

APLICACIÓN DE UNA PRUEBA DE PCR-RFLP EN EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR *Babesia spp* EN BOVINOS. ESTUDIO RETROSPECTIVO

Data de submissão: 08/02/2023

Data de aceite: 03/04/2023

Pedro Julián Soberanis Bernal

Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Mesoamericana, Puebla, Puebla, México

Roberto O. Castañeda Arriola

Sitio Experimental Pichucalco, CIRGOC, INIFAP, Pichucalco, Chiapas, México

Julio Vicente Figueroa Millán

Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, INIFAP. Jiutepec, Morelos, México

Carmen Rojas Martínez

Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, INIFAP. Jiutepec, Morelos, México

José Juan Lira Amaya

Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, INIFAP. Jiutepec, Morelos, México

Jesús Antonio Álvarez Martínez

Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, INIFAP. Jiutepec, Morelos, México

Rebeca Montserrat Santamaría Espinosa

Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, INIFAP. Jiutepec, Morelos, México

Grecia Martínez García

Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, INIFAP. Jiutepec, Morelos, México

RESUMEN: Dentro de las enfermedades que ocasionan mayores pérdidas económicas en la ganadería bovina están aquellas transmitidas por garrapatas y que afectan considerablemente a las especies productivas, principalmente al ganado bovino. La babesiosis bovina es una enfermedad causada por los parásitos intra-eritrocíticos del género *Babesia* *bovis* y *Babesia bigemina*, en México y en otros países de Latinoamérica, es transmitida por la garrapata *Rhipicephalus microplus* y *Rhipicephalus annulatus*. Actualmente la técnica de laboratorio utilizada rutinariamente para el diagnóstico de la enfermedad aguda es el frotis de gota delgada teñido con colorante de Giemsa. Una de las técnicas con elevada sensibilidad analítica y más rápida que los métodos convencionales ha sido la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con el uso de iniciadores específicos. El objetivo de este trabajo estuvo dirigido

a evaluar la capacidad diagnóstica de una prueba de PCR para *Babesia* spp, basada en oligonucleótidos género-específicos que amplifican una porción del gen DNA ribosomal, así como en la determinación de especie de *Babesia* mediante digestión del producto de amplificación con enzimas de restricción (PCR-RFLP). El trabajo se dividió en dos etapas, en el cual se incluyeron 22 animales *Bos taurus* de 6-10 meses de edad. La primera etapa experimental se realizó con un grupo de 4 animales esplenectomizados e infectados experimentalmente con 4 aislados de *Babesia*, 2 de *B. bovis* y 2 de *B. bigemina*, utilizando sangre criopreservada en nitrógeno líquido. Los animales fueron monitoreados diariamente durante 15 días pos-inoculación. La segunda fase, desarrollada en campo, se realizó con un lote de 18 bovinos previamente inmunizados con *B. bigemina* e introducidos un mes después a una zona endémica de babesiosis bovina en donde fueron monitoreados durante 21 días pos-introducción al potrero para evaluar la infección transmitida por *Babesia* spp. Los resultados del monitoreo demostraron que por microscopía óptica el promedio en días en que los animales fueron detectados como positivos fue de 7 días, mientras que por la prueba de PCR fue de 11 días. La utilización de enzimas de restricción en la prueba de PCR-RFLP permitió, además, identificar la especie involucrada en la infección. La prueba de PCR-RFLP aplicada es una herramienta molecular con elevada especificidad para la discriminación de las especies de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en animales expuestos a garrapatas.

PALABRAS CLAVE: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, PCR-RFLP.

APPLICATION OF A PCR-RFLP TEST IN THE DIAGNOSIS OF *Babesia* spp INFECTION IN CATTLE. RETROSPECTIVE STUDY

ABSTRACT: Among the diseases that cause the greatest economic losses in livestock are those transmitted by ticks and that considerably affect productive species, mainly cattle. Bovine babesiosis is a disease caused by the intra-erythrocytic parasites *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*, in Mexico and other Latin American countries. The pathogens are transmitted by the tick *Rhipicephalus microplus* and *Rhipicephalus annulatus*. Currently, the laboratory technique routinely used for the diagnosis of acute disease is the Microscopic examination of Giemsa-stained thin blood smears. One of the techniques with high analytical sensitivity and faster than conventional methods has been the Polymerase Chain Reaction (PCR) test with the use of specific primers. The objective of this work aimed to evaluate the diagnostic capacity of a PCR test for *Babesia* spp, based on genus-specific oligonucleotides that amplify a portion of the ribosomal DNA gene, as well as on the determination of *Babesia* species by digestion of the product of restriction enzyme amplification (PCR-RFLP). The work was divided into two stages, in which 22 *Bos taurus* of 6-10 months of age were included. The first experimental stage was carried out with a group of 4 splenectomized calves and experimentally infected with 4 different *Babesia* isolates, 2 with *B. bovis* and 2 with *B. bigemina*, using blood cryopreserved in liquid nitrogen. The animals were monitored daily for 15 days post-inoculation. The second phase, developed in the field, was carried out with a batch of 18 steers previously immunized with *B. bigemina* and introduced one month later to an endemic area for bovine babesiosis where they were monitored for 21 days post-introduction to the pasture to evaluate the infection transmitted by *Babesia* spp. The monitoring results showed that by optical microscopy the average number of days in which the animals were detected as positive was 7 days, while by the PCR test it was 11 days. The use of restriction enzymes

in the PCR-RFLP test also allowed the identification of the species involved in the infection. The applied PCR-RFLP test is a molecular tool with high specificity for the discrimination of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* species in animals exposed to ticks.

KEYWORDS: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, PCR-RFLP.

INTRODUCCIÓN

La Babesiosis, anteriormente conocida en México como ranilla (Toussaint, 1906) y más tarde como piroplasmosis, es una enfermedad causada por parásitos intraeritrocíticos transmitidos por garrapatas. Las especies que afectan al ganado bovino en México and Latinoamérica son *Babesia bigemina* y *Babesia bovis* que se caracterizan por provocar una alta morbilidad y mortalidad y, clínicamente, por la presencia de fiebre, anemia hemolítica, hemoglobinuria e ictericia (Bock et al, 2004; Álvarez et al, 2019; OIE, 2021). En los hatos afectados existe merma temporal de la reproducción y abortos después del primer tercio de la gestación (Morilla González, 1981; OIE, 2021). La enfermedad es transmitida por las garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y *Rh. annulatus* (Martinez et al, 2021; OIE, 2021). La ganadería bovina en México asciende a más de 32 millones de cabezas (SIAP, 2022) de las cuales el 70% se desarrolla en regiones tropicales y subtropicales, lugares de alta incidencia de la garrapata vector (Navarrete, et al., 2002).

El diagnóstico de la enfermedad se puede realizar mediante el uso de técnicas directas e indirectas. Dentro de los métodos indirectos más utilizados en México se encuentra la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI), la cual se caracteriza por la detección de anticuerpos circulantes en sangre y con una aparentemente elevada sensibilidad y especificidad diagnóstica ($\geq 90\%$). Sin embargo, la prueba de IFI tiene la desventaja de ser subjetiva y no poder discriminar entre las especies infectante, dada la reacción cruzada observada en sueros de animales donde coexisten ambos parásitos (Álvarez et al, 2019; OIE, 2021).

Los métodos directos incluyen aquellos que detectan de manera directa la presencia del patógeno: El más común es la preparación y observación de parásitos intraeritrocíticos en frotis teñidos con colorante de Giemsa. Se han desarrollado procedimientos moleculares que permiten detectar, con mayor sensibilidad analítica, la presencia de los parásitos, y su identificación por especie. Entre estos se incluye a las sondas de ácidos nucleicos y la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Figuroa et al, 1992; Figuroa et al, 1993; Figuroa et al, 1996).

El objetivo de este trabajo estuvo dirigido a evaluar la capacidad diagnóstica de una prueba de PCR para *Babesia* spp, basada en oligonucleótidos género-específicos que amplifican una porción del gen DNA ribosomal, así como en la determinación de especie mediante digestión del producto de amplificación con enzimas de restricción (PCR-RFLP).

MATERIALES Y METODOS

El desarrollo de la investigación se realizó en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en Jiutepec, Morelos, México.

Los bovinos experimentales utilizados en el estudio se dividieron en dos grupos para la investigación: 1) Animales experimentalmente infectados; y 2) Animales naturalmente infectados. Para la primera fase se utilizaron 4 bovinos (identificados con arete plástico 031, 032, 033 y 035) los cuales fueron esplenectomizados e inoculados experimentalmente con 4 diferentes aislados de *Babesia*: 031 con *B. bigemina* aislado México; 032 con *B. bovis* aislado Tabasco; 033 con *B. bigemina* aislado Chiapas; y 035 con con *B. bovis* aislado Tamaulipas. Se realizó monitoreo clínico a los animales desde el día de la inoculación (tomándose como el día cero), hasta el día 15 post-inoculación, colectando una muestra de sangre diariamente y obteniéndose un total de 60 muestras. El seguimiento diario consistió en toma de la temperatura rectal, observación de los individuos en búsqueda de signos clínicos relacionados con la babesiosis y la toma de una muestra de sangre por animal en tubos con anticoagulante EDTA, para determinar el volumen celular aglomerado mediante la prueba de micro-hematocrito y elaboración de frotis sanguíneo para tinción con colorante de Giemsa. Para la fase de animales naturalmente infectados, se utilizaron muestras de sangre congeladas pertenecientes a 18 bovinos (Identificados con arete plástico Nos. 6, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 28, 41, 45, 46 112), los cuales fueron introducidos a una zona de alta incidencia de garrapatas (Sitio Experimental Pichucalco, en Pichucalco Chiapas). Para evitar la presentación de babesiosis clínica severa, este grupo de individuos fue preinmunizado con *Babesia bigemina* dos meses antes de su introducción al potrero (Reyes-Sandoval et al, 2016). Los bovinos fueron expuestos naturalmente a la garrapata vector por al menos 21 días y se muestrearon consecutivamente a partir de los 8 días después de su llegada al sitio de exposición. La duración del muestro de los 18 animales por 15 días permitió obtener un total de 270 muestras sometidas a análisis por ambas técnicas directas de diagnóstico (Frotis teñidos con colorante Giemsa y PCR).

La extracción de ADN de las 330 muestras (ambas fases del estudio) se realizó mediante la utilización de un kit comercial. Para la prueba de PCR se procedió a la amplificación de la porción variable del gen que codifica para el ARN ribosomal de la pequeña subunidad 18S (ssrRNA, por sus siglas en inglés), utilizando los oligonucleótidos PIRO-A y PIRO-B (Carret et al, 1999) y que amplifican diferentes especies de *Babesia* (Carret, 1999). Las reacciones de PCR se realizaron en tubos de 0.2 ml, con un volumen final de 25 µl, a los cuales se agregaron 12.5 µl de Mezcla maestra (Taq polimerasa, dNTPs, Cloruro de magnesio), 5.5 µl de agua libre de nucleasas, 5 µl de ADN purificado, y 2 µl de mezcla de los oligonucleótidos sentido PIRO-A (5'-AATACCCAATCCTGACACAGGG-3') y anti-sentido PIRO-B (5'-TTAAATACGAATGCCCCAAC-3') (Carret et al., 1999). La

reacción de amplificación se hizo en un termociclador, bajo el siguiente protocolo de ciclado: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos un ciclo, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineamiento a 55°C por 1 minuto, extensión a 72°C por 1 minuto, extensión final a 72°C por 5 minutos y conservación a 4°C hasta retiro de los tubos de PCR para análisis de las muestras. El producto amplificado por PCR con los oligonucleótidos PIRO-A y PIRO-B se sometió a digestión con las enzimas de restricción *Box I* y *Msp I*. De acuerdo a un análisis bioinformático realizado de la secuencia de ADN ribosomal de cada especie de *Babesia*, se identificó un sitio de reconocimiento para cada una de estas enzimas en la parte variable del gen ADNr del parásito (Lira Amaya et al, 2023). En teoría, la enzima de restricción *Box I* (secuencia de reconocimiento 5'-GACNN↓NNGTC-3') cortaría solamente el amplicón correspondiente al ADNr de *Babesia bigemina*, mientras que la enzima *Msp I* (sitio de reconocimiento 5'-C↓CGG-3') cortaría solamente el amplicón correspondiente al ADNr de *Babesia bovis*. De acuerdo con la cantidad de ADN amplificado y necesitado para cada digestión con las enzimas de restricción, el volumen final de reacción fue de 31 µl, en donde se agregaron 10 µl de producto de PCR, 18 µl de agua libre de nucleasas, 2 µl de buffer tango 10x, 1 µl de enzima *Box I* y/o 1 µl de *Msp I*. La digestión con dichas enzimas se llevó a cabo en un baño maría a una temperatura de 37°C y durante 16 horas. Los productos de PCR y los derivados de la digestión con enzimas de restricción se visualizaron por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2% en buffer TAE 1X teñidos con 1.5 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml). Se utilizaron marcadores moleculares de 1 Kb y 100 pb (pares de bases) para discernir y estimar el tamaño de los amplicones y los productos de digestión enzimática. Para esto, del producto obtenido por PCR se colocaron 24 µl de reacción en cada pozo y se sometieron a electroforesis a 85 voltios con buffer de corrimiento (TAE 1X) y el gel se visualizó en un transluminador con luz ultravioleta.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del muestreo de la sangre periférica de los 4 animales utilizados en la primera fase se realizaron frotis de gota delgada teñidos con Giemsa y observados bajo microscopía óptica. La primera detección de *B. bigemina* mediante esta técnica se logra en los días 4 PI para el animal 031, mientras que el 033 se detecta positivo hasta el día 5 PI. La mayor parasitemia (1.95%) se presenta el día 5 PI en el animal 031, y en el día 7 PI para el animal 033 con una parasitemia de 1.5%. Los animales infectados con *B. bovis* (032 y 035) muestran positividad hasta los días 8 y 9 PI, respectivamente, alcanzando las mayores parasitemias (6.84% y 11.65%, respectivamente) el día 11 PI. Los resultados del monitoreo de los animales experimentalmente infectados en condiciones controladas con *Babesia* spp, y analizados mediante la técnica de Microscopía óptica se muestran en el Cuadro 1.

ID/ DPI	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
031	-	-	-	0.03	0.03	1.95	0.67	-	-	-	-	-	-	-	-
032	-	-	-	-	-	-	-	0.02	0.2	1.73	6.84	3	-	-	-
033	-	-	-	-	0.2	0.2	1.5	0.2	0.1	-	-	-	-	-	-
035	-	-	-	-	-	-	-	-	0.3	4.94	11.6	5.8	-	-	-

Cuadro 1. Parasitemias diarias estimadas en los animales experimentalmente infectados, seguimiento realizado mediante microscopía óptica.

Mediante la técnica de PCR punto final, se amplificó el ADN extraído de las muestras de sangre de los 4 bovinos experimentales. Utilizando los oligonucleótidos Piro A y Piro B que alinean en la porción variable del gen que codifica el ARN ribosomal 18S de varias especies de *Babesia* (Olmeda *et al.*, 1997; Carret, 1999), incluyendo la amplificación de ADN de *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*, así como de *B. canis vogeli*, *B. canis canis*, *B. canis rossi*, y *B. divergens*. A partir de la publicación de Carret, 1999, se toma como referencia el amplicón amplificado de tamaño aproximado a 390 pb para *Babesia bigemina* y 395 pb para *Babesia bovis*. Los resultados obtenidos en la amplificación de las muestras se presentan de forma representativa en las Figuras 1 y 2. Los productos de la prueba de PCR separados mediante corrida por electroforesis demuestran la presencia de un amplicón similar en tamaño al que se reporta previamente (Carret, 1999).

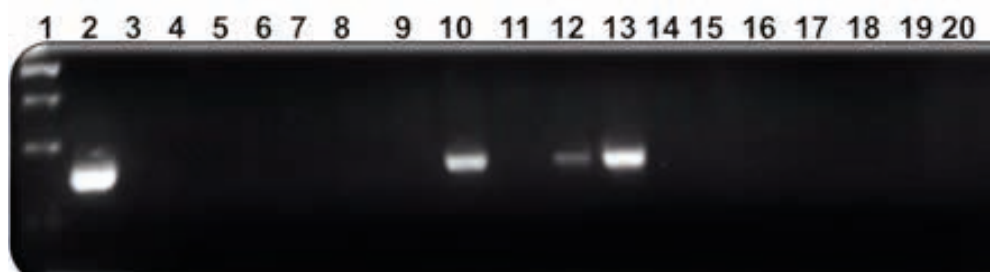


Figura 1. Análisis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (0.2%) y visualizado en transiluminador de luz UV, de productos de PCR con oligonucleótidos Piro-A y Piro-B. Amplificación de muestras del becerro # 033 infectado con *Babesia bigemina*. ID Carriles: 1, Marcador molecular de 1 Kb; 2, Control positivo de *B. bigemina*; 3, Control negativo; 4, vacío; 5-20; Días 0-15 pos-infección experimental.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

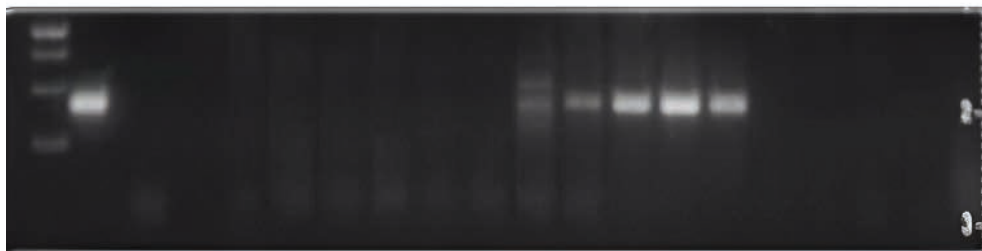


Figura 2. Análisis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (0.2%) y visualizado en transiluminador de luz UV de productos de PCR con oligonucleótidos Piro-A y Piro-B. Amplificación de muestras del becerro # 032 infectado con *Babesia bovis*. ID Carriles: 1, Marcador molecular de 1 Kpb; 2, Control positivo de *B. bovis*; 3, Control negativo; 4, vacío; 5-20; Días 0-15 pos-infección experimental.

Por otra parte, los resultados de los 4 animales experimentalmente infectados permiten identificar amplicones a partir del día 5 en los bovinos 031/033 (inoculados con *B. bigemina*), y 7 días pos-inoculación en los bovinos 032 y 035 (inoculados con *B. bovis*), respectivamente (Cuadro 2).

ID/DPI	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	15
031	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
032	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
033	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
035	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-

Cuadro 2. Resultados globales de PCR con oligonucleótidos Piro-A y Piro-B en los becerros experimentalmente infectados.

El análisis por microscopía óptica demostró la presencia de parásitos *B. bigemina* en los días 4 y 5 PI mientras que la técnica de PCR muestra que ambos animales inoculados con *B. bigemina* muestran un amplicón el día 5 PI, demostrándose que para el caso de infección por *B. bigemina* la microscopía tuvo una mejor eficacia. En cambio, para el caso de los animales inoculados con *Babesia bovis* la prueba de PCR demostró la presencia de un amplicón el día 7 PI para ambos animales. En contraste, la microscopía óptica permitió observar parásitos hasta el día 8 y 9 PI. En este caso, la prueba de PCR tuvo mayor sensibilidad que la microscopía óptica para detectar la infección prepatente en los animales inoculados con *B. bovis*. Con respecto a esta etapa de la investigación se puede resumir que la prueba de PCR para amplificación de ADN con los oligonucleótidos del ARN ribosomal 18S, Piro A y Piro B, si logra detectar una infección real, y por tanto, la presencia de *Babesia bigemina* y *B. bovis* en animales experimentalmente inoculados.

Trabajos previamente realizados utilizaron ADN purificado a partir de parásitos cultivados in vitro (Carret, 1999, Carret et al, 1999; Lira et al, 2023); o de animales experimentalmente infectados con diferentes aislados de campo (Lira et al, 2023).

Con relación a la etapa 2 del estudio, los resultados globales de los animales naturalmente infectados por la exposición a garrapatas y consecuente inoculación de *Babesia* spp, y analizados mediante la técnica de Microscopía óptica y PCR con oligonucleótidos Piro-A y Piro-B se muestran en el Cuadro 3 y Cuadro 4, respectivamente.

DPI/ ID	-2	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
10	-	-	-	-	-	-	0.01	0.01	0.03	0.05	0.05	1	-	-	-
23	-	-	-	0.01	0.01	0.01	-	0.01	0.01	0.05	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.04	0.02	0.05	0.01	-	0.01
46	-	-	-	-	-	-	0.01	0.05	0.08	0.1	0.1	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.1	0.1	0.05	0.01
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.01	0.01	0.01	0.01	-
20	-	-	-	-	-	-	0.01	0.05	0.1	0.1	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	0.01	0.8	0.1	0.05	0.05	0.01	0.01	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	0.01	0.04	0.1	0.1	0.05	0.01	0.01
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.01	1	1	-
45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
112	-	-	-	-	-	-	0.01	0.01	0.01	0.03	0.05	0.05	0.01	0.01	-
13	-	-	-	-	-	-	-	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.01	0.01	0.01
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.01	0.01	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.01	0.01	0.05	0.05	0.05	0.01
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.01	0.01	0.05	-
9	-	-	-	-	-	-	-	0.01	0.01	0.05	0.01	-	0.01	0.01	0.01
7	-	-	-	-	-	-	0.01	-	-	-	0.01	0.01	-	0.01	0.01

Cuadro 3. Parasitemias de animales naturalmente infectados con *Babesia* spp. Resultados obtenidos por microscopía óptica, realizada diariamente a partir del día 7 pos-introducción al potrero infestado con garrapatas.

De los 18 animales naturalmente expuestos a cepas de campo de *Babesia* spp los animales 10 y 25 tuvieron el máximo porcentaje de parasitemia del 1% en los días 17 al 19 PI (Cuadro 3). El inicio de la detección de parásitos se dio desde el día 9 PI en el bovino 23; el día 11 PI en el bovino 12; el día 12 PI en los bovinos 10, 46, 20, 112 y 7; el día 13 PI en los bovinos 22, 13 y 9; el día 14 PI en bovino 6; para el día 15 PI en bovinos 21 y 41; el día 17 PI en bovino 25; y para el día 18 PI en el bovino 28.

ID/DPI	-30	-2	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
10	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
23	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
41	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
46	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
12	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
15	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
22	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
25	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
45	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
112	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
28	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
19	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

Cuadro 4. Resultados del análisis por PCR con oligonucleótidos Piro-A y Piro-B en los bovinos experimentalmente infectados.

Los resultados arrojados del análisis por PCR sencillo con oligonucleótidos Piro-A y Piro-B demuestran, por un lado, que 14 de los 18 animales están positivos antes de la introducción al potrero. Este resultado aparentemente sorprendente, puede indicar simplemente que la prueba de PCR detecta animales portadores de *Babesia* spp. Como se indicó en la sección de materiales y métodos, todos los animales habían sido premunizados con *B. bigemina* 60 días antes de ser trasladados a Pichucalco, Chiapas. Para confirmar esto, todas las muestras correspondientes a la fecha -2 PI, fueron sometidas a una re-amplificación por PCR con oligonucleótidos Piro A y Piro B. Los resultados demostraron que, efectivamente, todos los animales resultan positivos a la prueba de PCR y, muy probablemente, el amplicón obtenido corresponda a *B. bigemina*, producto de la premunización realizada previamente. Sin embargo, es de hacer notar que la prueba de PCR Piro A/B por si sola, no permite discriminar la especie de *Babesia* involucrada. Por otro lado, se observa una variabilidad en cuanto al número de días que transcurren desde la introducción de los animales al potrero y la detección de amplicón de ADN, y consecuentemente, la determinación de infección por *Babesia* spp transmitida por la garrapata. De acuerdo con trabajos anteriores, tomando como punto de referencia la etapa de pre-patencia de la babesiosis bovina, que puede variar de 7 a 35 días dependiendo de las condiciones naturales (Álvarez Martínez & Figueroa Millan, 2007; Lopez et al, 2008), se tomaron fechas estratégicas donde hubiera

un mayor número de animales positivos a la prueba de PCR. Considerando que a partir del día 8 post-introducción a potreros infestados con garrapatas se pueden detectar animales infectados con *B. bovis* (Figuroa Millán & Álvarez Martínez, 2003; Lopez et al, 2008), las muestras obtenidas entre los días 11-15 PI se sometieron a una re-amplificación con los mismos oligonucleótidos. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3, en donde se permite apreciar que todos los animales aparecen positivos a la prueba de PCR Piro A/B y por lo tanto se pueden clasificar como infectados a *Babesia* spp sin poder, en esta etapa, discriminar si están infectados por *B. bovis*, *B. bigemina* o ambas.

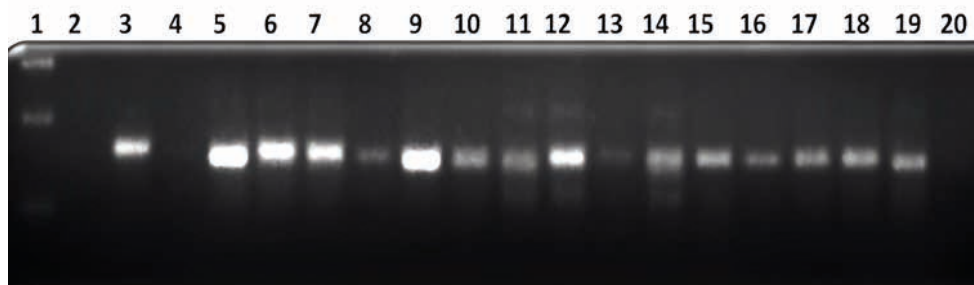


Figura 3. Análisis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (0.2%) y visualizado en transiluminador de luz UV de productos de PCR con oligonucleótidos Piro-A y Piro-B. Amplificación de muestras de bovinos introducidos a zona endémica de babesiosis. ID Carriles: 1, Marcador molecular de 1 Kpb; 2, Control negativo; 3-20 bovinos naturalmente infectados en los días 11-15 pos-exposición a garrapatas.

Con base en los resultados obtenidos de las amplificaciones realizadas, se considera que el 100% de los animales se detecta positivo a *Babesia* spp, incluyendo los animales portadores de infección por *B. bigemina* resultado de la premunición realizada. Estudios previamente realizados por PCR e hibridación de amplicon con sondas marcadas y dirigidas a otro gen de *B. bigemina* demuestran que la infección por *B. bigemina* puede permanecer al menos 2 meses (Figuroa Millán & Álvarez Martínez, 2003) y hasta por 11 meses después de una primo-inoculación (Figuroa *et al.*, 1992), detectándose en este estudio como positivos desde el día de introducción al potrero y hasta el día 22 PI. Con respecto a las muestras correspondientes a los días 11-15 PI que se re-amplificaron, se obtuvo una mejor calidad de amplicón que, si bien puede considerarse específico de *Babesia* en México, con esta metodología no se permite discernir la(s) especie(s) involucrada(s). Sin embargo, estos amplicones reamplificados se utilizaron para llevar a cabo la prueba de digestión de fragmentos con enzimas de restricción y poder, eventualmente, realizar la especiación de especie.

Al realizar un contraste entre las técnicas de microscopía óptica y PCR se tuvieron las siguientes comparaciones; los 18 animales muestran ser negativos para ambas técnicas para el día 30 previo a su premunización, Sin embargo, en el día 2 previo a su introducción

a la exposición natural, la técnica de microscopía óptica clasificó a los 18 animales como negativos, mientras que la técnica de PCR determinó el 77.7% (14 animales) como positivos; Al inicio del muestreo a partir del día 7 PI se encuentran 7 animales positivos en la prueba de PCR, mientras que por microscopía óptica se tienen los 18 animales como negativos y se mantienen así hasta el día 8 PI. La técnica de PCR detecta otros 3 animales positivos el día 9 y 10 PI mientras que por microscopía el día 9 PI se encuentra solamente un animal positivo. El día 11 PI se detectan dos animales positivos adicionales para cada técnica, y es hasta el día 12 PI cuando se detectan 5 animales positivos a microscopía. El día 13 PI la prueba de PCR detecta como positivos 2 animales adicionales mientras que por microscopía se tienen 3 animales positivos el día 14 PI. Ambas técnicas detectan a la mayoría de los animales como positivos los días 15, 16, 17 y 18 PI.

La duración del muestro de los 18 animales por 15 días da un total de 270 días/animal sometidas a análisis por ambas técnicas. El promedio en días que un animal fue detectado como positivo a *Babesia* spp por microscopía óptica fue de 7.06 días, mientras que por la prueba de PCR fue de 11.66 días, siendo la técnica de PCR la que mostró el mayor número de días que un animal podría ser detectado como positivo a *Babesia*. Otro contraste que se puede hacer con ambas técnicas es en cuestión de la cantidad de muestras trabajables en un día por un solo analista; Es obvio que un microscopista puede analizar fácilmente 18 frotis de gota delgada observados en una jornada si se le dedica aproximadamente 10-15 minutos de microscopía óptica por frotis. Sin embargo, para lograr esto se necesita contar con una persona con experiencia para la detección de los parásitos. Por otro lado, la prueba de PCR si bien es una técnica elevada en costo por los reactivos que utiliza, tiene la gran ventaja que en una jornada laboral de 8 hrs, y dada la automatización del procedimiento de amplificación del ADN, se puede tener un mayor número de muestras procesadas en un día.

Resultado de la digestión con enzimas de restricción *Msp* I y *Box* I

Con base en el amplicón resultante de la amplificación y re-amplificación por PCR, las muestras se sometieron a la técnica de PCR-RFLP (polimorfismo de longitud del fragmento de restricción, por sus siglas en inglés) mediante digestión enzimática con las enzimas de restricción *Msp* I y *Box* I. En principio, con la prueba PCR-RFLP y análisis de fragmentos en geles de agarosa, se esperarían los siguientes resultados: Dos fragmentos con un tamaño esperado de 240 pb y 160 pb a partir de amplicones digeridos con la enzima *Msp* I correspondientes a *B. bovis* exclusivamente; y de aproximadamente 280 pb y 120 pb en amplicones digeridos con la enzima *Box* I para *Babesia bigemina*, exclusivamente. Si existe infección por ambas especies de *Babesia*, en teoría se esperaría visualizar 4 fragmentos en el gel de agarosa como producto de la digestión del amplicón con las 2 enzimas de restricción (Lira et al, 2023).

Los resultados de la digestión de amplicones Piro-A y Piro-B con las enzimas de

restricción *Box I* y *Msp I* en muestras de los animales experimentalmente infectados en la etapa I del trabajo de investigación confirma que la digestión enzimática permite especificar la especie de *Babesia* involucrada en la infección de cada individuo. La Figura 4 muestra un resultado representativo de los amplicones obtenidos en la prueba de PCR y sujetos a digestión enzimática (RFLP) en muestras control y de los animales experimentalmente infectados.

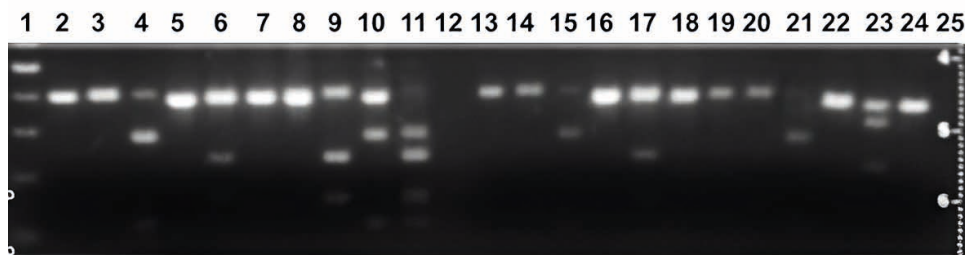


Figura 4. Análisis por PCR/RFLP de productos amplificados con oligonucleótidos PIRO-A/PIRO-B y digeridos con las enzimas *Box I* y *Msp I*. Carriles: 1: Marcador de 100 pb; 2-4: Amplicón de *B. bigemina*; 5-7: Amplicón de *B. bovis*; 8-11: Amplicón de mezcla de *B. bigemina*/*B. bovis*; 13-15: Amplicón de bovino 031; 16-18: Amplicón de bovino 032; 19-21: Amplicón de bovino 033; 22-24: Amplicón de bovino 035. Carriles 2, 5, 8, 13, 16, 19, 22: Amplicones sin digestión enzimática; 3, 6, 9, 14, 17, 20, 23: Digestión con *Msp I*; 4, 7, 10, 15, 18, 21, 24: Digestión con *Box I*; Carril 11: Doble digestión con *Msp I*/*Box I*.

En a la Figura 4 se presentan los resultados de la digestión enzimática, en los carriles 2 al 4 se presentan los controles para *B. bigemina* y se puede observar en el carril 2 el amplicón no digerido y en el carril 3 el amplicón digerido con la enzima *Msp I*. Ambas muestras presentan el amplicón esperado de 390 pb, por lo que se demuestra que un amplicón de *B. bigemina* no es digerido con la enzima *Msp I*, mientras que en el carril 4 se tiene amplicón de *B. bigemina* digerido con la enzima *Box I* observándose las bandas esperadas de 280 pb y 120 pb (débil). Sin embargo, se presentan también una fracción del amplicón de 390 pb lo que indica una digestión incompleta. Este resultado puede derivarse de una elevada concentración de amplicón, una insuficiente cantidad de enzima utilizada en la reacción de digestión, un limitado tiempo de incubación para acción enzimática, una inadecuada concentración de sales en la solución de reacción por dilución al adicionar el producto de PCR (se utilizaron hasta 18 μ l de éste) o una combinación de todas. Para *B. bovis* los controles que se usaron se presentan en los carriles 5 a 7. En estos, se puede observar que solo el amplicón digerido con la enzima *Msp I* (carril 6) presenta dos bandas de aproximadamente 240 pb y 160 pb además del amplicón de 395 pb lo que indica, al igual que sucedió en el caso anterior, que la digestión no fue completa. Los carriles 8 al 11 muestran los resultados de muestras control para ambas especies dado que se utilizó ADN de *B. bigemina* y *B. bovis* mezclado artificialmente. Se corrobora que las enzimas de restricción digieren regiones específicas para ambas especies, visualizándose

fragmentos con un tamaño esperado de 240 pb y 160 pb (carril 9) a partir del amplicón digerido con la enzima *Msp* I (correspondiendo a *B. bovis*) y de aproximadamente 280 pb y 120 pb (carril 10) en el amplicón digerido con la enzima *Box* I (correspondiendo a *B. bigemina*). Además, se demuestra que al existir amplicones de ambas especies (carril 11), se presentan 4 fragmentos de aproximadamente 280 pb, 240 pb, 160 pb y 120 pb, una mezcla de los 2 fragmentos esperados para cada especie, cuando estos son sometidos a una doble digestión con las enzimas *Msp* I y *Box* I, confirmando la infección mixta, si bien esta haya sido artificialmente mezclada. En los carriles 13 a 24 se presentan los resultados obtenidos producto del análisis de restricción enzimática de los amplicones obtenidos a partir de muestras correspondientes a los animales 31, 32, 33 y 35, respectivamente. En los carriles 13, 16, 19 y 22 se observan las muestras de amplicón sin digerir, en los se obtienen los fragmentos de entre 390 pb y 395 pb (difícil de discernir la talla exacta), característicos de cada especie. En los carriles 14 y 20 aparecen los amplicones de *B. bigemina* (bovinos 031 y 033) que no son digeridos con la enzima *Msp* I, mientras que en los carriles 18 y 24 aparecen los amplicones de *B. bovis* (bovinos 032 y 035) que no son digeridos con la enzima *Box* I. En contraste, en los carriles 15, 17, 21 y 23 se presentan los resultados obtenidos cuando las muestras son sometidas a digestión con la enzima específica para el DNA de cada especie. Se puede observar que para las muestras correspondientes a los animales 031 y 033 se obtienen los tamaños esperados para *B. bigemina*, 280 pb y 120 pb (débilmente visible ésta última) una vez digeridos con la enzima *Box* I. No obstante, y al igual que los controles se observa una digestión parcial de la muestra. Finalmente, las muestras de amplicones correspondientes a los animales 032 y 035, infectados con *B. bovis*, son parcialmente digeridas solamente cuando se utiliza la enzima *Msp* I (Figura 4). Con base en los resultados obtenidos con las muestras de los animales 031, 032, 033 y 035 (infectados experimentalmente con aislados conocidos de *Babesia*), además de las considerados como controles (derivadas de cultivo in vitro), se utilizó entonces la prueba PCR-RFLP con las enzimas *Msp* I y *Box* I en los amplicones obtenidos en las muestras de los animales que fueron expuestos al vector y, por tanto, a *Babesia* de campo. Las figuras 5 y 6 son una imagen representativa de los resultados que se obtuvieron en los animales introducidos al potrero infestado con garrapatas, y el cuadro 5 presenta los resultados globales producto de la digestión enzimática de los amplicones en todos los animales experimentales.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25

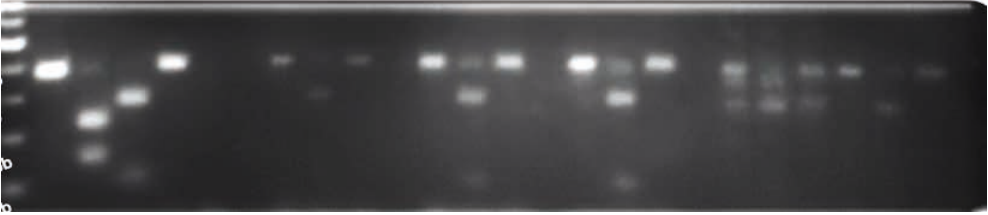


Figura 5. Análisis por PCR/RFLP de productos amplificados con oligonucleótidos PIRO-A/PIRO-B y digeridos con las enzimas *Box I* y *Msp I*. Carriles: 1: Marcador de 100 pb; 2: Control positivo *B. bovis* no digerido; 3: Control positivo *B. bovis* digerido con *Msp I*; 4: Control positivo *B. bigemina* digerido con *Box I*; 5: Control positivo *B. bigemina* no digerido; Carriles 6 y 7: Vacíos; 8-9 Bovino #10; 12-14: Bovino #23; 16-18: Bovino #41; 20-22: Bovino # 46; 23-25: Bovino #12; muestras de amplicones, no digeridos, digeridos con *Box I*, y digeridos con *Msp I*, respectivamente.

La Figura 5 representa los resultados obtenidos en las muestras reamplificadas por PCR PiroA/B en animales premunizados con *B. bigemina* en su primer muestreo correspondiendo al día -2 PI. En los carriles 2 (no digerido) y 3 (digerido con *Msp I*) se representan los controles de *B. bovis* observándose los resultados esperados: bandas de 390 pb (no digerido), y de 240 pb y 160 pb en el carril 3 digerido con *Msp I*. De forma similar, se observan las bandas esperadas cuando el control de *B. bigemina* que se utilizó es digerido con la enzima *Box I* (carril 5) donde aparecen bandas de 280 pb y 120 pb (débilmente visible ésta última). En los carriles 8 al 25 se representan los resultados obtenidos en muestras de los animales 10, 23, 41, 46 y 12 de los 18 animales probados. En las muestras de amplicón sin digerir se observa la banda de 390-395 pb característica de *Babesia* spp (carriles 8, 12, 16, 20 y 23). No se observa digestión de los amplicones cuando estos son digeridos con la enzima *Msp I* (carriles 10, 14, 18 y 25), mientras que cuando éstos son digeridos con la enzima *Box I* (carriles 9, 13, 17, 21 y 24) si se observan productos de la digestión. Se demuestra, entonces, que en las muestras correspondientes a los animales 10, 23, 41, 46 y 12 se obtienen bandas similares a los tamaños presentes en el control positivo para *B. bigemina*. En el caso particular del bovino 46 (carriles 20-22) aparentemente hay una contaminación de producto del carril 21 hacia los carriles 20 y 22, dado que el patrón producido es muy similar. En el cuadro 11 se encuentran los resultados globales de los 18 animales probados en con las muestras obtenidas el día -2 PI, donde se demuestra que los 18 animales son positivos a *B. bigemina* y resultado del estado portador alcanzado posterior a la premunición realizada 60 días antes de introducirse al potrero.

Una situación diferente se presenta cuando se analizan por PCR-RFLP las muestras de los animales colectadas el día 8 PI al potrero (Figura 6).



Figura 6. Análisis por PCR/RFLP de productos amplificados con oligonucleótidos PIRO-A/PIRO-B y digeridos con las enzimas *Box I* y *Msp I*. Carriles: 1: Marcador de 100 pb; 2-4: Control positivo *B. bigemina*; 5-7: Control positivo *B. bovis*; 8: Control negativo; 9-11: Bovino #10; 13-15: Bovino #23; 17-19: Bovino #41; 21-23: Bovino # 46. 2,5,9,13,17,21: Muestras de amplicones no digeridos; 3,6,10,14,18,22: Amplicones digeridos con *Box I*; 4,7,11,15,19,23: Amplicones digeridos con *Msp I*.

La Figura 6 corresponde a muestras representativas observándose los siguientes resultados: en los carriles 2-4 se representan los controles de *B. bigemina*, observándose las bandas esperadas de 280 pb y 120 pb solo cuando el amplicón es digerido con la enzima *Box I* (carril 3). Los controles de *B. bovis* se presentan en los carriles 5-7, y solo el amplicón digerido con *Msp I* (carril 7) presenta dos bandas de 240 pb y 160 pb. En los carriles 9 al 23 se representan los animales con ID 10, 23, 41 y 46 de los 18 bovinos introducidos a potrero infestado con garrapatas. En los carriles 9, 13, 17 y 21 son muestras de amplicón sin digerir, obteniéndose la banda de 390-395 pb característica de *Babesia* spp. En los carriles 10, 14, 18 y 22 son amplicones digeridos con la enzima *Box I*, de los cuales se puede observar que, de acuerdo con el patrón de digestión, los animales con ID 10 y 46 son positivos a *B. bigemina*. En los carriles 11, 15, 19 y 23 son muestras que fueron digeridas con la enzima *Msp I*, se determina que el patrón de digestión obtenido en la muestra del animal ID 46 (carril 19) corresponde a un patrón positivo a *B. bovis*. Para el caso del animal con ID 23 no se obtuvo un patrón de digestión definitivo dado que el amplicón original fue de muy baja calidad y concentración.

ID	DPI	-2		11		12		13		15	
	Enzima	Box I	Msp I	Box I	Msp I	Box I	Msp I	Box I	Msp I	Box I	Msp I
10		+	-			+	-				
23		+	-			-	-				
41		+	-				+				
46		+	+			+	-				
12		+	-			+	-				
15		+	-	+	-						
20		+	-	-	+						
22		+	-	+	+						
6		+	-	+	+						
25		+	-	+	-						
45		+	-	-	-						
112		+	-	+	+						
13		+	-	+	+						
28		+	-					-	-		
21		+	-					+	-		
19		+	-					-	-		
9		+	-							-	+
7		+	-							+	-

Cuadro 5. Resultados globales de los animales naturalmente infectados mediante la exposición a garrapata y analizados por la prueba de PCR-RFLP para discriminación de especie de *Babesia* en función de la digestión de amplicones con las enzimas *Box I* y *Msp I*.

En el cuadro 5 se presentan los resultados globales de los 18 animales (muestras correspondientes a los días 11, 12, 13 y 15 PI) de los cuales 7 de los 18 animales son positivos solo a *B. bigemina*, 3 de los 18 animales son positivos solamente a *B. bovis*, 4 de los 18 animales son positivos a ambas especies, y 4 de los 18 animales son aparentemente negativos en la prueba de PCR-RFLP. Esta aseveración resulta del hecho que todos los animales resultaron positivos a la prueba de PCR PiroA/B (ver cuadro 5), sin embargo, no se logró reamplificar suficiente material para llevar a cabo la digestión enzimática. Alternativamente, existe la posibilidad que el amplicón corresponda a otra especie de *Babesia* y/o *Theileria* presente en estos animales. Esto, derivado del hecho que se evidenciaron formas intraeritrocíticas sugerentes de piroplasmas cuando se realizó el examen microscópico de los frotis derivados de estos animales. Si los piroplasmas observados microscópicamente y los correspondientes amplicones obtenidos por la prueba de PCR PiroA/B corresponden a otra especie de *Babesia* y/o *Theileria* merece especial atención para investigarse en otro estudio, ya que a la fecha no se ha reportado en México, la presencia de otros piroplasmas que infecten a los bovinos, aparte de *B. bovis* y *B. bigemina*. Para poder realizar esto, se tendrá que verificar, mediante la clonación molecular

y secuenciación de los amplicones clonados, la naturaleza y homología de la secuencia para establecer pertenencia del amplicón a alguna especie en particular.

Se ha utilizado previamente, como blanco de detección por PCR, el gen de la β -tubulina para la detección temprana de *Babesia bigemina* y *Theileria annulata* (Cacciò et al, 2010). Considerando el análisis de la secuencia del fragmento del gen p-tubulina de varios aislados, se desarrolló un método de PCR-RFLP basado en las enzimas *Eco* RI y *Hind* III para la identificación de especies de *B. bigemina* y *T. annulata* (Singh et al, 2010).

De forma similar, estudios realizados anteriormente en China, establecieron un método basado en RFLP del gen RPS8, considerado como una herramienta de diagnóstico molecular confiable para la detección e identificación simultánea de especies bovinas de *Babesia* y *Theileria* (Tian, et al, 2015). El tamaño claramente diferente de los productos PCR-RFLP permitió una discriminación directa entre ocho especies de patógenos de los bovinos (*T. annulata*, *T. sinensis*, *T. sergenti*, *B. ovata*, *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. major* y *Babesia* sp. Kashi).

CONCLUSIONES

Se logró implementar la prueba de PCR para detectar *Babesia spp* en las etapas prepatente y patente de la babesiosis bovina, mediante el uso de oligonucleótidos genéricos Piro-A y Piro-B. Se demuestra que la prueba de PCR para amplificación de ADN de *Babesia* sp utilizando oligonucleótidos que alinean al gen que codifica por el ARN ribosomal 18S, logra detectar una infección recausada por la presencia de *Babesia bigemina* y/o *B. bovis* en animales experimentalmente inoculados. Trabajos previamente realizados utilizaron como molde ADN purificado a partir de parásitos cultivados *in vitro* (Carret, 1999; Carret et al, 1999).

De acuerdo con el análisis comparativo que se realizó en este estudio con las dos técnicas de detección directa se puede esgrimir que ambas técnicas son precisas y confiables. Sin embargo, es en términos de la especificidad de las pruebas y de la cantidad de muestras que pueden ser procesadas en un día por un solo analista donde aparecen claras diferencias. Es obvio que un microscopista puede analizar fácilmente 18 frotis de gota delgada observados en una jornada si se le dedica aproximadamente 10-15 minutos de microscopía óptica por frotis. Sin embargo, para lograr esto se necesita contar con una persona con experiencia para la detección y especiación de los parásitos. Por otro lado la prueba de PCR si bien es una técnica de elevado costo por los reactivos que utiliza, tiene la gran ventaja que en una jornada laboral de 8 hrs, y dada la (semi)automatización del procedimiento de amplificación del ADN, se puede tener un mayor número de muestras procesadas en un día.

El monitoreo de los 18 animales durante 15 días una vez introducidos aun potrero infestado con garrapatas, permitió obtener un total de 270 muestras o días/animal las cuales

fueron sometidas a análisis por las técnicas diagnósticas de microscopía óptica y PCR. El promedio en días que un animal fue detectado como positivo a *Babesia* spp por microscopía óptica fue de 7.06 días, mientras que por la prueba de PCR fue de 11.66 días. Con la prueba de PCR se identificó un mayor número de días en que un animal podría ser detectado como positivo a *Babesia*. Además, para la discriminación de infección entre ambas especies, utilizando la enzima *Box I* para digerir los productos de PCR obtenidos con los iniciadores genéricos PiroA - PiroB y correspondientes a las muestras de los animales premunizados con *B. bigemina* un mes antes de la introducción al potrero infestado con garrapatas (día -2), se pudo corroborar la infección por *B. bigemina* en 14 bovinos. De forma similar, pero utilizando la enzima *Msp I* para digerir los productos de PCR obtenidos con los iniciadores genéricos PiroA - PiroB y correspondientes a las muestras obtenidas entre los días 11- 15 post introducción al potrero infestado con garrapatas, se pudo corroborar la infección por *B. bovis* en los 18 bovinos experimentales.

En conclusión, se constata la aplicación de una prueba basada en PCR-RFLP para identificar las infecciones por *Babesia* en animales experimental y naturalmente infectados con *B. bovis* y/o *B. bigemina*. Este trabajo permite establecer una diferenciación de las especies *B. bovis* y/o *B. bigemina* con el uso de enzimas de restricción para digestión de un amplicón obtenido por PCR. La prueba puede ser implementada para el monitoreo de infección por *Babesia* spp para estimar el período prepatente y/o patente de la infección en animales premunizados y/o naturalmente infectados.

AGRADECIMIENTOS

Financiado parcialmente por CONACYT, Proyecto CB2017-2018 No. A1-S-43508; e INIFAP, Proyecto SIGI No. 1672534936

REFERENCIAS

- Álvarez, J.A.; Rojas, C.; Figueroa, J.V. (2019). Diagnostic tools for the identification of *Babesia* sp. in persistently infected cattle. *Pathogens*. 9; 8(3):143.
- Bock, R.E.; Jackson, L.; de Vos, A.J.; Jorgensen, W. (2004) Babesiosis of cattle. *Parasitology*. 129, 247-269.
- Cacciò, S.; Cammà, C.; Onuma, M.; Severini, C. (2000). The beta-tubulin gene of *Babesia* and *Theileria* parasites is an informative marker for species discrimination. *Int. J. Parasitol.* 11:1181-1185.
- Carret, C.M. 1999. *Babesia canis: caracterisation d'antigenes parasitaires solubles potentiellement impliqués dans l'immunoprotection induite chez le chien et analyse molecularire du polymorphisme genetique des sous especies*. Tesis de doctorado. Facultad de Farmacia, Universidad de Montpellier I. Montpellier, Francia.

Carret, C.; Walas, F.; Carcy, B.; Grande, N.; Précigout, É.; Moubri, K.; Schetters, T.P.; Gorenflot, A. (1999). *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossii*: Differentiation of the three subspecies by a Restriction Fragment Length Polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. *J. Eukaryotic Microbiol.* 46(3): 298-303.

Figuroa, J.V.; Chieves, L.P.; Johnson, G.S.; Buening, G.M. (1992). Detection of *Babesia bigemina*-infected carriers by polymerase reaction amplification. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2576–2582.

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

Figuroa, J.V.; Alvarez, J.A.; Canto, G.J.; Ramos, J.A.; Mosqueda, J.J.; Buening, G.M. (1996). Comparative sensitivity of two tests for the diagnosis of multiple hemoparasite infection of cattle. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 23, 117–127.

Lira Amaya, J.J.; Polanco Martínez, D.J.; Santamaría Espinosa, R.M.; Martínez García, G.; Rojas Martínez, C.; Álvarez Martínez, J.A.; Figuroa Millán, J.V. (2023). Use of a PCR-RFLP molecular test for the differentiation of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in the diagnosis of bovine babesiosis. En: Eduardo Eugênio Spears, Ed., “Agrárias: Pesquisa e Inovação nas Ciências que Alimentam o Mundo IX”. Aceptado para publicación.

Lopez M, Figuroa JV, Ramos JA, Mosqueda JJ, Rojas E, Vega CA, Alvarez JA. (2008). Infection and seroconversion of susceptible animals introduced into a babesiosis endemic area. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1149:131-135.

Martínez-García, G.; Santamaría-Espinosa, R.M.; Lira-Amaya, J.J.; Figuroa, J.V. (2021). Challenges in tick-borne pathogen detection: The case for *Babesia* spp. identification in the tick vector. *Pathogens* 10, no. 2: 92.

Morilla-González, A. 1981. Inmunología de la babesiosis. *Ciencia Veterinaria*, 3: 240-268.

Navarrete, I.; Serrano, F.J.; Reina, D. (2002). Parásitos hemáticos. En: M. Cordero del Campillo & R. A. Rojas Vazquez, edits. *Parasitología Veterinaria*. España: Mc Graw Hill, pp. 283-294.

OIE, World Organization for Animal Health (WOAH) (2021). Bovine Babesiosis; OIE WOAHO Terrestrial Manual: Paris, France, 2021; Chapter 3.4.2; Available online: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.02_BABESIOSIS.pdf (accessed on 28 June 2022).

Olmeda, A S; Armstrong, P M; Rosenthal, B M; Valladares, B; del Castillo, A; de Armas, F; Miguelez, M; González, A; Rodríguez Rodríguez, J A; Spielman, A; Telford III, S R., (1997). A subtropical case of human babesiosis. *Acta Tropica*, Volumen 67, pp. 229-234.

Reyes-Sandoval, R.M.; Bautista-Garfias, C.R.; Castañeda-Arriola, R.O.; Vargas-Urióstegui, P.; Álvarez-Martínez, J.A.; Rojas-Martínez, C.; Mejía-Estrada, F.; Figuroa-Millán, J.V. (2016). Babesiosis: Field assessment of protection in cattle immunized with a mixture of *Babesia bovis* recombinant proteins. *Quehacer Científico en Chiapas*,11(2):36-46.

SIAP. (2022). Población Ganadera Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera Gobierno Gob. mx. Available online: www.gob.mx (accessed on 30 June 2022).

Singh, H.; Cheema, P.S.; Mishra, A.K.; Tewari, A.K.; Rao, J.R.; Ravindran, R.; Ray, D.; Bansal, G.C. (2010). β -tubulin gene based PCR-RFLP method for specific detection of *Babesia bigemina* and *Theileria annulata* isolates. J. Appl. Anim. Res. 37: 233-238.

Tian, Z.; Du, J.; Yang, J.; Liu, A.; Liu, X.; Liu, G.; Yin, H. (2015). A PCR-RFLP assay targeting RPS8 gene for the discrimination between bovine *Babesia* and *Theileria* species in China. Parasit. Vectors. 8:475.

Toussaint, M. (1906). La Ranilla y el *Piroplasma bigeminum*. En: *Comision de Parasitología Agrícola*. Mexico, DF: Secretaría de Fomento, pp. 5-12.