

**OPTIMIZACIÓN DE UNA PRUEBA DE PCR-RFLP PARA DETECCIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE *Babesia sp* EN GARRAPATAS *Rhipicephalus microplus***

Julio Vicente Figueroa-Millán, José Juan Lira-Amaya, Roberto Castañeda-Arriola, Jesús Antonio Álvarez-Martínez, Carmen Rojas-Martínez, Carlos Ramón Bautista-Garfias. CENID-Parasitología Veterinaria, INIFAP. Carr. Fed. Cuernavaca-Cuautla No. 8534, Jiutepec, Morelos, CP 62550, [figueroa.julio@inifap.gob.mx](mailto:figueroa.julio@inifap.gob.mx); [lira.juan@inifap.gob.mx](mailto:lira.juan@inifap.gob.mx); [castaneda.roberto@inifap.gob.mx](mailto:castaneda.roberto@inifap.gob.mx); [alvarez.jesus@inifap.gob.mx](mailto:alvarez.jesus@inifap.gob.mx); [rojas.carmen@inifap.gob.mx](mailto:rojas.carmen@inifap.gob.mx); [bautista.carlos@inifap.gob.mx](mailto:bautista.carlos@inifap.gob.mx).

**RESUMEN:** Este estudio tuvo como objetivo evaluar la capacidad de una prueba de PCR-RFLP para detectar y diferenciar la especie de *Babesia* presente en garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, la garrapata común del ganado. La prueba de PCR amplificó una porción del gen 18S rDNA de aproximadamente 400 pb. Se generaron fragmentos de 250 y 150 pb en productos de PCR digeridos con la enzima de restricción *MspI*, solo en muestras conteniendo ADN de *B. bovis*, mientras que los amplicones de las muestras infectadas con *B. bigemina* no fueron digeridos. Los productos de PCR digeridos con *Box I* mostraron fragmentos de 290 y 110 pb en muestras infectadas solo con *B. bigemina*. La prueba de PCR-RFLP puede ser una herramienta molecular útil que permite detectar la presencia de *Babesia spp* en garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y la discriminación de *B. bovis* y *B. bigemina*.

Palabras clave: *Babesia*, *Boophilus microplus*, PCR-RFLP.

**Optimization of a pcr-rflp test for *Babesia sp.* detection and differentiation in *Rhipicephalus microplus* ticks.**

**ABSTRACT:** This study aimed to evaluate the ability of a PCR-RFLP test to detect and differentiate *Babesia* species present in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, the common cattle tick. The PCR assay amplified a portion of the 18S rDNA gene of approximately 400 bp. Fragments of 250 and 150 bp were generated by enzyme digestion of PCR products with the restriction enzyme *Msp I*, only in samples containing DNA from *B. bovis*, while amplicons from samples infected with *B. bigemina* were not digested. PCR products digested with restriction enzyme *Box I* showed fragments of 290 and 110 bp in size only in samples infected with *B. bigemina*. The PCR-RFLP test can be a useful molecular tool to detect the presence of *Babesia sp.* in *Rhipicephalus microplus* ticks and discrimination of *B. bovis* from *B. bigemina*.

Key words: *Babesia*, *Boophilus microplus*, PCR-RFLP.

**Introducción**

En México la garrapata común del ganado, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ha sido reconocida como uno de los vectores que transmiten la babesiosis bovina, una enfermedad causada por los parásitos intraeritrocíticos *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, que se caracteriza por provocar una alta morbilidad y mortalidad, con la presencia de fiebre, anemia hemolítica, hemoglobinuria, ictericia y frecuentemente muerte (Figueroa y Álvarez, 2003; OIE, 2004). La ganadería bovina en México asciende a más de 32 millones de cabezas (SIAP, 2010) 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 basa en la presentación de signos clínicos asociados a la presencia de la garrapata vector, sin embargo se requiere de pruebas de laboratorio para confirmar la presencia de los parásitos intraeritrocíticos (OIE, 2004). El método tradicionalmente utilizado para la identificación del agente en animales infectados es mediante el examen microscópico de frotis finos y gruesos de sangre teñidos con colorante de Giemsa. Es un método adecuado para la diferenciación de especies (basada en el tamaño y características morfológicas de *Babesia bovis* o *B. bigemina*) en los bovinos infectados, particularmente en la detección de infecciones agudas y es buena en frotis finos pero pobre

en los frotis gruesos (OIE, 2004). Se ha mencionado que para el estudio de la epidemiología de la babesiosis bovina y el establecimiento de adecuados programas de prevención y control de enfermedad, no solo se necesita saber la prevalencia de la enfermedad en los animales hospederos, sino que es primordial conocer el grado de infestación por garrapatas en los bovinos, pero también la prevalencia e intensidad de infección de las garrapatas por *Babesia* (Guglielmone, 1995). Desde los años 60's se ha descrito que la infección por *Babesia bovis* y *B. bigemina* en hembras repletas de *Boophilus microplus* puede ser detectada mediante microscopía óptica a partir de una muestra de hemolinfa (Riek, 1964, 1966). Esta prueba permite identificar la fase evolutiva de *Babesia* denominada quinetos, y con base en la longitud y otras características morfológicas de estos, se ha postulado que se puede diferenciar *B. bovis* de *B. bigemina* (Riek, 1964, 1966; Johnston, 1967). Sin embargo, otros autores reportan que no siempre es posible discernir la especie de *Babesia* que infecta a las garrapatas *B. microplus* solamente con base en el análisis morfológico de los quinetos en una muestra de hemolinfa (Buscher, 1988; Guglielmone et al, 1989, 1995). Por otro lado, se ha señalado que el método convencional actualmente disponible, tal como el examen microscópico de una muestra de hemolinfa teñida con Giemsa, tiene algunas limitaciones debido a la baja sensibilidad analítica, exigencia de un microscopista capacitado para identificar y diferenciar las especies involucradas, y bajo rendimiento en cuanto al número de muestras analizadas en una jornada (Figuroa y Buening, 1995; Sparagano et al, 1999,). Las pruebas diagnósticas modernas basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) tienen una elevada sensibilidad y especificidad analítica y son susceptibles de brindar un alto rendimiento (Figuroa y Buening, 1995; Figuroa y Álvarez, 2003; Oliveira et al, 2005). En la mayoría de estos métodos se requiere, sin embargo, una prueba de PCR por especie y en ocasiones dos pruebas de PCR por especie si se realiza una re-amplificación de ADN con el método de PCR anidado. El objetivo de este trabajo estuvo dirigido a poner a punto una prueba de PCR para *Babesia* spp, basada en oligonucleótidos género-específicos que amplifican una porción del gen DNA ribosomal 18S de cualquier especie de *Babesia*, así como en la determinación de especie mediante digestión del producto de amplificación con enzimas de restricción (PCR-RFLP), así como su aplicación preliminar en la detección de *Babesia bovis*, *B. bigemina* o ambas especies en la garrapata vector *Rh. microplus*.

## Materiales y Método

Con el objeto de poner a punto la prueba de PCR-RFLP, se obtuvieron glóbulos rojos infectados con *B. bovis* y *B. bigemina* a partir de cepas establecidas en cultivo in vitro (Alvarez y Figuroa, 2007). Se seleccionaron, además, 10 garrapatas hembra ingurgitadas en bovinos experimentalmente infectados con *B. bovis* y *B. bigemina* y positivas a la prueba de hemolinfa (Castañeda et al, 2012). La extracción del DNA genómico de *Babesia* spp se realizó mediante el procedimiento de purificación por columnas con 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, 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 25µl, a los cuales se agregaron 12.5µl de Mezcla maestra (*Taq* polimerasa, dNTPs, Mg<sub>2</sub>Cl), 5.5µl de agua libre de nucleasas, 5µl de ADN purificado (conteniendo 100 ng), y 2 µl de mezcla de los oligonucleótidos sentido PIRO A (5'-AATACCAATCCTGACACAGGG-3') y anti-sentido PIRO B (5'-TTAAATACGAATGCCCAAC-3') (Carret *et al.*, 1999). La reacción de amplificación se realizó con el siguiente protocolo de ciclado: un ciclo de desnaturalización inicial por 5 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 55°C por 1 min, extensión a 72°C por 1 min, extensión final a 72°C por 5 min 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/B se sometió a digestión con las enzimas de restricción (ER) *Msp* I y *Box* I, de acuerdo a las

especificaciones del proveedor. Con base en un análisis bioinformático realizado con 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. En teoría, la ER *Box I* (secuencia de reconocimiento 5'-GACNN↓NNGTC-3') cortaría solamente el amplicón correspondiente al DNA ribosomal de *B. bigemina*, mientras que la ER *Msp I* (sitio de reconocimiento 5'-C↓CGG-3') cortaría solamente el amplicón correspondiente al DNA ribosomal de *B. bovis*. De acuerdo a la cantidad de ADN amplificado y necesitado para cada digestión con las ER, el volumen final de reacción fue de 31 µl, agregando 10 µl de producto de PCR, 18 µl de agua libre de nucleasas, 2 µl de buffer 10X, 1 µl de ER conteniendo 10 Unidades de *Msp I* ó *Box I*. La digestión con las ER se llevó a cabo en un baño maría a 37°C durante 16 hrs. Los productos de PCR y los derivados de la digestión con ER se visualizaron por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2-3% en buffer TAE 1X, y teñidos con 1.5 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml). Se utilizaron marcadores moleculares de 100 pb 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 la 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

Con el objeto de implementar una prueba para detección y diferenciación del agente etiológico de la babesiosis bovina en garrapatas, se puso a punto un procedimiento que consiste en la amplificación de ADN de *Babesia* spp por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), y el análisis del polimorfismo en longitud de fragmentos con enzimas de restricción (RFLP). La prueba de PCR amplifica un fragmento de aproximadamente 400 pares de bases (pb), en *B. bovis* y *B. bigemina* derivada de cultivo in vitro. Si el amplicón obtenido se digiere con la ER *Msp I*, se obtienen 2 fragmentos de ≈250 y 150 pb de longitud (RFLP) en la muestra que contiene solamente *B. bovis*, mientras que en la muestra infectada con *B. bigemina* el amplicón no es digerido. Si el amplicón se digiere con la ER *Box I*, se obtienen 2 fragmentos de ≈290 y 110 pb en la muestra infectada solamente con *B. bigemina*, mientras que en la muestra infectada con *B. bovis* el amplicón de 400 pb no se digiere, diferenciándose así la especie infectante mediante el patrón de restricción (PCR-RFLP). Además, si los amplicones derivados de PCR a partir de una muestra simulando co-infección con *B. bovis* y *B. bigemina* son digeridos con la ER *Box I* se obtienen tres bandas de 400, 290 y 110 pb, mientras que en la muestra digerida con la ER *Msp I* se observan fragmentos de 400, 250 y 150 pb, diferenciándose la especie presente en las muestras co-infectadas con *B. bovis* y *B. bigemina*. Finalmente, si la muestra co-infectada se somete a una doble digestión con las ER *Box I* y *Msp I* se obtienen los 4 fragmentos esperados, ie, 290 y 110 pb; 250 y 150 pb correspondientes a *B. bigemina* y *B. bovis*, respectivamente. La Figura 1 muestra un resultado representativo de los amplicones obtenidos en la prueba de PCR y sujetos a digestión enzimática (RFLP) en las muestras derivadas de cultivo.

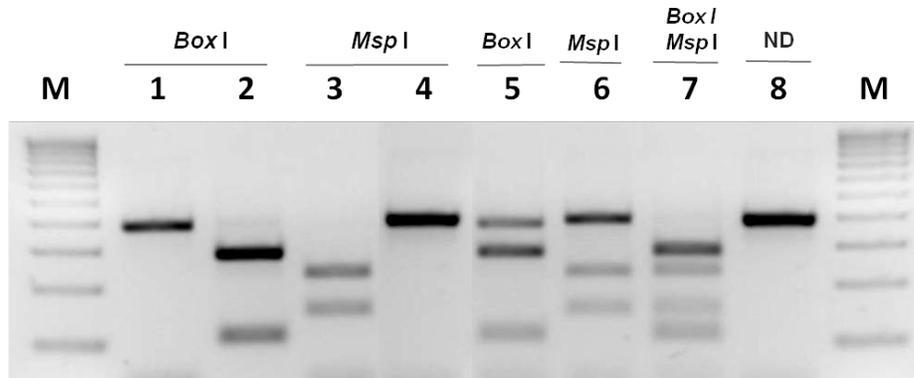


Figura 1. Prueba de PCR-RFLP. Identificación: M) Marcador de 100 pb; 1 y 3) *B. bovis*; 2 y 4) *B. bigemina*; 5-8) co-infección *B. bovis*/*B. bigemina*. 1, 2 y 5) digeridas con *Box I*; 3, 4 y 6) digeridas con *Msp I*; 7) doble digestión con *Box I* y *Msp I*; ND: No digerido.

La prueba de PCR practicada en las 10 muestras procesadas de garrapatas *Rh. microplus* permitió identificar a los 10 especímenes con amplicones de la talla esperada (400 pb). Sin embargo, solo en 6 especímenes se pudo visualizar una banda intensa (no mostrado). La digestión enzimática con las ER *Box I* y *Msp I* de los amplicones obtenidos permitió identificar un patrón correspondiente a *B. bigemina* en 5 de las garrapatas y un patrón correspondiente a *B. bovis* en 3 garrapatas, con una infección mixta en 2 garrapatas (Figura 2).

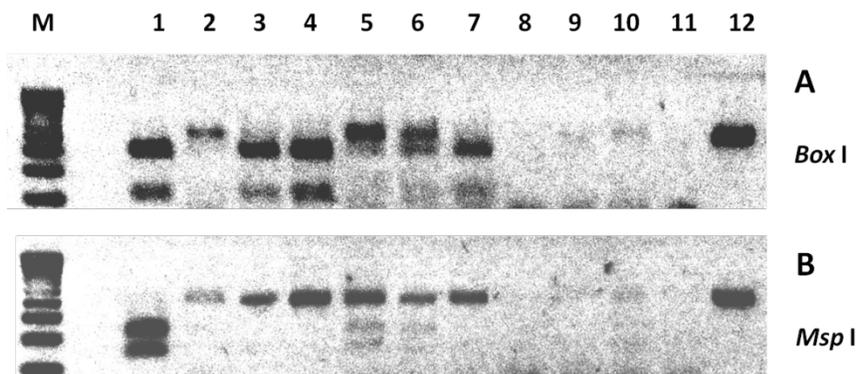


Figura 2. Prueba de PCR-RFLP en garrapatas *Rh. microplus*. M) Marcador de 100 pb; 1- Control positivo de digestión, Panel A: *B. bigemina*; Panel B: *B. bovis*; 2-11) garrapatas *Rh. microplus*. 12) No digerido. Panel A digeridas con *Box I*; Panel B digeridas con *Msp I*.

## Discusión

Se logró implementar la prueba de PCR para detectar *Babesia spp* en los eritrocitos infectados provenientes de cultivo *in vitro*. Mediante el uso de oligonucleótidos genéricos que alinean al gen que codifica por el ARN ribosomal 18S, la prueba de PCR logra detectar la presencia de *B. bigemina* y/o *B. bovis* en garrapatas *Rh. microplus* alimentadas en animales experimentalmente infectados. Trabajos previamente realizados utilizaron como molde DNA purificado a partir de parásitos cultivados *in vitro* (Carret, 1999; Carret *et al*, 1999), obteniéndose un amplicón de la talla esperada pero sin poder diferenciarse la especie: *B. bovis* o *B. bigemina*, dado que no se realizó proceso de digestión enzimática alguno. La prueba de PCR-RFLP utilizada como técnica para la detección directa puede ser precisa y confiable, cuando se compare con la prueba de microscopía óptica. Sin embargo, es necesario evaluar un mayor número de muestras de garrapatas provenientes de animales infectados y no infectados con *Babesia sp.*, para poder determinar su sensibilidad analítica y especificidad diagnóstica, en

comparación con la prueba convencional. No obstante, se puede argumentar que 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 se podrán establecer claras diferencias entre las pruebas diagnósticas directas. Por ejemplo, un microscopista puede analizar fácilmente 30 muestras de hemolinfa en una jornada si se le dedica aproximadamente 10-15 minutos de análisis microscópico. 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. Actualmente se están realizando los experimentos necesarios para determinar, con el uso de la prueba basada en PCR-RFLP, las tasas e intensidades de infección por *Babesia* en garrapatas experimental y naturalmente infectadas con *B. bovis* y/o *B. bigemina*. Este es el primer trabajo en México que permite realizar 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 a partir de muestras de eritrocitos de bovino y garrapatas infectadas con *Babesia sp*. La prueba puede ser implementada para el monitoreo de infección por *Babesia sp* en la fase aguda de la enfermedad en bovinos de tal forma que se pueda estimar el período prepatente y/o patente de la infección en animales premunizados y/o naturalmente infectados. Una prueba de diagnóstico más sensible y específica de especie, como la prueba de PCR-RFLP, es instrumental para la detección y diferenciación de *B. bovis* y *B. bigemina*, ya que permite analizar un mayor número de muestras en menor tiempo y facilita el establecimiento de una intervención médica más efectiva y oportuna para el tratamiento de la babesiosis bovina.

### Conclusión

La prueba de PCR-RFLP puede ser aplicada en cualquier parte del país en donde existan laboratorios con equipamiento básico para la prueba de PCR, donde se requiera un diagnóstico más preciso de la babesiosis, incluyendo estudios epidemiológicos para estimación de la prevalencia e intensidad de infección, tanto en bovinos como en garrapatas. La prueba puede utilizarse también en la detección de infección mixta en bovinos, así como en la identificación y diferenciación de *Babesia sp* en la garrapata *Rh. microplus* y eventualmente, en *Rh. annulatus*.

### Literatura citada

- Álvarez-Martínez, J.A., Figueroa-Millán, J.V. 2007. Cultivo in vitro de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* y su aplicación para la producción de vacuna. *Ciencia Veterinaria*. 10: 137-153.
- Buscher, G. 1988. The infection of various tick species with *Babesia bigemina*, its transmission and identification. *Parasitol. Res.* 74:324-330.
- Carret, C.M. 1999. *Babesia canis*: caractérisation d'antigènes parasitaires solubles potentiellement impliqués dans l'immunoprotection induite chez le chien et analyse moléculaire du polymorphisme génétique des sous espèces. 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 rossi*: 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.
- Castañeda-Arriola, R.O., Rojas-Martínez, C., Figueroa-Millán, J.V., Martínez-Ibáñez, F., Álvarez-Martínez, J.A. 2012. Uso de PCR anidada para determinación de infección por *Babesia spp* en garrapatas *Boophilus (Rhipicephalus) microplus*. *Acarología Latinoamericana*, 1er Congreso

- Latinoamericano de Acarología 2012. Sociedad Mexicana de Entomología A.C., Primera Ed 2012. Pp. 176-180.
- Figueroa, J.V., Buening, G.M. 1995. Nucleic acid probes as a diagnostic method for tick-borne hemoparasites of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 75: 75-92.
- Figueroa, J.V., Álvarez, J.A. 2003. Investigaciones sobre la aplicación de técnicas moleculares en el diagnóstico y control de la babesiosis bovina. *Ciencia Veterinaria.* 9: 75-103.
- Guglielmo, A.A. 1995. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Vet. Parasitol.* 57: 109-119.
- Guglielmo, A.A., Mangold, A.J., Aguirre, D.H., Gaido, A.B., de Olsen, A.A. 1989. The effect of infection by *Babesia* sp. on some biological parameters of engorged females of *Boophilus microplus*. *Folia Parasitol.* 36: 1-6.
- Guglielmo, A.A., Gaido, A.B., Mangold, A.J. 1995. 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.
- Johnston, L.A.Y. 1967. Epidemiology of bovine babesiosis in Northern Queensland. *Aust. Vet. J.* 43: 427-432.
- Navarrete, I., Serrano, F.J., Reina, D. 2002. Parásitos hemáticos. En: M. Cordero del Campillo & R. A. Rojas-Vazquez, Eds. *Parasitología Veterinaria*. España: Mc Graw Hill. Pp. 283-294.
- OIE. 2004. Babesiosis bovina. En: *Manual de la OIE sobre animales terrestres 2004*. Capítulo 2.3.8. Pp. 548-559.
- Oliveira, M.C.S., Oliveira-Sequeira, T.C.G., Araujo Jr., J.P., Amarante, A.F.T., Oliveira, H.N., 2005. *Babesia* spp infection in *Boophilus microplus* engorged females and eggs in Sao Paulo State, Brazil. *Vet. Parasitol.* 130: 61-67.
- Riek, R.F. 1964. The life cycle of *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). *Aust. J. Agric. Res.* 15: 802-821.
- Riek, R.F. 1966. The life cycle of *Babesia argentina* (Lignieres, 1903) (Sporozoa, Piroplasmidae) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). *Aust. J. Agric. Res.* 17: 247-254.
- Sparagano, O.A.E., Allsopp, M.T.E.P., Mank, R.A., Rijpkema, S.G.T., Figueroa, J.V., Jongejan, F. 1999. Molecular detection of pathogen DNA in ticks (Acari: Ixodidae): A review. *Exp Applied Acarol.* 23(12): 929-960.
- SIAP <http://www.siap.gob.mx/index.php?option=comcontent&view=article&id=21&Itemid=330> [SAGARPA, Accesado: 26 Septiembre 2012].