

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable

Efecto de los anticuerpos contra la proteína canal-aniónico dependiente de voltaje (VDAC) en el proceso de infección de *Babesia bigemina* en *Rhipicephalus microplus*

TESIS INDIVIDUAL

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestra en Salud y Producción Animal Sustentable

PRESENTA

MVZ Reyna Idaly Ortega Sánchez

CO-DIRIGIDO POR:

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Dra. Minerva Camacho Nuez

SINODALES

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito
Presidente

Dra. Minerva Camacho Nuez
Secretaria

M. C. Diego Josimar Hernández Silva
Vocal

Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú
Vocal

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón
Vocal

Dra. Juana Elizabeth Elton Puente
Directora de la Facultad

Dr. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de investigación y Posgrado

Querétaro, Qro.
Octubre 30, 2018
México



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
MAESTRÍA EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL SUSTENTABLE

Efecto de los anticuerpos contra la proteína canal-aniónico dependiente de voltaje (VDAC) en el proceso de infección de *Babesia bigemina* en *Rhipicephalus microplus*

TESIS

**Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestra en Salud y Producción Animal Sustentable**

Presenta

MVZ Reyna Idaly Ortega Sánchez

Querétaro, Qro. 30 de octubre de 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
MAESTRÍA EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL SUSTENTABLE

Efecto de los anticuerpos contra la proteína canal-aniónico dependiente de voltaje (VDAC) en el proceso de infección de *Babesia bigemina* en *Rhipicephalus microplus*

TESIS

**Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestra en Salud y Producción Animal Sustentable**

Presenta

MVZ Reyna Idaly Ortega Sánchez

Co-dirigida por

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Dra. Minerva Camacho Nuez

Asesores

M. C. Diego Josimar Hernández Silva

Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón

Santiago de Querétaro, 30 de octubre de 2018



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable

Efecto de los anticuerpos contra la proteína canal-aniónico dependiente de voltaje (VDAC) en el proceso de infección de *Babesia bigemina* en *Rhipicephalus microplus*

TESIS INDIVIDUAL

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestra en Salud y Producción Animal Sustentable

PRESENTA

MVZ Reyna Idaly Ortega Sánchez

CO-DIRIGIDO POR:

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Dra. Minerva Camacho Nuez

SINODALES

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito
Presidente

Dra. Minerva Camacho Nuez
Secretaria

M. C. Diego Josimar Hernández Silva
Vocal

Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú
Vocal

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón
Vocal

Dra. Juana Elizabeth Elton Puente
Directora de la Facultad

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de investigación y Posgrado

Querétaro, Qro
Octubre 30, 2018
México

Resumen

Babesia bigemina es un protozoo intraeritrocítico que causa anemia hemolítica en bovinos y es uno de los agentes causales de la babesiosis bovina en México, causa pérdidas económicas debido a la baja en la producción de leche y carne, además de la muerte de animales que no son tratados a tiempo. En México la garrapata del ganado *Rhipicephalus microplus* es vector de enfermedades como la babesiosis y la anaplasmosis bovina que afectan al ganado bovino, ocasionando pérdidas económicas a causa de la baja en la producción y por gastos asociados al tratamiento con acaricidas. El uso continuo de acaricidas como principal método de control ha ocasionado que las garrapatas generen resistencia, además de dejar residuos químicos en los productos pecuarios y el medio ambiente, lo que ocasiona preocupación en la sociedad. Un método de control no químico es el uso de vacunas, pero actualmente no se cuenta con vacunas comerciales efectivas para el control de infestaciones por garrapatas en el ganado. La proteína canal-aniónico dependiente de voltaje (BmVDAC) fue identificada en el 2013 en garrapatas de la especie *Rhipicephalus microplus*. BmVDAC se sobreexpresa en células del intestino de garrapatas que se alimentan con sangre de bovino infectada con *Babesia bigemina*. El propósito de este trabajo es evaluar la eficacia de los anticuerpos contra BmVDAC en la actividad de bloqueo de infección de *Babesia bigemina* en *Rhipicephalus microplus* y su capacidad inmunoprotectora contra las garrapatas. Para esto, bovinos provenientes de zona libre de babesiosis bovina y garrapata del ganado; se dividieron en tres grupos de cinco animales cada uno: el grupo uno fue inmunizado con adyuvante, el grupo dos y tres fueron inmunizados, con 100 µg de VDAC recombinante (rBmVDAC) resuspendida en adyuvante. Después de la tercera inmunización se determinó la producción de anticuerpos contra rBmVDAC usando la técnica de ELISA indirecta, utilizando diluciones de los sueros bovinos de 1:100 y 1:500 y los resultados se evaluaron por medio de una prueba de ANOVA con una significancia del 95%, se encontró el valor de $p=0.000$. Posteriormente los bovinos de los tres grupos fueron infestados con larvas *Rhipicephalus microplus* y los grupos uno y dos fueron infectados con *Babesia bigemina*. Se evaluó el efecto de los anticuerpos contra la proteína rBmVDAC por medio de la determinación de supervivencia, peso, ovoposición y fertilidad de huevos utilizando un análisis estadístico de ANOVA con un valor de significancia del 95% y con el uso de fórmulas para determinar la eficacia de la inmunización. Los resultados del análisis de ANOVA fueron los siguientes: número de garrapatas $p=0.000$, peso de garrapatas: $p=0.020$ y peso de huevos $p=0.058$. En el grupo 1 se encontró una eficiencia de inmunización de 23% y en el grupo 3 se encontró una eficiencia de 88%. La infección de *Babesia bigemina* en el grupo 1 y grupo 2 se determinó por medio de qRT-PCR de muestras de garrapatas repletas de cada uno de los grupos por medio de la amplificación de *gapdh* de *B. Bigemina* y *esterasa* de *R. microplus*, se utilizó el método $\Delta\Delta Ct$ para la normalización de los datos y posteriormente se evaluaron los resultados por medio del análisis estadístico de ANOVA con una significancia del 95% y se encontró un valor de $p=0.326$.

Palabras clave: *Babesia bigemina*, BmVDAC, *Rhipicephalus microplus*, inmunización, bloqueo de transmisión

Summary

Babesia bigemina is an intraerythrocytic protozoon that causes hemolytic anemia in cattle and is one of the causal agents of bovine babesiosis in Mexico, causes economic losses due to the decrease in the production of milk and meat, in addition to the death of animals that are not treated on time. In Mexico, the cattle tick *Rhipicephalus microplus* is a vector of diseases such as babesiosis and bovine anaplasmosis that affect cattle, causing economic losses due to the decrease in production and costs associated with treatment with acaricides. The continued use of acaricides as the main control method has caused ticks to generate resistance, in addition to leaving chemical residues in livestock products and the environment, which causes concern in society. A method of non-chemical control in the use of vaccines, but currently there are no effective commercial vaccines for the control of tick infestations in cattle. The voltage dependent channel-anionic protein (BmVDAC) was identified in 2013 in ticks of the species *Rhipicephalus microplus*. BmVDAC is overexpressed in cells of the intestine of ticks that feed on bovine blood infected with *Babesia bigemina*. The purpose of this work is to evaluate the efficacy of antibodies against BmVDAC in the blocking activity of *Babesia bigemina* infection in *Rhipicephalus microplus* and its immunoprotective capacity against ticks. For this, cattle coming from cattle-free bovine babesiosis and tick-free zone; were divided into three groups of five animals each: group one was immunized with adjuvant, group two and three were immunized, with 100 µg of recombinant VDAC (rBmVDAC) resuspended in adjuvant. After the third immunization, the production of antibodies against rBmVDAC was determined using the indirect ELISA technique, using dilutions of bovine sera of 1: 100 and 1: 500 and the results were evaluated by means of an ANOVA test with a significance of 95%, the value of $p = 0.000$ was found. Subsequently the cattle of the three groups were infested with larvae *Rhipicephalus microplus* and groups one and two were infected with *Babesia bigemina*. The effect of the antibodies against the rBmVDAC protein was evaluated by means of the determination of survival, weight, oviposition and fertility of eggs using a standard ANOVA analysis with a significance value of 95% and with the use of formulas to determine the efficacy of immunization. The results of the ANOVA analysis were the following: number of ticks $p = 0.000$, weight of ticks: $p = 0.020$ and weight of eggs $p = 0.058$. In group 1 an immunization efficiency of 23% was found and in group 3 an efficiency of 88% was found. The infection of *Babesia bigemina* in group 1 and group 2 was determined by means of qRT-PCR of samples of ticks filled with each of the groups by means of the amplification of gapdh of *B. bigemina* and esterase of *R. microplus*, use the $\Delta\Delta C_t$ method for the normalization of the data and later the results were evaluated by means of the statistical analysis of ANOVA with a significance of 95% and a value of $p = 0.326$ was found.

Keywords: *Babesia bigemina*, BmVDAC, *Rhipicephalus microplus*, immunization, transmission- blocking

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Querétaro por permitirme cursar el programa de Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable en la Facultad de Ciencias Naturales.

A mis directores de tesis Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito y Dra. Minerva Camacho Nuez por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y por su asesoría para realizar el presente proyecto.

A M. C. Diego Josimar Hernández Silva por su gran ayuda de asesoría en laboratorio y trabajo experimental.

A los miembros de mi comité de evaluación Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón y Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para cursar mis estudios de maestría.

A MVZ Gilberto Reyes de Luna por su gran ayuda durante el periodo de inmunizaciones y manejo de bovinos.

A MVZ José Rodrigo Morales García por su gran ayuda durante el periodo experimental, manejo de bovinos y conteo de larvas.

A MSPAS Roberto Guerrero por su gran ayuda durante el periodo experimental y manejo de bovinos.

A mis compañeros de laboratorio por su ayuda durante la movilización de bovinos MVZ Cristian Figueroa, MVZ Christopher Narro, MVZ Lorena Lara, MVZ Eréndira Peña, M. C. Mario Hidalgo, I. A. Z. Jesús Hernández y I. A. Z. Rodrigo Sánchez.

A MVZ Miguel Flores y MVZ Rodrigo Galván por su ayuda en la alimentación de bovinos.

A Dra. Jaqueline Castañeda, Dr. Máximo Berto Martínez Benítez, Dra. Isabel Carbajal, M. C. Martina Pérez, Lic. en Genómica Ana Laura Luna y Lic. en Genómica Karen Puente por su asesoría en técnicas de laboratorio.

A mis padres por su apoyo constante a lo largo de mi vida.

ÍNDICE

Resumen	ii
Summary	iii
Agradecimientos	iv
ÍNDICE	v
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Parasitosis por <i>R. microplus</i>	3
2.1.1 Clasificación taxonómica de <i>R. microplus</i>	3
2.1.2 Ciclo biológico de <i>R. microplus</i>	3
2.1.3 Patogenia	5
2.1.4 Signos clínicos	6
2.1.5 Diagnóstico	6
2.1.6 Tratamiento	6
2.2 Babesiosis bovina	7
2.2.1 Clasificación taxonómica de <i>B. bigemina</i>	8
2.2.2 Ciclo biológico de <i>B. bigemina</i>	8
2.2.3 Patogenia	11
2.2.4 Signos clínicos	11
2.2.5 Diagnóstico	11
2.2.5.1 Microscopia	12
2.2.5.2 Fijación de complemento	12
2.2.5.3 Hemoaglutinación indirecta	12
2.2.5.4 Cultivo <i>in vitro</i>	13
2.2.5.5 Inmunofluorescencia indirecta	13
2.2.5.6 Isotest	14
2.2.5.7 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas	14

(ELISA)	
2.2.5.8 Amplificación isotérmica mediada por asas	15
(LAMP)	
2.2.5.9 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	15
2.2.5.10 Reacción en cadena de la polimerasa	16
tiempo real cuantitativa	
2.2.6 Tratamiento	17
2.3 Vacunas bloqueadoras de transmisión	17
2.4 Vacunas contra <i>Babesia</i> spp.	18
2.4.1 Vacunas vivas	18
2.4.2 Vacunas congeladas	19
2.5 Vacunas contra garrapatas en bovinos	19
2.6 Candidatos vacunales contra <i>R. microplus</i>	22
2.6.1 Bm 86	22
2.6.2 Bm91	22
2.6.3 Subolesina	23
2.6.4 Péptido P0	23
2.6.5 Inhibidor de la tripsina	24
2.6.6 Inhibidor de la serina proteasa (serpins)	24
2.6.7 Inhibidor de la trombina	25
2.6.8 Péptido ATAQ	25
2.7 Canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC)	27
2.8 Antecedentes directos de BmVDAC	27
III. JUSTIFICACIÓN	29
IV. HIPÓTESIS	30
V. OBJETIVOS	31
5.1 Objetivo general	31
5.2 Objetivos específicos	31
VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	32
6.1 Objetivo 1	32

6.2 Objetivo 2	33
6.3 Objetivo 3	33
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	34
7.1 Material biológico	35
7.2 Inducción y purificación de rBmVDAC	35
7.3 Electroforesis de proteínas en SDS/PAGE	35
7.4 Western Blot	37
7.5 Examen físico de bovinos	37
7.6 Inmunizaciones	38
7.7 ELISA indirecta	38
7.8 Infección con <i>B. bigemina</i>	39
7.9 Infestación con larvas <i>R. microplus</i>	39
7.10 Colecta de garrapatas	40
7.11 Pesaje de huevos	40
7.12 Conteo de larvas y huevos sin eclosionar	41
7.13 Extracción de DNA	41
7.14 Detección de <i>B. bigemina</i> en larvas y garrapatas	41
7.15 Clonación de <i>ama-1</i>	41
7.16 Amplificación de <i>gapdh</i> para qRT-PCR	42
7.17 Cuantificación de <i>B. bigemina</i> por qRT-PCR	43
7.18 ELISA indirecta	43
7.19 Análisis estadísticos	44
7.20 Evaluación de la eficacia de la vacuna	44
7.20.1 Efecto en el número de garrapatas	45
7.20.2 Efecto en el peso de las garrapatas	45
7.20.3 Efecto en la ovoposición	45
7.20.4 Efecto en la fertilidad de los huevos	45
7.20.5 Eficacia de la vacuna	46
7.21 Análisis estadístico para qRT-PCR	46
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46

8.1 Inducción de rBmVDAC	47
8.2 Purificación de rBmVDAC	47
8.3 Cuantificación de rBmVDAC	47
8.4 Examen físico de bovinos	48
8.5 ELISA indirecta	48
8.6 Temperatura corporal y hematocrito de bovinos infectados	49
8.7 Análisis estadístico de número de garrapatas, peso de garrapatas, ovoposición, fertilidad y eficacia de la vacuna	49
8.7.1 Número de garrapatas	50
8.7.2 Peso de garrapatas	53
8.7.3 Ovoposición	60
8.7.4 Fertilidad de huevos	62
8.8 Eficacia de la vacuna	62
8.9 Extracción de DNA	65
8.10 Detección de <i>B. bigemina</i> en garrapatas	68
8.11 PCR de <i>ama-1</i>	71
8.12 PCR de colonia	72
8.13 Purificación de plásmido	76
8.14 PCR de GAPDH	76
8.15 qRT-PCR garrapatas y larvas	78
IX. CONCLUSIONES	79
X. APÉNDICE	80
10.1 Constantes fisiológicas del bovino	83
XI. LITERATURA CITADA	84

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Clasificación taxonómica de <i>R. microplus</i>	3
2	Clasificación taxonómica de <i>B. bigemina</i>	8
3	Concentración de rBmVDAC	50
4	Resultados de examen físico de becerro Holstein	51
5	Resultados de examen físico de bovinos del grupo 1	51
6	Resultados de examen físico de bovinos del grupo 2	52
7	Resultados de examen físico de bovinos del grupo 3	52
8	Diluciones de suero de bovino	60
9	Temperatura corporal, hematocrito y parasitemia del becerro Holstein	61
10	Temperatura corporal y hematocrito de bovinos del grupo 1	61
11	Temperatura corporal y hematocrito de bovinos del grupo 2	62
12	Número de garrapatas colectadas	63
13	ANOVA: número de garrapatas	64
14	HSH Tukey: número de garrapatas	64
15	ANOVA: peso de garrapatas	66
16	HSH Tukey: peso de garrapatas	66
17	Peso de huevos	68
18	ANOVA: peso de huevos	69
19	HSH Tukey: peso de huevos	70
20	Número de larvas y huevos sin eclosionar	71
21	Eficacia de rBmVDAC	72
22	Eficacia de otros candidatos vacunales	72
23	Cuantificación de <i>B. bigemina</i> en hembras repletas	73
24	Cuantificación de <i>B. bigemina</i> en larvas	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ciclo biológico de <i>R. microplus</i>	5
2	Ciclo biológico de <i>B. bigemina</i>	10
3	SDS/PAGE de cultivo de rBmVDAC	48
4	Western Blot de inducción de rBmVDAC	48
5	SDS/PAGE de fracciones purificadas de rBmVDAC	49
6	Curva estándar de ensayo de Bradford con albúmina sérica bovina	50
7	ELISA indirecta. Grupo 1 dilución 1:100	54
8	ELISA indirecta. Grupo 2 dilución 1:100	55
9	ELISA indirecta. Grupo 3 dilución 1:100	56
10	ELISA indirecta. Grupo 1 dilución 1:500	57
11	ELISA indirecta. Grupo 2 dilución 1:500	58
12	ELISA indirecta. Grupo 3 dilución 1:500	59
13	Número de garrapatas colectadas	63
14	Huevos obtenidos de los tres grupos	69
15	Larvas y huevos sin eclosionar	71
16	Integridad de DNA de garrapatas	76
17	Detección de <i>B. bigemina</i> en larvas	76
18	Detección de <i>B. bigemina</i> en garrapatas	77
19	PCR de <i>ama-1</i>	77
20	PCR de colonia de <i>ama-1</i>	78
21	Purificación de TOPO- <i>ama-1</i>	78
22	PCR de <i>gapdh</i> de <i>B. bigemina</i>	79

I. INTRODUCCIÓN

La babesiosis bovina es causada por un protozooario intraeritrocítico del género *Babesia* que se caracteriza por la presencia de fiebre, anemia, hemoglobinuria y puede ocasionar la muerte de animales que no reciben un tratamiento oportuno (Reik, 1964). Esta enfermedad afecta al ganado bovino de zonas geográficas con clima tropical y subtropical de América, Asia, África y Australia. En México las especies que infectan al ganado bovino son *Babesia bigemina* y *Babesia bovis* y la enfermedad que ocasionan afecta la economía de los productores, a causa de la disminución de peso corporal de los animales y por ende la baja de producción de leche, carne y calidad de pieles (Bose *et al.*, 1995; Huston, 1994).

El principal vector de la babesiosis bovina en México es la garrapata del ganado *Rhipicephalus microplus*, que ocasiona pérdidas económicas al aumentar los gastos de producción debido a la aplicación de tratamientos con acaricidas para el control de las garrapatas y tratamiento para la babesiosis bovina (Rodríguez-Vivaz *et al.*, 2017). Con el uso continuo de acaricidas las garrapatas han creado resistencia contra estos productos químicos, por lo cual los acaricidas se están volviendo ineficientes como método de control contra garrapatas (Piper *et al.*, 2009). Otro inconveniente con el uso de acaricidas es que derivado del uso de ellos, pueden quedar residuos químicos en productos pecuarios como la carne y leche, y en el medio ambiente, generando preocupación en la sociedad, por lo cual es necesaria otra alternativa de control de garrapatas que no ponga en riesgo la salud pública y medio ambiente (Beltacao *et al.*, 2013). Una opción de control no químico de garrapatas es el uso de vacunas, algunas de sus ventajas es que no contaminan los productos pecuarios, medio ambiente y no representan un riesgo para los operadores (Frisch, 1999).

Dos vacunas comerciales que tuvieron buenos resultados en el control de las infestaciones de los bovinos por las garrapatas son Gavac y Tick GARD; la primera actualmente solo se encuentra disponible en algunos países de sur América y la

segunda ya no se encuentra disponible en el mercado. Actualmente se estudian antígenos de garrapatas para encontrar candidatos vacunales con eficiencia del 90% o superior, lo que ha llevado al estudio de varios antígenos de garrapatas (de la Fuente *et al.*, 2007).

Con los avances en los últimos años en las áreas de biología molecular y proteómica se han identificado proteínas cuya expresión varía en las garrapatas infectadas con *B. bigemina*, lo que convierte a esas proteínas en excelentes candidatos como vacunas bloqueadoras que evitan la transmisión del protozoario de la garrapata al bovino, además de afectar el peso, número y fertilidad de huevos de las garrapatas (Merino *et al.*, 2013).

La proteína canal aniónico dependiente de voltaje de *R. microplus* (BmVDAC) se encuentra en células epiteliales del intestino. En un trabajo realizado por Rodríguez *et al.*, 2015 encontraron que esta proteína se sobreexpresa a las 12 y 24 horas post-repleción en hembras alimentadas con sangre de bovino infectada con *B. bigemina*, lo cual sugiere que BmVDAC y *B. bigemina* interactúan durante la infección del protozoario a las células epiteliales del intestino de la garrapata.

En el presente trabajo se utilizó rBmVDAC para la inmunización de bovinos con el objetivo de determinar su efecto en el bloqueo de transmisión de *B. bigemina*, además se evaluó su eficacia como inmunógeno en bovinos mediante la técnica de ELISA indirecta y el efecto de los anticuerpos contra rBmVDAC determinando la eficacia de la vacuna en las garrapatas infectadas y no infectadas con *B. bigemina*, además de evaluar la infección de *B. bigemina* en las garrapatas de los grupos: el grupo 1 fue inmunizado con adyuvante, infestado con larvas *R. microplus* e infectado con *B. bigemina*, el grupo 2 fue inmunizado con rBmVDAC resuspendida en adyuvante, infestado con larvas *R. microplus* e infectado con *B. bigemina* y el grupo 3 fue inmunizado con rBmVDAC e infestado con larvas *R. microplus*.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Parasitosis por *R. microplus*

Las garrapatas son parásitos externos que se alimentan de la sangre del hospedador vertebrado para sobrevivir (Brake & Pérez, 2012).

Las especies de garrapatas del género *Rhipicephalus* afectan la producción del ganado de zonas tropicales y subtropicales en el mundo. La infestación en el ganado ocasiona baja producción de leche y carne, pérdida de peso y pieles de mala calidad (Almazán *et al.*, 2010; Fragoso *et al.*, 1998). En México *R. microplus* es vector de parásitos como *B. bigemina*, *B. bovis* y *Anaplasma marginale* (Johnsson & Jorgensen, 2008).

2.1.1 Clasificación taxonómica de *R. microplus*

R. microplus es una garrapata de la familia *Ixodidae*, los miembros de esta familia se caracterizan por ser garrapatas duras, presentar escudo y estar aplanadas dorsoventralmente (Reik, 1964). En el cuadro 1 se encuentra la clasificación taxonómica de *R. microplus* (Bowman & Nutall, 2008; Callow & Hoyle, 1961):

Cuadro 1. Clasificación de *R. microplus*

Reino	Animalia
Filo	Arthropoda
Clase	Arachnida
Orden	Acarina
Familia	Ixodidae
Género	<i>Rhipicephalus</i>
Especie	<i>microplus</i>

2.1.2 Ciclo biológico de *R. microplus*

El ciclo de vida de *R. microplus* consta de dos etapas:

1. Etapa parasítica: este período tiene una duración de 21 días, en los cuales la garrapata se encuentra sobre el hospedador vertebrado alimentándose de

su sangre. Cuando las larvas entran en contacto con el hospedador, localizan un sitio para alimentarse, introduciendo las partes bucales en la piel del bovino y haciendo movimientos repetitivos hasta encontrar sangre (Figura 1, B). Una vez fija, se alimenta durante un período de 5-6 días para después mudar a ninfa (Figura 1, C), en este estadio se alimenta durante 6-8 días hasta mudar a la fase adulta (Figura 1, D). Durante su alimentación las garrapatas secretan saliva que contiene moléculas que inyecta para evadir la respuesta inmune del bovino gracias a su actividad anti hemostática e inmunosupresora, utilizando factores anti hemostáticos, vasodilatadores, inhibidores de agregación plaquetaria, prostaglandinas y anticoagulantes que inyectan en el sitio de la mordida, además la saliva se encarga de disolver azúcar sólida, lubricación de quelíceros, metabolismo de agua y iones, excreción de exceso de agua adquirida en la sangre que al hospedador (Xu *et al.*, 2016; Takagi *et al.*, 2006; Tatchell, 1969). La hembra adulta permanece sobre el bovino por 7-12 días más mientras se alimenta de sangre, se aparea y completa su repleción (García, 2010). La saliva de las garrapatas facilita la infección por *B. bigemina* en el bovino gracias a su actividad antiinflamatoria e inmunosupresora (Homer *et al.*, 2000).

2. Etapa no parasítica: Inicia cuando a los 21 días después que la larva ha infestado al bovino, la hembra repleta se cae al suelo (Figura 1, E) y comienza a ovopositar (hasta 3000 huevos, Figura 1, F). Los huevos eclosionan aproximadamente 2-7 meses después de la ovoposición, dependiendo de las condiciones medioambientales. Las larvas pueden sobrevivir (Figura 1, A) hasta por ocho meses, durante ese tiempo buscan un hospedador para continuar con su ciclo de vida (García, 2010).

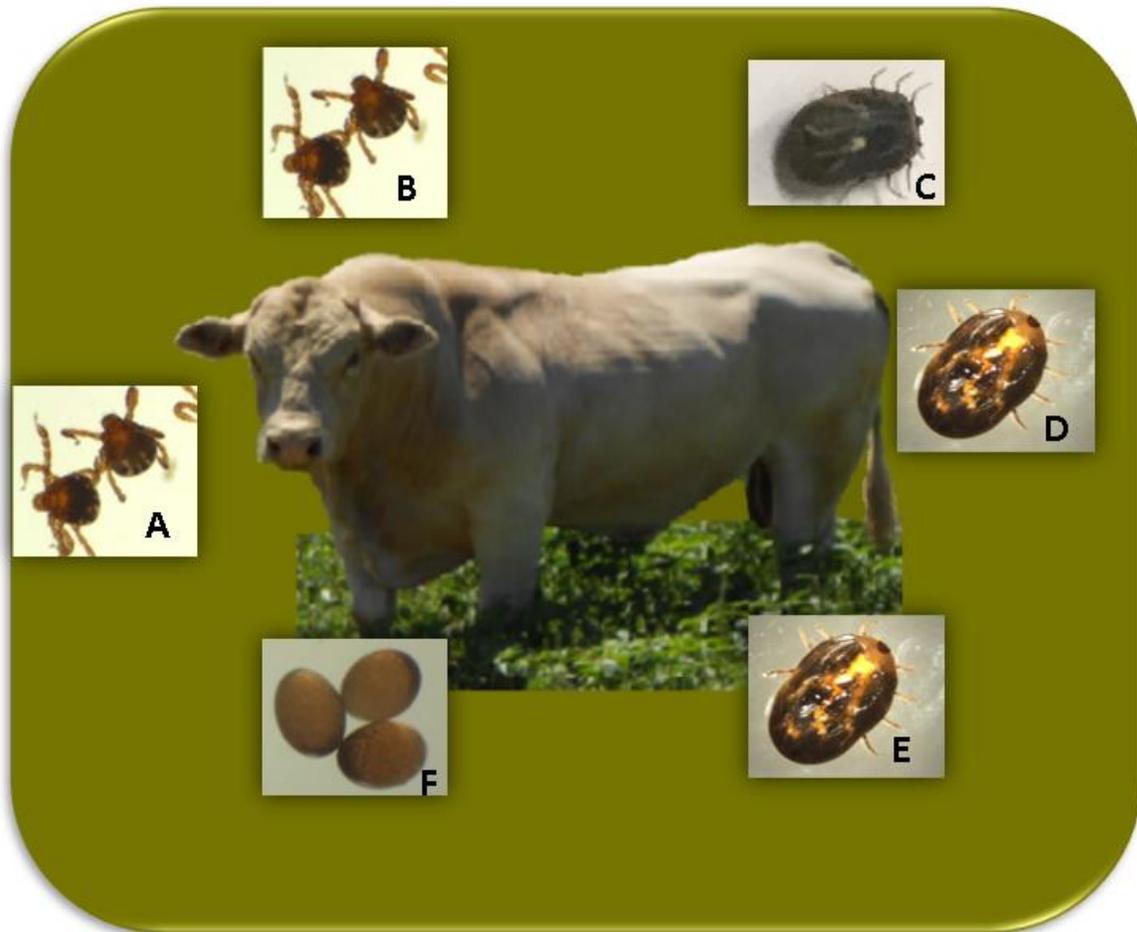


Figura 1. Ciclo biológico de *R. microplus*. A: larvas, B: larvas, C: ninfa, D: hembra repleta, E: hembra repleta, F: huevos (Ortega, 2016).

2.1.3 Patogenia

R. microplus causa baja producción en bovinos destinados a diferentes fines zootécnicos, las afecciones de mayor importancia son: anemia, lesiones en la piel y transmisión de enfermedades como la babesiosis y anaplasmosis (Ibelli *et al.*, 2012).

Durante el periodo de alimentación, *R. microplus* causa destrucción de tejido y succión de sangre, lo que ocasiona dolor, hinchazón, coagulación de sangre, inflamación, activación de complemento y respuesta de reparación de tejido (Tirloni *et al.*, 2016).

2.1.4 Signos clínicos

La infestación del ganado bovino con garrapatas *R. microplus* ocasiona daño en la piel, a causa de los quelíceros que utiliza para adherirse y alimentarse de la sangre, estrés, anemia, disminución en la ganancia diaria de peso, baja en la producción de leche y en infestaciones altas puede ocasionar la muerte. Cada hembra se alimenta de aproximadamente 1.5 mL de sangre del bovino (Rand *et al.*, 1989; García, 2010; Johnsson & Jorgensen, 2008; Beltacao *et al.*, 2013).

2.1.5 Diagnóstico

En infestaciones altas se observan garrapatas en todo el cuerpo del animal, mientras que en una infestación baja las garrapatas se encuentran distribuidas en zonas específicas como cuello, pecho, base de la cola, abdomen, pliegues de la ingle, testículos y ubre, lo que hace posible el diagnóstico de la infestación (García, 2010).

2.1.6 Tratamiento

El principal método de control contra garrapatas es el uso de acaricidas, los medicamentos más utilizados pertenecen a las familias de organofosforados, organoclorados, carbamatos, amidinas y piretroides sintéticos (Ibelli *et al.*, 2012; Frisch, 1999) a continuación, se muestran tres ejemplos:

La ivermectina se aplica en dosis de 0.2 mg/Kg vía intramuscular en dosis única, tiene un tiempo de retiro de 30-40 días (Frisch, 1999).

El fluazurón se aplica en dosis de 2.5 mg/Kg con aplicación de aspersión en dosis única, tiene un periodo de retiro de 40-50 días. Este producto se almacena en tejido adiposo y pasa a los becerros a través del calostro (Frisch, 1999).

La doramectina se utiliza a una dosis de 0.2 mg/Kg vía intramuscular en dosis única, es altamente efectiva en eliminar infestaciones y además tiene acción profiláctica hasta por 20 días en condiciones de re-infestaciones continuas (Gonzales *et al.*, 1993).

2.2 Babesiosis bovina

La babesiosis es una infección causada por un parásito intraeritrocítico del género *Babesia* que se caracteriza por la lisis de los eritrocitos ocasionando anemia, ictericia, hemoglobinuria y la muerte (Assadian & Stanek, 2002; Homer *et al.*, 2000; Howell *et al.*, 2007). Esta enfermedad que se encuentra en zonas con clima tropical y subtropical, es de gran importancia económica en la ganadería de África, Asia, Australia y América, ya que tres cuartos de la población bovina se encuentran en regiones endémicas del vector de la enfermedad (Böse *et al.*, 1995). La babesiosis bovina es conocida como fiebre del ganado del sur, fiebre mexicana, fiebre española, fiebre esplénica y enfermedad de garrapata en el ganado (Huston, 1994).

La babesiosis bovina fue reportada por primera vez en Rumania en el año 1888 por Víktor Babes, quien estudiaba una enfermedad que causaba hemoglobinuria en el ganado y detectó la presencia de cuerpos de inclusión intraeritrocíticos en sangre de ganado infectado a los que llamo *Haematococcus bovis* (Babes, 1888). En 1868 en EE.UU más de 70000 bovinos Longhorns llevados del estado de Kansas a Texas presentaron signos de una extraña enfermedad, los animales provenientes de Kansas murieron, pero los animales de Texas aparentemente estaban saludables, los granjeros llamaron a esta enfermedad Fiebre de Texas (Texas fever). Ellos observaron que al mezclar ganado proveniente del norte con ganado de Texas al cual le habían sido retiradas las garrapatas previamente, ningún animal enfermaba de Fiebre de Texas, pero cuando las garrapatas del ganado de Texas infestaban al ganado proveniente del norte estos bovinos morían días después (Assadian & Stanek, 2002).

En 1893 Theobald Smith y Frederick Kilbourne de la oficina de la industria animal de EE. UU., publicaron resultados que demostraban que las garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* eran las responsables de transmitir la enfermedad de Fiebre de Texas al ganado, Smith llegó a la conclusión: “no garrapatas, no Fiebre de Texas”. Al patógeno responsable de la enfermedad lo nombro *Pyrosoma bigeminum* que ahora conocemos como *B. bigemina* (Smith &

Kilbourne, 1893) En Norteamérica los vectores responsables de transmitir la babesiosis bovina son *R. microplus* y *R. annulatus* (Assadian & Stanek, 2002).

Desde 1942 la babesiosis bovina se considera erradicada de los Estados Unidos de América (Assadian & Stanek, 2002).

2.2.1 Clasificación taxonómica

El género *Babesia* es el segundo género de mayor importancia en el mundo con respecto a patógenos sanguíneos, debido a su distribución geográfica y al número de especies animales a las que afecta. Un poco más de 100 especies pertenecientes a este género se han identificado (Homer *et al.*, 2000). En el cuadro 2 podemos observar la clasificación taxonómica de *B. bigemina* (Lanford, 1962):

Cuadro 2. Clasificación taxonómica de *Babesia bigemina*

Reino	Protista
Filo	Apicomplexa
Clase	Sporozoa
Orden	Piroplasmida
Familia	Babesiidae
Género	<i>Babesia</i>
Especie	<i>bigemina</i>

2.2.2 Ciclo biológico de *B. bigemina*

Los parásitos Apicomplexa generalmente presentan tres etapas de reproducción:

- Gametogonia: etapa en la cual se lleva a cabo la formación y fusión de los gametos dentro de las células del intestino de la garrapata.
- Esporogonia: reproducción asexual del protozooario en las glándulas salivares de la garrapata.
- Merogonia: etapa de reproducción asexual en eritrocitos bovinos (Homer *et al.*, 2000).

Cuando las garrapatas se alimentan de sangre de bovino infectada con *B. bigemina*, el protozoario se encuentra dentro de los eritrocitos del bovino. Entre las 24-48 horas post-repleción los protozoarios presentan núcleos picnóticos, citoplasma vacuolado y la célula pierde su forma de pera, para adquirir una forma de cigarro de 8-10 μ de largo y 3.5-4.5 μ de ancho, posteriormente se desarrolla a un cuerpo esférico con vacuolas y cromatina separadas alrededor de la periferia (Reik, 1964).

Después ocurre la reproducción sexual, por medio de la fusión de dos gametos (uno femenino y uno masculino), para convertirse en cigoto que utiliza una estructura llamada Strahlenkörper o cabeza de flecha para infectar a las células epiteliales del intestino de la garrapata. A las 24-40 horas post-repleción las células del epitelio del intestino están invadidas por parásitos en distintas etapas de desarrollo (Reik, 1964).

En las 40-60 horas post-repleción los protozoarios tienen forma globular y son conocidos como cuerpos de fisión, son vacuolados y miden 5-8 μ m de largo por 2-2.9 μ m de ancho y al alcanzar su maduración causan la ruptura de las células epiteliales liberando a los quinetos al lumen intestinal, donde migran al sistema hemolinfático para distribuirse en distintos tejidos entre ellos los ovarios y túbulos de Malpigio (Reik, 1964).

A las 72 horas post-repleción se pueden encontrar las diferentes fases del parásito en los tejidos de la garrapata, en este tiempo aproximadamente es cuando la garrapata comienza a ovopositar. Los huevos ovopositados en las primeras 24h están libres del protozoario (Smith & Kilbourne, 1893; Reik, 1964; Homer *et al.*, 2000).

Los quinetos viajan a través de la hemolinfa para llegar a glándulas salivales en donde se convierten en esporoblastos. Cuando la larva encuentra un hospedero los esporoblastos se transforman en esporozoitos, que son los responsables de infectar al bovino. Los esporozoitos infectan a los eritrocitos en donde se convierten en merozoitos, posteriormente los merozoitos se dividen por fisión binaria y forman trofozoitos que se pueden convertir en merozoitos o llegar a las células del intestino

de una garrapata y convertirse en gametos (Smith & Kilbourne, 1893; Reik, 1964; Uilenberg, 2006). En la figura 2 se ilustra el ciclo biológico de *B. bigemina*:

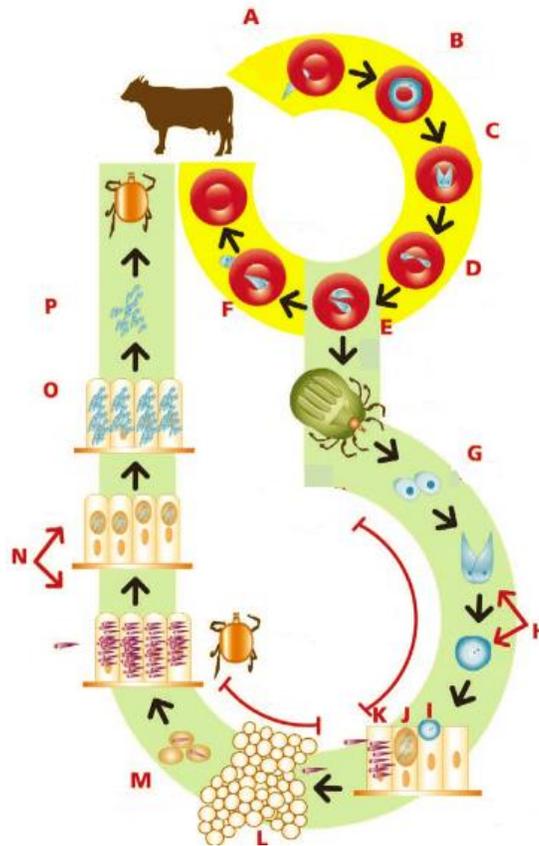


Figura 2. Ciclo biológico de *Babesia bigemina*

A: esporozoito invadiendo un eritrocito de bovino, B: trofozoito, C: merozoito generado a partir de un trofozoito por fisión binaria, D: merozoitos, E: merozoitos escapando del eritrocito, F: merozoito liberado invade un eritrocito y se convierte en trofozoito, G: fases sexuales se liberan del eritrocito en el lumen intestinal de la garrapata y se convierten en gametos, H: gameto macho y gameto hembra se fusionan para formar un cigoto, I: cigoto penetra e infecta a las células del intestino, J: cuerpos de fisión dan origen a los quinetos, K: quinetos destruyen las células intestinales y escapan a la hemolinfa, L: quinetos llegan a ovarios e infectan células embrionarias, M: embriones infectados capaces de transmitir la enfermedad al alcanzar el estado de larva, N: quinetos migran a glándulas salivares de la larva y se convierten en esporoblastos, O: esporoblastos dan origen a esporozoitos, P:

ninfa libera a los esporozoitos al sistema circulatorio del bovino. (Mosqueda *et al.*, 2012).

2.2.3 Patogenia

Durante la infección de *B. bigemina* en los eritrocitos ocurre una oxidación debido a la formación de metahemoglobina que produce radicales libres. La oxidación provoca cambios en la estructura e integridad de la membrana ocasionando que el eritrocito pierda su fluidez lo que aumenta la posibilidad de ser eliminado en el bazo (Saleh, 2009).

En el bazo las células responsables de la actividad protectora contra *B. bigemina* son: células T, células B, células asesinas naturales y macrófagos (Homer *et al.*, 2000).

En el bovino *B. bigemina* es eliminada por células y mecanismos de defensa innatos como macrófagos, células dendríticas, fagocitos y por la respuesta inmune adaptativa (Martiz-Oliver *et al.*, 2012). Las razas bovinas *Bos indicus* presentan una fuerte respuesta mediada por células T, mientras que las razas *Bos taurus* presentan una defensa con altos niveles de anticuerpos IgG, moléculas inflamatorias y una alta expresión del gen MHC II (Martiz-Oliver *et al.*, 2012).

2.2.4 Signos clínicos

Los signos que se observan durante el curso de la babesiosis son: fiebre igual o superior a 41°C, aborto, anorexia, anemia, depresión, pérdida del apetito, letargo, aumento de la frecuencia respiratoria, membranas mucosas de color pálido, hemoglobinuria, incremento de la motilidad intestinal, deshidratación y de no aplicar un tratamiento el animal puede morir a los ocho días posteriores a la infección (Zwart & Brock, 1979).

2.2.5 Diagnóstico

El diagnóstico de la babesiosis se realiza con el objetivo de detectar la enfermedad en curso, identificar especies y cepas, conocer la distribución de la enfermedad, identificar de etapas en las cuales el vector transmite la enfermedad y

para estudios de epidemiología (Böse *et al.*, 1995). A continuación, se mencionan algunos de los métodos más utilizados para el diagnóstico de la babesiosis bovina:

2.2.5.1 Microscopía

Es el método más utilizado para el diagnóstico de la enfermedad en fase aguda o en curso. Los frotis sanguíneos son fijados con metanol y se tiñen con colorante Giemsa, posteriormente se observan al microscopio con el objetivo 100X usando aceite de inmersión. Con el uso de esta técnica se puede detectar un parásito en 1×10^5 a 1×10^6 eritrocitos, también permite observar la morfología del parásito. Los animales que tienen pocas horas de haber muerto, pueden ser diagnosticados por medio de improntas de pulmón, cerebro, corazón, músculo, bazo e hígado (Böse *et al.*, 1995).

También se puede hacer el diagnóstico de garrapatas con frotis de hemolinfa teñidos con Giemsa en los cuales se pueden observar los protozoarios en fase de quinetos, esta técnica tiene una sensibilidad de 1×10^{-6} - 1×10^{-7} eritrocitos inyectados. Esta prueba es fácil de utilizar en campo, pero requiere de personal capacitado, una persona con experiencia es capaz de examinar 100-150 muestras por día (Böse *et al.*, 1995).

2.2.5.2 Fijación de complemento

Este método es utilizado desde el año 1964, inicialmente se utilizó para el control de *B. argentina* (*B. bovis*), consiste en una reacción de anticuerpos de un suero problema con antígenos crudos de lisado de eritrocitos infectados. Solo se puede utilizar para el diagnóstico de la enfermedad en curso y su uso es ineficiente en animales portadores, actualmente está en desuso (Johnston *et al.*, 1973; Curnow & Curnow, 1967; Mahoney, 1967 b). Actualmente está en desuso.

2.2.5.3 Hemoaglutinación indirecta

Es una técnica utilizada para el diagnóstico de la enfermedad en curso, utiliza eritrocitos infectados con *B. bigemina* como antígeno que son mezclados con el suero de un animal problema. Tiene una sensibilidad igual a la técnica de fijación de complemento, pero hay mayor ocurrencia de reacciones no específicas que en

la técnica de fijación de complemento, actualmente está en desuso(Johnston *et al.*, 1973; Curnow & Curnow, 1967). Actualmente está en desuso.

2.2.5.4 Cultivo *in vitro*

Este método consiste en realizar un cultivo de *B. bigemina* en eritrocitos bovinos, fue una técnica muy utilizada en la década de los ochentas, pero es costosa por el tejido necesario para hacer el cultivo, además requiere de personal capacitado y tarda 4 semanas para obtener un resultado (Böse *et al.*, 1995).

2.2.5.5 Inmunofluorescencia indirecta

La técnica de inmunofluorescencia indirecta ha sido utilizada en la investigación de la malaria para la detección de anticuerpos en personas infectadas. Posteriormente en 1965, Garnham & Voller fueron los primeros en medir la respuesta de anticuerpos contra *B. divergenes* en monos esplenectomizados y después se comenzó a utilizar para el diagnóstico de *B. bigemina* (Ludford, 1969).

Es una prueba más sensible que la técnica de fijación de complemento para la detección de *Babesia* spp. en el ganado, detecta anticuerpos en animales asintomáticos y no muestra reacción cruzada con otras especies de parásitos sanguíneos. Es una herramienta epidemiológica para la investigación de la babesiosis en el ganado, venados, hombre y otras especies (Zwart & Brocklesby, 1979).

En esta técnica se utilizan frotis sanguíneos de eritrocitos de bovinos con una parasitemia de 2-2.5%, que son utilizados como antígeno para probar sueros problema. Para el diagnóstico, por lo general es necesario probar dos diluciones del suero problema, primero es necesario fijar el antígeno a la laminilla con acetona y dejar secar, después se incuba sobre una laminilla el suero problema, sobre otra laminilla un suero positivo a *B. bigemina* y en otra laminilla un suero negativo a *B. bigemina*, posteriormente se realizan lavados para retirar el exceso de suero de la laminilla y se agrega el anticuerpo secundario anti-bovino IgG y se incuban nuevamente, se realiza un lavado y se procede a hacer la lectura en un microscopio para inmunofluorescencia. En infecciones latentes detecta el 95% de los casos

positivos. La aplicación de este método requiere de personal con experiencia. (Johnston *et al.*, 1973; Böse *et al.*, 1995).

2.2.5.6 Isotest

Esta técnica consiste en inocular 500-1000 mL de sangre de un animal que se sospecha está enfermo a un animal esplenectomizado con el fin de detectar infecciones latentes, es una técnica costosa y es necesario contar con animales para experimentación (Böse *et al.*, 1995).

2.2.5.7 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

Es una técnica utilizada para la detección de anticuerpos contra hemoparásitos de importancia veterinaria. Para tamizar la microplaca se utiliza el antígeno en diluciones de 1:400 o 1:1600 en tampón carbonato y se incuba a 4°C toda la noche. Posteriormente se elimina el exceso de antígeno y se bloquea con solución de caseinato sódico al 2% por 2 horas a temperatura ambiente. Después del bloqueo de la microplaca se lava con PBS Tween 0.1% y se agregan los sueros bovinos problema en una dilución 1:100 en PBST con 5% de leche desnatada en polvo, la microplaca se deja incubar por 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, se lava la microplaca con PBST y se agrega el anticuerpo anti-bovino acoplado a peroxidasa diluido en PBST con 5% de leche descremada en polvo y se incuba por 30 minutos a temperatura ambiente. La microplaca se lava con PBST y se añade el sustrato para la peroxidasa y la reacción se deja hasta que la absorbancia de un control positivo incluido se acerque a 1, en ese momento se lee la absorbancia a 414 nm en un lector de placas. Inicialmente para realizar esta técnica era necesario obtener los antígenos por medio de filtración en gel de fracción de lisado de eritrocitos infectados, pero actualmente se utilizan antígenos recombinantes (Waltisbuhl *et al.*, 1987; OIE, 2008).

Esta técnica permite evaluar varias muestras a la vez y la evaluación de los datos es más rápida ya que la lectura se realiza con ayuda de una computadora y un lector de microplaca. La sensibilidad de esta prueba es mayor a pruebas como fijación de complemento, hemoaglutinación e inmunofluorescencia, ya que es capaz

de detectar anticuerpos incluso 2-4 años después de una única infección (Savigny *et al.*, 1979).

Se ha reportado que puede ocurrir reacción cruzada con sueros positivos a *A. marginale* al utilizar antígenos de lisado de eritrocitos infectados con *B. bigemina*, pero no se obtiene reacciones cruzadas entre *B. bigemina* y *B. bovis* como ocurre en técnicas como fijación e complemento y hemoaglutinación indirecta (Böse *et al.*, 1995; Butler, 2000).

2.2.5.8 Amplificación Isotérmica Mediada por asas (LAMP)

LAMP es una herramienta para el diagnóstico de enfermedades infecciosas por medio de amplificación de genes en condiciones isotérmicas. Es un método rápido que tarda aproximadamente 1 hora. Para la amplificación se requiere de la DNA polimerasa, la muestra y un grupo de 8 oligonucleótidos (2 externos, 2 internos, 2 internos del asa y 2 externos del asa), estos oligonucleótidos deben ser específicos para el fragmento que se desea amplificar. Es una técnica 10-100 veces más sensible que un PCR convencional (Parida *et al.*, 2008; Iseki *et al.*, 2007).

La interpretación se hace por medio de la observación de turbidez o cambio de color de la reacción de las muestras y se compara con la curva estándar (Parida *et al.*, 2008).

2.2.5.9 Reacción en cadena de la polimerasa anidada (nPCR)

Los animales portadores no son diagnosticados por tinción de frotis, pero la técnica de nPCR si es capaz de detectar 0.001-0.000001% de parasitemia (Figueroa *et al.*, 1993).

Es una técnica molecular altamente sensible que permite encontrar hemoparásitos como *B. bigemina*, *B. bovis* y *A. marginale*, en la misma muestra. Tiene una sensibilidad de detectar un parásito en 10^{-9} de hematíes pero la desventaja es que durante el proceso, la reacción puede contaminarse fácilmente (Böse *et al.*, 1995).

Antes de preparar la reacción de nPCR es necesario hacer la extracción de ADN de eritrocitos de bovinos problema, y posteriormente se determinará la concentración de ADN de cada muestra por medio de espectrofotometría. La reacción de nPCR requiere de ADN polimerasa, deoxinucleótidos trifosfato (dNTP's), oligonucleótidos internos y externos para un fragmento de *ama-1*, agua grado biología molecular y ADN problema. En la primera reacción se utiliza el DNA problema, los oligonucleótidos internos, ADN polimerasa, dNTP's y agua grado biología molecular y se utilizan las siguientes condiciones de amplificación son las siguientes: fase de desnaturalización 95°C por 5 minutos seguido de 35 ciclos con fase de desnaturalización de 95°C por 30 segundos, fase de hibridación a 55°C por 1 minuto y una fase de extensión a 72°C por 1 minuto terminando con una fase de elongación a 72°C por 10 minutos. Después de primera reacción se es necesario hacer una segunda reacción conocida como reacción anidada que requiere de 1 µL de la primera reacción, oligonucleótidos externos, ADN polimerasa, dNTP's y agua grado biología molecular utilizando las mismas condiciones de amplificación para la primera reacción. Al finalizar la segunda reacción se determina el resultado por medio de la electroforesis de ADN en un gel de agarosa al 1.5 % que debe ser teñido y observado bajo luz ultravioleta, la talla molecular del fragmento obtenido de la reacción es de 170 pares de bases (OIE, 2014).

2.2.5.10 Reacción en Cadena de la Polimerasa Tiempo Real cuantitativa (qRT-PCR)

Las ventajas de esta técnica sobre la PCR convencional es la rapidez, además de que es una técnica cuantitativa de fácil estandarización y tiene una sensibilidad y especificidad mayor (Parida *et al.*, 2008).

Para la reacción de qPCR se requiere de la previa obtención de ADN de muestras problema, diseño de oligonucleótidos y estandarizar las condiciones de amplificación. Los componentes de la reacción son oligonucleótidos (los más utilizados para la cuantificación de *B. bigemina* son específicos para el gen del citocromo B), mezcla de ADN polimerasa, dNTP's y un colorante (ejemplo SYBR Green) y agua grado biología molecular. Las condiciones de amplificación par qPCR

serán las mismas que para el PCR punto final y será necesario incluir una curva estándar con diluciones de 1×10^2 a 1×10^9 de copias del gen o fragmento del gen utilizado para para la reacción de qPCR. Durante la amplificación el equipo de PCR tiempo real (RT-PCR) detecta la fluorescencia producida por cada amplificación de los fragmentos de interés que es producida por el colorante fluorescente presente en la reacción (SYBR Green ejemplo mencionando anteriormente), al finalizar la reacción el equipo proporciona los datos de la fluorescencia obtenida en la curva estándar y muestras en los ciclos de amplificación, posteriormente estos datos son analizados estadísticamente (Giglioti *et al.*, 2018).

2.2.6 Tratamiento

A continuación, se mencionan dos ejemplos para el tratamiento de la babesiosis bovina:

- Imidocarb tiene un efecto terapéutico y profiláctico a una dosis de 3 mg/Kg de peso vivo en aplicación de dosis única vía subcutánea y tiene un tiempo de retiro de 90 días (Kuttler *et al.*, 1986).
- Diaminacina se aplica a una dosis de 3 mg/Kg de peso vivo vía intramuscular y tiene un tiempo de retiro de 21 días en bovinos productores de carne y 6 días en bovinos productores de leche (Kuttler *et al.*, 1986).

2.3 Vacunas bloqueadoras de transmisión

Las vacunas bloqueadoras de transmisión inducen la producción de anticuerpos en el mamífero inmunizado con antígenos del vector que interactúan con el protozoario al momento de la infección. Estos anticuerpos al ser ingeridos por el vector interrumpen el desarrollo del protozoario, evitando así la transmisión al hospedero mamífero (Duffy & Kaslow, 1997).

El desarrollo de vacunas bloqueadoras de transmisión comenzó en 1997 cuando Kaslow y sus colaboradores reportaron la vacunación con una mezcla de parásitos completos en fase sexual y asexual de la malaria, observaron que los vectores alimentados con sangre con anticuerpos no transmitían la enfermedad a los humanos.

2.4 Vacunas contra *Babesia* spp

Las vacunas vivas atenuadas y vacunas congeladas son formuladas a partir de eritrocitos infectados con *B. bigemina*, que se obtienen de becerros esplenectomizados de los cuales se colecta sangre infectada que posteriormente es lavada para remover anticuerpos y células blancas (Butler, 2000). Para la producción de vacunas contra la babesiosis bovina se utilizaron cepas que fueron atenuadas mediante pases en becerros esplenectomizado, el número de pases para atenuar las cepas utilizadas para la producción de vacunas vivas es de ≤ 30 a ≥ 90 pases (Bock *et al.*, 1992).

Los animales utilizados para la producción de vacunas deben estar libres del virus sincitial bovino, pestivirus bovino, fiebre Q, *B. bigemina*, *B. bovis*, *A. marginale*, virus de la leucemia bovina, virus de inmunodeficiencia bovina y deben estar 8 semanas en cuarentena además de ser esplenectomizados (Butler, 2000).

El uso de medicamentos profilácticos aplicados antes o durante la vacunación interfiere con la eficacia de la vacuna, ya que al estar formulada con organismos atenuados los medicamentos tienen efecto contra los parásitos de la vacuna evitando que se establezca una infección subclínica que es necesaria para que se generen anticuerpos (Waal & Combrink, 2006).

2.4.1 Vacunas vivas

Desde 1964 se han utilizado las vacunas vivas como método de control de la babesiosis bovina, pero en 1976 comenzaron a aumentar los reportes de casos de babesiosis en bovinos que habían sido inmunizados por lo cual fue necesario atenuar nuevas cepas para la producción de vacunas (Bock *et al.*, 1992).

Las vacunas vivas fueron producidas en Australia y se comercializaron en Sur América, África y Asia ya que las vacunas vivas, aunque estaba formulada con una cepa de Australia también era efectiva en estos países (Bock & de Vos, 2001). En Australia, Argentina, Sudáfrica, Uruguay e Israel las vacunas vivas son producidas por soporte gubernamental, algunas desventajas de las vacunas vivas es que se contaminan fácilmente con otros microorganismos, ocurre reacción por

grupo sanguíneos y deben mantenerse en cadena de frío. Tienen una vida de almacén de 7 días. En 2001 en Australia la única vacuna disponible en el mercado era Combara C formulada con *B. bigemina*, *B. bovis* y *A. marginale* (Butler, 2000).

2.4.2 Vacunas congeladas

Las vacunas congeladas contra *B. bigemina* y *B. bovis* comenzaron a utilizarse desde 1989, debido a que su costo de producción es menor al costo de las vacunas vivas y tienen una vida de anaquel más larga (en nitrógeno líquido pueden almacenarse por 18 meses con criopreservantes) (Waal & Combrink, 2006).

2.5 Vacunas contra garrapatas en bovinos

Alternativas para el control de garrapatas consisten en el uso de razas bovinas más resistentes a la parasitosis en los sistemas de producción o crear resistencia por medio de la respuesta inmunológica a través de vacunas (Rodríguez *et al.*, 1994).

El ganado es capaz de adquirir inmunidad contra las garrapatas después de entrar en contacto con los antígenos de la saliva, provocando una respuesta humoral y celular, pero esta inmunidad no es suficiente para evitar pérdidas económicas a causa del ectoparásito (Guglielmone *et al.*, 1996). Las razas de bovinos *B. indicus* muestran mayor resistencia a la infestación con garrapatas ya que han desarrollado una relación huésped-parasito, lo que les confiere inmunidad contra las garrapatas, pero no la suficiente para evitar un impacto en la producción, esta resistencia a las infestaciones por parte de la raza *B. indicus* dio paso al estudio de antígenos de intestino de garrapatas para su posible uso como vacunas (Böse *et al.*, 1995).

El objetivo de las vacunas contra las garrapatas es reducir el porcentaje de infestación y reducir la transmisión de patógenos (Merino *et al.*, 2013). Los bovinos que son infestados por primera vez con *R. microplus* son muy sensibles al parásito, el 50% de las garrapatas terminan su ciclo de vida sobre el bovino (Willadsen *et al.*, 1988). Willadsen *et al.*, 1988 Reportes de estudios demuestran que la vacunación del ganado con material de hembras de *R. microplus* semirepletas (con una longitud

de 4-6mm y un peso de 20-30mg) confiere mayor inmunidad contra las garrapatas que la inmunidad adquirida de forma natural por infestación. encontraron que en la inmunización de bovinos con material de hembras repletas y el posterior desafío con larvas, se observaban garrapatas con una coloración rojiza principalmente en las patas, indicando que el intestino de la garrapata había sufrido daños

Johnston y colaboradores en 1986 reportaron que la inmunidad inducida con extractos completos solubles de garrapata confería inmunidad aún después de 14 semanas de la última inmunización, reduciendo en un 70% la infestación de bovinos desafiados comparado con el grupo control. Las garrapatas repletas terminaron de ovopositar al séptimo día de haber sido colectadas y se encontró un 50% de huevos eclosionados y un 50% de huevos negativos a eclosión. El 40% de las garrapatas que se alimentaron de sangre de bovinos inmunizados presentaban color anormal (rojo) igual al reportado en otros trabajos. El peso de las garrapatas de bovinos del grupo control fue de 195 mg mientras que las garrapatas de bovinos inmunizados tenían un peso de 159 mg a causa del daño de los anticuerpos en las células epiteliales del intestino.

Otros estudios similares han mostrado que las garrapatas que se alimentan de sangre de bovinos previamente inmunizados con extractos de garrapatas sufren lisis de las células del intestino, seguido por láminas basales y placas musculares, a comparación de las garrapatas que se alimentaron de la sangre de bovinos inmunizados únicamente con adyuvante, las cuales mostraron una apariencia y tamaño normal. Después de la lisis de las células epiteliales del intestino, los anticuerpos y eritrocitos del huésped bovino pasan al sistema linfático en donde los anticuerpos atacan a los tejidos y túbulos de Malpigio de la garrapata. La ovoposición de las garrapatas se ve afectada debido al daño que sufren las células del intestino y la disminución de la producción de vitelogenina, que es esencial para la formación de los huevos (Agbede & Kemp, 1986). En garrapatas machos se observó que los anticuerpos causan daños en los órganos reproductores e intestino, 24h post-repleción la mayoría de los machos comenzaron a morir. La eficacia de la

inmunización fue de un 60% (Johnston *et al.*, 1986; Willadesen *et al.*, 1988; Agbede & Kemp, 1986; Rodríguez *et al.*, 1994).

El uso de dos vacunas contra *R. microplus* se ha registrado en el mercado: Gavac en 1993-1997 en Cuba y otros países de Latino América y TickGARD en 1994 en Australia, ambas formuladas con el antígeno Bm86. La proteína Bm86 fue aislada de la membrana de células epiteliales del intestino de garrapata y es una proteína involucrada en el proceso de endocitosis. La producción de Bm86 recombinante se hizo en *Pichia pastoris* ya que produce la proteína glucosilada (Canales *et al.*, 1997; de la Fuente *et al.*, 1997; de la Fuente *et al.*, 1999).

El efecto de la vacunación con Gavac se determinó por medio de parámetros como: número de hembras repletas, peso de las garrapatas, fertilidad y viabilidad de los huevos (Canales *et al.*, 1997; de la Fuente *et al.*, 1999; Fragoso *et al.*, 1998). También se demostró que al usar Gavac disminuía el porcentaje de infección de *Babesia* spp (de la Fuente *et al.*, 1999; Fragoso *et al.*, 1998). Un análisis de costo beneficio de bovinos inmunizados con la vacuna Gavac mostró que hubo un 60% de reducción en el número de tratamiento para el control de la garrapata (de la Fuente *et al.*, 1999).

La vacuna TickGARD en Australia mostro resultados de un 56% en la reducción del número de hembras repletas que terminan su ciclo de vida en el hospedador, 53% de disminución en el número de huevos ovopositados y un 72% de eficacia en la reducción de ovoposición de las hembras repletas mantenidas en condiciones de laboratorio (Johnsson *et al.*, 2000).

2.6 Candidatos vacunales contra *R. microplus*

Diferentes glicoproteínas presentes en las células del intestino de la garrapata han sido utilizadas para vacunar al ganado bovino y estimular una respuesta protectora contra futuras infestaciones con garrapatas (Anderotti *et al.*, 2012).

2.6.1 Bm86

La glucoproteína Bm86 se expresa en huevos, ovarios y células epiteliales del intestino de larvas, ninfas y garrapatas adultas, la regulación de la expresión de este gen se ve afectada en los ovarios de hembras alimentadas con sangre infectada con *B. bovis* (Andereotti *et al*, 2012).

Bm86 inicialmente se obtenía por cromatografía líquida a partir de tejido epitelial del intestino de hembras repletas, pero se necesitaban de 40000 a 60000 garrapatas para obtener de 20 a 100 µg de Bm86, por lo cual fue necesario expresar la proteína recombinante para aumentar la producción de la vacuna (Rand *et al*, 1989; Parizi *et al.*, 2009).

En garrapatas que se alimentaron de sangre con anticuerpos contra Bm86 y otros componentes del sistema inmunológico del bovino, se observó que las células epiteliales del intestino eran lisadas, el crecimiento de la garrapata se redujo, disminuyó la ovoposición y un porcentaje de las garrapatas murieron. El daño ocasionado por los anticuerpos contra Bm86 se pudo ver en el cambio de color de gris a rojo en la garrapata, debido a la fuga de eritrocitos a la hemolinfa de la garrapata (Rand *et al*, 1989).

2.6.2 Bm91

Bm91 es una enzima carboxilasa que se encuentra en el intestino y glándulas salivales de la garrapata. Esta enzima tiene propiedades bioquímicas y catalíticas muy similares a la angiotensina testicular humana y se cree que esta carboxilasa tiene un rol de control de hormonas en la garrapata (Willadsen, 1997; de la Fuente & Kocan, 2006). Al combinar Bm91 con Bm86 aumenta la eficacia de la vacuna a diferencia de cuando se utilizan las proteínas por separado (Nijhof *et al.*, 2007).

2.6.3 Subolesina

La proteína 4D8 o subolesina fue descubierta como antígeno protector contra las garrapatas *Ixodes scapularis* y posteriormente fue caracterizada en diferentes especies de garrapatas incluida *R. microplus* (Merino *et al.*, 2011). Esta proteína actúa como factor de transcripción en la regulación de la expresión de genes y

afecta varios procesos celulares como la respuesta inmune de la garrapata, alimentación, reproducción y desarrollo (Shakya *et al.*, 2014). El bloqueo de la subolesina por medio de RNA de interferencia ocasiona esterilidad en las garrapatas, de este modo cuando una garrapata hembra o macho estéril se aparea con una garrapata no estéril se ve afectada la repleción y ovoposición de las hembras (Merino *et al.*, 2011).

La subolesina recombinante al ser utilizada como candidato vacunal confiere protección contra garrapatas en el ganado bovino (Merino *et al.*, 2011) y se demostró que causa una disminución de infestación de larvas, ninfas y garrapatas adultas en los hospedadores además de reducir la capacidad de vector de las garrapatas (Nijhof *et al.*, 2007; Shakya *et al.*, 2014). En otro estudio se reportó que al inmunizar con subolesina a bovinos, los títulos de anticuerpos después de la primera inmunización fueron significativamente mayores al título de anticuerpos del grupo control, además se mostró una reducción significativa en el número de garrapatas, pero no en el peso y ovoposición. El efecto de la inmunización con subolesina fue de 44% de reducción en el número de garrapatas y ovoposición (Merino *et al.*, 2011).

2.6.4 Péptido P0

P0 es un péptido seleccionado de una región altamente inmunogénica de la proteína P0, esta proteína se encuentra localizada en el citoplasma y es esencial para el ensamblaje de la subunidad ribosomal 60S y participa en la reparación de DNA y en apoptosis (Rodríguez *et al.*, 2015 a).

En un experimento se encontró que la eficacia del uso de P0 como candidato vacunal fue de 90% (Rodríguez *et al.*, 2015 a).

2.6.5 Inhibidor de la tripsina

El inhibidor de tripsina (rRmLTI) es una proteína presente en huevos, larvas y garrapatas adultas y tiene un peso molecular de 46 kDa. En un estudio en el cual rRmLTI fue expresada en *P. pastoris* y se utilizó como candidato vacunal se encontró que tenía una eficacia de 72.8% y 69.7% en la reducción en el número de

hembras repletas que terminaban su ciclo de vida en el bovino proporcionando un 32% de inmunoprotección contra la infestación de garrapatas (Andereotti *et al.*, 2012).

2.6.6 Inhibidor de la serina proteasa (serpinas)

Las serpinas son una superfamilia de proteínas que contienen de 350-500 aminoácidos y tienen un peso molecular de 40-60 kDa. La estructura de serpinas contienen tres láminas beta y de 8 a 9 hélices alfa. Esta superfamilia está compuesta por 500 proteínas en animales, bacterias, arqueas y virus (Tirloni *et al.*, 2014). En *R. microplus* se han encontrado 22 serpinas, pero sus funciones no han sido caracterizadas aún (Xu *et al.*, 2016).

Estas proteínas regulan en los bovinos varias vías de la coagulación de la sangre, fibrinólisis, inflamación, homeostasis y activación del complemento, además de que es una de las vías de defensa contra los hemoparásitos. Los holoparásitos utilizan inhibidores de serpinas para evadir las respuestas del hospedero y establecer la infestación. Las proteínas de la superfamilia de las serpinas son de gran importancia en muchos organismos, en los artrópodos están involucradas en los procesos del sistema inmune, desarrollo y morfogénesis. En garrapatas las serpinas están involucradas en la regulación de endopeptidasas endógenas, protección contra endopeptidasas de bacterias, coagulación de la hemolinfa y activación de la fenoloxidasas. La transcripción de serpinas es mayor en células de las glándulas salivares lo que le permite a la garrapata modular uno o varios mecanismos de defensa del hospedador (Tirloni *et al.*, 2014).

2.6.7 Inhibidor de la trombina

El inhibidor de la trombina (RmS-15) pertenece a la superfamilia de las serpinas y ha sido expresada en *P. pastoris* (Xu *et al.*, 2016).

Durante su alimentación las garrapatas secretan un complejo de moléculas bioactivas en la saliva que inyectan al hospedador para evadir sus mecanismos de defensa estas proteínas son esenciales para manipular las respuestas hemostáticas e inmunológicas del huésped contra la infestación por garrapatas, algunos ejemplos

son: factores anti-hemostáticos, vasodilatadores, inhibidores de plaquetas y anticoagulantes que son secretados en la saliva de las garrapatas (Xu *et al.*, 2016).

2.6.8 Péptido ATAQ

La proteína ATAQ está presente en el intestino y túbulos de Malpigio de *R. microplus*. Esta proteína ha sido aislada y caracterizada en varias especies del género *Rhipicephalus*, el alineamiento de secuencias de DNA de ATAQ de las distintas especies de *Rhipicephalus* mostró una identidad de 93.3%. ATAQ tiene una alta similitud en sus estructuras primaria y secundaria con la proteína Bm86 (de Abreu *et al.*, 2016).

En el 2016, Abreu y colaboradores utilizaron un péptido sintético de la proteína ATAQ seleccionado mediante análisis bioinformáticos e inmunizaron a un grupo de 4 bovinos con este péptido para posteriormente desafiar a los bovinos con 20000 larvas de *R. microplus*, los resultados obtenidos mostraron una baja eficiencia de la inmunidad conferida con la inmunización con el péptido ATAQ.

2.7 Canal aniónico selectivo dependiente de voltaje (VDAC)

La mitocondria es el organelo mas estudiado de la célula, en el proteoma de la mitocondria se han encontrado 1000 proteínas que son importadas del citoplasma celular al interior de la mitocondria. La mitocondria es esencial en la célula por vías metabólicas y de señalización como: ureogénesis, síntesis de colesterol y moléculas involucradas en la apoptosis (Lemasters & Holmuhamedov, 2006).

La mitocondria es el organelo donde se lleva a cabo la fosforilación oxidativa en las células eucariotas. Este organelo presenta doble membrana plasmática, la membrana interna contiene la maquinaria para la transducción de energía: el complejo de transferencia de electrón y la ATP sintetasa, mientras que la membrana externa de la mitocondria es una barrera física que separa los procesos metabólicos que ocurren en el citosol y en la mitocondria, el flujo de metabolitos a través de esta membrana es fundamental para los procesos que ocurren en ambos compartimentos (Mannella, 1998).

La única proteína identificada que media este flujo es la porina VDAC, que es considerada un canal que permite el flujo de metabolitos del espacio intermembranal de la mitocondria al citosol, pero se demostró que esta proteína es la más abundante de la membrana externa de la mitocondria, siendo el 50% del total de las proteínas, es capaz de interactuar con otras proteínas de la mitocondria, proteínas citosólicas, citocromo *c* y formar oligómeros con algunas de ellas (Goncalves *et al.*, 2007).

VDAC fue nombrada y descrita por primera vez en 1975 a partir de la membrana externa de mitocondrias de *Paramecium* (Colombini, 2004) el primer reporte de VDAC en *R. microplus* (BmVDAC) por medio de técnicas proteómicas y de biología molecular fue hecho por Rodríguez *et al.* en 2013. VDAC está formada por una hélice alfa con el dominio N-terminal localizado en el lumen de la porina y 13 plegamientos beta transmembranales, el canal interno tiene un diámetro de 2.5-3 nm que permite el paso de moléculas con masa menor a 30 kDa (Lemasters & Holmuhamedov, 2005 & Mannella, 1998). Los aniones y polianiones incrementan la dependencia de voltaje de VDAC, el polianión cierra el canal y evita el paso de moléculas de electrolitos a través del poro (Colombini, 2004). El cierre del canal tarda segundos y permanece así con un diámetro de 1.7-1.8 nm después se abre en cuestión de milisegundos y alcanza un diámetro de 2.5-3 nm (Colombini, 2004)

Los metabolitos que entran y salen de la membrana externa de la mitocondria lo hacen a través de VDAC. Cuando VDAC se encuentra cerrado solo tiene la capacidad de conducir ATP, ADP, pirofosfato, pequeños cationes como calcio, potasio y sodio. El cierre de VDAC ocurre para bloquear el suministro de sustratos de la respiración y previene el intercambio de ADP y pirofosfato por ATP durante la fosforilación oxidativa. En particular el cierre de VDAC también interviene en el desarrollo de la apoptosis y como consecuencia la mitocondria no libera ATP ni toma ADP, pirofosfato o sustratos de la respiración. Bcl2-XL es una molécula anti-apoptótica que al interactuar con VDAC evita que se cierre (Lemasters & Holmuhamedov, 2005).

Existen reportes de la interacción de VDAC con diferentes proteínas que contribuyen como mediadores de la interacción mitocondria-citosol y la iniciación de la fase mitocondrial de apoptosis (Colombini, 2004; Pastorino *et al.*, 2008).

Cuando ocurre apoptosis, isquemia, anoxia, hipoxia, cáncer, sepsis, presencia de nitrógeno y oxígeno reactivo y fallas en la función de varios órganos se produce una supresión del metabolismo mitocondrial y se incrementa el NADH que inhibe la conducción de VDAC (Lemasters & Holmuhamedov, 2005).

La hexoquinasa interactúa en la membrana externa de la mitocondria con VDAC, esta interacción da lugar al cambio en la susceptibilidad de la mitocondria a señales pro-apoptóticas que son mediadas por proteínas de la familia Bcl2. La unión de la hexoquinasa con VDAC está regulada por proteínas quinasas como la glucógeno quinasa y la quinasa C (Pastorino *et al.*, 2008; Goncalves *et al.*, 2007).

Para que se inicie la apoptosis es necesaria la convergencia de varias señales para activar a la familia de las cisteínas proteasas llamadas caspasas. Estudios recientes demuestran que la mitocondria es de gran importancia ya que permite el paso del citocromo c del espacio intermembranal al citosol. La familia de proteínas Bax y Bak regulan la liberación del citocromo c, mientras que Bcl-xl previene la liberación del citocromo c por lo que se le considera una proteína anti-apoptótica. Cuando Bax y Bak interactúan directamente con VDAC potencian su actividad, mientras que Bcl-xl la inhibe por medio de mecanismos de regulación (Shimizu *et al.*, 2000).

2.8 Antecedentes directos de rBmVDAC

El gen *bmvdac* de 819 pb, se encuentra ubicado en el locus GU994210 del genoma de *R. microplus*. Este gen codifica para la proteína canal anión selectivo dependiente de voltaje de *R. microplus* (GenBank, 2017).

Rodríguez y colaboradores en 2012 realizaron un estudio con un enfoque proteómico y encontraron un polipéptido de células del intestino de la garrapata que interactúa con proteínas de fases sexuales de *B. bigemina*.

La proteína BmVDAC fue aislada con el uso combinado de las técnicas 2D overlay y la técnica de espectrofotometría de masas. Posteriormente secuenciaron el gen *bmvdac* e hicieron el primer reporte de la proteína VDAC en *R. microplus* y su posible relación en el proceso de infección con *B. bigemina* (Rodríguez *et al.*, 2012; Rodríguez *et al.*, 2015b).

En un segundo estudio encontraron que a las 24 h y 72 h post-repleción de las garrapatas, ocurrió un incremento en la expresión de *bmvdac* en las células del intestino de garrapatas infectadas con *B. bigemina* (Rodríguez *et al.*, 2015 b).

Posteriormente en un estudio realizado por López y colaboradores en 2017, encontraron que al inmunizar a bovinos con la proteína rBmVDAC seguido de un desafío de los animales con larvas *R. microplus*:

- Solo el 49.01% de las garrapatas terminó su ciclo de vida sobre los bovinos inmunizados.
- Se obtuvo una reducción del 30.1% en la ovoposición de garrapatas alimentadas con sangre con anticuerpos contra VDAC.

III. JUSTIFICACIÓN

La babesiosis bovina ha matado a millones de bovinos y causa pérdidas económicas millonarias a causa de la baja producción y mortalidad que ocasiona en el ganado.

Más de tres cuartos de la población bovina es susceptible a la babesiosis bovina, ya se encuentran en zonas geográficas con presencia del vector, como en América, Asia, África y Australia. En México la garrapata del ganado *R. microplus* es el principal vector de *B. bigemina*.

El principal método de control contra las infestaciones de garrapatas es el uso de acaricidas, pero estos generan resistencia en las garrapatas, dejan residuos químicos en productos pecuarios y medio ambiente, lo que causa preocupación en la sociedad.

Las vacunas contra babesiosis y garrapatas son un método de control no químico, que no deja residuos en los productos pecuarios y medio ambiente, pero desafortunadamente en el país so se cuanta con vacunas eficientes en el mercado.

Se han estudiado proteínas presentes en el vector como posibles candidatos vacúnales para determinar su eficiencia. También se han estudiado proteínas involucradas en el proceso de infección en el vector que prometen ser excelentes candidatos vacúnales si logran evitar la transmisión de la infección al bovino.

BmVDAC es una proteína que se sobre expresa en presencia de *B. bigemina* lo cual indica que tiene una función en la interacción vector-patógeno y podría bloquear la transmisión del protozooario al bovino.

IV. HIPÓTESIS

Los anticuerpos contra rBmVDAC disminuyen la infección de *B. bigemina* en *R. microplus*.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

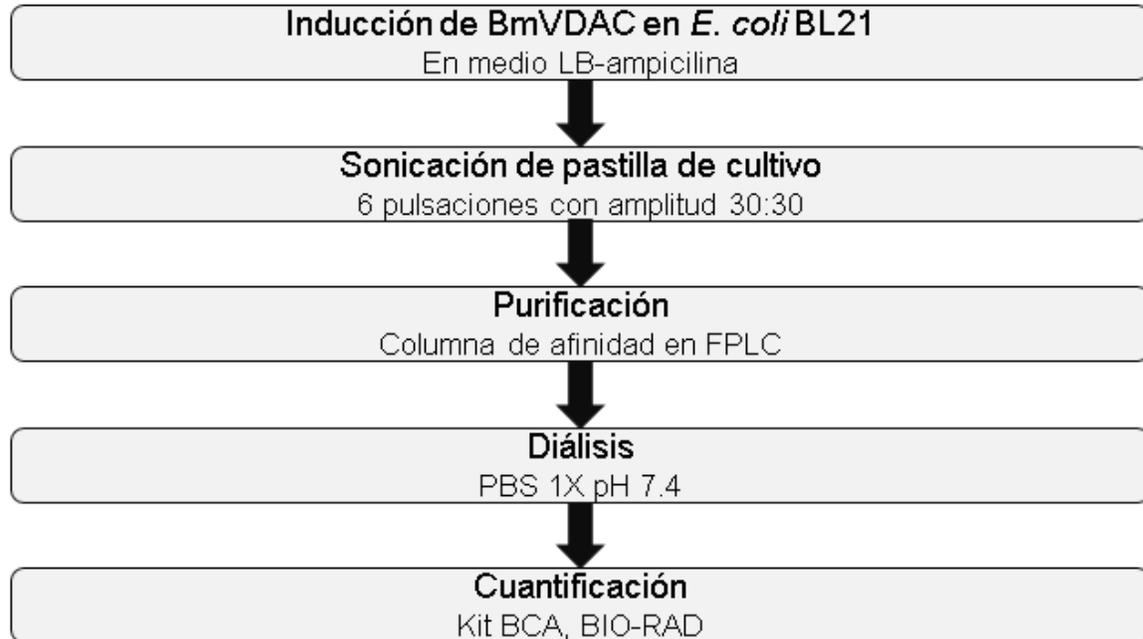
Evaluar el efecto de anticuerpos contra la proteína rBmVDAC en el proceso de infección de *B. bigemina* en *R. microplus*.

5.2 Objetivos Específicos

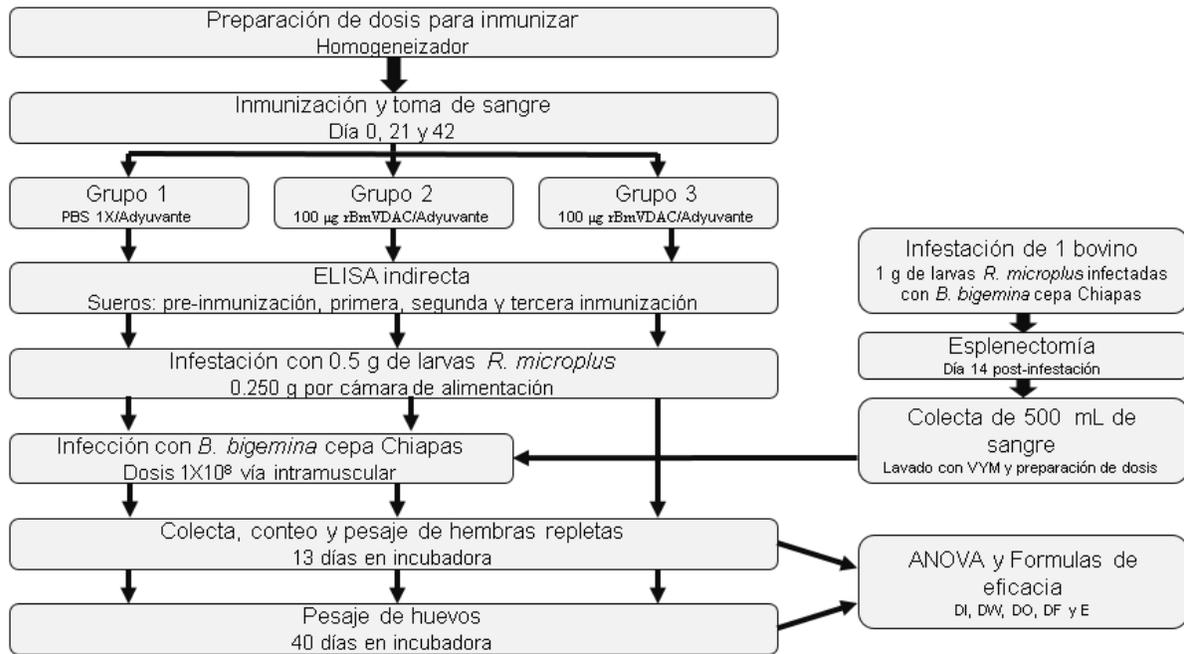
1. Obtener rBmVDAC.
2. Evaluar la acción de anticuerpos contra la proteína rBmVDAC en las garrapatas determinando su porcentaje de supervivencia, peso y ovoposición.
3. Determinar la infección de *B. bigemina* en garrapatas alimentadas con sangre de bovino con anticuerpos contra rBmVDAC.

VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

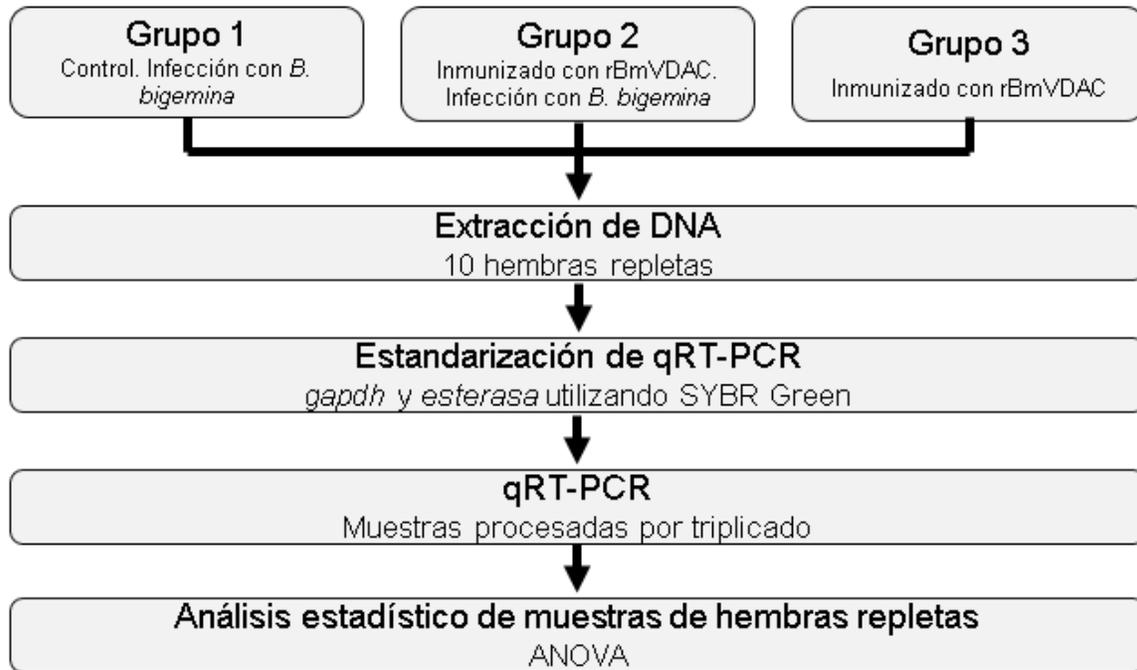
6.1 Objetivo 1. Obtener rBmVDAC.



6.2 Objetivo 2. Evaluar la acción de anticuerpos contra la proteína rBmVDAC en las garrapatas determinado su porcentaje de supervivencia, peso y ovoposición.



6.3 Objetivo 3. Determinar la de infección de *B. bigemina* en garrapatas alimentadas con sangre de bovino con anticuerpos contra rBmVDAC.



VII. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en la nave Infectómica Animal (NINFA) en el Campus Amazcala de la Universidad Autónoma de Querétaro, en el municipio del Márquez, Querétaro, localizado al Norte 21° 40', al Sur 20° 01', al Este 99° 03' y al Oeste 100° 36' (INAFED, 2016), en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ, en el laboratorio de Inmunología y Vacunas (LINVAS) en Campus Aeropuerto de la UAQ y en el laboratorio de Posgrado en Genómica de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

7.1 Material biológico

Para el experimento donde se estudió la posible función de rBmVDAC en la transmisión de *B. bigemina*, se trabajó con tres grupos de 5 becerras en cada grupo de 12 meses de edad. Los animales del grupo 1 fueron inoculados con adyuvante/PBS 1x pH 7.4, los animales de los grupos 2 y 3 fueron inoculados con 100 µg de la proteína rBmVDAC/adyuvante y los tres grupos fueron infestados con garrapatas. Otro becerro de la raza Holstein de 9 meses, fue esplenectomizado e infestado con larvas *R. microplus* cepa Media Joya infectadas con la cepa Chiapas de *B. bigemina* del laboratorio de Investigación de Inmunología y Vacunas de la Universidad Autónoma de Querétaro. La sangre de este bovino se utilizó para infectar a los animales de los grupos 1 y 2.

La infestación de los grupos 1,2 y 3 se realizó con larvas *R. microplus* de la cepa Media Joya de del laboratorio de Investigación Inmunología y Vacunas de la Universidad Autónoma de Querétaro, la cual ha sido mantenida en el laboratorio y está libre de *Babesia* spp.

7.2 Inducción y purificación de rBmVDAC

Para realizar la inducción de rBmVDAC fue necesario preparar un pre-inóculo de células *E. coli* BL21 transformadas con BmVDAC en medio LB suplementado con ampicilina (50 µg/mL), el cultivo se dejó crecer durante 16h a 37°C en agitación a 4 G, posteriormente 50 mL del preinóculo fue añadido a un matraz con 500 mL de LB/ampicilina (50 µg/mL) fresco y se dejó incubar a 37°C en agitación a 4 G hasta

que alcanzó una densidad óptica (OD) de 0.4-0.6 en un rango de lectura de 600 nm, una vez alcanzada la OD se separó una alícuota del cultivo que se usó como control de cultivo no inducido, al resto del cultivo se añadió 1 mM de isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido (IPTG) y se dejó crecer a una temperatura de 16°C durante 24 h en agitación a 4 G. Posteriormente se obtuvieron pastillas vertiendo 40 mL del medio inducido en tubos falcón de 50 mL estériles y se centrifugaron a 2800 G durante 30 minutos y se retiró el sobrenadante. Se tomó una muestra de 1 mL del inducido para verificar la inducción de rBmVDAC por electroforesis SDS/PAGE. Una vez comprobada la inducción de la proteína recombinante, la pastilla fue resuspendida en 10 mL de PBS 1x pH 7.4 estéril y las células fueron lisadas por sonicación por 3 minutos a pulsaciones 30-30 con una amplitud de 80%, después fueron centrifugadas a 2800 G por 30 minutos a una temperatura de 4°C y se descartó el sobrenadante. Se tomó una muestra de 1 mL de la muestra sonicada para verificar la presencia de rBmVDAC.

La pastilla conteniendo los cuerpos de inclusión fue resuspendida en buffer de unión (6 M de hidrocloreto de guanidina, 20 mM de Tris HCl, 0.5 M de cloruro de sodio, 5 mM de imidazol y 1 mM de 2-mercaptoetanol) y filtrada a través de filtro millipore de 0.45 micras, antes de inyectarla al equipo FPLC plus (ÄKTA Prime, GE Healthcare Life Sciences), la purificación se realizó en condiciones desnaturizantes usando el programa On Column Refolding con columnas de afinidad de 1 mL HisTrap HP, GE Healthcare. Se colectaron fracciones de 1 mL que fueron analizadas en una electroforesis de proteínas en un gel de poliacrilamida SDS/PAGE al 12%, de las fracciones que resultaron positivas se hicieron mezclas de 3 mL y fueron dializadas en PBS 1x pH 7.4 estéril en agitación suave por 24 horas con cambios periódicos del PBS. Posteriormente se cuantificó la proteína por un ensayo de Bradford utilizando el Kit Quick Start y Bovine Serum Albumin (BSA de BIO-RAD), la microplaca fue leída en un lector iMark Microplate Absorbance Reader, BIO-RAD en un rango de lectura de 450 nm.

7.3 Electroforesis de proteínas en SDS/PAGE

Para corroborar la inducción y purificación de rBmVDAC se realizó una electroforesis de proteínas en un gel de poliacrilamida SDS/PAGE al 12%. Se tomaron 50 μ L de las muestras de extracto total no inducido, extracto total inducido, fracción soluble, fracción insoluble y mezclas de las fracciones resultantes de la purificación (muestras de 1 ml tomadas durante la inducción y sonicación) y se les adicionó 50 μ L de buffer de carga 2X y se dejaron en baño María 5 minutos a una temperatura de ebullición. En el gel se cargó 8 μ L de marcador de peso molecular (10-250 kDa), y 20 μ L de cada una de las muestras previamente preparadas. Se dejó correr a 100V hasta que el colorante que marca el frente de corrida llegó al otro extremo del gel, después se teñó con azul de Coomassie toda la noche en agitación suave y al día siguiente se destiñó (ácido acético, metanol y agua destilada).

7.4 Western Blot

Para confirmar la presencia de rBmVDAC en los extractos bacterianos, se realizó un Western Blot del extracto total no inducido y extracto total inducido. Primero se elaboraron dos geles SDS/PAGE al 12% en los cuales se cargó 8 μ L de marcador de peso molecular (10-250 kDa), y 20 μ L de cada una de las muestras previamente preparadas y se dejaron correr a 100V hasta que el frente del gel llegó al otro extremo, uno de los geles fue teñido con azul de Coomassie y el otro se utilizó para realizar una transferencia húmeda de proteínas a una membrana de nitrocelulosa (0.45 μ m) en condiciones de voltaje constante (100V) por una hora hasta que el frente de gel alcanzó el otro extremo del gel, la membrana de nitrocelulosa fue teñida con rojo de Ponceau por un minuto en agitación suave y se realizó el bloqueo de la membrana con TBS Tween al 0.1% y leche descremada al 5% en agitación suave toda la noche, posteriormente se lavó tres veces con TBS Tween al 0.1% en agitación suave por 15 minutos. La membrana de nitrocelulosa fue incubada con el anticuerpo primario Hismause monoclonal IgG (Santa Cruz, Biotechnology) en una dilución de 1:3000 en TBS Tween al 0.1% y leche descremada al 1% a 37°C por 1.5 h en agitación suave, posteriormente se lavó 3 veces con TBS Tween al 0.1% durante 15 minutos en agitación suave. Después

se incubo la membrana con el anticuerpo secundario goat anti-mause HRP conjugated IgG (Santa Cruz, Biotechnology) en una dilución 1:5000 en TBS Tween al 0.1% con leche descremada al 1% durante 1h a 37°C en agitación suave y fue lavada 3 veces con TBS Tween al 0.1% durante 15 minutos en agitación suave. Las membranas fueron reveladas con quimioluminiscencia (ECL Plus Western Blotting Detection System RPN2132, Amersham).

7.5 Examen físico de bovinos

Se realizó un examen físico de los bovinos de los tres grupos y se tomó una muestra de sangre sin anticoagulante y un tubo con EDTA para realizar hematocrito de cada uno de los animales de los tres grupos. Los parámetros evaluados en el examen físico fueron los siguientes:

- Condición corporal (1-5)
- Peso
- Estado reproductivo
- Presencia de signos clínicos
- Ingrediente de la dieta
- Postura y marcha
- Pelaje
- Temperatura corporal
- Pulso
- Frecuencia respiratoria
- Frecuencia cardíaca
- Movimientos ruminales
- Mucosas
- Exploración de ganglios linfáticos
- Exploración de sistemas

7.6 Inmunizaciones

Los bovinos de los tres grupos fueron inoculados con 3 dosis en los días: 0, 21 y 42, la dosis se aplicó vía subcutánea en la tabla del cuello utilizando una jeringa

de 3 mL con una aguja calibre 18G. Antes de cada inoculación y 14 días después de la tercera inoculación se tomó una muestra de sangre de cada animal para la obtención de suero y 1 tubo vacutainer con EDTA para realizar hematocrito. Para preparar el inóculo se utilizó un mezclador de alta velocidad Heidolph DIAZ 900 en condiciones de esterilidad en tubos falcón de 20 mL. Los animales del grupo 1 (control) se inocularon con adyuvante Montanide ISA 50V y PBS 1x pH 7.4 estéril en una relación 50:50, las dosis para inocular a los animales de los grupos 2 y 3 se prepararon con adyuvante Montanide ISA 50V y 100 µg de rBmVDAC en PBS 1x pH 7.4 estéril.

7.7 ELISA indirecta

Se colocó 2 µg/pocillo de rBmVDAC en buffer carbonatos pH 9.6 (carbonato de sodio y bicarbonato de sodio 50 mM) y se dejó incubar la placa a una temperatura de 4°C toda la noche y después de la incubación las placas se lavaron tres veces con PBS Tween 0.5% pH 7.2. El bloqueo de la placa se realizó con 100 µL de leche descremada a 5% en PBS Tween 0.5% y se dejó incubar 3h a 37° C, después las placas se lavaron tres veces con la solución de lavado. El suero fue diluido a 1:100 y 1:500 en PBS Tween 0.5% pH 7.2. Se colocó el suero en la placa y se incubó por 1h a 37°C, posteriormente las placas se lavaron tres veces con solución de lavado, después se añadió el anticuerpo secundario conejo anti-bovino IgG-HRP conjugado a peroxidasa en una dilución de 1:3000 en PBS Tween 0.5% pH 7.2 y se dejaron en incubación por 1h a 37°C, posteriormente se realizaron tres lavados más con la solución de lavado y se añadió el sustrato dihidrocloruro de o-fenilenediamina en buffer citrato (ácido cítrico 0.1 M, fosfato de sodio dibásico 0.2 M y 4 µL de peróxido de hidrogeno al 30%). La microplaca fue leída en un lector iMark Microplate Absorbance Reader, BIO-RAD en un rango de lectura de 450 nm.

7.8 Infestación con larvas *R. microplus*

Las becerras estaban sobre una trampa para limitar el movimiento del cuello, en cada costado de las becerras se colocó una cámara de alimentación pegada por los bordes, dentro de las cuales se liberó 0.25 g de larvas de *R. microplus* los dos días posteriores a la última inmunización con rBmVDAC.

7.9 Infección con *B. bigemina*

Un becerro Holstein de 9 meses de edad fue infestado con 1 g de larvas *R. microplus* positivas a *B. bigemina* cepa Chiapas y fue esplenectomizado al día 10 post-infestación. El monitoreo del animal se hizo a diario, a partir del día 15 post-infestación y consistió en la toma de temperatura, signos clínicos y una muestra de sangre de la vena coxígea en un tubo vacutainer con anticoagulante que fue mantenido a 4°C hasta llegar al laboratorio donde se realizó un hematocrito y frotis sanguíneo.

Una vez que se detectó una parasitemia de 1% en el becerro Holstein se colectó sangre y se llevó a laboratorio donde fue lavada con VYM(15 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 mg de KCl, 1415.4 mg de KH_2PO_4 , 154 mg de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1450 mg de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 707 mg de NaCl, 20.5 mg de dextrosa, 0.25 mM de adenina, 0.50 mM de guanosina y agua destilada, pH 7.4) para preparar las dosis de 1×10^8 de eritrocitos infectados con *B. bigemina* para infectar a los bovinos de los grupos 1 y 2 al día 14 post-infestación. Después de la toma de muestra de sangre se aplicó tratamiento al bovino Holstein para evitar su muerte.

Los animales de los grupos 1 y 2 fueron infectados y los animales del grupo 3 fueron inoculados con 2 mL de VYM por vía intramuscular utilizando una jeringa con aguja calibre 18G. El monitoreo de los animales se hizo a diario, a partir del día 5 post-infección y consistió en la toma de temperatura, signos clínicos y una muestra de sangre de la vena coxígea en un tubo vacutainer con anticoagulante que fue mantenido a 4°C hasta llegar al laboratorio donde se realizó un hematocrito y frotis sanguíneo.

7.10 Colecta de garrapatas

La colecta de garrapatas se realizó en los días 19-23 post-infestación. Se colectaron las garrapatas que habían terminado de alimentarse en las dos cámaras de alimentación de cada bovino, se identificó cada muestra con el número de animal, grupo, fecha y número de día post-infestación, las garrapatas fueron llevadas al laboratorio de Microbiología de la FCN de la UAQ donde fueron lavadas

en benzal al 10%, secadas y pesadas individualmente. Posteriormente se colocaron 20 garrapatas por caja Petri y se dejaron en una incubadora en condiciones de 12 h de luz y 12 h de oscuridad por día, una temperatura de 22-25°C y una humedad relativa de 95%.

Después de la colecta de las garrapatas del día 23 post-infestación se aplicó tratamiento contra la babesiosis y se realizaron 2 baños por aspersion con asuntol de cada uno de los animales.

7.11 Pesaje de huevos

Todas las garrapatas repletas se mantuvieron en condiciones de 12 h de luz y 12 h de oscuridad por día, una temperatura de 22-25°C y una humedad relativa de 95% hasta que terminaron un periodo de ovoposición de 13 días. Los huevos fueron colocados en viales y se registró el peso de gramos correspondientes a las garrapatas de cada uno de los animales de los tres grupos.

7.12 Conteo de larvas

Se realizó el conteo de larvas y huevos sin eclosionar de un vial de 1g de larvas (200 mg de huevos de cada uno de los 5 bovinos del grupo) de cada grupo.

7.13 Extracción de DNA

Se realizó la extracción de DNA seleccionando 2 garrapatas al azar de cada bovino de los tres grupos. Las muestras se llevaron 5 minutos a nitrógeno líquido para posteriormente macerarlas con pistilos, después se inició el protocolo de extracción de DNA del kit Puregene (Gentra Systems, MN, USA). Al término de la extracción se realizó una electroforesis de DNA en un gel de agarosa al 1% a 80 V por 45 minutos para verificar la integridad del DNA y también se midió la concentración y relación 260/280 de las muestras utilizando un NanoDrop.

7.14 Detección de *B. bigemina* en garrapatas

Para la detección de *B. bigemina* en las muestras de DNA de las garrapatas de los tres grupos se realizó un PCR anidado siguiendo la metodología descrita por Mtshali *et al.*, 2013 que consiste en la amplificación de la glicoproteína Gp45 de *B.*

bigemina utilizando las siguientes secuencias de oligonucleótidos para PCR: sentido CATCTAATTTCTCTCATACCCCTCC el oligonucleótido antisentido CCTCGGCTTCAACTCTGATGCCAAAG que amplifican un producto de 270 pb y para el PCR anidado se utilizaron las siguientes secuencias: oligonucleótido sentido CGCAAGCCCAGCACGCCCCGGTGC y oligonucleótido antisentido CCGACCTGGATAGGCTGTGTGATG que amplifican un producto de 170 pb. Se prepararon reacciones de 25 µL agregando 50 ng de templado y utilizando los oligonucleótidos a una concentración de 10 µM bajo las condiciones térmicas de 95°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos a 95°C por 30 segundos, 55°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto y la extensión final a 72°C por 10 minutos en un Thermal Cycler Dual S1000 de BIO-RAD. La reacción de PCR anidado se realizó bajo las mismas condiciones de amplificación utilizando como templado 5 µL del producto de la primera reacción del PCR. Para verificar el resultado se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 2% en condiciones de 80 V por 45 minutos.

7.15 Clonación de Antígeno Asociado a Membrana (*ama-1*)

ama-1 es un gen de copia única en el genoma de *B. bigemina*, característica que le permite ser utilizado para la cuantificación de parásitos utilizando la técnica de PCR tiempo real cuantitativo.

Se realizó PCR punto final de *ama-1* a partir de DNA genómico utilizando las siguientes secuencias de oligonucleótidos: oligonucleótido sentido ATTGAC CCGAAG TGG GAT CA y oligonucleótido antisentido AAGCAG ATT CGA GGG CAA CA que amplifican un producto de 100 pb. Se prepararon reacciones de 25 µL agregando 100 ng de templado y utilizando los oligonucleótidos a una concentración de 10 µM bajo las condiciones térmicas de 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos y la extensión final a 72°C por 7 minutos en un Gene Amp PCR System 9700 de Applied Biosystems. Para verificar el resultado se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 2% en condiciones de 80 V por 45 minutos. Posteriormente se realizó la ligación de AMA-1 en TOPO-TA Cloning Kit for Sequencing (Thermo Fisher Scientific).

7.16 Amplificación de Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (*gapdh*) para qRT-PCR

Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa(*gapdh*) es un gen constitutivo de *B. bigemina*.

Se realizó PCR punto final de *gapdh* a partir de DNA genómico utilizando las siguientes secuencias de oligonucleótidos: oligonucleótido sentido GGT TGT CAA GGT TGG TAT TAA C y oligonucleótido antisentido ATG TAG TCA GAG GTC ATG AAG que amplifican un producto de 123 pb. Se prepararon reacciones de 25 µL agregando 100 ng de templado y utilizando los oligonucleótidos a una concentración de 10 µM bajo las condiciones térmicas de 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos y la extensión final a 72°C por 7 minutos en un Gene Amp PCR System 9700 de Applied Biosystems. Para verificar el resultado se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 2% en condiciones de 80 V por 45 minutos.

7.17 Amplificación de esterasa para qRT-PCR

Esterasa es un gen constitutivo de *R. microplus* y será utilizado para la normalización de *gapdh*.

Se realizó PCR punto final de *esterasa* a partir de DNA genómico utilizando las siguientes secuencias de oligonucleótidos: oligonucleótido sentido CGC TGA AAT GCA CCA TGA AG y oligonucleótido antisentido TCA GTC CGG AAA GCC AGT AGA que amplifican un producto de 99 pb. Se prepararon reacciones de 25 µL agregando 100 ng de templado y utilizando los oligonucleótidos a una concentración de 10 µM bajo las condiciones térmicas de 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos y la extensión final a 72°C por 7 minutos en un Gene Amp PCR System 9700 de Applied Biosystems. Para verificar el resultado se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 2% en condiciones de 80 V por 45 minutos.

7.18 Cuantificación de *B. bigemina* por PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR) con *ama-1*

Se realizó una curva estándar de *ama-1* utilizando las diluciones 1×10^{10} a 1×10^2 a partir de la amplificación de *ama-1* en PCR punto final. Con ayuda del NanoDrop se determinó la concentración y relación 260/280 del producto de PCR, posteriormente con esos datos y con ayuda de software en línea OligoCalc se determinó el volumen necesario para tener una concentración de 1×10^{10} . Para obtener la curva estándar se utilizó el kit Power SYBR Green PCR Master Mix de applied biosystems Thermo Fisher Scientific bajo las mismas condiciones de amplificación utilizadas en el PCR punto final.

Para la evaluación de las muestras se utilizó una concentración de 200 ng de templado de cada muestra. Se evaluaron dos muestras de DNA de garrapata por cada animal (10 muestras por grupo) cada una por triplicado. Debido a que los animales del grupo 3 no fueron infectados con *B. bigemina* se utilizaron como control negativo en la reacción de qRT-PCR.

7.19 Cuantificación de *B. bigemina* por PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR) con *gapdh*

Se realizó una curva estándar de *gapdh* utilizando las diluciones 1×10^{10} a 1×10^2 a partir de la amplificación de *gapdh* en PCR punto final. Con ayuda del NanoDrop se determinó la concentración y relación 260/280 del producto de PCR, posteriormente con esos datos y con ayuda de software en línea OligoCalc se determinó el volumen necesario para tener una concentración de 1×10^{10} . Para obtener la curva estándar se utilizó el kit Power SYBR Green PCR Master Mix de applied biosystems Thermo Fisher Scientific bajo las mismas condiciones de amplificación utilizadas en el PCR punto final.

Para la evaluación de las muestras se utilizó una concentración de 200 ng de templado de cada muestra. Se evaluaron dos muestras de DNA de garrapata por cada animal (10 muestras por grupo) cada una por triplicado. Debido a que los

animales del grupo 3 no fueron infectados con *B. bigemina* se utilizaron como control negativo en la reacción de qRT-PCR.

7.20 Amplificación de *esterasa* como gen normalizador por PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR)

Se realizó una curva estándar de *esterasa* utilizando las diluciones 1×10^{10} a 1×10^2 a partir de la amplificación de *esterasa* en PCR punto final. Con ayuda del NanoDrop se determinó la concentración y relación 260/280 del producto de PCR, posteriormente con esos datos y con ayuda de software en línea OligoCalc se determinó el volumen necesario para tener una concentración de 1×10^{10} . Para obtener la curva estándar se utilizó el kit Power SYBR Green PCR Master Mix de applied biosystems Thermo Fisher Scientific bajo las mismas condiciones de amplificación utilizadas en el PCR punto final.

Para la evaluación de las muestras se utilizó una concentración de 50 ng de templado de cada muestra. Se evaluaron dos muestras de DNA de garrapata por cada animal (10 muestras por grupo) cada una por triplicado.

7.21 Análisis estadísticos

7.22 ELISA indirecta

El punto de corte se determinó con la suma de la media más tres desviaciones estándar, posteriormente se graficó el punto de corte y los valores correspondientes a los sueros pre-inmunización, primera inmunización, segunda inmunización y tercera inmunización de cada animal, se evaluaron diluciones de suero bovino de 1:100 y 1:500.

También se realizó un análisis de ANOVA con un valor de significancia del 95% utilizando el software IBM SPSS Statistics 23.0, para determinar la diferencia estadística de la inmunización entre los tres grupos.

7.23 Eficacia de la vacuna

Se realizó un análisis de ANOVA con un valor de significancia del 95% utilizando el software IBM SPSS Statistics 23.0, de los resultados obtenidos de

número de garrapatas, peso de garrapatas y peso de huevos ovopositados en un periodo de 13 días, además se calculó la media y desviación estándar de estos parámetros, y se determinó la eficacia de los anticuerpos contra rBmVDAC utilizando las siguientes formulas:

7.23.1 Efecto en el número de hembras repletas

$$=100 \times [1 - (NGT/NGC)]$$

Dónde:

NGT es el número de garrapatas repletas que terminaron su ciclo de vida en bovinos del grupo tratado.

NGC es el número de garrapatas repletas que terminaron su ciclo de vida en bovinos del grupo control.

7.23.2 Efecto en el peso de las garrapatas

$$=100 \times [1 - (PGV/PGC)]$$

Dónde:

PGV es el peso de las garrapatas repletas que terminaron su ciclo de vida en bovinos del grupo tratado.

PGC es el peso de las garrapatas repletas que terminaron su ciclo de vida en bovinos del grupo control.

7.23.3 Efecto en la ovoposición

$$=100 \times [1 - (PPGV/PPGC)]$$

Dónde:

PPGV es el promedio del peso de los huevos ovopositados por garrapatas repletas recolectadas de bovinos del grupo tratado.

PPGC es el promedio del peso de los huevos ovopositados por garrapatas repletas recolectadas de bovinos del grupo control.

7.23.4 Efecto en la fertilidad de los huevos

$$= 100 \times [(HC-HT) / HC]$$

Dónde:

HC es índice de viabilidad en controles.

HT es índice de viabilidad en grupo tratamiento

7.23.5 Eficacia de la vacuna

$$= 100 - [1 - (RGA \times RGO \times RGF)]$$

Dónde:

RGA es la reducción en el número de hembras repletas.

RGO es la reducción en la ovoposición.

RGF es la reducción en la fertilidad de los huevos de garrapatas alimentadas en los bovinos del grupo tratado comparado con el grupo control.

7.24 Análisis de qRT-PCR

Los datos obtenidos de la qRT-PCR para la amplificación de gapdh y esterasa fueron normalizados por el método $\Delta\Delta Ct$ y posteriormente se realizó una prueba de t de Student con un valor de significancia del 95% utilizando el software IBM SPSS Statistics 23.0, de los resultados normalizados del qRT-PCR de garrapatas de los grupos 1 y 2 que fueron infectados, con el objetivo de determinar si existe diferencia estadística entre el grupo 1 y grupo 2.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se muestran los resultados obtenidos del trabajo de laboratorio, experimental y análisis estadísticos necesarios para cumplir el objetivo general del presente trabajo.

8.1 Inducción de rBmVDAC

La inducción de rBmVDAC fue necesaria para obtener proteína para realizar las inmunizaciones de los bovinos de los grupos tratamiento, antes de realizar la purificación se realizó una electroforesis de proteínas en un gel de acrilamida SDS/PAGE al 12 % para verificar la correcta inducción de rBmVDAC.

Para obtener la cantidad suficiente para preparar las dosis para inmunizar, se realizaron 5 inducciones de 500 mL cada una. A continuación, se muestra una figura 3 de un SDS/PAGE 12% de la inducción número 4.

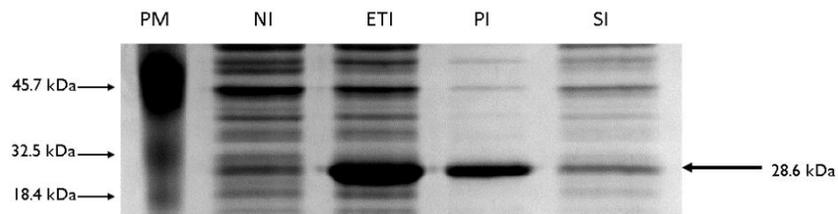


Figura 3. SDS/PAGE de cultivo inducido de rBmVDAC. PM: marcador de peso molecular, NI: no inducido, ETI: extracto total inducido, PI: pastilla de cultivo inducido y SI: sobrenadante inducido.

Posteriormente para corroborar que la proteína presente en el extracto total era rBmVDAC se realizó una prueba de Western blot utilizando anticuerpos Anti HIS-TAG. En la figura 4 se muestra el resultado.

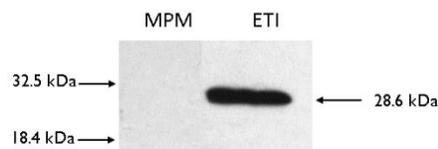


Figura 4. Western blot de inducción de rBmVDAC. MPM: marcador de peso molecular y ETI: extracto total inducido.

8.2 Purificación

Cuando se obtuvieron los resultados del Western blot fue necesario lisar las células utilizando la técnica de sonicación para posteriormente hacer la purificación de rBmVDAC en columnas de afinidad en un sistema FPLC. Para obtener la cantidad suficiente de proteína recombinante fue necesario hacer 6 purificaciones, después de cada purificación se realizó una electroforesis de proteínas en un gel de acrilamida SDS/PAGE al 12% de las fracciones elegidas de acuerdo a los resultados del cromatograma proporcionado por el equipo FPLC. A continuación, se muestra la figura 5 con las fracciones de la primera purificación de rBmVDAC.

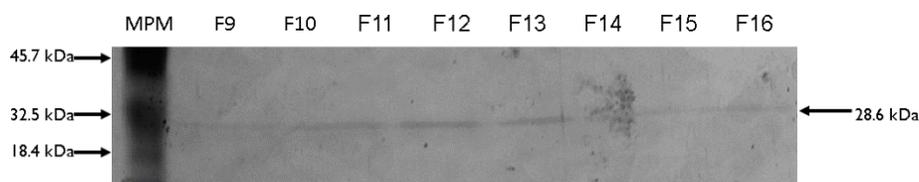


Figura 5. SDS/PAGE de fracciones purificadas de rBmVDAC. MPM: marcador de peso molecular y F: número de fracción.

8.3 Diálisis y cuantificación de rBmVDAC

Posterior a la purificación de rBmVDAC realizada en el laboratorio de Genómica de la UACM, se realizó la diálisis de la proteína y la cuantificación por medio de un ensayo de Bradford, para obtener la curva estándar se utilizó albumina sérica bovina. A continuación, se muestra en la figura 6 la curva estándar y las concentraciones (cuadro 3) de proteína obtenidas:

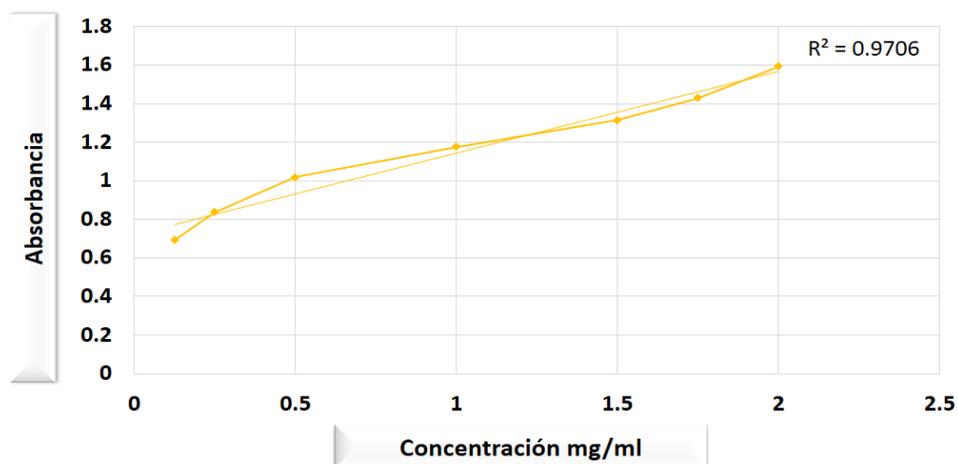


Figura 6. Curva estándar de ensayo de Bradford con alúmina sérica bovina

Cuadro 3. Concentración de rBmVDAC

Mezcla de fracciones	Concentración $\mu\text{g/mL}$
1	0.136
2	0.216
3	0.198
4	0.174
5	0.212
6	0.198
7	0.186

8.4 Examen físico de bovinos

A continuación, se muestran los resultados de los parámetros del examen físico realizado a los bovinos antes de comenzar el experimento, los valores de referencia se encuentran en el ANEXO 10.1.

En el cuadro 4 se observan los resultados del examen físico hecho al becerro Holstein, los resultados obtenidos muestran que el becerro se encontraba saludable.

Cuadro 4. Resultados de examen físico del becerro Holstein

	Holstein
Frecuencia cardiaca/min	49
Pulso/min	49
Frecuencia respiratoria/min	35
Temperatura corporal °C	38.4
Movimientos ruminales/3 min	2
Condición corporal (1-5)	3.5
Peso Kg	130
Signos clínicos	N
Postura y marcha	N
Pelaje	N
Mucosas	N
Ganglios linfáticos	N
Exploración de sistemas	N

Cuadro 4. N: normal.

En el cuadro 5 se observan los resultados del examen físico de los bovinos del grupo 1, los resultados obtenidos muestran que los bovinos se encontraban saludables.

Cuadro 5. Resultados de examen físico de bovinos del grupo 1

	Grupo 1				
No de arete	1369	1341	7974	5907	1347
Frecuencia cardiaca/min	52	60	60	55	50
Pulso/min	52	60	60	55	50
Frecuencia respiratoria/min	31	40	32	37	30
Temperatura corporal °C	38.4	38.4	38.5	38.4	38.6
Movimientos ruminales/3 min	2	2	2	2	2
Condición corporal (1-5)	5	5	5	5	
Peso Kg	294	290	326	306	285
Estado reproductivo	V	V	V	V	V
Signos clínicos	N	N	N	N	N
Postura y marcha	N	N	N	N	N
Pelaje	N	N	N	N	N
Mucosas	N	N	N	N	N
Ganglios linfáticos	N	N	N	N	N
Exploración de sistemas	N	N	P	P	N

Cuadro 5. N: normal, P: papilomatosis y V: vacía.

En el cuadro 6 se observan los resultados del examen físico de los bovinos del grupo 2, los resultados obtenidos muestran que los bovinos se encontraban saludables.

Cuadro 6. Resultados de examen físico de los bovinos del grupo 2

Grupo 2					
No de arete	1614	7474	7316	8583	1340
Frecuencia cardiaca/min	58	63	55	70	61
Pulso/min	58	63	55	70	61
Frecuencia respiratoria/min	35	39	40	57	50
Temperatura corporal °C	38.6	38.7	38.4	38.5	38.6
Movimientos ruminales/3 min	2	2	2	2	2
Condición corporal (1-5)	5	5	5	5	5
Peso Kg	293	296	275	281	281
Estado reproductivo	V	V	V	V	V
Signos clínicos	N	N	N	N	N
Postura y marcha	N	N	N	N	N
Pelaje	N	N	N	N	N
Mucosas	N	N	N	N	N
Ganglios linfáticos	N	N	N	N	N
Exploración de sistemas	N	N	P	N	N

Cuadro 6. N: normal, P: papilomatosis y V: vacía.

En el cuadro 7 se observan los resultados del examen físico de los bovinos del grupo 3, los resultados obtenidos muestran que los bovinos se encontraban saludables.

Cuadro 7. Resultados de examen físico de bovinos del grupo 3

Grupo 3					
No de arete	7483	7479	4572	6289	0827
Frecuencia cardiaca/min	52	71	61	50	58
Pulso/min	52	71	61	50	58
Frecuencia respiratoria/min	28	42	35	30	32
Temperatura corporal °C	38.6	38.7	2	38.5	38.7
Movimientos ruminales/3 min	2	2	5	2	2
Condición corporal (1-5)	5	5	170	5	5
Peso Kg	305	271		302	288
Estado reproductivo	V	V	V	V	V
Signos clínicos	N	N	N	N	N

Postura y marcha	N	N	N	N	N
Pelaje	N	N	N	N	N
Mucosas	N	N	N	N	N
Ganglios linfáticos	N	N	N	N	N
Exploración de sistemas	N	P	P	P	N

Cuadro 7. N: normal, P: papilomatosis y V: vacía.

Con los resultados obtenidos del examen físico de los bovinos se observó que los animales estaban saludables, a excepción de los animales en los que se observó una ligera papilomatosis que a los pocos días desapareció. Y con un cambio de dieta paulatino se logró bajar la condición física de un valor inicial de 5 a un valor de 4, que se mantuvo durante todo el experimento.

8.5 ELISA indirecta

Para determinar el título de anticuerpos posterior a las 3 inmunizaciones de los bovinos se realizó una ELISA indirecta de los sueros tomados antes de cada inmunización y 14 días después de la última inmunización, se probaron 2 diluciones 1:100 y 1:500. A continuación, se muestran las gráficas correspondientes a cada animal de cada uno de los grupos de acuerdo a la dilución 1:100 y :500.

En la figura 7 se observan los resultados de ELISA indirecta para la dilución 1:100 de los sueros pre-inmunización, primera inmunización, segunda inmunización y tercera inmunización de los animales del grupo 1 (control), se puede observar que en ningún momento pasan el punto de corte.

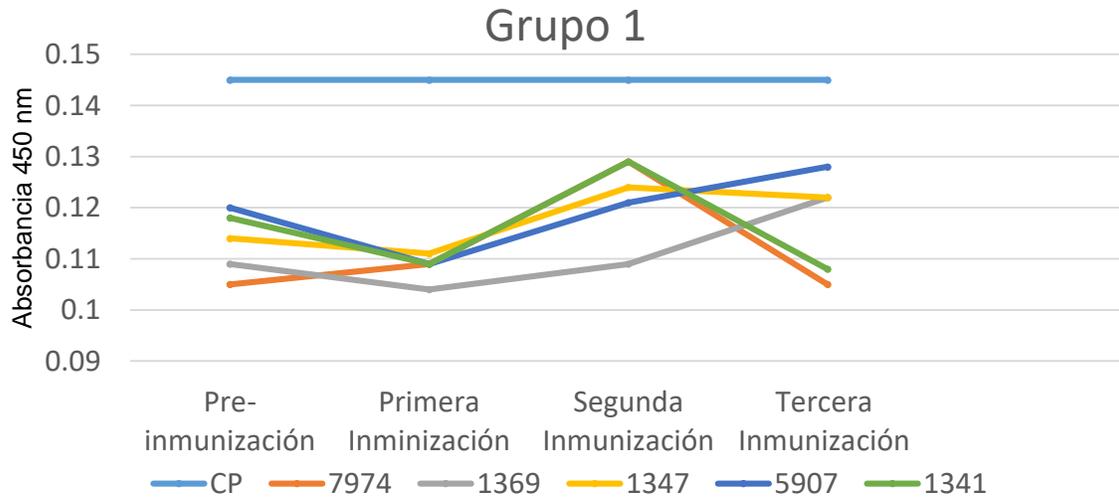


Figura 7. ELISA indirecta del grupo 1. Dilución 1:100 de sueros pre-inmunización, primera inmunización, segunda inmunización y tercera inmunización de bovinos del grupo 1. CP: punto de corte, 7974, 1369, 1347, 5907 y 1341 número de arete de bovinos.

En la figura 8 se observan los resultados de ELISA indirecta para la dilución 1:100 de los sueros pre-inmunización, primera inmunización, segunda inmunización y tercera inmunización de los animales del grupo 2 (inmunizado con 100 µg de rBmVDAC), se puede observar que los sueros pre inmunización no pasan el punto de corte, mientras que en los sueros colectados después de la primera inmunización se observa un incremento en el título de anticuerpos en cada inmunización.

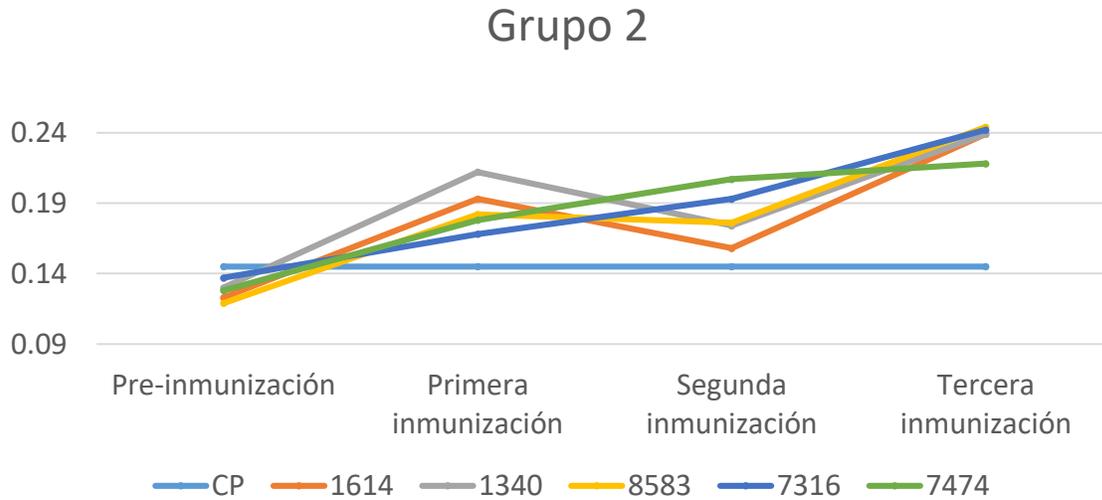


Figura 8. ELISA indirecta del grupo 2. Dilución 1:100 de sueros pre-inmunización, primera inmunización, segunda inmunización y tercera inmunización de bovinos del grupo 2. CP: punto de corte, 1614, 1340, 8583, 7316 y 7474 número de arete de bovinos.

En la figura 9 se observan los resultados de ELISA indirecta para la dilución 1:100 de los sueros pre-inmunización, primera inmunización, segunda inmunización y tercera inmunización de los animales del grupo 3 (inmunizado con 100 µg de rBmVDAC), se puede observar que los sueros pre inmunización no pasan el punto de corte, mientras que en los sueros colectados después de la primera inmunización se observa un incremento en el título de anticuerpos en cada inmunización, estos resultados son similares a los obtenidos en el grupo 2.

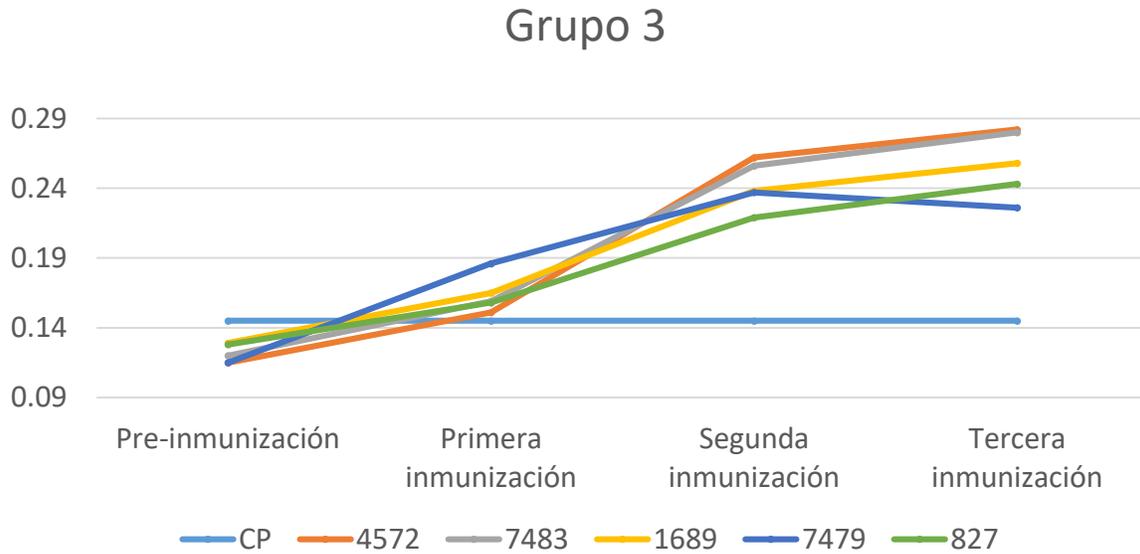


Figura 9. ELISA indirecta del grupo 3. Dilución 1:100 de sueros pre-inmunización, primera inmunización, segunda inmunización y tercera inmunización de bovinos del grupo 3. CP: punto de corte, 4572, 7483, 1689, 7479 y 827 número de arete de bovinos.

En la figura 10 se observan los resultados de ELISA indirecta para la dilución 1:500 de los sueros pre-inmunización, primera inmunización, segunda inmunización y tercera inmunización de los animales del grupo 1 (control), se puede observar que en ningún momento pasan el punto de corte.

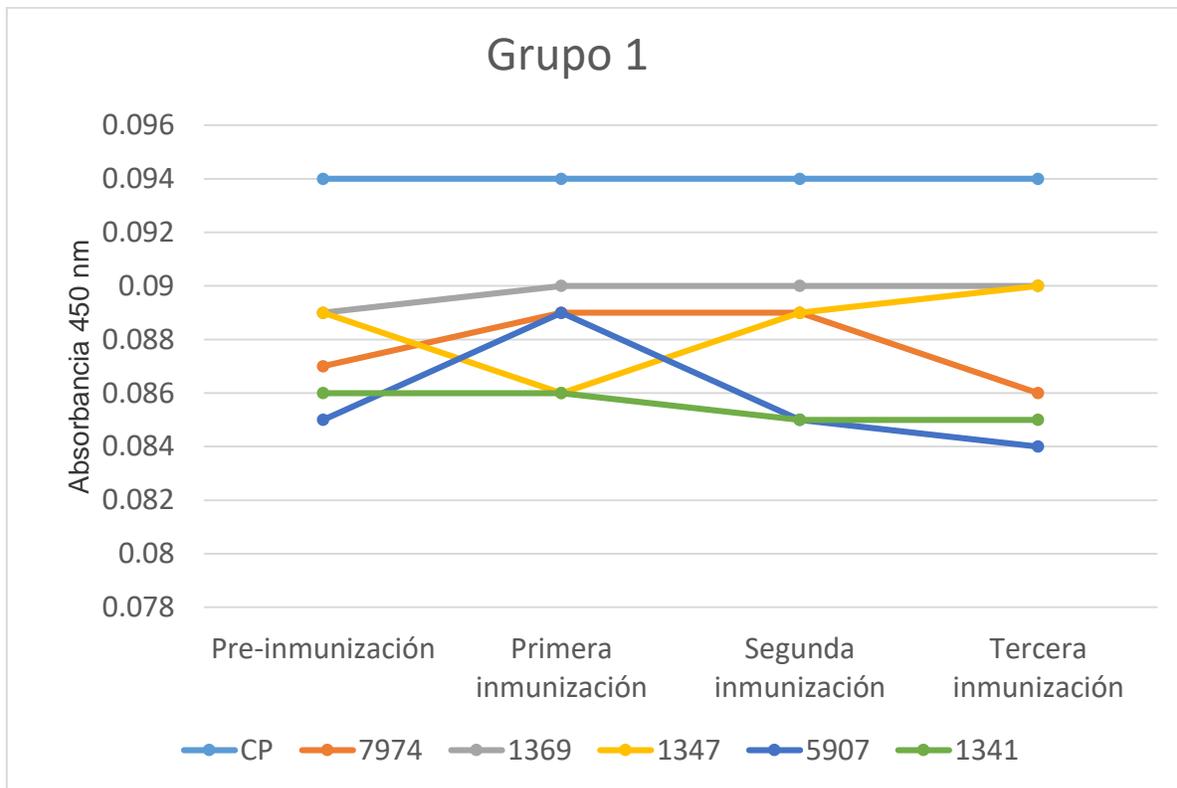


Figura 10. ELISA indirecta del grupo 1. Dilución 1:500 de sueros pre-inmunización, primera inmunización, segunda inmunización y tercera inmunización de bovinos del grupo 1. CP: punto de corte, 7974, 1369, 1347, 5907 y 1341 número de arete de bovinos.

En la figura 11 se observan los resultados de ELISA indirecta para la dilución 1:500 de los sueros pre-inmunización, primera inmunización, segunda inmunización y tercera inmunización de los animales del grupo 2 (inmunizado con 100 µg de rBmVDAC), se puede observar que los sueros pre inmunización no pasan el punto de corte, mientras que en los sueros correspondientes a la segunda y tercera inmunización se observa un incremento en el título de anticuerpos.

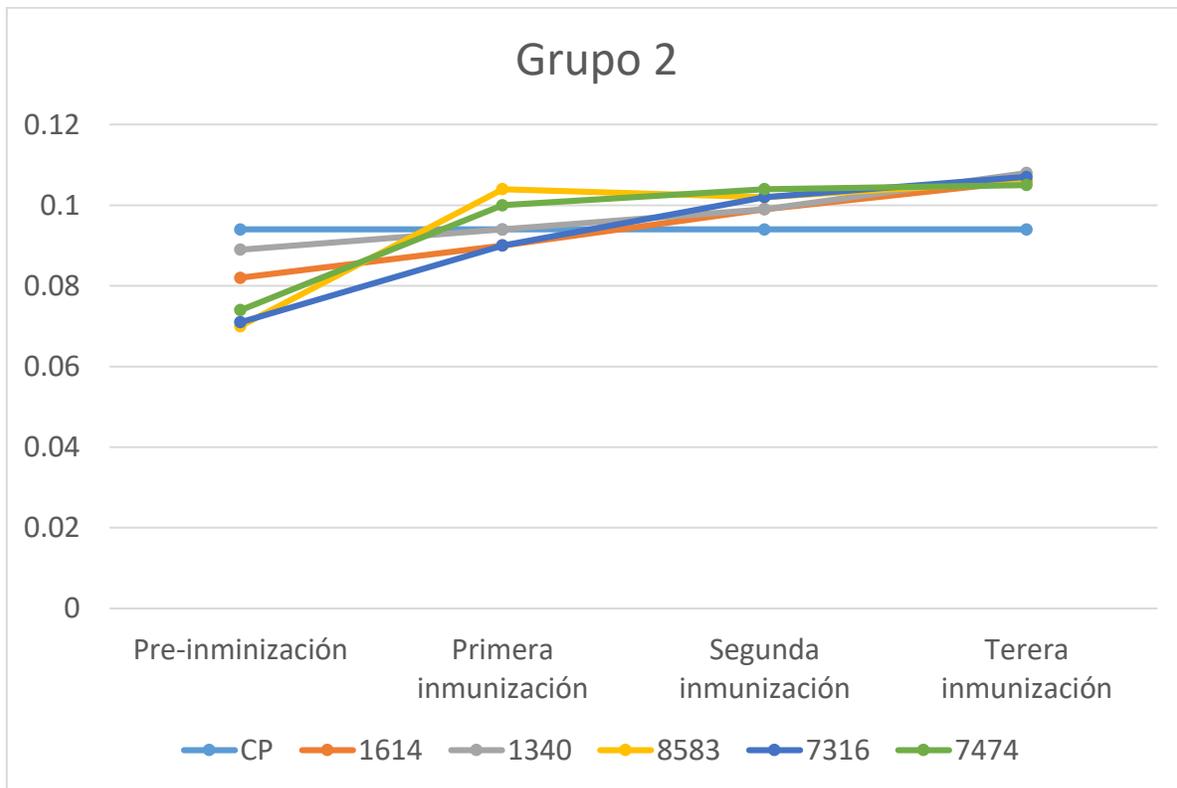


Figura 11. ELISA indirecta del grupo 2. Dilución 1:500 de sueros pre-inmunización, primera inmunización, segunda inmunización y tercera inmunización de bovinos del grupo 2. CP: punto de corte, 1614, 1340, 8583, 7316 y 7474 número de arete de bovinos.

En la figura 12 se observan los resultados de ELISA indirecta para la dilución 1:500 de los sueros pre-inmunización, primera inmunización, segunda inmunización y tercera inmunización de los animales del grupo 3 (inmunizado con 100 µg de rBmVDAC), se puede observar que los sueros pre inmunización no pasan el punto de corte, mientras que en los sueros correspondientes a la segunda y tercera inmunización se observa un incremento en el título de anticuerpos, estos resultados son similares a los obtenidos en el grupo 2.

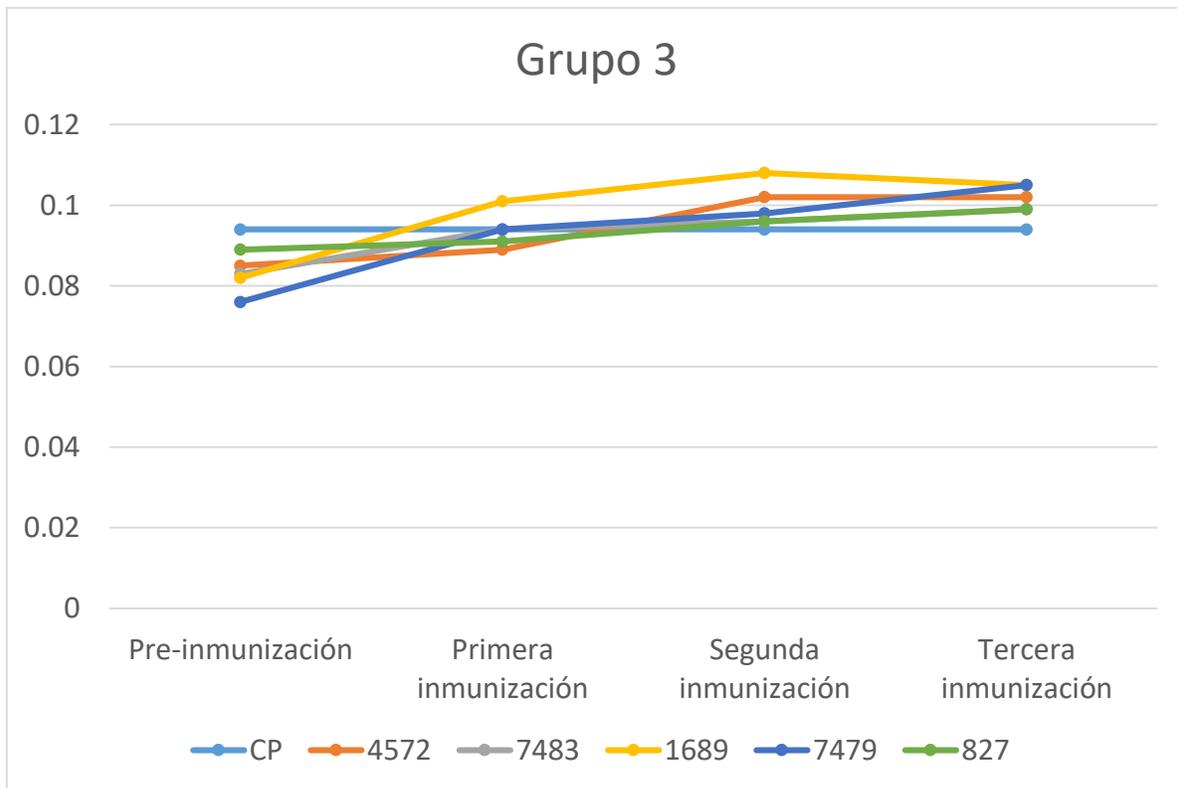


Figura 12. ELISA indirecta de sueros de bovinos del grupo 3. Dilución 1:500 de sueros pre-inmunización, primera inmunización, segunda inmunización y tercera inmunización de bovinos del grupo 3. CP: punto de corte, 4572, 7483, 1689, 7479 y 827 número de arete de bovinos.

El principio para el control inmunológico contra infestaciones de garrapatas es la respuesta de anticuerpos policlonales contra el antígeno blanco. En el estudio de candidatos vacúnales se evalúa la respuesta inmunológica de las inmunizaciones por medio de la titulación de anticuerpos de animales inmunizados, una técnica utilizada comúnmente para este fin es ELISA indirecta (García-García *et al.*, 1999).

En el presente trabajo se probaron diluciones 1: 100 y 1: 500 de los bovinos de los tres grupos, a continuación, se muestra en el cuadro 8 las diluciones utilizadas en otros trabajos para determinar el título de anticuerpos de bovinos inmunizados con diferentes antígenos de *R. microplus* y la referencia de cada una.

Cuadro 8. Diluciones de suero bovino

Diluciones de sueros bovinos	
Dilución	Referencia
1: 25	Martiz-Oliver <i>et al.</i> , 2012
1: 100	Lambertz <i>et al.</i> , 2012
1: 100	Merino <i>et al.</i> , 2011
1: 100	Pipano <i>et al.</i> , 2003
1: 300	Andreotti, 2016
1: 500	de Vos <i>et al.</i> , 2001
1: 1000	Almanzán <i>et al.</i> , 2010
1: 1000	Opdebeeck <i>et al.</i> , 1988 b

En el presente trabajo los resultados de ELISA indirecta muestran que los sueros de los bovinos inmunizados con rBmVDAC de la dilución 1: 100 todos pasan el punto de corte, mientras que en la dilución 1: 500 pasan el punto de corte a partir de la segunda inmunización. También se muestra que los sueros de los animales del grupo 1 (control) no pasan el punto de corte en ninguna de las diluciones probadas.

8.7 Parasitemia, hematocrito y temperatura corporal de bovinos infectados

A lo largo del experimento los animales infectados con *B. bigemina* fueron monitoreados diariamente y se revisó la temperatura corporal, porcentaje de hematocrito y porcentaje de parasitemia mediante tinción de frotis sanguíneo.

En el cuadro 9 se muestran los valores obtenidos de temperatura, hematocrito y porcentaje de parasitemia durante el periodo que el becerro Holstein que se infectó con *B. bigemina* capa Chiapas.

Cuadro 9. Temperatura corporal, hematocrito y parasitemia de bovino Holstein

Fecha	Becerro Holstein		
	TC °C	%H	%P
21-10-2018	N	N	0
2-11-2018	N	N	0
4-11-2018	N	N	0
7-11-2018	N	N	0
8-11-2018	N	N	0.25
9-11-2018	A	B	1.1
10-11-2018	A	B	1.5
10-11-2018	A	B	1.2

Cuadro 9. N: normal, A: alto y B: bajo.

Cuando el becerro tuvo una parasitemia de 1.2 % se tomó 500 mL sangre para infectar a los bovinos del grupo 1 y grupo 2.

En el cuadro 10 se muestran los valores obtenidos de temperatura y hematocrito durante el periodo que los bovinos del grupo 1 se infectaron con *B. bigemina* capa Chiapas.

Cuadro 10. Temperatura corporal y hematocrito de bovinos del grupo 1

Fecha	Grupo 1									
	1369		5907		1341		7974		1347	
	TC °C	% H	TC °C	% H	TC °C	% H	TC °C	% H	TC °C	% H
16-11-2018	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
17-11-2018	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
18-11-2018	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
19-11-2018	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
20-11-2018	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
21-11-2018	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
22-11-2018	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
23-11-2018	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Cuadro 10. N: normal, A: alto y B: bajo.

Durante el periodo de infección de *B. bigemina* en los animales del grupo 1 (control), no mostraron fiebre, signos clínicos y los valores de hematocrito se mantuvieron normales.

En el cuadro 11 se muestran los valores obtenidos de temperatura y hematocrito durante el periodo que los bovinos del grupo 2 se infectaron con *Babesia bigemina* capa Chiapas.

Cuadro 11. Temperatura corporal y porcentaje de hematocrito de bovinos del grupo 2

Fecha	Grupo 2									
	7474		8583		1360		1614		7316	
	TC °C	% H	TC °C	% H	TC °C	% H	TC °C	% H	TC °C	% H
16-11-2018	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
17-11-2018	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
18-11-2018	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
19-11-2018	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
20-11-2018	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
21-11-2018	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
22-11-2018	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
23-11-2018	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Cuadro 11. N: normal, A: alto y B: bajo.

Durante el periodo de infección de *B. bigemina* en los animales del grupo 2, no mostraron fiebre, signos clínicos y los valores de hematocrito se mantuvieron normales.

8.7 Análisis estadístico de datos de número, peso, peso de huevos, fertilidad y eficacia de la vacuna

Se realizó un análisis de ANOVA y prueba post-Hoc Tukey con una significancia del 95% para determinar si existe diferencia estadística significativa entre los tres grupos.

8.7.1 Número de garrapatas

A partir del día 19 post-infestación hasta el día 23 pots-infestación se colectaron diariamente las garrapatas que terminaron su alimentación y se llevaron al laboratorio de Microbiología de la FCN, UAQ, donde fueron lavadas, pesadas, contadas y puestas en una incubadora.

En el cuadro 12 se muestra el número de garrapatas colectadas de cada bovino de los tres grupos.

Cuadro 12. Número de garrapatas colectadas

Grupo	No de arete	Garrapatas colectadas
1	1369	721
1	1347	666
1	7974	656
1	5907	653
1	1341	613
2	1614	774
2	1360	772
2	8583	741
2	7316	708
2	7474	709
3	0827	473
3	7483	420
3	1340	418
3	7479	402
3	6289	362

En la figura 13 se muestra una gráfica del número de garrapatas colectadas de los tres grupos.

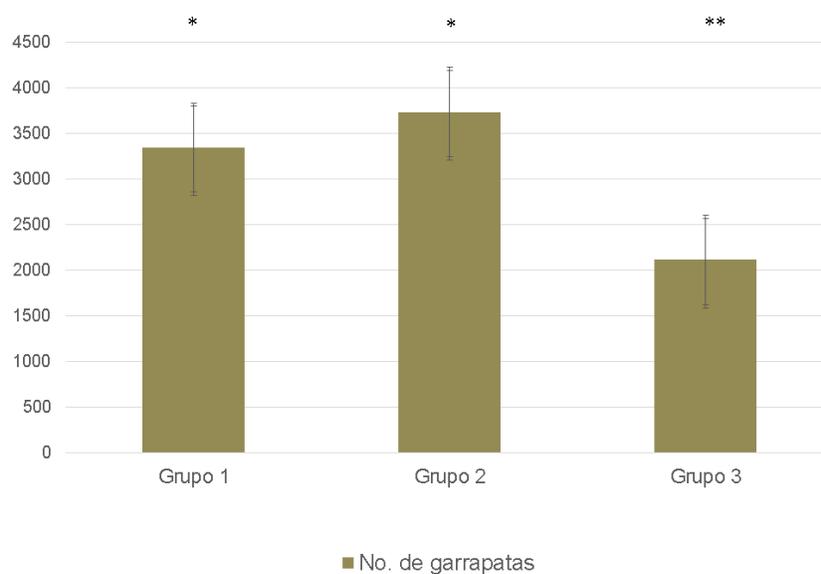


Figura 13. Número de garrapatas colectadas de los 3 grupos. Grupo 1: inmunizado con adyuvante, infestado con larvas e infectado con *B. bigemina*, Grupo 2: inmunizado con rBmVDAC, infestado con larvas e infectado con *B. bigemina*, Grupo 3: inmunizado con rBmVDAC e infestado con larvas. *: p=0.01 **: p=0.001.

En el cuadro 13 se muestran los resultados de ANOVA para número de garrapatas obtenidas de los tres grupos.

Cuadro 13. ANOVA: número de garrapatas

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	288288.933	2	144144.467	103.676	0.000
Dentro de grupos	16684	12	1390.333		
Total	304972.933	14			

En el cuadro 14 se muestran los resultados de la prueba HSH Tukey para número de garrapatas obtenidas de los tres grupos.

Cuadro 14. HSH Tukey: número de garrapatas

HSD Tukey						
Grupo	Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-78.6	23.58	0.015	-141.51	-15.69
	3	246.8	23.58	0.000	183.89	309.71
2	1	78.6	23.58	0.015	15.69	141.51
	3	325.4	23.58	0.000	262.49	388.3
3	1	-246.6	23.58	0.000	-309.71	-183.89
	2	-325.4	23.58	0.000	-388.31	-262.49

En un trabajo realizado por Rodríguez y colaboradores en el 2015 b, encontraron que en presencia de *B. bigemina* la proteína BmVDAC se sobrexpresas en garrapatas *R. microplus* a las 24 h y 48h post-infección, ya que *B. bigemina* se desarrolla en el lumen del intestino de la garrapata 24 horas post-repleción y a las 72 horas post-repleción los vermiculos entran a hemolinfa (Reik, 1964).

En los resultados del número de garrapatas colectadas, podemos ver existe diferencia estadística entre los tres grupos de acuerdo al valor de $p= 0.000$. En el grupo 1 (control) y grupo 2, en los cuales los bovinos fueron infectados con *B. bigemina*, podemos observar que en el grupo 2 se colectaron más garrapatas que en el grupo 1, debido a que *B. bigemina* infecta las células del intestino de *R. microplus*, ocasionando alta mortalidad en hembras repletas a partir del quinto día post-colecta, las garrapatas que no han sido expuestas previamente a la infección de *Babesia* tienen mayor mortalidad ya que no han desarrollada una asociación natural con el protozoario (Guglielmone *et al.*, 1996). Al comparar el grupo 3 en el cual los bovinos no fueron infectados con *B. bigemina*, con grupo control y grupo 2 en los cuales los bovinos si fueron infectados, podemos observar que se colecto un menor número de garrapatas, esto es a causa que la proteína BmVDAC se sobre expresa en garrapatas infectadas, entonces al haber mayor concentración de proteína BmVDAC en las garrapatas infectados no se logra apreciar el efecto de los anticuerpos contra rBmVDAC sobre las garrapatas, a diferencia de las garrapatas del grupo 3 en las cuales es evidente la acción de los anticuerpos en el número de garrapatas colectadas al ser menor la concentración de proteína BmVDAC en ausencia de infección de acuerdo a los resultados de expresión de BmVDAC encontrados por Rodríguez y colaboradores en el 2015 b.

8.7.2 Peso de garrapatas

En el cuadro 15 se encuentran los resultados de ANOVA para peso de garrapatas obtenidas de los tres grupos.

Cuadro 15. ANOVA: peso de garrapatas

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	0.400	2	0.200	3.936	0.020
Dentro de grupos	460.853	9081	0.051		
Total	461.252	9083			

En el cuadro 16 se muestran los resultados de la prueba HSH Tukey para el peso de garrapatas obtenidas de los tres grupos.

Cuadro 16. HSH Tukey: peso de garrapatas

HSD Tukey						
					Intervalo de confianza al 95%	
Grupo	Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Límite inferior	Límite superior
1	2	0.00877	0.00539	0.234	0.0071	0.0104
	3	-0.00824	0.00631	0.392	-0.0102	-0.0063
2	1	-0.00877	0.00539	0.234	-0.0104	-0.0071
	3	-0.01701	0.00618	0.016	-0.0189	-0.0151
3	1	0.00824	0.00631	0.392	0.0063	0.0102
	2	0.01701	0.00618	0.016	0.0151	0.0189

Cuando las garrapatas se alimentan de sangre de bovinos inmunizados con Bm86 las células epiteliales del intestino se lisan por vías de mecanismos mediados por anticuerpos de defensa del hospedador ocasionando menor número de garrapatas que terminan su ciclo de vida sobre el bovino, menor peso y capacidad de reproducción (García-García *et al.*, 2000).

Desde que comienza la digestión de sangre en el intestino de las garrapatas, los anticuerpos entran en contacto con los antígenos del intestino (Rachinsky *et al.*, 2008). El intestino de las garrapatas que se alimentan con sangre de bovinos inmunizado muestran daño que comienza a observarse a las 24 h-48 h post-repleción (Agbede *et al.*, 1986).

En los resultados del peso de garrapatas colectadas, podemos ver la diferencia estadística entre los tres grupos de acuerdo al valor de $p= 0.020$. En el grupo 1 (control) y grupo 2, en los cuales los bovinos fueron infectados con *B. bigemina*, podemos observar que en el grupo 2 se colectaron garrapatas de mayor peso que en el grupo 1 ($p= 0.23$), esto es a causa de que en garrapatas susceptibles alimentadas con sangre de bovino infectada con *B. bigemina* ocurre destrucción de células epiteliales del intestino (Reik, 1964).

Al comparar el grupo 3 en el cual los bovinos no fueron infectados con grupo 2 en los cuales los bovinos si fueron infectados con *B. bigemina*, podemos observar que se colectaron garrapatas de menor peso en el grupo 3 ($p= 0.016$), esto es a causa que la proteína BmVDAC se sobre expresa en garrapatas infectadas, entonces al haber menor concentración de proteína BmVDAC en las garrapatas no infectadas se logra apreciar el efecto de los anticuerpos contra rBmVDAC sobre las garrapatas.

En 1986 Johnston y colaboradores encontraron que el 40% de garrapatas que se alimentaron con sangre de bovinos inmunizados con antígenos de intestino de garrapata mostraron un color rojo debido a la hemoglobina presente en la hemolinfa, además se encontró un 10% de eritrocitos en un hematocrito de hemolinfa, las garrapatas del grupo control no mostraron esos cambios, debido a la lisis de células epiteliales del intestino por acción de anticuerpos y otros componentes del sistema inmunológico del bovino. Posteriormente en un trabajo realizado por Rodríguez *et al.*, 1994, encontraron que los anticuerpos contra la glicoproteína Bm86 del intestino de las garrapatas provocan daños suficientes en la garrapata, la digestión de la sangre en esas garrapatas se ve inhibida a causa de

que los anticuerpos y otros componentes de la sangre causan lisis de las células epiteliales del intestino.

8.7.3 Peso de huevos

Los huevos de las garrapatas fueron pesados el día 13 post-ovoposición, se colocaron en viales de 1g y se dejaron en una incubadora para su eclosión.

En el cuadro 17 se muestra el peso de los huevos ovopositados por las garrapatas de los bovinos de los tres grupos.

Cuadro 17. Peso de huevos

Grupo	No de arete	Peso de huevos (g)
1	1369	33.7
1	1347	25.49
1	7974	19.13
1	5907	26.79
1	1341	12.9
2	1614	40.68
2	1360	27.92
2	8583	35.28
2	7316	20.56
2	7474	25.13
3	0827	33.43
3	7483	11.53
3	1340	10.22
3	7479	9.79
3	6289	9.02

En la figura 14 se muestra una gráfica del peso de huevos de las garrapatas de los tres grupos.

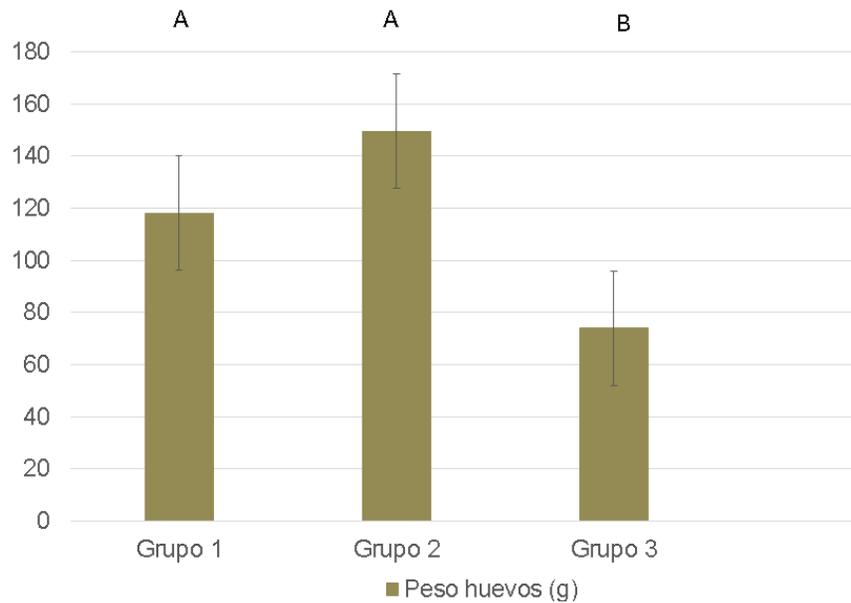


Figura 14. Gramos de huevos obtenidos de los 3 grupos. Grupo 1: inmunizado con adyuvante, infestado con larvas e infectado con *B. bigemina*, Grupo 2: inmunizado con rBmVDAC, infestado con larvas e infectado con *B. bigemina*, Grupo 3: inmunizado con rBmVDAC e infestado con larvas.

En el cuadro 18 se encuartarán los resultados de ANOVA para peso de huevos obtenidos de las garrapatas de los tres grupos.

Cuadro 18. ANOVA: peso de huevos

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	576.4	2	288.204	3.654	0.058
Dentro de grupos	946.5	12	78.87		
Total	1522.9	14			

En el cuadro 19 se muestran los resultados de la prueba HSH Tukey para el peso de huevos obtenidos de las garrapatas de los tres grupos.

Cuadro 19. HSH Tukey: número de garrapatas

HSD Tukey						
					Intervalo de confianza al 95%	
Grupo	Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Límite inferior	Límite superior
1	2	8.804	5.6	0.296	-6.18	23.79
	3	-6.312	5.6	0.518	-21.30	8.67
2	1	-8.804	5.6	0.296	-23.79	6.18
	3	-15.116	5.6	0.048	-30.10	-0.13
3	1	6.31	5.6	0.518	-8.67	21.30
	2	15.16	5.6	0.048	0.13	30.10

Las hembras requieren de una alimentación apropiada para una reproducción efectiva y una producción masiva de huevos (Parizi *et al.*, 2009). Una garrapata se alimenta aproximadamente de 1.5 mL de sangre, cuando las garrapatas se alimentan de sangre con anticuerpos y otros componentes del sistema inmune se genera lisis de las células del intestino (Rand *et al.*, 1986).

En los resultados del peso de huevos, podemos ver que no existe diferencia estadística entre los tres grupos de acuerdo al valor de $p= 0.58$. En el grupo 1 (control) y grupo 2, en los cuales los bovinos fueron infectados con *B. bigemina*, podemos observar que ovoposición fue similar ($p= 0.51$). Al comparar el grupo 3 en el cual los bovinos no fueron infectados, con grupo 2 en los cuales los bovinos si fueron infectados podemos observar que se obtuvo menos huevos en el grupo 3 ($p= 0.048$), esto es a causa que la proteína BmVDAC se sobre expresa en garrapatas infectadas, entonces al haber mayor concentración de proteína BmVDAC en las garrapatas infectados no se logra apreciar el efecto de los anticuerpos contra rBmVDAC sobre las garrapatas, ya que la destrucción de intestino afecta la ovoposición en hembras porque detiene o bloquea la síntesis de

vitelogenina (Agbede *et al.*, 1986) y la posterior acumulación de vitelogenina en tejido de los ovarios (Parizi *et al.*, 2009).

8.7.4 Fertilidad de huevos

Se realizó el conteo de larvas y huevos sin eclosionar de un vial de 1g de cada uno de los grupos. En el cuadro 20 se muestran los resultados obtenidos.

Cuadro 20. Número de larvas y huevos sin eclosionar

Grupo	Larvas vivas	Huevos sin eclosionar
Grupo 1 (control)	4718	10729
Grupo 2	2570	13369
Grupo 3	1455	15375

En la figura 15 se muestra una gráfica del peso de huevos de las garrapatas de los tres grupos.

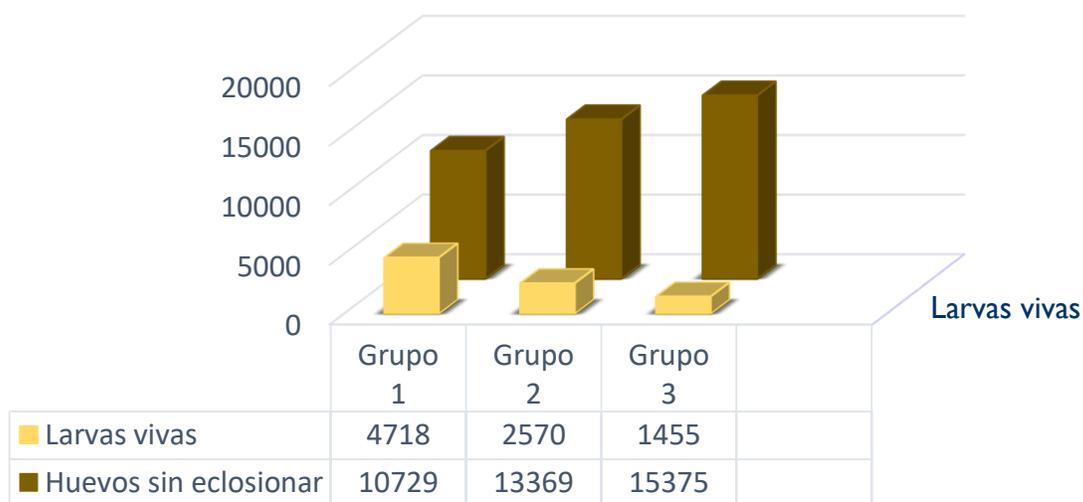


Figura 15. Larvas y huevos sin eclosionar de los 3 grupos. Grupo 1: inmunizado con adyuvante, infestado con larvas e infectado con *B. bigemina*, Grupo 2: inmunizado con rBmVDAC, infestado con larvas e infectado con *B. bigemina*, Grupo 3: inmunizado con rBmVDAC e infestado con larvas.

En las garrapatas la digestión es intracelular, la hemoglobina, lípidos y otras moléculas son movilizadas vía hemolinfa a otros tejidos de la garrapata un ejemplo son las hemoproteínas HeLp que transportan hemoglobina a los tejidos y la proteína Yolk pro-catepsina que está asociada a la movilización de vitelogenina a los ovarios (Parizi *et al.*, 2012).

En el grupo 2 se encontró una reducción de fertilidad del 31.12%, mientras que en el grupo 3 la reducción de fertilidad fue de 55.80%, esto puede ser a causa de que los anticuerpos también tienen actividad en otros tejidos al pasar a la hemolinfa y ser transportados a ovarios por medio de proteínas (Rachinsky *et al.*, 2008).

8.8 Eficacia de la vacuna

Siguiendo las fórmulas para evaluar la eficiencia de la vacuna, se analizaron los datos, en el cuadro 21 se muestran los resultados.

Cuadro 21. Eficacia de rBmVDAC

	DT	DW	DO	DF	E
Grupo 2	-11.87%	-9.06%	-26.73%	32.12%	23%
Grupo 3	37.45%	0%	37.34%	55.80%	88%

Grupo 2: inmunizado con rBmVDAC, infestado con larvas e infectado con *B. bigemina*, Grupo 3: inmunizado con rBmVDAC e infestado con larvas. DT: efecto en el número de hembras repletas, DW: efecto en el peso de hembras repletas, DO: efecto en la ovoposición, DF: efecto en la fertilidad de los huevos y E: eficacia de la vacuna.

En el cuadro 22 se muestran los resultados encontrados en otros trabajos en los cuales determinaron la eficiencia de la vacuna de candidatos vacunales de *R. microplus*.

Cuadro 22. Eficacia de otros candidatos vacunales

Inmunógeno	Dosis	DT	DW	DO	DF	E	Referencia
Bm86	100 µg/IM	30%	40%	48%	-	-	Rodríguez <i>et al.</i> , 1994
Bm86	400 µg/IM	25%	42%	50%	-	-	Rodríguez <i>et al.</i> , 1994
Bm86	100 µg/IM	19%	-	26%	30%	58%	Canales <i>et al.</i> , 1997
Bm86	100 µg/IM	19%	-	26%	30%	58%	de la Fuente <i>et al.</i> , 1999
Bm86	100 µg/IM	19%	-	26%	30%	58%	García-García <i>et al.</i> , 1999
Bm86	100 µg/SC	-	-	53%	56%	-	Johnsson <i>et al.</i> , 2000
Bm86	100 µg/IM	-	-	-	-	89%	García-García <i>et al.</i> , 2000
Bm86	-	51%	5%	14%	6%	60%	Almanzán <i>et al.</i> , 2010
Bm95	100 µg/IM	-	-	-	-	58%	García-García <i>et al.</i> , 2000
Inhibidor de tripsina	100 µg/IM	30.15%	24.66%	-	7.27%	32%	Anderotti <i>et al.</i> , 2012
Ubiquitina	-	26%	9%	-2%	29%	55%	Almanzán <i>et al.</i> , 2010
Subolesina	-	43%	0%	0%	15%	51%	Almanzán <i>et al.</i> , 2010
Subolesina	-	24%	13%	8%	-	44%	Merino <i>et al.</i> , 2011
P0	-	-	-	-	-	90%	Rodríguez <i>et al.</i> , 2015
ATAQ	100 µg/IM	37.5%	-5.2%	-6.7%	1.8%	35%	Andreotti, 2016

DT: efecto en el número de hembras repletas, DW: efecto en el peso de hembras repletas, DO: efecto en la ovoposición, DF: efecto en la fertilidad de los huevos y E: eficacia de la vacuna.

Al inmunizar a bovinos con material de hembras semirepletas se obtiene mayor eficacia que la inmunidad adquirida por infestaciones naturales. Las garrapatas alimentadas con sangre de bovinos inmunizados adquieren un color

rojizo debido a la presencia de hemoglobina en la hemolinfa a causa de la destrucción de las células epiteliales del intestino de las garrapatas (Willadsen *et al.*, 1987), la vacunación del ganado con antígenos de intestino de garrapata protege al ganado contra infestaciones en un 91% por 7 días (Opdebeeck *et al.*, 1988 a).

Cuando la garrapata se alimenta de la sangre de bovinos inmunizados, las células epiteliales del intestino entran en contacto con anticuerpos contra determinado antígeno presente en la garrapata y otros componentes del sistema inmune del bovino que causan daño en los tejidos de la garrapata, que se ven reflejados en la supervivencia, peso, fertilidad y ovoposición, así como en la viabilidad de los huevos (Willadsen, 1997).

La infección de *B. bigemina* afecta la expresión de genes durante la alimentación de las garrapatas, las vacunas que están formuladas con proteínas con las cuales interacciona el vector-patógeno funcionarían para el control de infestaciones e infección (Merino *et al.*, 2013). Existen algunas proteínas que se sobreexpresan en garrapatas infectadas, algunas de ellas son:

- Transportador de electrones y protones: está involucrado en la endocitosis de los componentes de la sangre, además participa en la diuresis y balance de agua (Rachinsky *et al.*, 2008).
- Proteína ribosomal P0: es una proteína estructural de los ribosomas con actividad endonucleasa (Rachinsky *et al.*, 2008).
- Riboporina 1: está presente en el retículo endoplásmico y para la oligosacariltransferasa (Rachinsky *et al.*, 2008).
- Proteína hetro-oligomérica: esta proteína está involucrada en la glicosilación (Rachinsky *et al.*, 2008).
- BmVDAC: proteína de membrana de células epiteliales de *R. microplus* (Rodríguez *et al.*, 2015 b).

En el grupo 2 (inmunizado con rBmVDAC e infectado con *B. bigemina*) se encontró un aumento del 11.87% del número garrapatas (DT -11.87), porque los anticuerpos contra rBmVDAC posiblemente evitan parcialmente la infección, a diferencia de las garrapatas susceptibles del grupo control que al infectarse con *B.*

bigemina aumenta la mortalidad (Guglielmone *et al.*, 1996). En el grupo 3 (inmunizado con rBmVDAC) se encontró una reducción en el número de garrapatas de 37.45% (DT 37.45), debido a que al no estar infectadas no se presenta una sobreexpresión de BmVDAC y los anticuerpos y componentes del sistema inmune del bovino tiene un efecto más evidente que al encontrado en el grupo 2.

En el grupo 2 incremento en un 9.06% el peso de las garrapatas (DW -9.06) a comparación del grupo control, debido a que no ocurre una lisis de células epiteliales de intestino a causa de la infección de *B. bigemina* por el efecto de los anticuerpos contra rBmVDAC (García-García *et al.*, 2000). En el grupo 3 no se observó ningún efecto en el peso de las garrapatas (DW 0%).

Con respecto a los resultados de ovoposición en el grupo 2 se encontró un aumento de 26.73% (DO -26.73) con respecto al grupo control, ya que los anticuerpos contra BmVDAC evitan parcialmente la infección de *B. bigemina*, evitando la destrucción de células epiteliales del intestino, logrando una eficiente digestión de sangre y como resultado mayor acumulación de vitelogenina en ovarios (Parizi *et al.*, 2009). Mientras que en el grupo 3 se encontró una disminución de 37.34% en la ovoposición (DO 37.34) con respecto al grupo control debido al efecto de lisis de los anticuerpos contra BmVDAC de las células epiteliales del intestino, evitando la correcta digestión de sangre y la movilización de proteínas y vitelogenina necesarias para la ovoposición (Agbede *et al.*, 1986; Parizi *et al.*, 2009).

En el grupo 2 se encontró una reducción de fertilidad de 32.12% (DF 32.12) y en el grupo 3 hubo una reducción de fertilidad de un 55.80% (DF 55.80) a comparación del grupo control, a causa del efecto de los anticuerpos contra rBmVDAC que llegan del intestino de las garrapatas a los ovarios, huevos y larvas durante la incubación de los huevos.

La eficacia en la inmunización con rBmVDAC en el grupo 2 fue de un 23% y en el grupo 3 fue de un 88%, la única diferencia en los grupos es la infección con *B. bigemina* en las garrapatas del grupo 2 y la ausencia de infección en las garrapatas del grupo 3. De acuerdo a lo reportado por Rodríguez *et al.*, 2015 b, BmVDAC se sobre expresa en presencia de infección, por lo cual el efecto de los anticuerpos

contra rBmVDAC es más evidente en el grupo 3 donde la proteína se encuentra en baja concentración y se puede observar el efecto de la inmunización, a diferencia del grupo 2 en el cual la proteína BmVDAC se encuentra en mayor concentración debido a la infección, el efecto de los anticuerpos contra rBmVDAC es más evidente en la infección de *B. bigemina* en las larvas como se mencionara más adelante.

8.9 Extracción de DNA

Se seleccionaron 2 garrapatas al azar de cada animal de cada grupo a las cuales se les extrajo DNA. En la figura 16 se observa la integridad del DNA de las muestras de garrapata de los tres grupos.

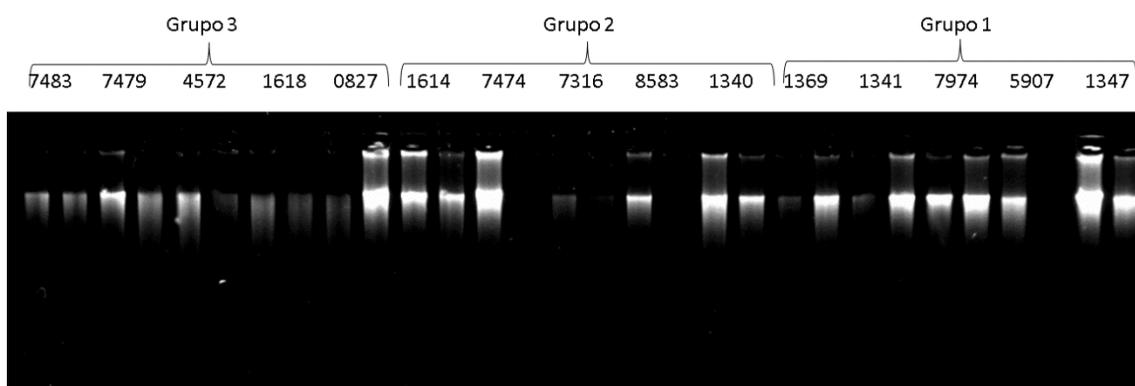


Figura 16. Integridad de DNA de garrapatas. Grupo 1: inmunizado con adyuvante, infestado con larvas e infectado con *B. bigemina*, Grupo 2: inmunizado con rBmVDAC, infestado con larvas e infectado con *B. bigemina*, Grupo 3: inmunizado con rBmVDAC e infestado con larvas.

8.10 Detección de *B. bigemina* en garrapatas



Figura 18. Detección de *B. bigemina* en garrapatas. MTM: marcador de talla molecular, C+: control positivo, Grupo 1: inmunizado con adyuvante, infestado con larvas e infectado con *B. bigemina*, Grupo 2: inmunizado con rBmVDAC, infestado

con larvas e infectado con *B. bigemina*, Grupo 3: inmunizado con rBmVDAC e infestado con larvas.

8.11 PCR de Antígeno Asociado a Membrana (*ama-1*)

En el laboratorio de Genómica de la UACM diseñaron un par de oligonucleótidos para un fragmento de 100 pb de *ama-1*, los cuales se probaron en una PCR punto final. Como se muestra en la figura 19, estos oligonucleótidos solo se observó una banda de amplificación por lo cual el producto de PCR fue purificado y clonado en TOPO.

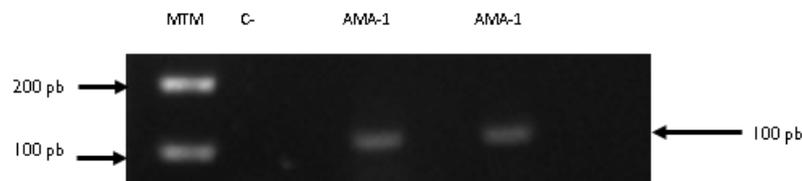


Figura 19. PCR de *ama-1*. MTM: marcador de talla molecular, C-: control negativo y *ama-1*.

8.12 PCR de colonia

Después de realizar la clonación de *ama-1* en TOPO y transformación de células competentes, se seleccionaron 10 colonias a las cuales se les realizo un PCR de colonia para determinar cuáles eran positivas a *ama-1* (Figura 20).

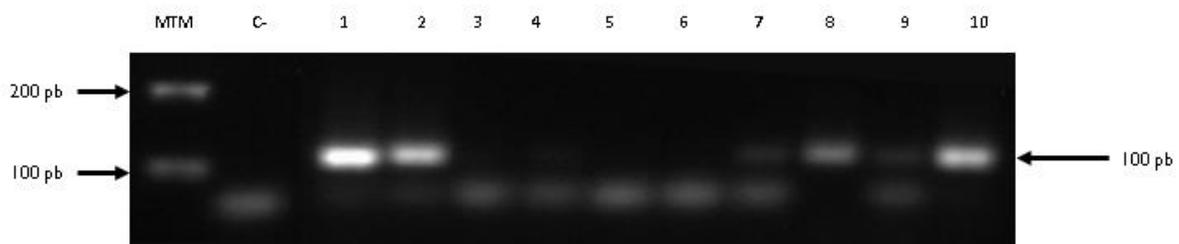


Figura 20. PCR de colonia de clonación de *ama-1*. MTM: marcador de talla molecular, C-: control negativo y 1-10 número de colonia.

Como se observa en la figura, las colonias consideradas como positivas fueron la numero 1, 2, 8 y 10.

8.13 Purificación de plásmido

Se seleccionaron las 4 colonias que fueron positivas a *ama-1*, las cuales se dejaron crecer en medio LB y posteriormente se realizó la purificación del plásmido. En la figura 21 se observa que solo se logró la purificación de plásmido de la colonia número 10.

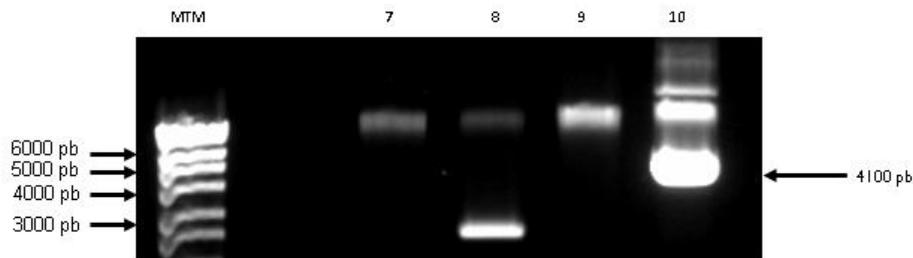


Figura 21. Purificación de TOPO- *ama-1*. MTM: marcador de talla molecular y 7-10 número plásmido purificado de colonia.

Posteriormente se realizó la restricción del plásmido con la enzima ECO-R1 siguiendo el protocolo del fabricante, pero no se llevó a cabo correctamente, por lo cual se decidió trabajar la curva de estandarización para qRT-PCR directamente del producto de PCR punto final.

Al trabajar en la curva estándar para qRT-PCR se encontró que los oligonucleótidos para la amplificación de *ama-1* estaban contaminados con DNA, por lo cual se decidió trabajar con un juego de oligonucleótidos para la amplificación de *gapdh*.

8.14 Amplificación de *gapdh*

A causa de la contaminación de los oligonucleótidos de *ama-1*, se decidió trabajar con un juego de oligonucleótidos utilizados en el laboratorio de Genómica de la UACM. Los oligonucleótidos que se utilizaron amplifican un fragmento de 150 pb del gen constitutivo gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (*gapdh*) de *B. bigemina* (Figura 22). Para obtener la curva estándar para qRT-PCR de *gapdh*, se trabajó con producto purificado de una reacción de PCR punto final de *gapdh*.

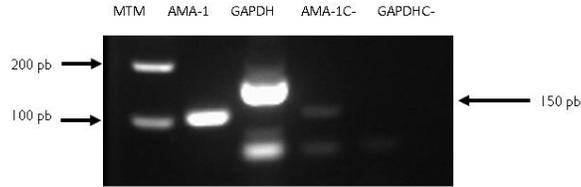


Figura 22. PCR de *gapdh*. MTM: marcador de talla molecular, *ama-1*: control positivo de *ama-1*, *gapdh*: *gapdh*, AMA-1C-: control negativo de *ama-1*, *gapdh* C-: control negativo de *gapdh*.

8.15 qRT-PCR de garrapatas

Se realizó una prueba de qRT-PCR para determinar si los anticuerpos contra la proteína rBmVDAC bloquean la infección de *B. bigemina* en *R. microplus*, y los datos obtenidos de *gapdh* y *esterasa* fueron normalizados por el método $\Delta\Delta Ct$, Posteriormente los datos normalizados se sometieron a un análisis estadístico e prueba de t de Student con una significancia del 95% y se encontró que en las garrapatas del grupo 1 (control) y grupo 2 no existe diferencia estadística entre ambos grupos ($p= 0.326$) con respecto a la infección. En el cuadro 23 se muestran los resultados de la prueba de t de Student de la infección en las garrapatas.

Cuadro 23. Infección de *B. bigemina* en hembras repletas

Prueba t de Student					
Grupo	N	Media	Desviación estándar	F	Sig.
1	10	2792.8	42501	1.022	0.326
2	10	26588	2839.2		

En un estudio realizado por Antunes y colaboradores en el 2014 en el cual alimentaron garrapatas con sangre infectada con *B. bigemina* y suero con anticuerpos contra subolesina, SILK y TROSOPA encontraron que los anticuerpos contra estas proteínas no disminuyen la infección en las garrapatas.

IX. CONCLUSIONES

Para el control inmunológico es necesaria la respuesta de anticuerpos contra un determinado antígeno (García-García *et al.*, 1999). En el presente trabajo se evaluó la producción de anticuerpos contra la proteína rBmVDAC utilizando la técnica de ELISA indirecta. Desde la primera inmunización se detectó la producción de anticuerpos contra rBmVDAC, lo que demuestra que es una proteína inmunógena.

Cuando las garrapatas se alimentan de sangre de bovinos inmunizados con antígenos de células epiteliales del intestino, ocurre lisis de estas células. Además, se ve afectada la digestión de la sangre por lo cual las garrapatas serán menos en número y de menor peso. En las garrapatas la digestión es intracelular, la hemoglobina, lípidos y otras moléculas son movilizadas vía hemolinfa a otros tejidos de la garrapata incluidos los ovarios, en donde se almacena la vitelogenina necesaria para la ovoposición. En la garrapata existen proteínas que transportan moléculas a los distintos tejidos de la garrapata, estas proteínas son las que transportan los anticuerpos a los huevos y durante la incubación afectan la fertilidad de los huevos (García-García *et al.*, 2000; Parizi *et al.*, 2009).

En la evaluación del efecto de inmunización en las garrapatas se encontró que en garrapatas infectadas con *B. bigemina* existe mayor número de garrapatas (DT -11.87), garrapatas más pesadas (DW -9.06) y mayor número de huevos opositados (DO -26.7) con respecto al grupo control. Esto es posiblemente al efecto de bloqueo de transmisión de los anticuerpos contra BmVDAC, ya que las garrapatas del grupo control se ven afectadas por la destrucción de las células epiteliales del intestino a causa de la infección, porque al comparar la disminución de la fertilidad del grupo 2 (DF 32.12) con respecto al grupo control encontramos que se ve afectada por la acción de los anticuerpos durante el periodo de incubación de los huevos.

Al comparar el efecto de la inmunización en garrapatas no infectadas con *B. bigemina* se encontró disminución en el número de garrapatas (DT 37.45),

disminución en la ovoposición (DO 37.34) con respecto al grupo control. Posiblemente al efecto de los anticuerpos contra BmVDAC que tiene efecto en el intestino y otros tejidos de la garrapata. La fertilidad de los huevos (DF 55.80) se ve a causa de la acción de los anticuerpos en los huevos durante la incubación.

La eficacia de la vacuna en el grupo 2 (E 23%) es menor que en el grupo 3 (E 88%) posiblemente por la sobreexpresión de BmVDAC en presencia de *B. bigemina* sugerida por Rodríguez y colaboradores en el 2015 b. La ausencia de infección en las garrapatas del grupo 3 hace más evidente la acción de los anticuerpos debido que BmVDAC se encuentra expresada en menor concentración que en las garrapatas infectadas (grupo 2).

La infección de *B. bigemina* afecta la expresión de proteínas durante la alimentación de las garrapatas. Las proteínas del vector con las cuales interacciona patógeno funcionarían para el control de infestaciones e infección (Merino *et al.*, 2013). BmVDAC es una proteína que se sobreexpresa en presencia de *B. bigemina* (Rodríguez *et al.*, 2015 b). Anteriormente no se había evaluado la capacidad de los anticuerpos contra rBmVDAC en la infección de *B. bigemina* en *R. microplus*.

Para evaluar el efecto de los anticuerpos en el proceso de infección fue necesario estandarizar la técnica de qRT-PCR con un fragmento de 100 pb del gen *ama-1*, el cual fue clonado en el vector TOPO. Después de clonar *ama-1* se realizó la purificación del plásmido con el inserto y fue purificado, posteriormente se utilizaron enzimas de restricción para liberar el inserto del plásmido, pero no funciono a causa de esto se decido trabajar con producto de PCR punto final de *ama-1*. El producto de PCR fue purificado y cuantificado para posteriormente obtener la curva estándar para cuantificación, pero se observó que los oligonucleótidos para la amplificación de *ama-1* estaban contaminados por lo cual fue necesario utilizar producto de PCR purificado de *gapdh*.

Cuando se obtuvo la curva estándar de *gapdh* para la cuantificación de *B. bigemina* se procesaron las muestras de garrapatas (10 garrapatas por grupo) por triplicado. Se evaluaron 10 garrapatas de cada grupo, se encontró un resultado de 0 en el grupo 3 ya que este grupo no fue infectado, en los resultados de la prueba

de t de Student para las garrapatas del grupo 1 y grupo 2 se encontró que no existe diferencia estadística significativa ($p= 0.326$) en la infección de *B. bigemina*.

X. APÉNDICE

10.1. Constantes fisiológicas del bovino

Constantes fisiológicas	
Temperatura retal	38.6°C
Frecuencia cardiaca	48-84/min
Pulso	40-80/min
Frecuencia respiratoria	26-50/min
Movimientos ruminales	3/2 min
Valor de hematocrito	24-46%

Referencia: Manual Merck, 2007.

XI. LITERATURA CITADA

Agbede, R. & Kemp, D. 1986. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: histopathology of ticks feeding on vaccinated cattle. *Int J Parasitol Parasites*. 16: 35-41.

Almazán, C., Lagunes, R., Villar, M., Canales, M., Cruz, R., Jongejan, F., Fuente, J. 2010. Identification and characterization of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* candidate protective antigens for the control of cattle tick infestation. *Parasitol Res*. 106:471-479.

Altay, K., Aydin, M. F., Dumanli, N., Aktas, M. 2008. Molecular detection of *Theileria* and *Babesia* infections in cattle. *Vet Parasitol*. 158: 295-301.

Andreotti, R., Casquero, R., Aparecida, M., Guerrero, F., Leivas, F., Pérez, A. 2012. Protective immunity against tick infestation in cattle vaccinated with recombinant trypsin inhibitor of *Rhipicephalus microplus*. *Vaccine*. 30:6678-6685.

Antunes, S., Merino, O., Mosqueda, J., Moreno-Cid, J., Bell-Sakyi, L., Fragkoudis, R., Weisheit, S., Perez, J., Alberdi, P., Domingos, A., de la Fuente, J. 2014. Tick capillary feeding for the study of proteins involved in tick-pathogen interactions as potential antigens for the control of tick infestation and pathogen infection. *Parasite Vector*. 7: 42-54.

Assadian, O. & Stanek, G. 2002. Theobald Smith-The discover of ticks as vector of disease. *Phys Rev*. 47: 777-780.

Babes, V. 1888. Sur l'hémoglobinure bacteriane du boef. *C. R. Acad. Sci*. 107: 692-694. Citado por Lozano, M. 2014. Situación sanitaria de la babesiosis y anaplasmosis en la ganadería lechera en tres sistemas de producción. Tesis individual para obtener el título de Maestra en Salud y Producción Animal Sustentable. Universidad Autónoma de Querétaro.

Beltacao, M. M., Silva, F. F., Buzatti, A., Staude, K. F., Kan, S. L., Coimbra, E., Dorneles, S.L. 2013. Partial selective treatment of *Rhipicephalus microplus* and

breed resistance variation in beef cows in Río Grande do Sul Brazil. *Vet Parasitol.* 192: 234-239.

Bock, R., de Vos, J., Kingston, T., Shiels, I., Dalgliesh, R. 1992. Investigations of breakdowns in protection provided by living *Babesia bovis* vaccine. *Vet Parasitol.* 43: 45-56.

Bock, R., & de Vos, J. 2001. Immunity following use of Australian tick fever vaccine: a review of the evidence. *Aust Vet J.* 79: 832-839.

Böse, R., Jorgensen, W., Dalgliesh, R., Friedhoff, K., de Vos, A. 1995. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Vet Parasitol.* 57:61-74.

Bowman, A. & Nutall, P. 2008. *Ticks Biology, Disease and Control.* Cambridge University Press. United Kingdom. Citado por Cota, S. 2015. Control biológico e integrado de la garrapata *Hyalomma lusitanicum* en explotaciones silvo-agrocinéticas de ecosistema mesomediterráneo. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

Brake, D. & Pérez, A. 2012. Immunoregulation of bovine macrophages by factors in the salivary glands of *Rhipicephalus microplus*. *Parasit Vectors.* 5:38-45.

Butler, J. 2000. Enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunoassay Immunoch.* 21: 165-209.

Callow, L. & Hoyte, H. 1961. Transmission experiments using *Babesia bigemina*, *Theileria mutans*, *Borrelia* spp and the cattle tick *Boophilus microplus*. *Aust Vet J.* 31: 381-390.

Canales, M., Enríquez, A., Ramos, E., Cabrera, D., Dandie, H., Soto, A., Falcón, V., Rodríguez, M., de la Fuente, J. 1997. Large-scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine Gavac against cattle tick. *Vaccine.* 15: 414-422.

Colombini, M. 2004. VDAC: The channel at the interface between mitochondria and the cytosol. *Mol Cell Biol.* 25: 107-115.

Curnow, J. & Curnow, B. 1967. An indirect hemoagglutination test for the diagnosis of *Babesia argentina* infection in cattle. Aust Vet J. 43: 286-290.

de Abreu, A., Pereira, F., Casquero, R., Valerio, M., Andreotti, R. 2016. Design of the ATAQ peptide and it's evaluation as an immunogen to develop a *Rhipicephalus* vaccine. Vet Parasitol. 221: 30-38.

de la Fuente, J., Rodríguez, M., Redondo, M., Montero, C., García, J., Méndez, L., Serrano, E., Valdés, M., Enríquez, A., Canales, M., Ramos, E., Boué, O., Machado, H., Lleonart, R., Armas, C., Rey, R., Rodríguez, J., Artiles, M., García, L. 1997. Field studies and cost-effectiveness analysis of vaccination with Gavac against the cattle tick *Boophilus microplus*. Vaccine. 16: 366-373.

de la Fuente, J., Rodríguez, M., Montero, C., Redondo, M., García-García, J. C., Méndez, L., Serrano, E., Valdés, M., Enríquez, A., Canales, M., Ramos, E., Boue, O., Machado, H., Heonart, R. 1999. Vaccination against ticks (*Boophilus* spp): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac. Biomol Eng. 15: 143-148.

de la Fuente, J. & Kocan, K. M. 2006. Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. Parasite Immunol. 28: 275-285.

de la Fuente, J., Almazán, C., Canales, M., Pérez, L., Kocan, K., Willadsen, D. 2007. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. Anim Health Res Rev. 8: 23-28.

de Vos, S., Zeinstra, L., Taoufik, O., Willadsen, P., Jongejan, F. 2001. Evidence for the utility of the Bm86 antigen from *Boophilus microplus* in vaccination against other tick species. Exp Appl Acarol. 25: 245-261.

Duffy, P. & Kaslow, D. 1997. A Novel Malaria Protein, Pfs28, and Pfs25 Are Genetically Linked and Synergistic as *Falciparum malaria* Transmission-Blocking Vaccines. Infect Immun. 65: 1109-1113.

Figuroa, J., Chieves, L., Johnson, G., Buening, G. 1993. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Vet Parasitol.* 50: 69-81.

Fragoso, H., Hoshman, P., Ortiz, M., Rodríguez, M., Redondo, M., Herrera, L., de la Fuente, J. 1998. Protection against *Boophilus annulatus* infestations in cattle vaccinated with the *B. microplus* Bm86-containing vaccine Gavac. *Vaccine.* 16: 1990-1992.

Frisch, J. E: 1999. Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. *Int J Parasitol.* 29: 57-71.

García, Z. 2010. Garrapatas que afectan al ganado bovino y enfermedades que transmiten en México. Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (CENID-PAVET. INIFAP). 1-9.

García-García, J. C., Gonzales, I., González, D., Valdez, M., Méndez, L., Lamberti, J., D'Agostino, B., Citroni, D., Fragoso, I., Ortiz, M., Rodríguez, M., de la Fuente, J. 1999. Sequence variation in the *Boophilus microplus* Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. *Exp Appl Acarol.* 23: 883-895.

García-García, J. C., Montero, C., Redondo, M., Vargas, M., Canales, M., Boue, O., Rodríguez, M., Joglar, M., Machado, H., González, I., Valdés, M., Méndez, L., de la Fuente, J. 2000. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine.* 18: 3275-3287.

Giglioti, R., Nunes, H., Hiromi, C., de Sena, M. 2018. qPCR estimates of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection levels in beef cattle and *Rhipicephalus microplus* larvae.

Goncalves, R., Buzhynskyy, N., Prima, V., Sturgis, N., Scheuring, S. 2007. Supramolecular assembly of VDAC in Native Mitochondrial Outer Membranes. *J Mol Biol.* 369: 413-416.

Gonzales, J. C., Muñiz, R. A., Farías, A., Gonclaves, R., Rew, R. S. 1993. Therapeutic and persistent efficacy of doramectin against *Boophilus microplus* in cattle. *Vet Parasitol.* 49: 107-119.

Guglielmone, A., Gaido, A., Mangold, A. 1996. Light microscopy diagnosis of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* kinetes in the haemolymph of artificially infected *Boophilus microplus* engorged female ticks. *Vet Parasitol.* 61: 15-20.

Homer, M., Aguilar, I., Teleford, S., Krause, P., Persing, D. 2000. Babesiosis. *Clin Microbiol Rev.* 13: 451-469.

Howell, J. M. Ueti, M. W., Palmer, G. H., Scoles, G. A., Knowles, D. R. 2007. Persistently infected calves as reservoirs for acquisition and transovarial transmission of *Babesia bovis* by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *J Clin Microbiol.* 45: 3155-3159.

Huston, C. K. 1994. Texas fever in Kansas. *Ag H.* 68: 74-104.

Ibelli, A., Ribeiro, A., Giglioti, R., Regitano, L., Alencar, M., Chagas, A., Paco, A., Oliveira, H., Duarte, J., Oliviera, M. 2012. Resistance of cattle of various genetic groups to the tick *Rhipicephalus microplus* and the relationship with coat traits. *Vet Parasitol.* 186: 425-430.

Iseki, H., Alhassan, A., Ohta, N., Thekiso, O., Yokoyama, N., Inue, N., Nambota, A., Yasuda, J., Igarashi, I. 2007. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine *Babesia* parasites. *J Microbiol Methods.* 71: 281-287.

Johnston, L., Kemp, D., Pearson, R. 1986. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: effect on induced immunity on tick populations. *Int J Parasitol Parasites.* 16: 27-34.

Johnsson, N., Matschos, A., Pepper, P., Green, P., Albercht, M., Hungerford, J., Ansell, J. 2000. Evaluation of TickGARD PLUS, a novel vaccine against *Boophilus microplus*, in lactating Holstein-Friesian cows. *Vet Parasitol.* 88: 275-285.

Johnsson, N. & 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. *Vet Parasitol.* 155: 1-9.

Kaslow, D. 1997. Transmission-blocking Vaccines: Uses and Current Status of Development. *Int J Parasitol.* 27: 183-189.

Kuttler, K. L. & Johnsson, L. W. 1986. Chemoprophylactic activity of imidocarb diminazene and oxytetracycline against *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Vet Parasitol.* 21: 107-118.

Lambertz, C., Chongkaskt, N., Jittapalung, S., Gauly, M. 2012. Immune response of *Bos indicus* cattle against the anti-tick antigen Bm91 derived from local *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks and its effect on tick reproduction under natural infestation. *J Parasitol Res.* 2012: 1-9.

Lemasters, J. & Holmuhamedov, E. 2006. Voltage-dependent anion channel (VDAC) as mitochondrial governor-thinking outside the box. *Biochim Biophys Acta.* 1762:181-190.

Ludford, C. G. 1962. Fluorescent antibody staining of four *Babesia* species. *Exp Parasitol.* 24: 327-335.

Mahoney, D. F. (a). 1967. Bovine babesiosis: the immunization of cattle with killed *Babesia argentina*. *Exp Parasitol.* 20: 125-129.

Mahoney, D. F. (b). 1967. Bovine babesiosis: preparation and assessment to complement fixing antigens. *Exp Parasitol.* 20: 232-241.

Mannella, C. 1998. Conformational Changes in the Mitochondrial Channel Protein, VDAC, and Their Functional Implication. *J Struct Biol.* 121: 207-218.

El Manual Merck de Veterinaria. 2007. Sexta Edición. Barcelona, España. OCEANO. 2: 2546-2548.

Martiz-Oliver, C., Van-Zy, L., Stutzer, C. 2012. A systematic, functional genomics and reverse vaccinology approach to the identification of vaccine candidates in the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. Ticks Tick Borne Dis. 17: 179-187.

Merino, O., Almazán, C., Canales, M., Villar, M., Moreno, J., Estrada, A., Kocan, K., de la Fuente, J. 2011. Control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation by the combination of subolesin vaccination and tick autocidal control after subolesin gene knockdown in ticks fed on cattle. Vaccine. 29: 2248-2254.

Merino, O., Antunes, S., Mosqueda, J., Moreno-Cid, J., Pérez, J., Rosario-Cruz, R., Rodríguez, S., Domingos, A., de la Fuente, J. 2013. Vaccination with proteins involved in tick-pathogen interactions reduces vector infestations and pathogen infection. Vaccine. 31: 5880-5896.

Mosqueda, J., Olvera, A., Aguilar, G., Cantó, G. 2012. Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis. Curr Med Chem. 19: 1504-1518.

Mtshali, P., Tsoetsi, A., Thekiso, M., Mtshali, M. 2013. Nested PCR detection and phylogenetic analysis of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle from peri-urban localities in Gauteng province, South Africa. J Vet Med Sci. 76: 145-150.

Nijhof, A., Taoufik, A., de la Fuente, J., Kocan, K., Vries, E., Jongejan, F. 2007. Gene silencing of the tick protective antigens, Bm86, Bm91 and subolesin, in the one-host tick *Boophilus microplus* by RNA interference. Int J Parasitol Parasites. 37: 653-662.

Nijhof, A., Balk, J., Postigo, M., Rhebergen, A., Taoufik, A., Jongejan, F. 2010. Bm86 homologues and novel ATAQ proteins with multiple epidermal growth factor (EGF) like domains from hard and soft ticks. Int J Parasitol. 40: 1587-1597.

Opdebeeck, J. P., Wong, J. Y., Jackson, L., Dobson, C. (a). 1988. Vaccines to protect Hereford cattle against the cattle tick, *Boophilus microplus*. J Immunol. 63: 363-367.

Opdebeeck, J. P., Wong, J. Y., Jackson, L., Dobson, C. (b). 1988. Hereford cattle immunized and protected against *Boophilus microplus* with soluble and membrane-associated antigens from the midgut of ticks. *Paraste Immunol.* 10: 405-410.

Pastorino, J. & Hock, J. 2008. Regulation of hexokinase binding to VDAC. *J Bioenerg Biomembr.* 40:171-182.

Parida, M., Sannarangaiah, S., Kumar, S., Rao, P., Morita, K. 2008. Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev Med Virol.* 18: 407-421.

Parizi, L. F., Pohl, P. C., Masuda, A., da Silva-Vaz, I. Jr. 2009. New approaches toward anti-*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick vaccine. *Rev Bras Parasitol Vet.* 18: 1-7.

Parizi, L. F., Reck, J. Jr., Oldiges, D. P., Guizzo, M. G., Seixas, A., Loguillo, C., de Oliveira, P. L., Termignoni, C., Martins, J. R., da Silva-Vaz, T. Jr. 2012. Multi-antigenic vaccine against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: A field evaluation. *Vaccine.* 30: 6912-6917.

Pipano, E., Alekceev, E., Galker, F., Fish, L., Samish, M., Shkap, V. 2003. Immunity against *Boophilus microplus* induced by the Bm86 ((Tick-GARD) vaccine. *Exp Appl Acarol.* 29: 141-149.

Piper, E. K., Johnsson, W. N., Gondro, C., Lew-Tabor, A. E., Moolhuijzen, P., Vance, M. E., Jackson, L.A. 2009. Immunological profiles of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Clin Vaccine Immunol.* 16: 1074-1086.

Rachinsky, A., Guerrero, F., Scoles, G. 2008. Proteomic profiling of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* midgut responses to infection with *Babesia bovis*. *Vet Parasitol.* 152: 294-313.

Rand, N., Moore, T., Sriskantha, A., Spring, K., Tellam, R., Willadsen, P., Cobon, G. 1986. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Biochem.* 86: 9657-9661.

Rangel, A. A., Pereira, L. F., Casquero, C. R., Valerio, G. M., Andereotti, R. 2016. Design of the ATAQ peptide and it's evaluation as an immunogen to develop a *Rhipicephalus* vaccine. *Vet Parasitol.* 221: 30-38.

Riek, R. 1964. The life cycle of *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). *Crop Pasture Sci.* 15: 802-821.

Rodríguez, M., Rubiera, R., Penichet, M., Montesinos, R., Cremata, J., Falcón, V., Sánchez, G., Bringas, R., Cordovés, C., Valdés, M., Leonadr, R., Herrera, L., de la Fuente, J. 1994. Hig level expression of the *Boophilus microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. *J Biotechnol.* 33: 135-146.

Rodríguez, E., Mosqueda, J., Álvarez, M., Falcón, A., Mendoza, G., Camacho, M. 2012. The identification of a VDAC-like protein involved in the interaction of *Babesia bigemina* sexual stages with *Rhipicephalus microplus* midgut cells. *Vet Parasitol.* 187: 538-541.

Rodríguez, A., Encinosa, P., Méndez, L., Bello, Y., Rodríguez. R., Garay, H., Cabrales, A., Méndez, L., Borroto, C., Estrada, M. 2015 (a). High efficacy of a 20 amino acid peptide of the acidic ribosomal protein PO against the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*. *Ticks Tick Borne Dis.* 6:530-537.

Rodríguez, E., Mosqueda, J., León, G., Castañeda, E., Álvarez, M., Camacho, A., Ramos, A., Camacho, M. 2015 (b). BmVDAC upregulation in the midgut of *Rhipicephalus microplus*, during infection with *Babesia bigemina*. *Vet Parasitol.* 212: 368-374.

Rodríguez-Vivas, R., Grisi, I., Pérez de León, A., Silva, H., de Jesús, J., Fragoso, H., Romero, D., Rosario, R., Saldierna, F., García, D. 2017. Potential economic

impact assessment for cattle parasites in México. Review. Rev Mex Cienc Pecu. 8: 61-74.

Saleh, M. A. 2009. Erythrocytic oxidative damage in crossbred cattle naturally infected with *Babesia bigemina*. Res Vet Sci. 86: 43-48.

Savigny, D., Voller, A., Woodruff, W. 1979. Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. J Clin Pathol. 32: 284-288.

Shakya, M., Kumar, B., Nagar, G., Fuente, J., Ghosh, S. 2014. Subolesin: A candidate vaccine antigen for the control of cattle tick infestation in Indian situation. Vaccine. 32:3488-3494.

Shimizu, S., Ide, T., Yanagida, T., Tsujimoto, Y. 2000. Electrophysiological Study of a Novel Large Formed by Bax and the Voltage-dependent Anion Channel That is Permeable to Citocromo c. J Biol Chem. 275: 12321-12325.

Smith, T. & Kilbourne, F. 1893. Investigations into the nature causation and prevention of Texas or southern cattle fever. Citado por Lozano, M. 2014. Situación sanitaria de la babesiosis y anaplasmosis en la ganadería lechera en tres sistemas de producción. Tesis individual para obtener el título de Maestra en Salud y Producción Animal Sustentable. Universidad Autónoma de Querétaro.

Takagi, W. E., Camargo, M., Henrique, B. 2006. Structural and cytochemical changes in the salivary glands of the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) (Acari: Ixodidae) tick female during feeding. Vet Parasitol. 140: 114-123.

Tatchell, R. J. 1969. The ionic regulatory role on the salivary secretion of the cattle tick *Boophilus microplus*. J Insect Physiol. 15: 1421-1430.

Tirloni, L., Seixas, A., Mulega, A., da Silva, I., Termignoni, C. 2014. A family proteasa inhibitors (serpins) in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Exp Parasitol. 137: 25-34.

Tirloni, L., Kwon, K., Loner, C., Ali, A., Seixas, A., Termignoni, C., Muelaga, A., da Silva-Vaz, I. Jr. 2016. The putative role of *Rhipicephalus microplus* salivary serpins in the tick-host relationship. *Insect Biochem Mol Biol.* 71: 12-28.

Uilenberg, G. 2006. *Babesia*- an historical overview. *Vet Parasitol.* 138: 3-10.

Waal, D., & Combrink, M. 2006. Live vaccines against bovine babesiosis. *Vet Parasitol.* 138: 88-96.

Waltisbuhl, D., Goodger, B., Wright, I., Comminis, W., Mahoney, D. 1987. An enzyme linked immunosorbent assay to diagnose *Babesia bovis* infection in cattle. *Parasitol Res.* 73: 126-131.

Willadsen, P. 1997. Novel vaccines for ectoparasites. *Vet Parasitol.* 71: 209-222.

Willadsen, P., McKenna, R., Riding, G. 1988. Isolation from the cattle tick, *Boophilus microplus*, of antigenic material capable of eliciting a protective immunological response in the bovine host. *Int J Parasitol Parasites.* 18: 183-189.

Xu, T., Lew, A., Rodríguez, M. 2016. Effective inhibition of thrombin by *Rhipicephalus microplus* serpin-15 (RmS-15) obtained in the yeast *Pichia pastoris*. *Ticks Tick Borne Dis.* 7: 180-187.

Xu, T., Lew-Tabor, A., Rodríguez-Valle, M. 2016. Effective inhibition of thrombin by *Rhipicephalus microplus* serpin-15 (Rms-15) obtained in the yeast *Pichia pastoris*. *Ticks Tick Borne Dis.* 7: 180-187.

Zwart, D. & Brocklesby, D. W. 1979. Babesiosis: non-specific resistance, immunological factors and pathogenesis. *Adv Parasitol.* 17: 49-113.

