuencia de un gen conservado en todas las cepas de *B. bovis* reportadas en la base de datos Nucleotide.



**Figura 16.** Determinación y comparación de sensibilidad de las técnicas PCR anidada (Figuroa y col., 1994) y LAMP para la detección de *B. bovis*. **A.** Prueba de PCR anidada para la detección de *B. bovis* diluciones  $1 \times 10^2$ - $1 \times 10^{11}$ . Carriles: **MP.** Marcador de talla molecular de 1kb (Bioline); **1.** Control positivo; **2-11.** Diluciones  $1 \times 10^2$ - $1 \times 10^{11}$ . **13.** Control negativo. La flecha indica un amplicón de ~291 pb. **B.** Prueba de LAMP para la detección de *B. bovis* diluciones  $1 \times 10^2$ - $1 \times 10^{11}$ . Carriles: **MP.** Marcador de talla molecular de 1kb; **1.** Control negativo; **2. -;** **3.** Control positivo; **4-13.** Diluciones  $1 \times 10^2$ - $1 \times 10^{11}$ .



La babesiosis bovina es una enfermedad con alto impacto económico en los países ganaderos. En México, el sector ganadero es de vital importancia para la economía del país ya que se ubica en el séptimo lugar a nivel global en términos de cuanto ganado es producido para fines comerciales. En el 2010, los bovinos constituían la segunda especie ganadera más importante en el país después de la ganadería avícola. A pesar de los pronósticos en incremento de la producción, las enfermedades parasitarias permanecen como un factor importante ya que impactan directamente a la productividad del ganado bovino en México. Estas enfermedades parasitarias pueden obstaculizar el comercio internacional de ganado, por ejemplo el ganado que se intenta exportar a E.E.U.U es inspeccionado en los puertos de entrada y son regresados a México si se encuentra infestado de garrapatas que pueden ser portadoras de enfermedades como la babesiosis (Rodríguez y col., 2017). Debido a esto es de vital importancia el diseño de pruebas que tengan un nivel de detección alto, puedan ser realizadas por personal que no se encuentre capacitado y sobre todo que sea una prueba poco costosa. Las diferentes pruebas que se han desarrollado para el diagnóstico del parásito, tales como el PCR, PCR anidado (AbouLaila y col., 2010), PCR multiplex (Figuroa y col., 1993), qPCR (Iseki y col., 2007) y RLBH (Georges y col., 2001; Paoletta y col., 2017; Silva y col., 2010), aumentan la sensibilidad y especificidad, proporcionando resultados certeros. Sin embargo, muchas de estas pruebas son caras, requieren equipo y personal especializado además de que son tardadas.

Existen dos reportes previos de diseño de la técnica de LAMP que son capaz de detectar tanto a *B. bovis* como *B. bigemina*. La primer técnica de LAMP se desarrolló por Liu y col (2012), en China. Los oligonucleótidos que se utilizaron fueron diseñados a partir de los espaciadores transcritos internos (o por sus siglas en inglés ITS) de esas especies. Sin embargo, esta prueba podría no ser aplicable para otras partes del mundo ya que aunque la prueba no demuestra una reacción cruzada con otro tipo de organismos esta no fue probada con otras cepas de diferentes partes del mundo, por lo cual se limita la aplicación de la prueba al mismo país de donde se desarrolló, además de que se ha reportado que las secuencias ITS son en extremo variables, por lo que es contraproducente extrapolar su uso a otros países con las mismas secuencias. La segunda técnica se desarrolló en 2016. En esta investigación la prueba de LAMP se asoció con un unas tiras marcadas con isotiocianato de fluoresceína como nuevo método de visualización de los resultados y se diseñaron los oligonucleótidos respecto al gen del Citocromo b para detectar tanto a *B. bovis* como a *B. bigemina*. La técnica también demostró ser altamente específica y rápida, sin embargo los gastos



por inversión que requiere la técnica son altos, debido a la elaboración de las tiras para la visualización de los resultados (Yang y col., 2016).

### CONCLUSIÓN

La técnica de LAMP para la detección de *B. bovis* mostró ser específica y más sensible que la prueba de diagnóstico de PCR anidada reportada por Figueroa y colaboradores.

La técnica de LAMP resulta ser una opción para el diagnóstico molecular de *B. bovis*.

### REFERENCIAS

- AbouLaila, M., Yokoyama, N., & Igarashi, I. (2010). Development and evaluation of two nested PCR assays for the detection of *Babesia bovis* from cattle blood. *Veterinary Parasitology*, 172(1–2), 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.04.011>
- Aguilar-delfin, I., Persing, D., Homer, M. J., Aguilar-delfin, I., Iii, S. A. M. R. T., Krause, P. J., & Persing, D. H. (2000). Babesiosis, (May 2014). <https://doi.org/10.1128/CMR.13.3.451-469.2000>
- Ahmed, J. S. (2002). The role of cytokines in immunity and immunopathogenesis of piroplasmoses. *Parasitology Research*, 88(13 Suppl 1), S48-50. <https://doi.org/10.1007/s00436-001-0573-4>
- Allred, D. R. (2003). Babesiosis : persistence in the face of adversity, 19(2), 51–55.
- Allred, D. R., Carlton, J. M., Satcher, R. L., Long, J. A., Brown, W. C., Patterson, P. E., ... Stroup, S. E. (2000). The ves Multigene Family of *B. bovis* Encodes Components of Rapid Antigenic Variation at the Infected Erythrocyte Surface, 5, 153–162.
- Allsopp, M. T. E. P., Waal, D. T. D. E., & Allsopp, B. A. (1994). Phylogeny and evolution of the piroplasms, 147–152.
- Alvarez, A. J., Endsley, J. J., Werling, D., & Estes, D. M. (2009). WC1 + cd T Cells Indirectly Regulate Chemokine Production During *Mycobacterium bovis* Infection in SCID-bo Mice, 56, 275–284. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2009.01081.x>
- Anderson, J. F., & Magnarelli, L. A. (2008). *Biology of Ticks*, 22, 195–215. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2007.12.006>

- Angus, B. M. (1996). The history of the cattle tick *Boophilus microplus* in Australia and achievements in its control. *International Journal for Parasitology*, 26(12), 1341–1355. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(96\)00112-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(96)00112-9)
- Antunes, S., Rosa, C., Couto, J., Ferrolho, J., & Domingos, A. (2017). Deciphering Babesia -Vector Interactions, 7(September), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00429>
- Araujo, F. R. (1998). Comparison between enzyme-linked immunosorbent assay , indirect fluorescent antibody and rapid agglutination tests in detecting antibodies against Babesia bovis, 101–108.
- Babes, V. 1888. Sur l'hémoglobinurie bacterienne du boeuf. *CR Acad Sci.* 107:692–694
- Benavides, E. (2014). Criterios y protocolos para el diagnóstico de hemoparásitos en bovinos, (May).
- Benavides, M. V., Maria, A., & Sacco, S. (2007). Differential Bos taurus cattle response to Babesia bovis infection, 150, 54–64. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.08.022>
- Besuschio, Murcia, L., Benatar, A. F., Monnerat, S., Besuschio, S. A., Kubota, Y., ... Mori, Y. (2017). Analytical sensitivity and specificity of a loop- mediated isothermal amplification ( LAMP ) kit prototype for detection of Trypanosoma cruzi DNA in human blood samples. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(7), e0005779. <https://doi.org/>. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005779>
- Blackman, M. J., & Bannister, L. H. (2001). Apical organelles of Apicomplexa : biology and isolation by subcellular fractionation, 117, 11–25.
- Bock, R., Jackson, L., Vos, A. D. E., & Jorgensen, W. (2004). Babesiosis of cattle Babesiosis of cattle, (February 2004). <https://doi.org/10.1017/S0031182004005190>
- Bonneville, M., Brien, R. L. O., & Born, W. K. (2010). plasticity. *Nature Publishing Group*, 10(7), 467–478. <https://doi.org/10.1038/nri2781>
- Böse, R., W. K. Jorgensen, R. J. Dalgliesh, K. T. Friedhoff, and A. J. de Vos. 1995. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Vet. Parasitol.* 57:61–74.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
Facultad de Ciencias Naturales

- Bowman, S., Lawson, D., Basham, D., Brown, D., Chillingworth T., Churcher M., Craig A., Davies R. M., Devlin K., Feltwell T., Gentles S., Gwilliam R., Hamlin N., Harris D., Hornsby T., Horrocks P., Jagels K., Jassal B., Kyes S., McLean J., Moule S., Mungal K., Murphy L., Oliver K., Quail A., Rajandream M., Rutter S., Skelton J., Squares S., Sulston J., Whitehead S., Woodward J., Newbold C., Barrel B. (1999). The complete nucleotide sequence of chromosome 3 of *Plasmodium falciparum*. *Nature* 400, 532-538.
- Brayton, K. A., Lau, A. O. T., Herndon, D. R., Hannick, L., Kappmeyer, L. S., Berens, S. J., ... Nene, V. M. (2007). Genome Sequence of *Babesia bovis* and Comparative Analysis of Apicomplexan Hemoprotozoa, 3(10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030148>
- Brown, W. C. (2001). Molecular approaches to elucidating innate and acquired immune responses to *Babesia bovis*, a protozoan parasite that causes persistent infection, 101, 233–248.
- Brown, W. C., Logan, K. S., Wagner, G. G., & Tetzlaff, C. L. (1991). Cell-mediated immune responses to *Babesia bovis* merozoite antigens in cattle following infection with tick-derived or cultured parasites. *Infection and Immunity*, 59(7), 2418–2426.
- Brown, W. C., Norimine, J., Knowles, D. P., & Goff, W. L. (2006). Immune control of *Babesia bovis* infection. *Veterinary Parasitology*, 138(1–2), 75–87. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.041>
- Buling, A., Criado-fornelio, A., Asenzo, G., & Benitez, D. (2007). A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*, 147, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.03.031>
- Canto, G. J., Figueroa, J. V., Ramos, J. A., Rojas, E. E., Garcia-Tapia, D., Alvarez, J. A., ... Carson, C. A. (2006). Evaluation of cattle inoculated with *Babesia bovis* clones adhesive in vitro to bovine brain endothelial cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1081, 397–404. <https://doi.org/10.1196/annals.1373.058>
- Cantu, A., Ortega-s, J. A., Mosqueda, J., Garcia-, Z., Henke, S. E., & George, J. E. (n.d.). Immunologic and Molecular Identification of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in Free-Ranging White-Tailed Deer in Northern Mexico.
- Chen, D., Copeman, D. B., Burnell, J. I. M., & Hutchinson, G. W. (2000). Helper T cell and antibody

- responses to infection of CBA mice with *Babesia microti*, (September 1999), 81–88.
- Connor, R. M. O., Long, J. A., Allred, D. R., & Mmun, I. N. I. (1999). Cytoadherence of *Babesia bovis* -Infected Erythrocytes to Bovine Brain Capillary Endothelial Cells Provides an In Vitro Model for Sequestration, *67*(8), 3921–3928.
- Court, R. A., Jackson, L. A., & Lee, R. P. (2001). Elevated anti-parasitic activity in peripheral blood monocytes and neutrophils of cattle infected with *Babesia bovis*, *19*, 29–37.
- Cowman F. A., Crabb S. B.(2006). Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell* *124*, 755-766.
- Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Saraña, A., & Barba-Carretero, J. C. (2003). Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe: Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history. *Veterinary Parasitology*, *114*(3), 173–194. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(03\)00141-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(03)00141-9)
- Criado, A. (2014). A review of nucleic-acid-based diagnostic tests for *Babesia* and *Theileria* , with emphasis on bovine piroplasms, (May).
- Cupp, E. W. (1991). Biology of Ticks. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, *21*(1), 1–26. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(91\)50001-2](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(91)50001-2)
- De, E., & Componentes, I. (1997). Epidemiología de la babe- siosis bovina. I. Componentes Epidemiológicos., (1), 37–47.
- Demessie, Y., & Derso, S. (2015). Tick Borne Hemoparasitic Diseases of Ruminants : A Review, *9*(4), 210–224. <https://doi.org/10.5829/idosi.abr.2015.9.4.9516>
- Dowling, S. C., & Perryman, L. E. (2014). A *Babesia bovis* 225-Kilodalton Spherical-Body Protein : Localization to the Cytoplasmic Face of Infected Erythrocytes after Merozoite Invasion A *Babesia bovis* 225-Kilodalton Spherical-Body Protein : Localization to the Cytoplasmic Face of Infected Erythrocy, (July).
- Duh, D., & Petrovec, M. (2005). Cervids as *Babesia* Hosts , *11*(7), 1121–1123.
- Endsley, J. J., Furrer, J. L., Endsley, M. A., McIntosh, M. A., Maue, A. C., Waters, W. R., ... Estes, D. M. (2004). Characterization of Bovine Homologues of Granulysin and NK-lysin 1.

- Estes, D. M., & Brown, W. C. (2002). Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 90(1–2), 1–10.  
[https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(02\)00201-5](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(02)00201-5)
- Fichera, M. E., & Roos, D. S. (1997). A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites, 1(September), 407–409.
- Figueroa, J. V., Chieves, L.P., Johnson, W.L., Goff, Buening G. M. (1992). Polymerase Chain Reaction-Based Diagnostic assay to detect cattle chronically infected with *Babesia bovis*. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* 36, 47-55.
- Figueroa, J. V., Chieves, L. P., Johnson, G. S., & Buening, G. M. (1993). Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Veterinary Parasitology*, 50(1–2), 69–81.  
[https://doi.org/10.1016/0304-4017\(93\)90008-B](https://doi.org/10.1016/0304-4017(93)90008-B)
- Florin-Christensen, M., Suarez, C. E., Rodriguez, A. E., Flores, D. A., & Schnittger, L. (2014). Vaccines against bovine babesiosis: Where we are now and possible roads ahead. *Parasitology*, 141(12), 1563–1592. <https://doi.org/10.1017/S0031182014000961>
- Fuente, J. De, Antunes, S., Bonnet, S., Cabezas-cruz, A., Domingos, A. G., Estrada-peña, A., ... Johnson, N. (2017). Tick-Pathogen Interactions and Vector Competence : Identification of Molecular Drivers for Tick-Borne Diseases, 7(April), 1–13.  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00114>
- Gaffar, F. R., Yatsuda, A. P., Franssen, F. F. J., & Vries, E. De. (2004a). A *Babesia bovis* merozoite protein with a domain architecture highly similar to the thrombospondin-related anonymous protein ( TRAP ) present in *Plasmodium sporozoites* &, 136, 25–34.  
<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2004.02.006>
- Gaffar, F. R., Yatsuda, A. P., Franssen, F. F. J., & Vries, E. De. (2004b). Erythrocyte Invasion by *Babesia bovis* Merozoites Is Inhibited by Polyclonal Antisera Directed against Peptides Derived from a Homologue of *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen 1, 72(5), 2947–2955. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.5.2947>
- Gale, K. R., Waltisbuhl, D. J., Bowden, J. M., Jorgensen, W. K., Matheson, J., East, I. J., ... Leatch,

- G. (1998). Amelioration of virulent *Babesia bovis* infection in calves by administration of the nitric oxide synthase inhibitor aminoguanidine. *Parasite Immunology*, 20(9), 441–445.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1998.00169.x>
- Georges, K., Loria, G. R., Riili, S., Greco, A., Caracappa, S., Jongejan, F., & Sparagano, O. (2001). Detection of haemoparasites in cattle by reverse line blot hybridisation with a note on the distribution of ticks in Sicily. *Veterinary Parasitology*, 99(4), 273–286.  
[https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00488-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00488-5)
- Ghosh, S., & Bansal, G. C. (2007). Status of tick distribution in Bangladesh , India and Pakistan, 101. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0684-7>
- Goff, W. L., Johnson, W. C., Parish, S. M., Barrington, G. M., & Tuo, W. (2001). The age-related immunity in cattle to *Babesia bovis* infection involves the rapid induction of interleukin-12 , interferon-  $\gamma$  and inducible nitric oxide synthase mRNA expression in the spleen, (18), 463–471.
- Goff, W. L., Mcelwain, T. F., Suarez, C. E., Johnson, W. C., Brown, W. C., Norimine, J., & Knowles, D. P. (2003). Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based on a Rhopty-Associated Protein 1 Epitope Specifically Identifies *Babesia bovis* -Infected Cattle, 10(1), 38–43. <https://doi.org/10.1128/CDLI.10.1.38>
- Goff, W. L., Molloy, J. B., Johnson, W. C., Suarez, C. E., Pino, I., Rhalem, A., ... Mcelwain, T. F. (2006). Validation of a Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Antibodies against *Babesia bovis* □, 13(11), 1212–1216. <https://doi.org/10.1128/CVI.00196-06>
- Goff, W. L., Wagner, G. G., Craig, T. M., & Long, R. F. (1982). ( Mahoney , 1964 ) and indirect fluorescent antibody ( IFA ) ( Ross and Lohr , 1968 ) are especially useful in determining the status of infections ( Mahoney , 1964 ; Johnston and Tammemagi , 1969 ; Todorovic et al . , 1971 ; Leeflang and Perie , 1972 ; Jo, 11, 109–120.
- Gohil, S., Kats, L. M., Sturm, A., & Cooke, B. M. (2010). Recent insights into alteration of red blood cells by *Babesia bovis* : moovin ' forward. *Trends in Parasitology*, 26(12), 591–599.  
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.06.012>
- Goodger, B. V, Wright, I. G., & No, P. B. (1981). © INITIAL CHARACTERIZATION OF



CRYOPRECIPITATES IN CATTLE RECOVERING FROM ACUTE BABESIA BOVIS ( ARGENTINA ) INFECTION ( From the CSIRO , Division of Animal Health , Long Pocket Laboratories , 59, 521–529.

Goto, M., Honda, E., Ogura, A., Nomoto, A., & Hanaki, K. (2009). Short Technical Reports. <https://doi.org/10.2144/000113072>

Graham, E. M., Thom, M. L., Howard, C. J., Boysen, P., Storset, A. K., Sopp, P., & Hope, J. C. (2009). Veterinary Immunology and Immunopathology Natural killer cell number and phenotype in bovine peripheral blood is influenced by age, 132, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.05.002>

Gray, J. S., & Zintl, A. (2018). Vectors of Babesiosis, (September), 1–17.

Gubbels, M., & Duraisingh, M. T. (2012). Evolution of apicomplexan secretory organelles. *International Journal for Parasitology*, 42(12), 1071–1081. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.09.009>

Hein, W. R., & Mackay, C. R. (1991). Prominence of T cells in the ruminant immune system, 12(1), 30–34.

Hines, S. A., Palmer, G. H., Brown, W. C., McElwain, T. F., Suarez, C. E., Vidotto, O., & Rice-ficht, A. C. (1995). *i&IEMcAL*.

Hodgson, J. L., Stiller, D., Jasmer, D. P., Buening, G. M., Wagner, G. G., & McGuire, T. C. (1992). Babesia bigemina : Quantitation of infection in Nymphal Boophilus microplus Using a DNA Probe and Adult protozoan parasite which causes babesiosis losses , but have numerous inherent disad-, 126, 117–126.

Homer, M. J., I. Aguilar-Delfin, S. R. Telford, P. J. Krause, and D. H. Persing. 2000. Babesiosis. *Clin.Microbiol. Rev.* 13:451–469.

Howell, J. M., Ueti, M. W., Palmer, G. H., Scoles, G. A., & Knowles, D. P. (2007). Transovarial transmission efficiency of Babesia bovis tick stages acquired by Rhipicephalus (Boophilus) microplus during acute infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(2), 426–431. <https://doi.org/10.1128/JCM.01757-06>





- Hunfeld, K. P., Hildebrandt, A., & Gray, J. S. (2008). Babesiosis: Recent insights into an ancient disease. *International Journal for Parasitology*, 38(11), 1219–1237.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.03.001>
- Hutchings, C. L., Li, A., Fernandez, K. M., Fletcher, T., Jackson, L. A., Molloy, J. B., ... Cooke, B. M. (2007). New insights into the altered adhesive and mechanical properties of red blood cells parasitized by *Babesia bovis*, 65(July), 1092–1105. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05850.x>
- Hybridization, L. B. (1999). Simultaneous Detection of Bovine Theileria and Babesia Species by Reverse Simultaneous Detection of Bovine Theileria and Babesia Species by Reverse Line Blot, (September 2014).
- Igarashi, I., Suzuki, R., Waki, S., Tagawa, Y., Seng, S., Tum, S., ... Iwakura, Y. (1999). Roles of CD4  $\alpha$  T Cells and Gamma Interferon in Protective Immunity against *Babesia microti* Infection in Mice, 67(8), 4143–4148.
- Iseki, H., Alhassan, A., Ohta, N., Thekiso, O. M. M., Yokoyama, N., Inoue, N., ... Igarashi, I. (2007). Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine *Babesia* parasites. *Journal of Microbiological Methods*, 71(3), 281–287. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.09.019>
- Jacobson, L.S., The South African form of severe and complicated canine babesiosis: clinical advances 1994-2004. *Veterinary parasitology*, 2006, 138, (1-2), 126-139.
- Jalovecka, M., Hajdusek, O., Sojka, D., Kopacek, P., & Malandrin, L. (2018). The Complexity of Piroplasm Life Cycles. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(July).  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00248>.
- Jones, S. H., Lew, A. E., Jorgensen W. K. & Barker S. C. (1997). *Babesia bovis*: Genome Size, Number of Chromosomes and Telomeric Probe Hybridisation. *International Journal for Parasitology* 23(12), 1569-1573.
- Jongejan, F., & Uilenberg, G. (2004). The global importance of ticks.  
<https://doi.org/10.1017/S0031182004005967>
- Jonsson, N. N., Bock, R. E., & Jorgensen, W. K. (2008). Productivity and health effects of

anaplasmosis and babesiosis on *Bos indicus* cattle and their crosses , and the effects of differing intensity of tick control in Australia, 155, 1–9.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.03.022>

Kaneko, H., Kawana, T., Fukushima, E., & Suzutani, T. (2007). Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(3), 499–501. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2006.08.008>

Keeling, P. J., Burger, G., Durnford, D. G., Lang, B. F., Lee, R. W., Pearlman, R. E., ... Gray, M. W. (2005). The tree of eukaryotes. *Trends in Ecology and Evolution*, 20(12), 670–676.

<https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.09.005>

Krantz, G. W. 1978. A Manual of Acarology. Corvallis: Oregon State:Univ.

Laha, R., Das, M., & Sen, A. (2015). Morphology , epidemiology , and phylogeny of *Babesia* : An overview, 94–100. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.162490>

Levine, N. D. 1971. Taxonomy of the Piroplasms. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 90:2–33.

Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P., Clark, D. (2009). Brock. Biología de los microorganismos. Madrid, España: *Pearson Education S.A.*

Mahoney, D. F. (1969). Bovine babesiosis: a study of factors concerned in transmission. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 63(1), 1–14.

<https://doi.org/10.1080/00034983.1969.11686595>

McLaughlin, G.L; Edlind, T.D; Ihler, G.M. Detection of *Babesia bovis* using DNA hybridization. *The journal of protozoology*, 33, (1), 125-128.

Mcguire, T. C., Musoke, A. J., & Diseases, O. A. (1979). Functional properties of bovine IgG1 and IgG2 : interaction with complement , macrophages , neutrophils and skin.

Mohandas, N., & Gallagher, P. G. (2018). ASH 50th anniversary review Red cell membrane : past , present , and future, 112(10), 3939–3949. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-161166>.

Montealegre, F., Levy, M. G., Ristic, M., & James, M. A. (1985). Growth Inhibition of *Babesia bovis* in Culture by Secretions from Bovine Mononuclear Phagocytes, 50(2), 523–526.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
Facultad de Ciencias Naturales

- Mori, Y., K. Nagamine, N. Tomita, and T. Notomi. 2001. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289:150–154.
- Mori, Y., and T. Notomi. 2009. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J. Infect. Chemother. Springer Sci. Bus. Media BV.* 15:62–69.
- Morrison, D. A. (2009). Evolution of the Apicomplexa : where are we now ?, 375–382.  
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.05.010>
- Morzaria, S., J. Katende, A. Kairo, V. Nene, and A. Musoke. 1992. New methods for the diagnosis of *Babesia bigemina* infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 87 Suppl 3:201–205.
- Mosqueda, J., & Cantó, G. J. (2012). Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis, 1504–1518.
- Muraleedharan, K. (2015). Babesia and Babesiosis in Livestock of Karnataka State , India- An Overview, 3(4), 81–88.
- Murray, L., Edwards, L., Tuppurainen, E. S. M., Bachanek-bankowska, K., Oura, C. A. L., Mioulet, V., & King, D. P. (2013). Detection of capripoxvirus DNA using a novel loop-mediated isothermal amplification assay.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12), E63.  
<https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
- Oliver, J. H. (1989). Biology and systematics of ticks (acari:ixodida), (7).
- Owen, A. I. L. (n.d.). RUSA DEER ( *Cervus timorensis* ) AS A HOST FOR THE CATTLE TICK ( *Boo philus micro plus* ) IN PAPUA NEW GUINEA, 13(2), 208–217.
- Palmer, G. H. 1991. Development of diagnostic reagents for anaplasmosis and babesiosis. In: *Recent Developments in the control of Anaplasmosis, Babesiosis and Cowdriosis:*



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
Facultad de Ciencias Naturales

Proceedings of a Workshop Held at ILRAD. The International Laboratory for Research on Animal Diseases. T.T. Dolan, Kenya

Paoletta, M. S., López Arias, L., de la Fournière, S., Guillemi, E. C., Luciani, C., Sarmiento, N. F., ... Wilkowsky, S. E. (2017). Epidemiology of Babesia, Anaplasma and Trypanosoma species using a new expanded reverse line blot hybridization assay. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, (August), 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.08.011>

Pearson, R. D. (1977). B.V.Sc., M.A.C.V.Sc., K. F., 53.

Penzhorn, B. L., Kjemtrup, A. M., Lopez-rebollarf, L. M., Conradf, P. a, & Bag, X. (2001). BABESIA tEO N . SP . FROM LIONS IN THE KRUGER NATIONAL PARK , SOUTH AFRICA , TO OTHER SMALL PIROPLASMS AND ITS RELATION, 87(3), 681–685.

Pérez De Leán, A. A., Strickman, D. A., Knowles, D. P., Fish, D., Thacker, E., De La Fuente, J., ... Pound, J. M. (2010). One health approach to identify research needs in bovine and human babesioses: Workshop report. *Parasites and Vectors*, 3(1). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-36>

Perry, B. D. 1996. Epidemiological indicators and their application to the control of tick-borne diseases. In: Manual on Tick and Tick-borne Disease Control. FAO, Roma.

Potgieter, F. T., & Els, H. J. (1977). THE FINE STRUCTURE OF INTRA-ERYTHROCYTIC STAGES OF BABESIA BIGE-, 44(April).

Rodríguez-Vivas, R. I., Grisi, L., De León, A. A. P., Villela, H. S., De Jesús Torres-Acostaa, J. F., Sánchez, H. F., ... Carrasco, D. G. (2017). Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 8(1), 61–74. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v8i1.4305>

Romero-salas, D., Mira, A., Mosqueda, J., García-vázquez, Z., Hidalgo-ruiz, M., Aditya, N., ... Schnittger, L. (2016). Veterinary Parasitology Molecular and serological detection of Babesia bovis- and Babesia bigemina- infection in bovines and water buffaloes raised jointly in an endemic field. *Veterinary Parasitology*, 217, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.12.030>

- Ristic, M., Sibinovic, S. (1964). Serological diagnosis of *Babesia bigemina* infection in cattle by the indirect fluorescent antibody test. *Res Vet Sci*, 9, 557.
- Rudzinska, M. A., Trager, W., Lewengrub, S. J., & Gubert, E. (1976). An electron microscopic study of *Babesia microti* invading erythrocytes. *Cell and Tissue Research*, 169(3), 323–334. <https://doi.org/10.1007/BF00219605>
- Ruef, B. J., Dowling, S. C., Conley, P. G., Perryman, L. E., Brown, W. C., Jasmer, D. P., & Riceficht, A. C. (2000). A unique *Babesia bovis* spherical body protein is conserved among geographic isolates and localizes to the infected erythrocyte membrane, 105, 1–12.
- Sandbulte, M. R., Platt, R., & Roth, J. A. (2004). T Cells from a High Proportion of Apparently Naive Cattle Can Be Activated by Modified Vaccinia, 17(1), 39–49.
- Schnittger, L., Rodriguez, A. E., Florin-christensen, M., & Morrison, D. A. (2012). Infection , Genetics and Evolution *Babesia* : A world emerging. *INFECTIO, GENETICS AND EVOLUTION*, 12(8), 1788–1809. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.07.004>
- Seetang-nun, Y., Jaroenram, W., Sriurairatana, S., & Suebsing, R. (2013). Visual detection of white spot syndrome virus using DNA-functionalized gold nanoparticles as probes combined with loop-mediated isothermal amplification. *Molecular and Cellular Probes*, 27(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2012.11.005>
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. SENASICA, 2019. <https://www.gob.mx/senasica>.
- Shoda, L. K. M., Palmer, G. H., Florin-Christensen, J., Florin-Christensen, M., Godson, D. L., & Brown, W. C. (2000). *Babesia bovis*-stimulated macrophages express interleukin-1 $\beta$ , interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide and inhibit parasite replication in vitro. *Infection and Immunity*, 68(9), 5139–5145. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.9.5139-5145.2000>
- Silva, M. G., Marques, P. X., & Oliva, A. (2010). Detection of *Babesia* and *Theileria* species infection in cattle from Portugal using a reverse line blotting method. *Veterinary Parasitology*, 174(3–4), 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.08.038>
- Slogan, K. (1992). *Babesia bovis* : Bovine Helper T Cell Lines Reactive Membrane Antigens of

Merozoites with Soluble and, 199, 188–199.

Smith, T., 1859-1934, F. L. Kilborne, and 1858-1936. 1893. Investigations into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever. Available from:  
<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300655646>

Sse, R. B., Jorgensen, W. K., Dalgliesh, R. J., & Friedhoff, K. T. (1995). Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis, 57, 61–74.

Suarez, C. E., & Noh, S. (2011). Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. *Veterinary Parasitology*, 180(1–2), 109–125.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.032>

Tanner, N. A., & Evans, T. C. (2013). Loop-mediated isothermal amplification for detection of nucleic acids. *Current Protocols in Molecular Biology*, (SUPPL.105), 1–14.  
<https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1514s105>

Tomley, F. M., & Soldati, D. S. (2001). Mix and match modules : structure and function of microneme proteins in apicomplexan parasites, 17(2), 81–88.

Trueman, K. F. (1978). THE EFFECT OF AGE ON RESISTANCE OF CATTLE TO BABESIA BOVIS, 54(1969).

Ulienber, G. (1972) Diagnosis of Babesia argentina infection in cattle using brain smear. *Australian veterinary journal*, , 48, (9), 534.

Wagner, G. G., Holman, P., & Waghela, S. (2002). Babesiosis and heartwater: threats without boundaries. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 18(3), 417–430.  
[https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(02\)00027-0](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(02)00027-0)

Wegener, L., Lahr, D. J. G., Knoll, A. H., & Katz, L. A. (2011). Estimating the timing of early eukaryotic diversification with multigene molecular clocks, 108(33), 13624–13629.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1110633108>

Wongsrichanalai, C., Barcus, M. J., Muth, S., Sutamihardja, A., & Wernsdorfer, W. H. (2007). A Review of Malaria Diagnostic Tools : Microscopy and Rapid Diagnostic Test ( RDT ), 77(2), 119–127.



- Wright, I. G. (1979). AFTER SINGLE INFECTIONS WITH PARASITES OF VARIOUS ORIGIN, 55, 3–5.
- Wright, I. G., & Goodger, B. V. (1988). Immunopathophysiology of *Babesia bovis* and *Plasmodium falciparum* Infections, 4(8), 214–218.
- Yang, Y., Li, Q., Wang, S., Chen, X., & Du, A. (2016). Rapid and sensitive detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* by isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *Veterinary Parasitology*. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.02.004>
- Yokoyama, N., Okamura, M., & Igarashi, I. (2006). Erythrocyte invasion by *Babesia* parasites : Current advances in the elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage, 138, 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.037>
- XiaoBo, W., J. HuiTing, Z. YangLong, L. XiuYan, L. Jiao, and N. HongBo. 2016. Rapid and sensitive diagnosis of cattle anaplasmosis by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Pak. Vet. J.* 36:174–17.