

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del grado académico de Doctor en
Ciencias Biológicas

“Estudio de la diversidad genética en
poblaciones de *Babesia bigemina* de diferentes
regiones geográficas.”

Carolina S. Thompson

Director: Dr. Atilio J. Mangold

Laboratorio de Inmunología y Parasitología, Estación Experimental –
Rafaela, INTA

-2013-

ÍNDICE GENERAL

1. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.	5
2. DEFINICIONES.	8
3. RESUMEN/ABSTRACT.	9
4. INTRODUCCIÓN.	11
4.1. Babesiosis. Aspectos generales.	11
4.2. Taxonomía y filogenia de <i>Babesia</i> .	12
4.3. Ciclo biológico de <i>Babesia bigemina</i> .	13
4.4. Epidemiología de la babesiosis causada por <i>B. bigemina</i> en Argentina.	14
4.5. Prevención de la babesiosis bovina.	15
4.6. Diagnóstico de la babesiosis.	17
4.6.1. Diagnóstico por métodos directos.	17
4.6.1.1. Observación microscópica directa.	17
4.6.1.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	18
4.6.1.3. PCR en Tiempo Real (rt-PCR) – Disociación del ADN con alta resolución (HRM).	18
4.6.1.4. Hibridación en fase reversa (RLBH).	19
4.6.2. Diagnóstico por métodos indirectos.	20
4.6.2.1. Inmunofluorescencia indirecta (IFI).	20
4.6.2.2. Prueba inmunoenzimática en fase sólida (ELISA).	21
4.7. Multiplicación de <i>Babesia</i> spp. <i>in vitro</i> .	21
4.8. Variabilidad intraespecífica de <i>Babesia</i> .	22
4.8.1. Variación antigénica.	22
4.8.2. Variabilidad genética.	23
4.8.2.1. Cambios en la patogenicidad.	24
4.8.3. Consecuencia de la variabilidad intraespecífica. Multiplicidad de infecciones.	24
4.9. Identificación de las variaciones genéticas.	25
4.9.1. Marcadores moleculares de secuencia conocida.	26
4.9.1.1. Genes ribosomales.	26
4.9.1.2. Secuencias codificantes de proteínas.	30

4.9.1.3. Secuencias repetitivas en tándem.	31
5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.	32
5.1. Objetivo específico 1.	32
5.2. Objetivo específico 2.	32
5.3. Objetivo específico 3.	32
6. MATERIALES Y MÉTODOS.	33
6.1. Materiales.	33
6.1.1. Cepas de <i>Babesia bigemina</i> .	33
6.1.2. Medio de cultivo.	34
6.1.3. Muestras de eritrocitos parasitados obtenidos <i>in vitro</i> .	35
6.1.4. Muestras de sangre obtenidas de bovinos y búfalos de zonas endémicas.	35
6.1.5. Clonación molecular de productos de PCR.	36
6.1.5.1. Vector de transformación.	36
6.1.5.2. Bacteria seleccionada para la clonación.	37
6.1.5.3. Medio de cultivo.	37
6.2. Métodos.	38
6.2.1. Cultivo continuo <i>in vitro</i> de <i>B. bigemina</i> .	38
6.2.2. Criopreservación de cepas de <i>Babesia</i> .	38
6.2.3. Cuantificación de eritrocitos parasitados por <i>Babesia bigemina</i> .	38
6.2.3.1. Tinción de extendidos de eritrocitos.	38
6.2.3.2. Hematocitometría.	39
6.2.4. Clonación biológica.	40
6.2.5. Caracterización fenotípica de los clones.	41
6.2.5.1. Eficiencia de los clones para multiplicarse <i>in vitro</i> .	41
6.2.5.1.1. Experimento 1.	41
6.2.5.1.2. Experimento 2.	41
6.2.5.1.3. Experimento 3.	41
6.2.5.2. Evaluación de la patogenicidad de los clones <i>in vivo</i> .	42
6.2.6. Caracterización molecular de los clones biológicos.	43
6.2.6.1. Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos.	43
6.2.6.1.1. ADN genómico (ADNg).	43

6.2.6.1.2. ADN plasmídico.	44
6.2.6.1.3. Análisis de la concentración y calidad del ADN.	44
6.2.6.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	44
6.2.6.2.1. Electroforesis para ADN.	45
6.2.6.2.2. Purificación de los productos de PCR.	45
6.2.6.3. Clonado molecular de productos de PCR.	45
6.2.6.3.1. Clonado en el vector.	45
6.2.6.3.2. Transformación de <i>E. coli</i> competentes y selección de clones.	46
6.2.6.4. Secuenciación.	46
6.2.6.5. Evaluación de marcadores moleculares para <i>B. bigemina</i> .	47
6.2.6.5.1. Gen <i>18S rARN</i> .	49
6.2.6.5.1.1. Diagnóstico basado en el gen <i>18S rARN</i> .	50
6.2.6.5.1.2. Hibridación en fase reversa (RLBH).	51
6.2.6.5.2. Gen <i>rap-1c</i> .	51
6.2.6.5.2.1. rt-PCR. Curvas de disociación.	52
6.2.6.5.3. Gen <i>gp-45</i> .	52
6.2.6.5.4. Espaciador transcrita interno (<i>ITS</i>).	53
6.2.6.5.5. Secuencias repetitivas.	54
6.2.6.6. Análisis de secuencias de ADN.	54
6.2.7. Prueba inmunoenzimática en fase sólida (ELISA).	56
7. RESULTADOS.	57
7.1. Clonación biológica.	57
7.1.1. Obtención de clones biológicos.	57
7.2. Caracterización de los clones por su fenotipo de patogenicidad.	59
7.2.1. <i>In vitro</i> .	59
7.2.2. <i>In vivo</i> .	59
7.3. Caracterización molecular.	61
7.3.1. Gen <i>18S rARN</i> .	61
7.3.1.1. Diagnóstico.	61
7.3.1.1.1. PCR. Sensibilidad.	61
7.3.1.1.2. RLBH.	62

7.3.1.1.3. Comparación de PCR con ELISA.	63
7.3.1.2. Secuenciación del gen <i>18S rARN</i> .	64
7.3.1.3. Estructura secundaria.	67
7.3.2. Gen <i>rap-1c</i> .	68
7.3.2.1. <i>rap-1c</i> .	68
7.3.2.2. <i>rap-1c</i> . Análisis de disociación de alta resolución (<i>HRM</i>).	71
7.3.2.2.1. Eficiencia de la rt-PCR.	71
7.3.2.2.2. Curvas de disociación.	72
7.3.2.3. <i>rap-1c</i> . ADN de <i>B. bigemina</i> de bovinos infectados naturalmente.	74
7.3.3. Gen <i>gp-45</i> .	78
7.3.4. ITS.	79
7.3.5. Secuencias repetitivas.	80
7.3.5.1. Cepas de referencia.	80
7.3.5.2. ADN de <i>B. bigemina</i> de bovinos infectados naturalmente.	83
7.3.6. Evaluación de la eficiencia de dos clones de <i>B. bigemina</i> para persistir <i>in vitro</i> .	84
8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.	86
9. BIBLIOGRAFÍA.	95
Apéndice I. Reactivos químicos y Soluciones.	109
Apéndice II. Alineamientos de secuencias.	113
AGRADECIMIENTOS.	126

1. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.

%	porcentaje
A260	absorbancia a 260 nm
A280	absorbancia a 280 nm
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNg	ácido desoxirribonucleico genómico
ADNr	ácido desoxirribonucleico ribosomal
ARN	ácido ribonucleico
cm	centímetro
cm ²	centímetro cuadrado
CT	ciclo umbral
DMSO	dimetilsulfóxido
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	ácido tetraacético - etilenglicol
ej.	ejemplo
ELISA	prueba inmunoenzimática en fase sólida
EP	eritrocitos parasitados
ETS	región externa espaciadora
F_{st}	índice de fijación
G	calibre aguja hipodérmica
g	gramo
h	hora
HEPES	4 -(2- hidroxietil)-piperazina-1-etano-ácido sulfónico
HRM	high resolution melting
IFI	inmunofluorescencia indirecta
IPTG	isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
ITS	regiones internas espaciadoras
K	índice kappa
kDa	kilo Dalton
kg	kilogramo

kpb	kilo pares de bases
L	litro
M	molaridad
MB	medio de cultivo base
MC	medio de cultivo completo
min	minuto
mg	miligramo
ml	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
ms	microsatélite
MS	minisatélite
n	número
nm	nanómetro
NEA	Noreste argentino
NOA	Noroeste argentino
°C	grado centígrado
P/V	peso en volumen
pb	pares de bases
PBS	buffer fosfato salino
pH	potencial hidrógeno
PV	post-vacunal
PVP	polivinilpirrolidona
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
RAPD	amplificación de fragmentos de ADN al azar
RLBH	hibridación en fase reversa
RFLP	polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción
rARN	ácido ribonucleico ribosomal
rt-PCR	reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
SDS	dodecilsulfato sódico
SSPE	solución tampón de fosfato sódico salino/EDTA

SSU	subunidad ribosomal pequeña
seg	segundo
TAE	solución tampón tris-acético-EDTA
T _(h)	temperatura de hibridación
U	unidades
UV	ultravioleta
V/V	volumen/volumen
V	voltaje
xg	gravedad
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido
μg	microgramo
μl	microlitro
μm	micrómetro

2. DEFINICIONES.

Aislamiento: Grupo de parásitos obtenidos de un bovino infectado naturalmente en un determinado momento. Estos parásitos pueden no ser genéticamente homogéneos (Gill y col., 1987).

Cepa: Se utilizó este término para denominar los parásitos mantenidos mediante pasajes en cultivo (*in vitro*) o a través de pasajes en bovinos (*in vivo*) (Gill y col., 1987)

Clon: Población de organismos genéticamente homogéneos, derivados de un solo parásito por división asexual (Vega y col., 1985; Gill y col., 1987).

Contig: Para la obtención del genoma completo de un determinado organismo, se desarrollan bibliotecas genómicas a partir de fragmentos de ADN. Cada fragmento de esta biblioteca es secuenciado y, mediante programas informáticos se determina la superposición o secuencias continuas en cada fragmento. Este montaje permite obtener tramos largos y continuos de secuencias de ADN genómico, con extremos superpuestos denominadas *contigs*.

Subpoblación: Grupo de parásitos obtenidos de una población (cepa o aislamiento), los cuales pueden ser o no genéticamente homogéneos. Por ej., un clon es una subpoblación genéticamente homogénea de su cepa parental (Carson y col., 1994).

3. RESUMEN.

La babesiosis bovina es una enfermedad enzoótica causada por protozoarios Apicomplexa del género *Babesia* transmitidos por diferentes especies de garrapatas. En Argentina, esta enfermedad es provocada por *B. bovis* y *B. bigemina*, ambas transmitidas por la garrapata de los bovinos *Rhipicephalus microplus*. La babesiosis genera importantes pérdidas económicas a la producción bovina por provocar pérdidas de peso, abortos, costos de tratamiento y frecuentemente la muerte. La caracterización molecular de aislamientos de *B. bigemina* es fundamental para realizar estudios epidemiológicos, desarrollar pruebas para diagnóstico y sintetizar nuevas vacunas. En este trabajo se seleccionaron clones biológicos a partir de una cepa patógena y una cepa atenuada de *B. bigemina*, ambas adaptadas a la multiplicación continua *in vitro*, utilizando diluciones límite. Estos clones fueron útiles para establecer la constitución genética de aislamientos y cepas de referencia, comparar clones con diferente fenotipo de virulencia, evaluar distintos marcadores moleculares, y caracterizar aislamientos silvestres. Se trabajó con 7 clones biológicos terciarios derivados de la cepa patógena BbiS2P-i y 5 de la cepa atenuada BbiS1A-i. El estatus de virulencia de los clones se evaluó *in vitro* e *in vivo*. Se compararon mediante HRM y/o secuenciación los genes *18S rARN*, *rap-1c* y *gp45* y las regiones intergénicas *ITS* y diferentes secuencias repetitivas en clones y cepas silvestres.

Los clones no mostraron diferencias genéticas con sus parentales, pero sí una reducción de haplotipos con respecto a las cepas originales mantenidas *in vivo*. Las regiones polimórficas de los marcadores moleculares permitieron diferenciar las cepas de diferentes regiones geográficas. Las mutaciones observadas en el gen *18S rARN* se ubicaron en su mayoría en la región hipervariable de la hélice E23-1, mientras que la zona polimórfica del gen *rap-1c* se ubicó en el extremo 3'. El gen *gp45* no pudo utilizarse debido a la falta de detección en una cepa y las regiones *ITS* mostraron elevado polimorfismo. Sólo 3 ms y 1 MS permitieron diferenciar clones con diferentes geno- y fenotipos. Estos marcadores también permitieron agrupar clones y cepas por su fenotipo de virulencia. El análisis simultáneo de las secuencias de los genes *18S rARN* y *rap-1c* de los clones biológicos, confirmó que solo ciertas subpoblaciones de *Babesia* prevalecen durante la adaptación *in vitro*, lo que generó una reducción del número de haplotipos. En conclusión, los clones y los marcadores moleculares seleccionados permitieron establecer la diversidad existente entre cepas obtenidas de diferentes regiones de Argentina y las diferencias relevantes con las

cepas de Australia e Israel. Este trabajo establece la base para definir la importancia de la patogenia de *B. bigemina* en infecciones naturales. Deberán evaluarse nuevos marcadores moleculares para el estudio de los aislamientos de casos naturales que ocurren en diferentes regiones enzoóticas.

ABSTRACT.

Bovine babesiosis is an enzootic disease caused by Apicomplexa protozoa from *Babesia* genus, transmitted by ticks. In Argentina, the etiological agents are *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*, both transmitted by *Rhipicephalus (B.) microplus*. This tick is found at the North of parallel 30°S, producing losses of US\$ 30 million per year. Studying the biology and the intraespecific genetic variations of *B. bigemina* from Argentinean and other region strains has become an easy task after the development of continuous *in vitro* multiplication for these parasites.

The present studies were based on the use of strains and clones which pathogenicity level was established *in vivo*. Seven clones derived from BbiS2P-i strain and five from BbiS1A-i strain were used. These clones were obtained by the limiting dilution technique and showed similar *in vitro* multiplication efficiency and the same phenotype as their parental strains. *18S rRNA*, *rap-1c*, *gp45*, *ITS* genes and repeat sequences were compared with the molecular pattern established in clones. The *18S rRNA* gene allowed strains differentiation by using punctual mutations visualized in the secondary structure of E23-1 helix. Individually, *rap-1c* gene was used to identify strains associated to pathogenicity, confirmed with HRM technique. Differences existing between not geographically related strains were identified by using *18S rRNA* and repeat sequences. Finally, the population selection after the strains adaptation to the *in vitro* growth was confirmed through the simultaneous analysis of *18S rRNA* and *rap-1c* sequences from clones. As a conclusion, clones and molecular markers selected allowed to establish the diversity among different Argentinean regions and among these and foreign strains. Differences between the virulence of the strains helped us to gain knowledge of the pathogenicity from *B. bigemina* natural isolates. More molecular markers are needed to advance in the study of isolates occurred in different enzootic regions.

4. INTRODUCCIÓN.

4.1. Babesiosis. Aspectos generales.

La babesiosis bovina es una enfermedad anemizante causada por al menos seis especies del género *Babesia*, protozoarios Apicomplexa que parasitan exclusivamente los eritrocitos. Estos parásitos son transmitidos por diferentes especies de garrapatas. La babesiosis se manifiesta en forma aguda con la pérdida del estado de salud general, abortos y muerte en la mayoría de los casos no tratados. Los bovinos que superan esta etapa se transforman en portadores sanos, inmunes a nuevas re-infecciones. La babesiosis es enzoótica en regiones del mundo donde habitan las especies de garrapatas que la transmite (Uilenberg, 1995). Las únicas especies que causan babesiosis bovina en la Argentina son *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*, ambas transmitidas por la garrapata común del bovino, *Rhipicephalus microplus*. En nuestro país la enfermedad es enzoótica al norte del paralelo 30 °S, donde existen aproximadamente 12 millones de bovinos, y genera pérdidas económicas estimadas en 30 millones de dólares anuales (Späth y col., 1994).

Además de los bovinos, en esa región existen aproximadamente unos 80.000 búfalos (*Bubalus bubalis*). En esta especie se observó la presencia de *Babesia* spp. y de su vector, aunque no han sido reportados casos clínicos (Jacobo y col., 2004).

R. microplus se distribuye en el noreste (NEA) y noroeste (NOA) de Argentina al norte de los paralelos 30 °S, con excepción de la región andina. La zona comprende la totalidad de las provincias de Chaco, Formosa, Misiones, Santiago del Estero y parcialmente Catamarca, Córdoba, Corrientes, Jujuy, Salta, Santa Fe y Tucumán. La distribución de la garrapata en Argentina está relacionada a dos factores ambientales, el déficit hídrico y la temperatura (Guglielmone, 1992). La presencia de *R. microplus* depende de inviernos benignos con temperaturas promedio superiores a 14,5 °C y climas relativamente húmedos. Estas dos variables permiten clasificar la aptitud ecológica de cada región para *R. microplus* en 1) Región intermedia 1: déficit hídrico anual < 200 mm y 3-4 meses del año con temperaturas < 14,5 °C; 2) Región intermedia 2: déficit hídrico anual entre 200-500 mm y < 3 meses del año con temperatura < 14,5 °C; 3) Región favorable: déficit hídrico anual < 200 mm; ≤ 1 mes del año con temperatura < 14,5 °C; 4) Región naturalmente libre; y 5) Región favorable de la cual se erradicó la garrapata mediante una campaña nacional de lucha (Figura 1).



Figura 1: Aptitud de diferentes regiones ecológicas de Argentina para el desarrollo de la garrapata *Rhipicephalus microplus*. Regiones 1 y 2: intermedias; Región 3: favorable; Región 4: poco favorable y naturalmente libre; Región 5: favorable pero libre de garrapatas por erradicación programada.

4.2. Taxonomía y filogenia de *Babesia*.

El género *Babesia* pertenece a la familia Babesiidae, orden Piroplasmida, subclase Aconoidasida, clase Sporozoea, phylum Apicomplexa, subreino Alveolata, dominio Eucariota.

El género *Babesia* se multiplica por fisión binaria exclusivamente en los eritrocitos del hospedador vertebrado. Posee dos formas invasivas denominadas esporozoitos y merozoitos y una forma de multiplicación, el trofozoito (Bock y col., 2004). El phylum Apicomplexa incluye a otros microorganismos causantes de enfermedades de importancia médica y veterinaria como *Plasmodium* spp., *Theileria* spp., *Toxoplasma* spp., *Neospora* spp. (Figura 2).

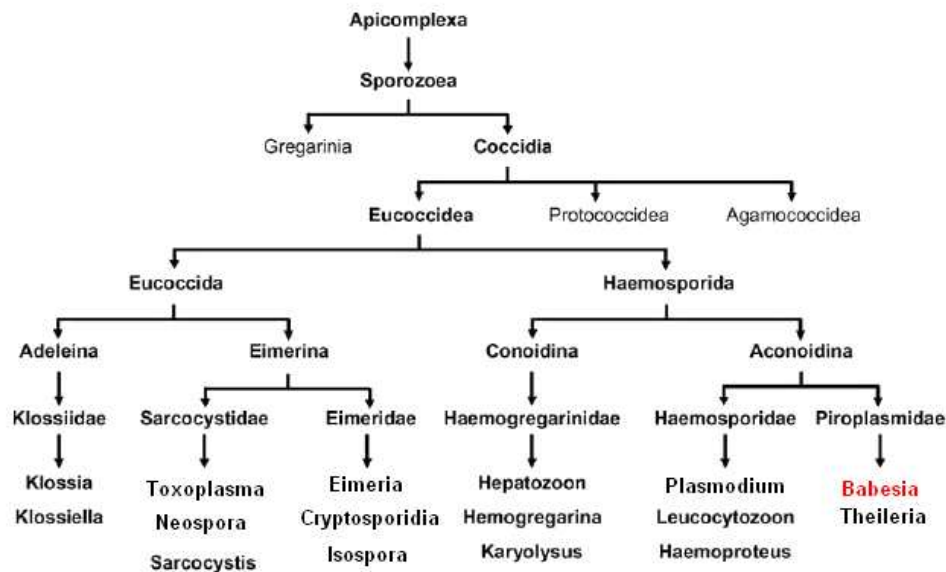


Figura 2. Árbol filogenético de los organismos Apicomplexa (Beck y col., 2009). En rojo se destaca la ubicación del género *Babesia*.

4.3. Ciclo biológico de *Babesia bigemina*.

El ciclo biológico de *B. bigemina* consta de una etapa sexual compleja en la garrapata *R. microplus* y de una etapa asexual en los eritrocitos del bovino.

La etapa sexual se inicia en el intestino de las hembras de *R. microplus* después de la ingestión de sangre de bovinos portadores de *B. bigemina*. Las condiciones propias del intestino medio de la garrapata estimulan la producción de dos poblaciones de células denominadas cuerpos radiados o “Strahlenkorper” derivadas de los gametocitos diferenciados en los eritrocitos del bovino. Los cuerpos radiados se multiplican, forman agregados multinucleados, y se fragmentan en unidades haploides que se fusionan de a pares (singamia) para formar cigotos, proceso que incluye una división meiótica. Cada cigoto se multiplica en las células digestivas y luego en las células basofílicas, para generar los kinetos (o vermículos), proceso conocido como esporogonia. Los kinetos se descargan en la hemolinfa desde donde invaden células de diferentes órganos, incluidos los ovarios, en los que producen sucesivos ciclos de esporogonia secundaria. La colonización de los óvulos permite la transmisión transovárica del parásito a la próxima generación de garrapatas (Mackenstedt y col., 1995).

El esporozoito, estadio infectante de *B. bigemina*, madura en las glándulas salivales de la garrapata *R. microplus* aproximadamente nueve días después de que las larvas han infestado al

bovino, momento en el que alcanzan su etapa de ninfa y continúa en los adultos machos y hembras (Riek, 1964). Los esporozoitos son inoculados directamente al torrente sanguíneo a través del hipostoma de la garrapata y transportados por la saliva (Hodgson, 1992).

Cada esporozoito coloniza un eritrocito a través de un mecanismo que incluye la selección del eritrocito, adherencia, reorientación e invasión. Esta última depende de la integridad de una estructura denominada complejo apical. Este complejo, situado en el extremo agudo de las formas invasivas del parásito, incluye las organelas llamadas *rhoptries* y *micronemas*, que se abren en la parte anterior de la célula y secretan adhesinas y enzimas que permiten al parásito la adherencia al eritrocito, la modificación de su membrana plasmática y la rápida invasión dentro de una vacuola parasitófora que se desintegra antes de la división del trofozoito. Esta nueva forma sin las organelas del complejo apical, inicia el estadio de merogonia caracterizado por la división binaria, asexual, la que finaliza con la formación de dos nuevas formas invasivas denominadas merozoitos. Estos abandonan el glóbulo rojo, a través de un mecanismo no bien definido, para reiniciar un nuevo ciclo de invasión y multiplicación intracelular. Los sucesivos ciclos lisan los eritrocitos, generando la anemia que caracteriza la babesiosis por *B. bigemina*, y es la principal causa de la muerte del hospedador (Young y Morzaria, 1986).

4.4. Epidemiología de la babesiosis causada por *B. bigemina* en Argentina.

La interacción del complejo *babesia*-garrapata-bovino tiende, en situación ideal, a mantener un equilibrio que asegura la ausencia de babesiosis clínica. El punto más débil del complejo corresponde a *Babesia*, ya que la continuidad de su ciclo biológico depende de la presencia de la garrapata y de los bovinos; le sigue la garrapata porque depende de la presencia de los bovinos, y por último los bovinos que son meros soportes de los dos anteriores.

Un aspecto de gran importancia en la epidemiología de la babesiosis bovina es el hecho de que la mayoría de los terneros menores de 9 meses superan la primo infección en forma subclínica y sin los signos graves que se producen en los bovinos adultos, más susceptibles de padecer formas graves de babesiosis (Guglielmone y col., 1992). Esta relación entre el sistema inmune de los bovinos y *Babesia* spp., diferente a la observada en otras enfermedades de los bovinos fue ampliamente estudiada por Goff y col. (1998, 2001 y 2010) para *B. bovis*. Ellos analizaron los niveles de expresión de los mARN de IL-10, IL-12, IFN- γ , TGF- β y de ácido nítrico como factores responsables de la respuesta inmune innata de los terneros. Las diferencias en los niveles

de expresión de estos mediadores solubles explicarían la mayor resistencia de los bovinos jóvenes con respecto a los adultos (Goff y col., 2010). Superada la infección subclínica, los animales establecen una sólida inmunidad contra desafíos heterólogos, la que persiste por el resto de la vida útil del bovino, aún en ausencia de re-infecciones (Mahoney y col., 1973, 1979; Dalglish, 1993).

Para que un rodeo alcance la estabilidad enzoótica que garantizará la ausencia de brotes de babesiosis, es imprescindible una elevada tasa de inoculación de esporozoitos de *Babesia* spp. por las garrapatas (probabilidad de que cada uno de los animales del rodeo se infecte en un día), necesaria y suficiente para infectar alrededor del 75% de los terneros a los 9 meses de edad. Alcanzada esta proporción, es poco probable que ocurran brotes agudos de babesiosis bovina durante la adultez. En zonas donde la babesiosis es enzoótica, los bovinos reciben superinfecciones con diferentes genotipos de *Babesia*, determinando un continuo cambio de las subpoblaciones de parásitos sin que se manifiesten signos de enfermedad (Mahoney y col., 1973). Las situaciones de inestabilidad enzoótica se producen cuando la tasa de inoculación no es suficiente, y se manifiestan por la ocurrencia de brotes de la enfermedad con un impacto económico grave. El estudio de algunos aspectos de la interacción entre *babesia*-garrapata-bovino se vio facilitado por la elaboración de modelos matemáticos (Mahoney y Ross, 1972) que permitieron predecir el riesgo de ocurrencia de brotes de babesiosis. La tasa de inoculación debe ser mayor a 0,005 y depende de la dinámica de las poblaciones de *R. microplus*. Esta es modificada por diversos factores que incluyen la composición genética del rebaño (razas y biotipos), las condiciones climáticas y edáficas, la carga bovina por unidad de superficie y el tipo de pasturas.

Por lo tanto, el parámetro fundamental para evaluar la probabilidad de ocurrencia de brotes de babesiosis es la tasa de inoculación, la cual depende de la proporción de bovinos infectados con *B. bigemina* en el rodeo, la cantidad de garrapatas que infestan a los bovinos y la proporción de garrapatas infectadas con *B. bigemina*. Debido a la dificultad para evaluar esos parámetros, la tasa de inoculación puede establecerse en forma indirecta a través de la determinación de anticuerpos específicos en los terneros de 9 meses de edad promedio.

4.5. Prevención de la babesiosis bovina.

Actualmente, en Argentina, Brasil, Uruguay, Colombia, Israel, Sudáfrica y Australia, se utilizan vacunas basadas en parásitos vivos atenuados en su patogenicidad. En las primeras décadas del siglo pasado, el método de inmunización que se usaba en Argentina, consistía en la inoculación de sangre de bovinos portadores crónicos de los parásitos patógenos y la posterior aplicación de quimioterápicos para controlar las infecciones (Boero, 1976; Lombardero y col., 1978).

Investigadores australianos lograron mediante 20-25 pasajes sucesivos en terneros esplenectomizados con intervalo de 4-5 días (pasajes rápidos), obtener cepas de *B. bovis* atenuadas en su patogenicidad (Callow y Mellors, 1966).

En Australia obtuvieron una cepa atenuada de *B. bigemina* a partir de 7 pasajes sucesivos en bovinos con bazo durante períodos de 3 a 16 semanas (pasajes lentos). Los bovinos que recibieron el séptimo pasaje fueron esplenectomizados 1 a 14 semanas después de la infección (Dalgliesh, 1993). Con esta cepa elaboraron una vacuna indicada para bovinos menores a 10 meses de edad y capaz de generar protección inmune en el 95-100% de los animales inoculados (Callow y col., 1979).

En Argentina se obtuvo una cepa de *B. bigemina* atenuada (BbiS1A) mediante dos pasajes en terneros esplenectomizados, en los que se le permitió alcanzar un estado de cronicidad (Aguirre y col., 1989). La atenuación de la patogenicidad se comprobó mediante la comparación entre los parámetros clínicos generados por la vacuna y los provocados por una cepa virulenta en sendos grupos de bovinos susceptibles (Aguirre y col., 1989; Mangold y col., 1992). Otra cepa de *B. bigemina* se obtuvo de manera similar en la Estación Experimental de Mercedes, Corrientes (Vanzini, com. pers.). Ambas cepas se utilizan en la vacuna elaborada por la EEA-Rafaela y EEA-Mercedes, de las cuales se distribuyen alrededor de 500.000 dosis anuales.

En Australia han ocurrido casos severos de babesiosis clínica en animales vacunados con *B. bovis* atenuada. Estos fueron provocados por cepas silvestres resistentes a la inmunidad generada por las cepas vacunales, aspecto que obligó a utilizar nuevas cepas. La caracterización molecular mostró gran variabilidad entre las proteínas superficiales (VMSA) de las cepas vacunales y las silvestres (LeRoith y col., 2005; Berens y col., 2007), lo que explicaría la falta de protección cruzada. En la Argentina hasta ahora se considera un evento poco frecuente la ocurrencia de babesiosis clínica en bovinos vacunados. Un estudio realizado en una población de 105.000 bovinos vacunados mostró que la mayoría de los casos identificados (0,06%) ocurrieron en bovinos adultos introducidos en regiones de babesiosis enzoótica desde zonas libres de la

enfermedad. A su vez, la mayoría de casos incluyó bovinos de raza Hereford o sus cruza lo que sugiere la influencia de aspectos genéticos no definidos aún (Guglielmone y Vanzini, 1999). Estos casos podrían verse favorecidos por situaciones de inmunodepresión ocasionados como consecuencia del estrés generado en los bovinos trasladados.

Los riesgos de la utilización de vacunas vivas incluyen la posible reversión de la virulencia y el riesgo de transmisión de otras enfermedades. Debido a esto, en las últimas décadas, se ha intentado desarrollar vacunas basadas en antígenos no-viables o en subunidades proteicas. Se han evaluado lisados de parásitos, fracciones purificadas de proteínas nativas y subunidades obtenidas mediante recombinación del ADN (Brown y col., 2006). Hasta ahora, no se ha logrado un nivel de protección adecuado con estos antígenos, posiblemente debido a la dificultad para incluir los múltiples epitopes necesarios. Los avances en la secuenciación del genoma de *B. bigemina* aún incompleto, la identificación de los genes asociados a la virulencia y el uso de proteómica funcional podrían ser elementos de utilidad para el desarrollo de nuevas vacunas.

4.6. Diagnóstico de la babesiosis.

Para el diagnóstico de la babesiosis bovina se utilizan métodos directos o indirectos. Entre los primeros se incluye la observación microscópica de frotis de sangre o la amplificación y análisis de secuencias específicas de ADN perteneciente a *Babesia* a través de PCR, rt-PCR o RLBH. Los métodos indirectos incluyen ELISA e IFI (Echaide y col., 1995), pruebas serológicas que permiten detectar anticuerpos específicos en los bovinos infectados.

4.6.1. Diagnóstico por métodos directos.

4.6.1.1. Observación microscópica directa.

Se utilizan extendidos finos o gota gruesa de sangre periférica (punta de la cola o borde de una oreja) y también de improntas de órganos en el caso de animales muertos. El extendido fino se realiza permitiendo primero que una gota de sangre se expanda en el ángulo agudo que genera un portaobjetos apoyado a 45° sobre otro, y deslizando el primero sobre la superficie del segundo suavemente. Se seca a temperatura ambiente, se fija con metanol y se tiñe con colorante Giemsa. La observación se realiza con 1000x en un microscopio de luz blanca (Callow y col., 1993). El método de la gota gruesa consiste en el depósito de una gota de sangre sobre un portaobjetos, la expansión en un círculo de 10 mm, el secado a temperatura ambiente y la tinción con colorante

Giemsa. La eficiencia de este método es de 1 EP cada $1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ glóbulos rojos (Böse y col., 1995). La lisis total de una elevada concentración de eritrocitos no fijados con metanol en una pequeña zona, permite la observación de parásitos libres aún cuando la parasitemia no sea relevante (Mahoney, 1973). Las improntas se realizan con material de órganos muy irrigados como riñón, corazón, bazo o cerebro. La observación microscópica directa es el método más eficiente por su rapidez y economía para el diagnóstico de la babesiosis aguda causada por *B. bovis* y *B. bigemina* (Lew y Jorgensen, 2005). Además, permite la diferenciación entre especies de *Babesia* por su morfología y la determinación de la parasitemia (proporción de eritrocitos parasitados).

4.6.1.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Este método enzimático permite la amplificación exponencial de secuencias específicas de ADN, *in vitro*. La técnica se basa en la utilización de la enzima termoestable *Taq* polimerasa que en presencia del buffer adecuado, magnesio, desoxiribonucleótidos (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) y oligonucleótidos específicos, permite amplificar un gen o secuencia particular a partir de ADN (Palumbi, 1996).

Esta técnica ha facilitado el desarrollo de numerosos métodos para identificar y caracterizar bacterias, parásitos y virus de importancia en medicina humana y veterinaria (Pfeffer y col., 1995). La PCR utilizada simultáneamente con los métodos de diagnóstico convencionales, ha probado ser de utilidad para la detección de *B. bigemina* en bovinos portadores y como prueba confirmatoria debido a su elevada sensibilidad y especificidad (Figueroa y col., 1992; 1993; Bock y col., 2004). Estas características han permitido su utilización para identificar diferencias genómicas no detectables mediante los métodos de diagnóstico convencionales, entre hemoparásitos de una misma especie (Lew y Jorgensen, 2005).

Es importante la adecuada estandarización de la técnica para cada secuencia en particular y la inclusión de controles de reacción para evitar los falsos positivos o negativos.

4.6.1.3. PCR en tiempo real (rt-PCR). Disociación del ADN con alta resolución (HRM).

La PCR en tiempo real (rt-PCR) es una técnica basada en la PCR clásica, que depende de un equipo al que se le ha incorporado un sistema de espectrofotometría, que permite detectar en

tiempo real la fluorescencia que emiten diferentes fluoróforos al conjugarse con cada nueva doble hebra de ADN generada de la amplificación de las secuencias. La intensidad de la emisión se incrementa en forma proporcional al número de fragmentos amplificados, durante sucesivos ciclos de la PCR (Ginzinger, 2002). Esta técnica ha sido utilizada para la detección y cuantificación de *Babesia* y *Theileria* (Criado-Fornelio y col., 2009).

El método HRM permite discriminar secuencias de ADN a través de la temperatura de disociación de las dobles hebras de ADN durante la amplificación por rt-PCR. Este ha sido utilizado para caracterizar cepas de otros protozoarios apicomplexa como *Plasmodium falciparum* (Andriantsoanirina y col., 2009) y *Babesia canis* (Adaszek y Winiarczyk, 2010). Este es un método de genotipificación basado en la definición de las diferentes temperaturas de disociación generadas debido al tamaño, orden de los nucleótidos y la proporción de GC de secuencias diferentes (Patel, 2009).

El HRM es rápido, poco costoso y de aplicación sencilla, sin embargo la evaluación de muestras que contienen mezclas de genotipos, diferentes a la secuencia buscada, dificulta la interpretación de los resultados (Taylor, 2009).

4.6.1.4. Hibridación en fase reversa (RLBH).

Esta prueba permite la detección y diferenciación simultánea de diversas especies de hemoparásitos a partir de una muestra única. Gubbels y col. (1999) lo desarrollaron para los géneros de *Babesia* spp., *Theileria* spp., *Ehrlichia* spp. y *Anaplasma* spp. Se basa en la amplificación simultánea por PCR de fragmentos de ADN de especies relacionadas como *Ehrlichia* y *Anaplasma* o *Theileria* y *Babesia*, y la identificación a través de sondas específicas, adheridas a una membrana de nitrocelulosa mediante unión covalente.

Durante la primera etapa se amplifica mediante PCR una región variable del gen *16S rARN* (*Ehrlichia/Anaplasma*) o *18S rARN* (*Theileria/Babesia*) utilizando oligonucleótidos ubicados en las regiones conservadas. Estos oligonucleótidos están unidos a una molécula de biotina, que permitirá su identificación en la etapa de revelado. Durante la segunda etapa, si los productos de la PCR pertenecen a alguno de los hemoparásitos considerados, estos se hibridan a la sonda específica correspondiente, fijada a la membrana. Para esto, los productos de PCR se descargan en cada ranura del *blotter* perpendicular a la dirección de las sondas específicas (Figura 3).

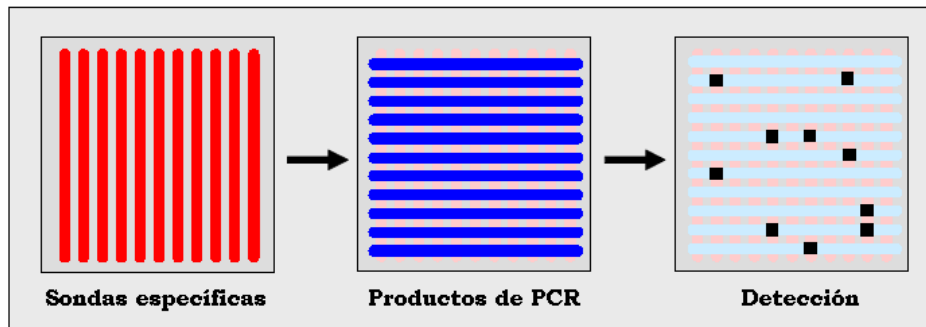


Figura 3. Esquema del RLBH. Las sondas específicas para cada género o especie se encuentran pegados a la membrana de manera vertical, mientras que los productos de PCR se siembran de manera horizontal. Por medio de quimioluminiscencia se detectan las reacciones positivas.

Los productos hibridados se visualizan usando quimioluminiscencia. El fragmento marcado con biotina es detectado por incubación con un ligando de estreptoavidina conjugado con peroxidasa. La incubación del sustrato de la peroxidasa (H_2O_2) con la membrana, produce una reacción luminiscente que puede ser detectada en una placa de rayos X. Luego del revelado de la placa, se observan puntos oscuros en los sitios donde la sonda hibridó con el producto de PCR, identificando específicamente los fragmentos de PCR correspondientes a los microorganismos presentes en las muestras estudiadas (Gubbels y col., 1999).

4.6.2. Diagnóstico por métodos indirectos.

4.6.2.1. Inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Esta prueba de diagnóstico serológico se utiliza para la detección de anticuerpos específicos de *Babesia* en suero de bovinos. El antígeno está constituido por un extendido de eritrocitos -5% parasitados- sobre un portaobjetos de vidrio. La superficie del portaobjetos está subdividida en cuadrados, en los que se depositan 20 μ l de cada uno de los sueros desconocidos y se incuban para permitir que los anticuerpos se unan a los antígenos de *Babesia* spp. La reacción se detecta mediante un suero anti-inmunoglobulina bovina conjugado con isotiocianato de fluoresceína. Esta es excitada por la luz ultravioleta y emite fluorescencia en los puntos de reacción, lo que se visualiza mediante un microscopio. La observación de fluorescencia verde sobre el parásito y eritrocitos indica la presencia de anticuerpos específicos en el suero problema. La técnica de IFI tiene limitaciones prácticas, como la subjetividad para la interpretación de la reacción, el

requerimiento de personal especializado y el escaso número de muestras procesadas por sesión (Echaide y col., 1995).

4.6.2.2. Prueba inmunoenzimática en fase sólida (ELISA)

La prueba de ELISA se basa en la formación de un complejo antígeno-anticuerpo sobre una fase sólida y su detección mediante una reacción enzimática. Esta última se produce entre la enzima conjugada a un anticuerpo secundario y un sustrato cromógeno. La intensidad de la reacción se mide mediante un espectrofotómetro. Se han desarrollado ELISAs de *B. bigemina* basados en mezclas de antígenos nativos solubilizados o proteínas recombinantes. Los antígenos solubles se obtienen después de la lisis de merozoitos de *B. bigemina* aislados a través de gradientes de densidad (Echaide y col., 2004). Entre los antígenos recombinantes se destacan las proteínas superficiales RAP-1 (58 kDa) (Molloy y col., 1998) y la p200 (Tebele y col., 2000). Esta prueba se utiliza para diagnóstico (Bono y col., 2008), estudios epidemiológicos (De Vos y col., 2000), controles posvacunales (Guglielmone y col., 1997) y evaluaciones experimentales de antígenos (Baravalle y col., 2010).

4.7. Multiplicación de *Babesia* spp. *in vitro*.

El método usado para la multiplicación de *Babesia* spp., conocido como microaerófilico en fase estacionaria (MASP), fue desarrollado para *B. bovis* por Levy and Ristic (1980) y adaptado para *B. bigemina* por Vega y col. (1985). La adaptación de las diferentes especies de *Babesia* a un sistema de multiplicación continua *in vitro* ha facilitado la disponibilidad de proteínas y ácidos nucleicos para estudios epidemiológicos, caracterización fenotípica y genotípica de cepas, la producción de antígenos para pruebas de diagnóstico serológico y estudios sobre el ciclo biológico, procesos fisiológicos y bioquímicos del parásito (Schuster, 2002). Este método ha sido adaptado también para la producción de vacunas vivas, lo que ha permitido aumentar su calidad con respecto a la producida *in vivo*.

La multiplicación *in vitro*, permite la disponibilidad continua de parásitos evitando la utilización de bovinos esplenectomizados (Lehtinen y col., 2008). Sin embargo, debido a los distintos requerimientos metabólicos, no todas las cepas pueden ser adaptadas al cultivo, aspecto que no ha sido estudiado en profundidad para *Babesia*.

4.8. Variabilidad intraespecífica de *Babesia*.

Todas las especies de *Babesia* spp. tienen la capacidad de generar infecciones persistentes en aquellos hospedadores que logran superar la babesiosis aguda, durante períodos variables entre los 6 – 12 meses hasta los 4 años (Mahoney y col., 1973; Smith, 1984). Se genera así un estado de portador sano, no interrumpido por la potente respuesta inmune específica desencadenada en el hospedador a partir de la *primo* infección. La persistencia de los parásitos en el sistema circulatorio, limitada por la respuesta inmune, se basa en un mecanismo de evasión que consiste en la variación de epitopes de distintas proteínas superficiales, lo que impide que los efectores del sistema inmune logren su eliminación. Esta estrategia es utilizada por diferentes hemoparásitos (Allred, 2003). Las variaciones antigénicas responden a cambios genéticos aleatorios propios de cada cepa de *Babesia* y las variaciones genéticas a la recombinación del ADN durante la multiplicación sexual en el hospedador invertebrado (Carcy y col., 2006). Las variaciones de las secuencias de los genes de estos parásitos, la modificación de los productos expresados y los sutiles cambios de los mecanismos biológicos pueden ser identificados, caracterizados y comparados entre cepas. Para conocer la diversidad de cepas y aislamientos de *B. bigemina*, se han realizado diversos estudios basados en estas variaciones antigénicas y genéticas.

4.8.1. Variación antigénica.

La variación antigénica es un mecanismo de evasión de los efectores del sistema inmune de los hospedadores utilizado por virus, bacterias y protozoos (Allred, 2001).

Los principales mecanismos de evasión definidos por Allred (2003) para diferentes hemoparásitos son 1) variación antigénica rápida; 2) citoadhesión y secuestro; 3) unión de proteínas del huésped a los eritrocitos y 4) expresión monoalélica de miembros de familias multigénicas como respuesta a su persistencia en los hospedadores.

Otro mecanismo de evasión utilizado por distintos parásitos, se basa en la utilización de moléculas del hospedador para evitar los efectores del sistema inmune. Los eritrocitos parasitados por *B. bigemina* favorecerían la adherencia de la fracción cristalizante de la IgM a la superficie de estas células, cambio que permitiría la circulación de los parásitos sin la interferencia de los efectores del hospedador, mientras completan su multiplicación (Echaide y col., 1998).

Curnow (1973b) observó que los antígenos purificados de una cepa de *B. bigemina* multiplicada en un ternero después de ser mantenida durante 2 años en bovinos con bazo, tenían una reacción

suave cuando se lo enfrentaba con el antisuero producido por inoculación de un bovino con la cepa parental. A partir de esta observación y una similar realizada en bovinos inoculados con *B. bovis* (Curnow, 1973a), el autor hipotetizó que durante los 2 años de pasajes continuos, la cepa derivada había sufrido variaciones antigénicas. Años más tarde, Thompson y col. (1978) demostraron la existencia de diversidad antigénica a través de la inoculación de dos grupos de 16 terneros con una cepa de *B. bigemina* purificada en bovinos inoculados mediante jeringa y de bovinos infectados por garrapatas y posterior desafío con las mismas cepas, aunque recuperadas 90 días después de la primo infección (Thompson y col., 1977). Los títulos serológicos de los grupos desafiados con la misma cepa pero en su estadio de persistencia (heterólogos) fueron mayores que los producidos por los animales desafiados con las cepas en sus etapas agudas (homólogas). La severidad de los signos clínicos generados por los estadios crónicos se manifestó a través de mayor temperatura corporal, mayor descenso del hematocrito y valores de parasitemia superiores con respecto a los estadios agudos de las dos cepas utilizadas. Estos resultados confirmaron la diversidad antigénica dentro de la misma cepa de *B. bigemina*, al ser sometida a diferentes tratamientos.

4.8.2. Variabilidad genética.

La variabilidad genética es una medida de la tendencia de los genotipos de una población de individuos a diferenciarse, e implica la extensión de las diferencias genómicas entre dos poblaciones (Nei y Kumar, 2000). Esta no puede ser medida exhaustivamente en todo el genoma, analizando la totalidad de la población, pero puede estimarse en un grupo de genes a través de una muestra representativa de la población. La recombinación del ADN genómico de las especies de *Babesia*, producido durante su multiplicación sexual en el intestino de la garrapata, genera las modificaciones genéticas más importantes (Simuunza y col., 2011). Vogl (2004) pudo observar variabilidad genética entre diferentes aislamientos de *Babesia* y dentro de cada uno de ellos mediante la evaluación de regiones de ADN pertenecientes al tandem ribosomal de estos parásitos. Variaciones genéticas intraespecíficas fueron determinadas para otros Apicomplexa como por ejemplo, *Plasmodium falciparum* (Druihhe y col., 1998), *Theileria parva* (Oura y col., 2003), *B. bovis* (Dalrymple, 1992a; LeRoith y col., 2005; Berens y col., 2007; Baravalle y col., 2012; Perez-Llaneza y col., 2010; Simuunza y col., 2011) y *Toxoplasma gondii* (Ajzenberg y col., 2004; de Melo Ferreira y col., 2004; Ragozo y col., 2010). A estas deben agregarse las

secuencias polimórficas encontradas por Fisher y col. (2001), para una proteína superficial (GP-45) entre cepas de *B. bigemina* de diferentes regiones geográficas.

4.8.2.1. Cambios en la patogenicidad.

Algunas de las variaciones genéticas se manifiestan a través de aspectos mensurables como los niveles de virulencia. De Vos y col. (1987) establecieron que la virulencia de las especies de *Babesia* no es una característica estable, debido a que cepas no-patógenas podían manifestarse como patógenas al ser inoculadas en otros bovinos y viceversa. Se han observado variaciones del comportamiento de las cepas de *B. bigemina* a través de los cambios de patogenicidad de cepas mantenidas durante períodos prolongados en terneros esplenectomizados, característica explotada para el desarrollo de una vacuna para el control de la babesiosis causada por este hemoparásito (Aguirre y col., 1989). Estas variaciones en el comportamiento de *B. bigemina* han sido estudiadas previamente por Dalgliesh y col., (1981) quienes observaron que las cepas atenuadas multiplicadas en terneros mediante pasajes por jeringas, pueden variar y comportarse como virulentas. La variación fenotípica de estas especies podrían responder a la selección de una subpoblación de *B. bigemina* preexistente, con características fenotípicas definidas (Vega y col., 1986) y/o a la regulación de genes de virulencia como se ha descrito para *P. falciparum* (Cooke y col., 2001).

4.8.3. Consecuencia de la variabilidad intraespecífica. Multiplicidad de infecciones.

Los avances realizados en métodos de genotipificación revelan que en muchas enfermedades, los hospedadores no son infectados con un solo genotipo de cada hemoparásitos, sino por una variedad de ellos (Read y Taylor, 2001). En la babesiosis esta variedad se originaría por la inoculación de esporozoitos de *Babesia* durante las picaduras de diferentes garrapatas infectadas con poblaciones de parásitos genéticamente diversas. La constitución heterogénea de aislamientos de *B. bigemina* fue observada en Brasil a través de estudios genéticos basados en cepas locales (Madruga y col., 2002) y en Suiza, a través del estudio de un brote de la enfermedad (Hilpertshauer y col., 2007).

El uso de diferentes técnicas moleculares y biológicas ha facilitado la identificación de la variabilidad intraespecífica. Druilhe y col. (1998) y Taylor y col. (2002) demostraron que

individuos clonados provenientes de un mismo aislamiento de *P. falciparum* y *T. annulata*, poseían variabilidad genética entre ellos. Oura y col. (2003), pudieron estudiar la estructura poblacional de *T. parva* utilizando marcadores moleculares también definidos en clones biológicos. Gill y col. (1987) establecieron diferencias de patogenicidad entre clones de *B. bovis* obtenidos mediante el método de dilución límite en terneros esplenectomizados. Dalrymple (1992a) también observó más de una población de *B. bovis* en una cepa atenuada mediante este método. Algunas propiedades bioquímicas de *B. bigemina* pudieron ser identificadas en subpoblaciones selectivamente separadas mediante su clonación biológica *in vitro* (Vega y col., 1986).

Estos trabajos destacan la importancia de los clones biológicos para poder diferenciar los genotipos presentes en los aislamientos. De esta manera se podrían definir patrones moleculares asociados a determinados fenotipos que expresaran, por ejemplo, variaciones en la patogenicidad.

4.9. Identificación de las variaciones genéticas.

Para el estudio de la variación genética de poblaciones naturales de hemoparásitos, la utilización de secuencias específicas de ADN provee mayor información que la aportada mediante el estudio de proteínas (Nei y Kumar, 2000). Dentro de las ventajas de su utilización, Dowling y col. (1996) destacan que: 1) el análisis del genotipo permite la detección de mutaciones silenciosas, resultados que no se obtienen al analizar únicamente el fenotipo; 2) la posibilidad de utilizar numerosas secuencias provenientes de diferentes *loci*, disminuye la probabilidad de error; 3) las técnicas que se aplican para estos estudios son sencillas y 4) el ADN puede ser extraído a partir de cantidades pequeñas de material y es estable durante largos períodos de tiempo. Dalrymple y col. (1992b) establecieron que un gen ideal para la diferenciación de cepas de parásitos debería ser específico de especie, estar representado por una copia única y ser polimórfico entre cepas de diferentes orígenes.

Entre los marcadores moleculares utilizados, se incluyen los que se amplifican desconociendo la secuencia del ADN genómico (amplificación de fragmentos de ADN al azar - RAPD - o polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción - RFLP -). En el primer caso, se utilizan oligonucleótidos arbitrarios para amplificar por PCR, fragmentos aleatorios. En el segundo los fragmentos amplificados a partir del ADN genómico se digieren con enzimas de restricción. Para ambos casos el patrón de bandas obtenido para cada individuo o especie se visualiza mediante

electroforesis. Estas técnicas suelen tener baja reproducibilidad y la especificidad depende de la pureza del ADN y de la uniformidad de las condiciones de trabajo (Lew y Jorgensen, 2005).

Por otro lado, también se destacan aquellos marcadores cuyo orden exacto de nucleótidos debe establecerse mediante secuenciación como las secuencias codificantes para genes ribosomales, proteínas estructurales y microsatélites o minisatélites. Así, se pueden comparar las secuencias nucleotídicas para cada individuo o especie mediante programas informáticos especialmente diseñados para este fin. Esto permite mejorar la especificidad y la reproducibilidad de los marcadores moleculares. Para el presente trabajo, se decidió recurrir a esta técnica para el análisis de las cepas y aislamientos de *B. bigemina*.

4.9.1. Marcadores moleculares de secuencia conocida.

4.9.1.1. Genes ribosomales.

El ARN ribosomal es parte de la estructura de los ribosomas y se encuentra entre los genes más estables conocidos. Los genes ADN_r en los eucariotas se denominan 18S, 5,8S y 28S y se encuentran organizados en tándem, separados por secuencias que se transcriben identificadas como ITS-1 e ITS-2 (del Inglés *internal transcribed spacer*) o regiones internas espaciadoras y una región externa ETS (*external transcribed spacer*) adosada al extremo 5' del gen 18S rARN (Figura 4). El número de copias de esta familia multigénica varía entre los diferentes eucariotas, por ejemplo, se han reportado 200 copias en el genoma del ratón (*Mus musculus*) y hasta 6400 en el genoma del trigo, todas ubicadas en los cromosomas nucleares (Gerbi, 1986).

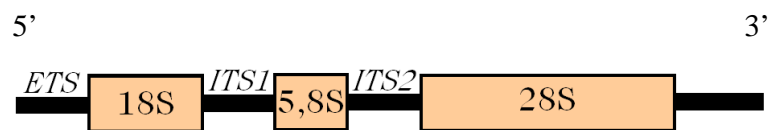


Figura 4. Esquema de los genes ribosomales en eucariotas. En naranja se identifican los genes 18S, 5,8S y 28S. Entre las regiones codificantes se ubican las regiones internas que se transcriben (ITS-1 e ITS-2) y en la región 5' se ubica la región externa ETS.

Los hemoparásitos Apicomplexa presentan diferencias con respecto a los demás eucariotas en el número de genes ribosomales. Para *Plasmodium* spp. se encontró que sólo existen 4-8 copias del tándem ribosomal distribuidos a lo largo del genoma. Las secuencias nucleotídicas de estas

copias son diferentes entre sí y cada una de ellas se expresa en distintos estadios del ciclo del hemoparásito (McCutchan y col., 1995).

El gen ribosomal *18S rARN*, denominado subunidad pequeña o SSU (del Inglés “*small ribosomal subunit*”), es ampliamente utilizado para realizar estudios filogenéticos entre miembros del phylum Apicomplexa, debido a que poseen regiones muy conservadas (Allsopp y col., 1994; Allsopp y Allsopp, 2006; Criado-Fornelio y col., 2003 a, b).

A modo de ejemplo, *Plasmodium vivax* posee tres copias diferentes de la SSU *18S*, expresadas diferencialmente en los diferentes estadios del hemoparásito dentro del eritrocito del humano (Tipo S y A) y del mosquito (Tipo O) (Li y col., 1997). *B. bigemina* tiene 3 copias del gen *18S rARN*, de acuerdo a lo demostrado por Reddy y col., (1991) quienes las denominaron *a* y *b* (idénticas) y la tercera *c* que se distinguió de las primeras por contener 2 nucleótidos diferentes. Además, las unidades *a* y *b* son transcriptas con mayor frecuencia que la unidad *c*.

Mediante la comparación de las secuencias de las SSU homólogas, pudieron diferenciarse, además de las regiones conservadas, otras variables. Estas regiones variables pueden ser útiles para evidenciar diferencias dentro de especies del mismo género. El análisis de la estructura secundaria de este gen, permitió identificar un núcleo “universal” presente en todos los seres vivos y regiones menos conservadas que se correspondían con las secuencias periféricas dentro de la mencionada estructura (de Rijk y col., 1992). En los eucariotas, estas regiones variables se denominaron V1-V5 y V7-V9. En la Figura 5 se muestra la estructura secundaria del gen *18S rARN*, típica de los eucariotas, donde se detallan 8 regiones variables (de Rijk y col., 1992). Estas regiones varían entre especies del mismo género por su extensión y secuencia de nucleótidos. Si bien las regiones variables están conservadas dentro de organismos de una misma especie, Bhoora y col. (2008), inesperadamente observaron diferencias intraespecíficas en este gen para *T. equi* y *B. caballi*. Estas diferencias se confirmaron posteriormente para *T. equi* mediante el clonado y secuenciación de esta región.

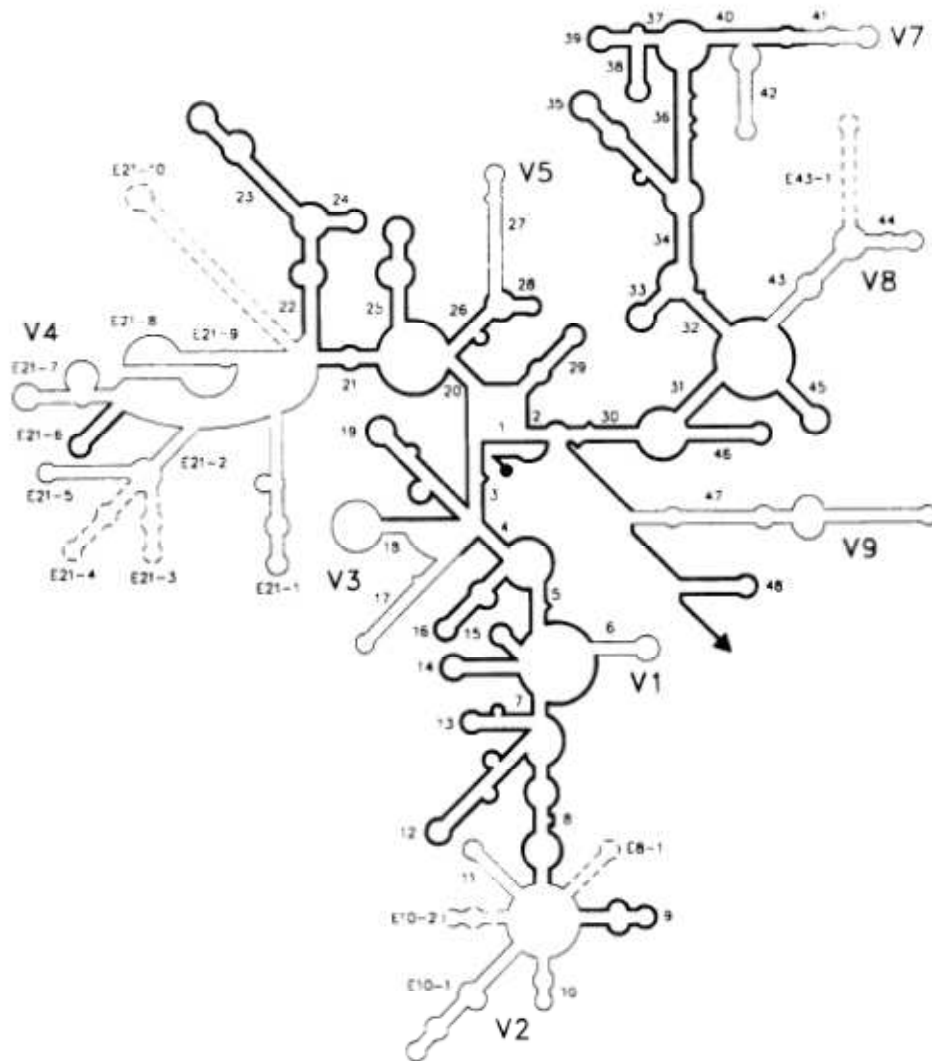


Figura 5. Estructura secundaria del gen *18S rARN* obtenida de Rijk y col., 1992. Las regiones conservadas están remarcadas en negrita y las variables como V1-V5 y V7-V9. Los números (1-48) de la estructura corresponden al número de hélice.

Van de Peer y col. (1997) desarrollaron un mapa de variabilidad de secuencias mediante la superposición de las estructuras secundarias correspondientes a 500 especies eucariotas (Figura 6), que les permitió establecer la probabilidad de mutaciones nucleotídicas, las que fueron graficadas sobre la estructura de *Saccharomyces cerevisiae*.

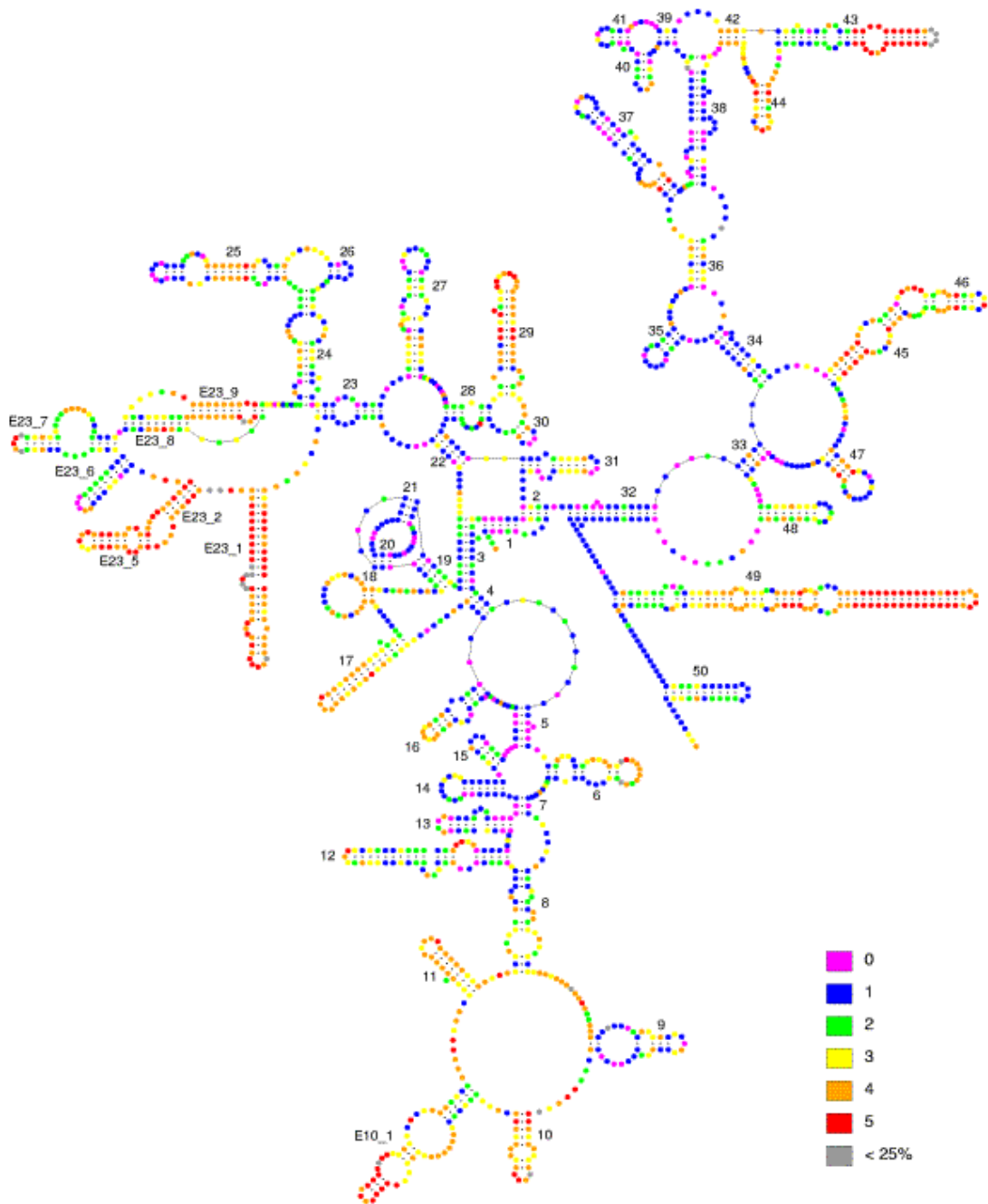


Figura 6. Mapa de variabilidad de la subunidad menor ribosomal (18S) basada en la estructura secundaria de *Saccharomyces cerevisiae*. Los colores muestran un rango de variación desde los más conservados (0) hasta los más variables (<25%). Los números de la estructura corresponden al número de hélice.

En las regiones ubicadas entre los genes ribosomales, se encuentran las regiones ITS-1 e ITS-2 (Figura 4). Estas secuencias regulan la transcripción e iniciación de la amplificación del ADN_r y han sido utilizadas para determinar diferencias inter- e intraespecíficas. Liu y col. (2008) utilizaron las regiones ITS-1 e ITS-2 para establecer las subespecies de *Babesia major* y *Babesia ovata*. Niu y col. (2009) también utilizaron estas dos regiones para discriminar entre especies de *Babesia* spp. de ovinos. Por último, Hilpertshauer y col. (2007) utilizaron la región ITS-2 para identificar polimorfismos entre y dentro de aislamientos de *B. bigemina*.

4.9.1.2. Secuencias codificantes de proteínas.

El estudio de proteínas de hemoparásitos (ubicadas en organelas citoplasmáticas y en la superficie) ha tenido como principal objetivo la identificación de epitopes inmunogénicos para el desarrollo de técnicas de diagnóstico o vacunas recombinantes (Florin-Christensen y col., 2002; Terkawi y col., 2007; Bono y col., 2008; Freeman y col., 2010). Sin embargo, la variabilidad encontrada en las secuencias de aminoácidos de algunas de ellas, ha permitido su utilización para la determinación de diferencias intraespecíficas en aislamientos y cepas de *P. vivax* y *T. parva* (Beck y col., 2009) y *Babesia* spp. y *Anaplasma* spp. (Lew y Jorgensen, 2005).

Fisher y col. (2001) estudiaron la glicoproteína Gp-45 de *B. bigemina* en el clon mexicano JG-29. El gen que codifica esta proteína tiene una sola copia en el genoma y carece de intrones. Al analizar cepas de cinco regiones geográficas diferentes encontraron que este gen no pudo detectarse en algunas de ellas, presentó polimorfismos en su secuencia y sugirieron que su expresión era regulada.

Hilpertshauer y col. (2007) utilizaron el gen que codifica la proteína RAP-1c (proteína asociada al rhoptry-1c) para caracterizar aislamientos de *B. bigemina* en un brote de babesiosis ocurrido en Suiza.

Las proteínas RAP-1 pertenecen a una familia multigénica, formada por 3 genes diferentes distribuidos en tándem. Estos genes, se denominan *rap-1a* y *rap-1b* (5 copias cada uno) y *rap-1c* (1 copia) ubicado en la región terminal del *locus* (Suárez y col., 2003) (Figura 7).

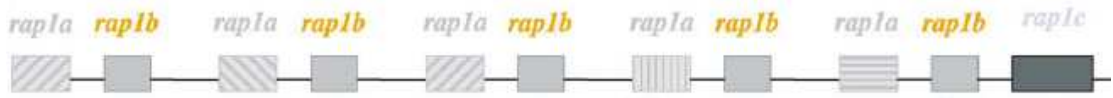


Figura 7. Estructura del locus *rap-1* en *Babesia bigemina* del clon mexicano JG-29 (Suárez y col., 2003).

Rap-1c es un gen de copia única, que no se transcribió en las cepas analizadas por los autores. De sus 510 aminoácidos, los últimos 100 presentaron la mayor cantidad de sitios polimórficos, con 18 residuos diferentes entre distintas cepas de *B. bigemina*. Estas características lo hacen elegible para la caracterización de cepas y aislamientos de *B. bigemina*.

4.9.1.3. Secuencias repetitivas en tándem.

Se denominan así a segmentos de secuencias repetidas que muestran variaciones en su longitud, debido a la cantidad de variantes que poseen. Existen dos tipos de secuencias repetitivas, denominadas micro- y minisatélites. Los microsatélites están constituidos por secuencias de 2-6 pares de bases. Por lo general son regiones no-codificantes, polimórficas y dispersas a lo largo de todo el genoma (Gasser, 1999). Para su amplificación es necesario conocer las regiones flanqueantes que deben estar conservadas en las cepas analizadas. Por otro lado, los minisatélites están compuestos por secuencias de entre 6 y hasta 100 pares de bases.

Tanto micro- como minisatélites han sido utilizados para genotipificar poblaciones de diferentes parásitos del phylum Apicomplexa, como *T. gondii* (de Melo Ferreira y col., 2004), *Neospora caninum* (Regidor-Cerrillo y col., 2006), *T. parva* (Oura y col., 2003; Oura y col., 2005; Odongo y col., 2006), *P. falciparum* (Anderson y col., 2000) y *B. bovis* (Wilkowsky y col., 2009; Perez-Llaneza y col., 2010).

5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

Hipótesis:

“Patrones moleculares de *B. bigemina* asociados a cepas con diferentes grados de patogenicidad se identifican en poblaciones naturales de este parásito.”

Objetivos:

5.1 Objetivo específico 1. Caracterización biológica de clones de *B. bigemina* de Argentina.

Base racional. La clonación biológica permite aislar poblaciones homogéneas o clones, a partir de una población heterogénea de *B. bigemina*, cada una con características genotípicas y fenotípicas idénticas. Clones con niveles de patogenicidad significativamente diferentes entre si, facilitarán la identificación de marcadores moleculares asociados a sus rasgos fenotípicos distintivos.

5.2. Objetivo específico 2. Identificación de marcadores moleculares en clones de *B. bigemina*.

Base racional. La caracterización molecular de clones de *B. bigemina* patógenos y no-patógenos permitirá establecer patrones moleculares estables distintivos para cada fenotipo.

5.3. Objetivo específico 3. Caracterización molecular de *B. bigemina* de diferentes orígenes.

Base racional: La prevalencia de los marcadores moleculares asociados a distintos fenotipos en cepas y poblaciones de *B. bigemina* de diferentes áreas geográficas brindará información epidemiológica necesaria para el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico y de control de la babesiosis bovina.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1. Materiales.

6.1.1. Cepas de *Babesia bigemina*.

Se usaron siete cepas provenientes de diferentes regiones de Argentina donde la babesiosis es endémica y una aislada en México. Se utilizó también ADN proveniente de cuatro cepas de Australia e Israel. Las cepas BbiS1A, BbiS3 y BbiS2P, aisladas en la provincia de Salta, fueron multiplicadas en terneros esplenectomizados (*in vivo*) y simultáneamente adaptadas al desarrollo en cultivos continuos *in vitro*. Estas últimas se identificaron mediante el agregado del sufijo -i a la cepa original (Ej. BbiS1A-i). La cepa BbiS1A se atenuó después de dos pasajes sucesivos en terneros sin bazo, con un intervalo de 6 meses (Aguirre y col., 1989). El inóculo original había sido obtenido de un ternero infestado con ninfas y adultos de garrapatas *R. microplus*, derivadas de teleoginas colectadas de un bovino infectado naturalmente con *B. bigemina*. La cepa atenuada BbiM1A es derivada de la cepa patógena BbiM1P, cuya atenuación también se logró después de un pasaje en un ternero sin bazo y un período de tiempo similar (Vanzini, com. pers.). La cepa BbiS3 se aisló de un bovino portador crónico, clínicamente sano. Las cepas BbiM1P y BbiM2P fueron aisladas de bovinos con babesiosis aguda, ocurridos en dos rodeos en Corrientes (Parajes Alen Cué y Chavarría, respectivamente). Las cepas BbiS1A-i y BbiM1A son utilizadas para producir vacunas en Argentina. Mientras que, la cepa BbiAvc y las cepas BbiIvc y BbiIMo, son las cepas vacunales utilizadas en Australia e Israel, respectivamente. El ADN de estas últimas fue provisto por las Dras. Ala Lew (Australia) y Varda Shkap (Israel).

Para evaluar la especificidad de las pruebas utilizadas en el trabajo se usó ADN de 2 cepas de *B. bovis* BboR1A-i, BboS2P-i y Am2. La primera fue atenuada en su patogenicidad mediante pasajes sucesivos entre terneros sin bazo con intervalos de 4-6 días (Anziani y col., 1993) y la BboS2P-i, aislada de un brote de babesiosis ocurrido en Salta, Argentina. La cepa de *A. marginale* Am2, fue aislada de la sangre de un bovino con anaplasmosis aguda en Cerrillos, Salta (Mangold, A. comunicación personal). Las cepas analizadas en esta tesis se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Referencias de las diferentes cepas de *Babesia bigemina* caracterizadas y las cepas de *B. bovis* y *Anaplasma marginale* utilizadas como control.

Nombre	Especie	Origen	Multiplicación	Fenotipo
BbiS1A-i	<i>B. bigemina</i>	NOA	<i>in vitro</i>	Atenuado
BbiS1A	<i>B. bigemina</i>	NOA	<i>in vivo</i>	Atenuado
BbiS2A	<i>B. bigemina</i>	NOA	<i>in vitro</i>	Atenuado
BbiM1A	<i>B. bigemina</i>	NEA	<i>in vivo</i>	Atenuado
BbiS2P-i	<i>B. bigemina</i>	NOA	<i>in vitro</i>	Patógeno
BbiS2P	<i>B. bigemina</i>	NOA	<i>in vivo</i>	Patógeno
BbiS3-i	<i>B. bigemina</i>	NOA	<i>in vitro</i>	ND
BbiS3	<i>B. bigemina</i>	NOA	<i>in vivo</i>	ND
BbiM1P	<i>B. bigemina</i>	NEA	<i>in vivo</i>	Patógeno
BbiM2P	<i>B. bigemina</i>	NEA	<i>in vivo</i>	Patógeno
BbiAVc	<i>B. bigemina</i>	Australia	<i>in vivo</i>	Atenuado
BbiAH19	<i>B. bigemina</i>	Australia	<i>in vivo</i>	Patógeno
BbiIvc	<i>B. bigemina</i>	Israel	<i>in vivo</i>	Vacunal
BbiIMo	<i>B. bigemina</i>	Israel	<i>in vivo</i>	Vacunal
JG29	<i>B. bigemina</i>	México	<i>in vitro</i>	Atenuado
BboR1A-i	<i>B. bovis</i>	Central	<i>in vitro</i>	Atenuado
BboS2P-i	<i>B. bovis</i>	NOA	<i>in vitro</i>	Patógeno
Am2	<i>A. marginale</i>	NOA	<i>in vivo</i>	Patógeno

(Nombre-i): cepas cultivadas *in vitro*; NOA: Noroeste Argentino; NEA: Noreste Argentino; ND: no determinado.

6.1.2. Medio de cultivo.

El medio base (MB) para la multiplicación de *B. bigemina* se preparó a partir del medio comercial M199 (Gibco), modificado mediante el agregado de 4,25 g/l del buffer zwitterion HEPES, 2,2 g/l de NaHCO₃; 0,1 g/l de penicilina y 0,16 g/l de estreptomina. El medio se esterilizó mediante filtración a través de membranas de 0,22 µm (Corning®). El MB se enriqueció

con el agregado de suero normal bovino en una proporción de 60:40. El medio completo (MC) se preparó con el agregado de 5-10 % (V/V) de eritrocitos normales de bovino.

Los eritrocitos y el suero desfibrinado normal se obtuvieron asépticamente de un bovino clínicamente sano. La sangre se colectó por punción yugular con una aguja 14G, unida mediante una manguera de látex a un Erlenmeyer de 2000 ml estéril, que contenía bolillas de vidrio de 2 cm de diámetro para el desfibrinado. La punción yugular se realizó en una zona de 9 cm², depilada y desinfectada. El desfibrinado se realizó mediante movimientos rotatorios continuos de las bolillas. Para separar el suero, la sangre se distribuyó en tubos de fondo cónico y se centrifugó a 2000 *xg*, a 4 °C durante 15 min. Extraído el suero, los eritrocitos se lavaron 3 veces utilizando la solución VYM (Vega y col., 1985) para eliminar restos de suero, coágulos de fibrina y los glóbulos blancos. El suero se congeló a -20 °C y los eritrocitos se mantuvieron a 8 °C durante un tiempo máximo de 15 días.

Para la adaptación de las cepas de *Babesia* spp. argentinas al método de cultivo *in vitro*, se incrementó la concentración de NaHCO₃ al medio de cultivo y se ajustó la profundidad de la columna líquida a 5 mm. Esto se ajustó de acuerdo a los requerimientos de las cepas locales.

6.1.3. Muestras de eritrocitos parasitados obtenidos *in vitro*.

Las muestras de ADN de parásitos multiplicados *in vitro* se extrajeron cuando las parasitemias alcanzadas fueron ≥ 6 %. Estas muestras se almacenaron congeladas a -20 °C hasta su procesamiento.

6.1.4. Muestras de sangre obtenidas de bovinos y búfalos de zonas endémicas.

Se obtuvieron 74 muestras de sangre de bovinos (*Bos taurus taurus* x *B. taurus indicus*) para carne de distintas razas y edades y 40 muestras de búfalos (*Bubalus bubalis*) adultos. Esta última especie se incluyó porque conviven habitualmente en algunos de los establecimientos muestreados.

Las muestras fueron identificadas de acuerdo a la zona de la cual fueron tomadas, las provenientes de la región noroeste con las siglas NOA y las del noreste del país como NEA seguidas de un número. Se obtuvieron 10 muestras de bovinos que habían sido vacunados con la cepa BbiS1A-i. Estas muestras fueron tomadas 60 días después de la vacunación y se denominaron PV (post-vacunales).

Las muestras provenientes de animales con signos clínicos se identificaron además con la letra (c).

Las muestras de bovinos infectados experimental o naturalmente en áreas endémicas a *R. microplus* se obtuvieron con citrato de sodio como anticoagulante.

6.1.5. Clonación molecular de productos de PCR.

6.1.5.1. Vector de transformación.

Se utilizó el vector *pGEM T-easy*, de 3015 pb, comúnmente utilizado para el clonado y secuenciación de fragmentos amplificados mediante PCR (Figura 8). La utilidad de este vector se debe a la capacidad de la enzima *Taq* ADN polimerasa de adicionar un nucleótido de adenina en los extremos 3' de los fragmentos sintetizados. El vector *pGEM T-easy* se provee linealizado y con el agregado de timina en sus extremos 3', lo cual hace posible ligar fragmentos de ADN generados mediante PCR en condiciones similares a una ligación inserto/vector con extremos cohesivos. Este vector contiene una región para el clonado múltiple que incluye los sitios de reconocimiento para diferentes enzimas de restricción, lo que permite la liberación del fragmento insertado. A su vez el vector contiene los promotores T7 y SP6 flanqueando a la región de múltiple clonado, la cual está contenida dentro del α -péptido que codifica para la enzima β -galactosidasa. La inserción de un fragmento de ADN en la región para el clonado múltiple resulta en la inactivación del α -péptido lo que permite la identificación de los clones recombinantes mediante la selección de colonias de bacterias transformadas, identificables a partir de su coloración blanca. El vector contiene sitios de unión para los oligonucleótidos T7 y SP6, utilizados para la secuenciación del fragmento de ADN clonado.

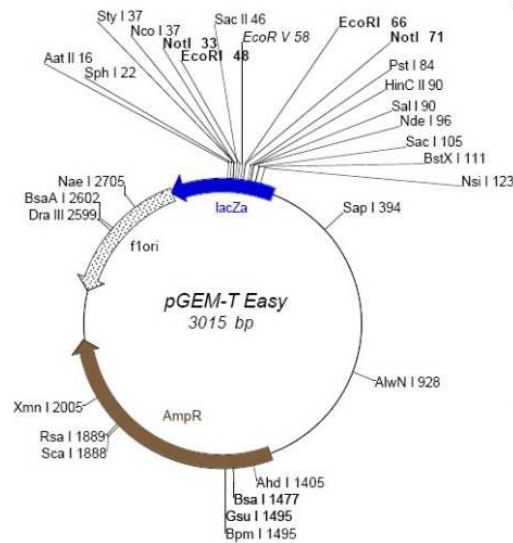


Figura 8. Esquema del vector *pGEM T-easy* (Promega®) utilizado para el clonado y secuenciación de fragmentos provenientes de una amplificación por PCR.

6.1.5.2. Bacteria seleccionada para la clonación.

Se utilizó la cepa Top 10 F' (Invitrogen®). Las células se hicieron competentes para ser transformadas mediante el método del cloruro cálcico (Ausubel y col., 2008) basado en una solución de 50 mM CaCl₂ y 15 % glicerol. Las bacterias competentes se distribuyeron en alícuotas de 100 µl y se almacenaron congeladas a -70 °C. Las bacterias transformadas con el plásmido *pGEM T-easy* poseen el gen de resistencia a ampicilina, lo que facilita su desarrollo y selección en medios de cultivo conteniendo este antibiótico.

6.1.5.3. Medio de cultivo.

Para cultivar las cepas Top 10 F' (Invitrogen®) se utilizó el medio de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido, compuesto de extracto de levadura al 0,5 % (P/V), peptona al 1 % (P/V) y NaCl al 1 % (P/V). El medio LB-Agar sólido se obtuvo añadiendo al medio LB líquido, 1,5 % de agar (P/V). Las soluciones madres de IPTG y X-Gal fueron preparadas para la selección de colonias azul/blanco. El IPTG fue preparado disolviendo 20 mg/ml en agua bidestilada, y el X-Gal disolviendo 20 mg/ml en DMSO. El antibiótico ampicilina preparado con una concentración de 100 mg/ml, se añadió al medio de cultivo hasta alcanzar una concentración final de 100 µg/ml.

Los reactivos químicos agregados fueron esterilizados mediante filtración (filtros de jeringa Corning[®], 0,22 µm) y el medio de cultivo mediante autoclave a 121 °C, 15 min.

6.2. Métodos.

6.2.1. Cultivo continuo *in vitro* de *B. bigemina*.

Para la multiplicación continua *in vitro* de *B. bigemina* se usó la técnica descrita por Levy y Ristic (1980) adaptada para esta especie por Vega y col. (1985).

Los cultivos se realizaron en botellas de plástico para cultivo de tejidos de 25 y 80 cm² de superficie y placas de 24 o 96 celdas en los que se distribuyó un volumen suficiente de MC para alcanzar una columna líquida de 5 mm. El MB se renovó cada 24 h, lo cual permitió eliminar metabolitos y sustancias tóxicas y renovar los nutrientes agotados. Los subcultivos permitieron evitar que el exceso de parásitos consumiera los nutrientes ofrecidos en cantidades fijas, antes de las 24 h, lo que genera elevadas pérdidas de parásitos. Para ello se mezcló medio completo normal en diferentes proporciones (ej. 1:2; 1:5; 1:10) con el medio completo parasitado, ambos con el mismo porcentaje de eritrocitos, cada 48 a 96 h. Los cultivos fueron mantenidos en estufa con una atmósfera de 5 % de CO₂ a 37 °C.

6.2.2. Criopreservación de cepas de *Babesia*.

Los eritrocitos parasitados (EP), provenientes de animales infectados o de cultivo, fueron centrifugados a 2000 *xg* a 4 °C por 10 min. Eliminado el MB sobrenadante, el paquete de eritrocitos se homogeneizó 1:1 (V/V) con una solución con el 20 % de polivinilpirrolidona (PVP) en buffer VyM. La suspensión de EP en una concentración final de 10 % de PVP se distribuyó en crioviales de 2 ml y estos se precongelaron a -70 °C en la capa gaseosa del nitrógeno líquido durante 30 min. Finalmente los viales se almacenaron a -196 °C (Palmer y col., 1982).

6.2.3. Cuantificación de eritrocitos parasitados por *Babesia bigemina*.

6.2.3.1. Tinción de extendidos de eritrocitos.

El extendido de los EP se realizó sobre portaobjetos de vidrio de 50 x 20 mm, secados a temperatura ambiente. Estos extendidos se fijaron en metanol y se tiñeron con colorante Giemsa. El colorante se diluyó al 10 % con una solución tamponada fosfatos salina (PBS) pH 7,2 y se usó para cubrir el extendido durante 20 min. Posteriormente fueron observados en un microscopio

óptico y una magnificación de 1000 x (Olympus® Modelo BH2). La parasitemia se calculó obteniendo el promedio de EP contados en 5 campos microscópicos sobre una línea oblicua virtual iniciada en uno de los bordes de la zona media del extendido y finalizada en el centro del extendido. Se contaron 10 campos microscópicos y se incluyó un campo microscópico de cada borde. Este método se estableció debido a la mayor proporción de EP con *B. bigemina* en los bordes y al final del extendido. El número promedio aproximado de eritrocitos totales por campo se estableció contando todas las células de 6 campos completa y uniformemente cubiertos de glóbulos rojos. Esta técnica permite tener un valor aproximado de la concentración de EP necesarios para realizar los subcultivos.

6.2.3.2. Hematocitometría.

Para realizar el clonado biológico de *B. bigemina* a partir de diluciones, fue necesario contar con una técnica de recuento de EP más precisa que la descrita en 6.2.3.1. Para esto, se desarrolló una técnica basada en la utilización de naranja de acridina, colorante que tiene la propiedad de intercalarse entre las dobles hebras de ADN, una vez que penetra las células (McCarthy y Senne, 1980; Darzynkiewicz, 1990). De esta manera, al ser excitado el fluoróforo por la luz UV, el brillo del núcleo de los parásitos permite detectar los EP.

Una suspensión de eritrocitos parasitados fue diluida 1/50 con MB y mezclada con una solución de naranja de acridina hasta obtener una concentración final de 1 %. Esta mezcla se incubó en oscuridad durante 10 min y después de una perfecta homogenización, se distribuyó en las dos celdas de una cámara de Neubauer (Figura 9).

Se contaron sucesivamente los glóbulos rojos totales y los EP utilizando alternadamente luz blanca y luz UV respectivamente, en cada uno de los cinco cuadrados de la cuadrícula central. El valor promedio obtenido de esas cuadrículas se multiplicó por un índice (10^4) y por la dilución utilizada, para tener el valor final de cada cámara (Archer, 1977).

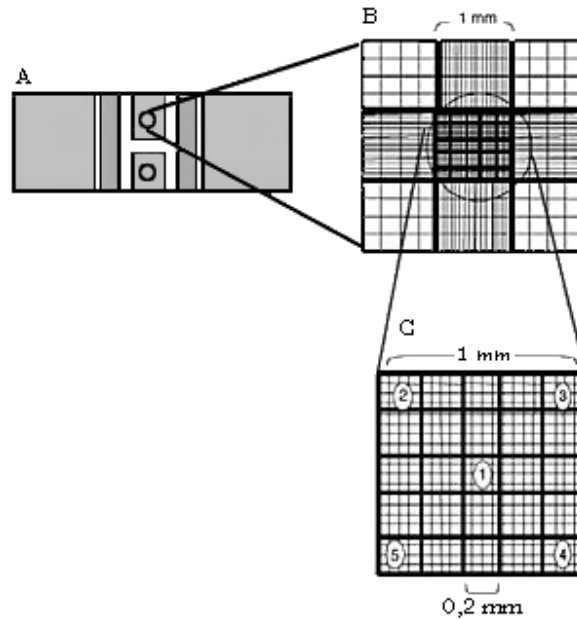


Figura 9. Hematocitometría. A) Esquema de la cámara de Neubauer, donde se observan las dos celdas; B) Ampliación de celda superior en la que se marca con un círculo la cuadrícula central usada para el recuento de eritrocitos; C) Cuadrícula central. Campos 1, 2, 3, 4 y 5 seleccionados para el recuento de eritrocitos parasitados.

6.2.4. Clonación biológica.

La clonación biológica *in vitro* se basó en la selección de un único eritrocito parasitado mediante una dilución límite (Vega y col., 1986). A partir de una concentración conocida de EP/ml (método descrito en 6.2.3.2.), se realizaron diluciones seriadas 1/10 hasta obtener una concentración final teórica de 1 EP por 1000 μ l. Doscientos μ l de esta suspensión se distribuyeron en 4 celdas de una placa de 96 (50 μ l cada una), a las que se le agregaron 130 μ l de MC para alcanzar un volumen final de 180 μ l en cada celda, y mantener una columna líquida de 5 mm. Cada una de estas diluciones constituyó un intento de clonado. Los cultivos se incubaron en una atmósfera con 5 % CO₂ en aire a 37 °C y se mantuvieron durante 36 días con cambios diarios del MB y subcultivos del MC cada 96 horas, momento en que se realizaron extendidos de sangre y posterior teñido con el colorante Giemsa, para detectar las celdas con EP.

Se consideraron clonados los parásitos que sólo se multiplicaron en uno de las 4 celdas de cada set de diluciones. El procedimiento de clonación inicial se repitió en dos ocasiones para obtener clones terciarios. Los clones primarios, secundarios y terciarios, se almacenaron a -196 °C. El

nivel de patogenicidad de los clones primarios se confirmó *in vivo* e *in vitro* antes de iniciar el segundo proceso de clonación.

Los períodos transcurridos hasta la detección de cada clon de *B. bigemina* se compararon mediante ANOVA y los valores promedios mediante el test de Tukey con un 95 % de confianza. La probabilidad de que sólo una de las 4 celdas hubiese recibido un único EP se analizó mediante el test de Poisson (Vega y col., 1986).

6.2.5. Caracterización fenotípica de los clones.

6.2.5.1. Eficiencia de los clones para multiplicarse *in vitro*.

Para determinar la eficiencia del crecimiento *in vitro* de los clones biológicos se diseñaron tres experimentos y se utilizaron las cepas parentales BbiS2P-i y BbiS1A-i como controles.

6.2.5.1.1. Experimento 1.

Se evaluó la eficiencia de los clones de *B. bigemina* Bbi2A1, Bbi3A1, Bbi8P1 y Bbi9P1, para multiplicarse *in vitro* durante 15 días. Para ello se obtuvo el porcentaje de EP alcanzado por cada clon al final de cada período de 48-72 h (subcultivo). Esto permitió además establecer la dilución de EP necesaria para que cada clon inicie un nuevo período de multiplicación con una concentración de parásitos de 0,1 % EP. El ensayo se realizó por triplicado en placas de 24 celdas y la parasitemia se estableció en extendidos de eritrocitos teñidos según Giemsa. Las tres réplicas se realizaron simultáneamente en la misma placa.

6.2.5.1.2. Experimento 2.

Evaluación de la eficiencia de crecimiento de los clones en base a la dilución fija 1:5 cada 48 h (subcultivo). Para este ensayo también se utilizaron los clones mencionados en el Experimento 1.

6.2.5.1.3. Experimento 3.

Para evaluar la capacidad de un clon patógeno (Bbi9P1) y uno atenuado en su virulencia (Bbi2A1) para persistir en el mismo medio de cultivo en forma simultánea se prepararon dos suspensiones de 10 % de eritrocitos parasitados con cada clon en MC (V/V) y con idéntica parasitemia (1 %). Tres réplicas se distribuyeron en botellas de 25 cm² y se incubaron como se

describió en el ítem 6.2.1. Los subcultivos se realizaron cada 48-72 h momento en el que se redujo la parasitemia al 1 %. Se tomaron alícuotas de cada réplica para la extracción de ADN.

6.2.5.2. Evaluación de la patogenicidad de los clones *in vivo*.

Para confirmar el fenotipo atenuado o patógeno de los clones obtenidos, se inocularon novillos de 1 año de edad y vacas adultas de raza Holando Argentino, libres de hemoparásitos.

Se realizaron dos ensayos para evaluar clones primarios y terciarios, detallados en la Tabla 2. Para ello, cada uno de los bovinos se inoculó por vía subcutánea con una suspensión de 10^7 EP en PBS. Se obtuvieron muestras de sangre con citrato de sodio al 5 % para la extracción de ADN de los clones inoculados. El citrato de sodio reemplaza al EDTA como anticoagulante debido a que puede disminuir la concentración de magnesio utilizado en la reacción de PCR (Khosravinia y Ramesha, 2007). Las muestras sin anticoagulante se usaron para la extracción de suero.

La reacción clínica generada por la infección se evaluó a través de los parámetros clínicos registrados en los bovinos diariamente a partir del 6^{to} día post inoculación. Para esto se midió la temperatura rectal, se determinó el período prepatente mediante frotis gruesos, la parasitemia a partir de frotis finos y se determinó el índice hematocrito a partir de sangre obtenida con EDTA en forma diaria. La reacción se controló durante 15 días y posteriormente se obtuvieron muestras de sangre cada 30 días. Como controles de la reacción clínica se inocularon 1-3 animales con las cepas parentales BbiS2P-i y BbiS1A-i, patógena y atenuada respectivamente.

Los animales fueron tratados con 3 mg.kg^{-1} de diminazene (Ganaseg[®]) cuando se registró una temperatura corporal ≥ 41 °C durante tres días consecutivos y/o un índice hematocrito ≤ 15 % y/o hemoglobinuria y/o parasitemia > 1 % para evitar la muerte de algunos de ellos.

Para el análisis de la parasitemia se utilizó una tabla de puntuación (*score*), asignando valores a los rangos de parasitemias observadas (Callow y Pepper, 1974). De esta manera se usó: 1- parásitos observables solo en frotis grueso; 2- muy pocos parásitos; 5- parásitos no muy numerosos pero fáciles de encontrar (1 en 300-500 eritrocitos); 10- 0,33 a 2 % de EP estimados y 15- más de 2 % de EP. El descenso máximo del hematocrito se estableció como proporción del menor valor observado con respecto a la media del hematocrito obtenida de tres muestreos previos a la inoculación.

Para el análisis de los parámetros se usó el test de ANOVA y las medias obtenidas se compararon con el test de Tukey y LSD con un porcentaje de confianza del 95 % en el software Statistics 1.

Tabla 2. Cepas y clones utilizados para la caracterización *in vivo* de *B. bigemina*. En el experimento 1 se evaluaron los clones primarios y en el experimento 2, los clones terciarios.

<i>Experimento</i>	<i>Inóculo</i>	<i>Fenotipo</i>	<i>Cepa/clon</i>	<i>Animales</i>
1	Bbi8P	Patógeno	Clon primario	2
	Bbi9P	Patógeno	Clon primario	2
	BbiS2P-i	Patógeno	Parental	2
	Bbi2A	Atenuado	Clon primario	2
	Bbi3A	Atenuado	Clon primario	2
2	Bbi8P1	Patógeno	Clon terciario	3
	Bbi9P1	Patógeno	Clon terciario	3
	BbiS2P-i	Patógeno	Parental	2
	Bbi2A2	Atenuado	Clon terciario	3
	Bbi3A1	Atenuado	Clon terciario	3
	BbiS1A-i	Atenuado	Parental	1

6.2.6. Caracterización molecular de los clones biológicos.

6.2.6.1. Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos.

6.2.6.1.1. ADN genómico (ADNg).

Para la extracción de ADNg, se utilizó el método basado en el uso del fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. Brevemente, a 800 µl de muestra, se le agregaron 800 µl de solución lisis de glóbulos rojos y se incubó a 37 °C durante 10 minutos. La mezcla se centrifugó a 13000 *xg* durante 10 min, se descartó el sobrenadante y se agregaron 1000 µl de agua destilada. Este procedimiento de lavado se realizó tres veces (cinco veces en muestras de sangre) hasta obtener un sobrenadante transparente. Al sedimento se le agregaron 400 µl de solución de lisis celular y 8 µl de proteinasa K de una solución de 20 mg/ml (Invitrogen®) y se incubó durante 2 horas a 58 °C en un termomixer (Eppendorf®).

Posteriormente se agregaron 200 µl de NaCl 5M y 400 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico a cada muestra y se centrifugaron a 13000 *xg* durante 10 min. La fase superior transparente (alcohol isoamílico) con el ADN, fue trasvasada cuidadosamente a tubos de 1,5 ml a los que previamente se les había agregado 400 µl de isopropanol. Esta solución se agitó suavemente 50 veces y se centrifugó a 13.000 *xg* durante 10 min. El sobrenadante se eliminó y el sedimento se

dejó secar durante 20 min. Se agregaron 500 µl de etanol 75 % y se centrifugó nuevamente usando las mismas condiciones. Finalmente, se dejó secar completamente el ADN y se lo resuspendió en agua libre de DNAsas y RNAsas. Para lograr la homogeneización total del ADN en el agua y la evaporación del etanol remanente, las muestras se incubaron a 65 °C durante una hora.

6.2.6.1.2. ADN plasmídico.

Se extrajo el ADN plasmídico a partir de 3 ml de cultivos de *E. coli* (descritos en 6.2.6.3.2.) mediante el kit comercial *Pure Link Quick Plasmid Miniprep Kit* (Qiagen®), basado en el método de lisis alcalina/SDS. Este método explota las diferencias en las propiedades de desnaturalización entre el DNA plasmídico (pequeños círculos de DNA cerrados covalentemente) y el DNA cromosómico (fragmentado). La alcalinización con NaOH en presencia de un detergente fuertemente aniónico (SDS), provoca la lisis celular, la desnaturalización del DNA cromosómico y de las proteínas, y la liberación de los plásmidos.

6.2.6.1.3. Análisis de la concentración y calidad del ADN.

Se utilizó el método de espectrofotometría de acuerdo a Gallagher y col. (2008). La suspensión de ADN se diluyó 1/20, 1/50 y 1/200 y la absorbancia se leyó en las longitudes de onda 260 nm (A260) y 280 nm (A280). La concentración de ADN [ADN] se calculó en µg/ml de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$[\text{ADN}] = A_{260} \times 50 \text{ µg/ml} \times \text{factor de dilución.}$$

La calidad del ADN extraído se consideró óptima cuando el cociente entre las longitudes de onda A260/A280 tuvo valores entre 1,6 y 2,0.

6.2.6.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La PCR fue realizada en un volumen final de 50 µl de una mezcla que contenía 1x buffer PCR Invitrogen® (200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl), 2,2 mM de MgCl₂, 0,008 mM de cada oligonucleótido y 2,5 U de Taq polimerasa (Invitrogen®). El programa utilizado se adaptó al fragmento a amplificar y el programa básico consistió de un período inicial de desnaturalización

del ADN a 95 °C por 5 min, seguida de 35 ciclos de 95 °C por 20 seg, 55-62 °C por 30 seg y 72 °C por 20-45 seg, finalmente se mantuvo a 72 °C durante 5 min. Simultáneamente con cada reacción de PCR, se incorporó una muestra para el control de contaminación, a la que no se adicionó ADN, un control de ADN de bovino normal y controles de ADNg de *B. bovis* y *A. marginale*. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 y se repitieron en un GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer®). Los productos de PCR (amplicones) fueron conservados a 4 °C hasta su uso.

6.2.6.2.1. Electroforesis para ADN.

Los amplicones se visualizaron mediante electroforesis en geles con 1,5 % de agarosa. La agarosa en polvo se suspendió en buffer TAE 1x, y se le agregó 0,4 µg de bromuro de etidio por ml de suspensión. Para la distribución en los geles, 10 µl de cada amplicon se diluyeron en 4 µl de solución de carga para ADN 3x. La corrida electroforética se realizó en cubas horizontales (BioRad®), a un voltaje constante de 65 V, empleando la solución TAE 1x. Los fragmentos fueron observados mediante un transiluminador de UV y su tamaño estimado mediante marcadores de peso molecular de 100 pb y 250 pb (Invitrogen®) y BenchTop Marker (Promega®). Las bandas generadas por los fragmentos fueron documentadas mediante el sistema de captura de imágenes G-box (Syngene®).

6.2.6.2.2. Purificación de los productos de PCR.

Los amplicones se purificaron mediante el kit comercial *QIAquick PCR purification Kit* (Qiagen®). Para la purificación de productos de PCR a partir de geles de agarosa se utilizó el sistema comercial *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen®) diseñado para extraer y purificar fragmentos de ADN de 70 pb a 10 Kpb. Trozos de gel con las bandas de ADN de interés se extrajeron utilizando una hoja de bisturí, se solubilizaron, y el ADN se adsorbió a una matriz de sílice en presencia de alta concentración salina. Finalmente se lavó y eluyó en buffer TE.

6.2.6.3. Clonado molecular de productos de PCR.

6.2.6.3.1. Clonado en el vector.

La reacción de ligación se realizó en el vector *pGEM T-easy* con aproximadamente 25 ng de la suspensión de amplicones purificados y 1U de T4 DNA ligasa (Promega®) en un volumen final

de 10 μ l. La reacción molar inserto:vector fue de 3:1 en la solución incluida en el kit comercial del vector (Promega[®]). La reacción se llevó a cabo a 4 °C durante 16 h.

6.2.6.3.2. Transformación de *E. coli* competentes y selección de clones.

La transformación de las *E. coli* competentes se realizó mediante choque térmico, utilizando 3 μ l de los productos de ligación correspondientes. El choque térmico se logró mediante la incubación de la suspensión en hielo durante 20 min seguido de la incubación a 42 °C durante 45 seg e incubación final en hielo durante 2 min. A continuación se añadieron 600 μ l de medio LB a la suspensión de células transformadas y se completó con la incubación a 37 °C durante 1 h en agitación. Finalmente las bacterias transformadas se sembraron en placas de LB agarizado después del agregado de 100 μ g/ml de ampicilina, 40 μ l de X-Gal (40 μ g/ml) y 10 μ l de IPTG (1M). Las placas se incubaron a 37 °C durante 16 h hasta la aparición de colonias blancas y azules. Las colonias azules fueron descartadas porque corresponden a las células transformadas con el vector que lleva el gen de la β -galactosidasa funcional y por inducción con IPTG produjeron la enzima capaz de hidrolizar al X-Gal y generar color azul. Las colonias blancas fueron las seleccionadas porque fueron las células transformadas que llevaban un gen de la β -galactosidasa no funcional por inserción exitosa del fragmento de ADN. La selección de clones transformantes de las bacterias que formaron colonias blancas, se realizó mediante la amplificación del gen insertado en el vector, usando una PCR como fue descrito previamente.

Las bacterias transformadas se identificaron mediante PCR y se multiplicaron *in vitro* a 37 °C durante 16 h. El medio de cultivo LB líquido se distribuyó en tubos de polipropileno de 15 ml y se inoculó con bacterias obtenidas de colonias puras aisladas de cultivos sólidos. La incubación se realizó a 37 °C durante 16 h con agitación a 250 rpm en un incubador-agitador orbital.

El almacenamiento de las cepas de *E. coli* durante largos períodos de tiempo, se realizó a -70 °C, criopreservadas con glicerol al 15 % (V/V) (Ausubel y col., 2008).

6.2.6.4. Secuenciación.

Tanto los productos de PCR purificados como los vectores clonados y purificados, fueron remitidos al laboratorio de secuenciación de la empresa Macrogen (USA-Corea) y del Ibiotec -

Servicio Interno de Genotipificación y Secuenciación de ADN (SIGYSA), INTA-Castelar (Buenos Aires).

6.2.6.5. Evaluación de marcadores moleculares para *B. bigemina*.

Los oligonucleótidos seleccionados para amplificar las secuencias usadas como marcadores moleculares se describen en la Tabla 3. La ubicación de los mismos en el respectivo gen se analizaron con respecto a la cepa de referencia JG-29, indicándose el número de acceso de GenBank correspondiente. Los micro y mini-satélites utilizados se describen en la Tabla 4.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación completa o fragmentos de los genes *18S rARN*, *rap-1c*, *gP45* y las secuencias ITS para la caracterización de *Babesia bigemina*.

Gen	Nombre	Secuencia 5'-3'	Número de acceso GenBank	T _h (°C)	Referencia
<i>18S rARN</i>	18sF1	TTTTGCTTTGCGACTCCTGGCGG	X59604	60	Esta tesis
	18sR1	CTAAGAATTTACCTCTGACAGT		60	Esta tesis
	18sF2	ACCAATTGGAGGGCAAGTCT		60	Esta tesis
	18sR2	TTGAAGCACAGGAGTCCCTCTA			
	18sF3	TGCATGGCCGTTCTTAGTTGGT			
	18sR3	AGAGCACGCATCACATGACA			
	BigRaffor	CGAGGCCTTTTGGCGGCGTTTATTAG	X59604	62	Esta tesis
	BigRafrev	ACAAATCTAAGAATTTACCTCTGAC			
<i>ITS</i>	ITSfor	AGTCGTAACAAGGTTTCCGTAG	EF458232.1	57	Esta tesis
	ITSrev	ATGCTTAAATTCGGCGGATGGC			
<i>Gp45</i>	TGF1.0	CTCGCTACGTTTTTCTATCGC	AF298631.1	58	Fisher y col., 2001
	TGF10R	AGTTGATCGCGTGTACCTGAT		58	Esta tesis
	gp45for-1	CTGCAAAGCAATGTAGCACCATC			
	gp45rev-1	GCTTTCGTCAAGAGTACTCAACCC			
<i>Rap-1c</i>	rap-1cfor1	CTACGCTTGCCTCATTATCGCA	AF026272.1	58	Esta tesis
	rap-1crev1	ATGTAAGTGCCTGTAACCGTAGG			
	rap-1cfor	AGAGTGAAAATGGCGAACTCGC			
	rap-1crev	TTACGACGATCGTTTGAAGTAC			

T_h: temperatura de hibridación

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación y análisis de microsatélites y minisatélites útiles para la caracterización de *Babesia bigemina*.

Contig	Nombre	Secuencia 5' 3'	T_h (°C)
2737	2737for	CACAGGCTTGCGTTCTTTGT	58
	2737rev	GCTCGCATTGCAGCAATAAC	
4135	4135for	CGCCAGTTCGTATTCAATCCGT	57
	4135rev	CCTTCTCCTTACGCTGCAGTT	
4179	4179for	TTGTCGCCGATTCCATCAATGT	58
	4179rev	TGGACCTGTCTAGACCGTGAAA	
4177	4177for	CTGGATTTCACGATTGTGCTC	57
	4177rev	TTCAGAGGTAGGTCAGAGTCTG	

T_h: temperatura de hibridación

6.2.6.5.1. Gen 18S rARN.

Para obtener la secuencia completa del gen se utilizaron los tres pares de oligonucleótidos 18sF1/18sR1; 18sF2/18sR2 y 18sF3/18sR3. Los tres fragmentos amplificados poseen regiones en sus extremos cuyas secuencias se superponen y de este modo se pudo analizar la totalidad del gen *18S rRNA*, de cada una de las cepas de referencia (Figura 10). Los productos amplificados con los oligonucleótidos BiRaffor/BiRafrev a partir de las cepas de referencia y de 7 muestras de ADN de bovinos infectados fueron clonados y secuenciados.

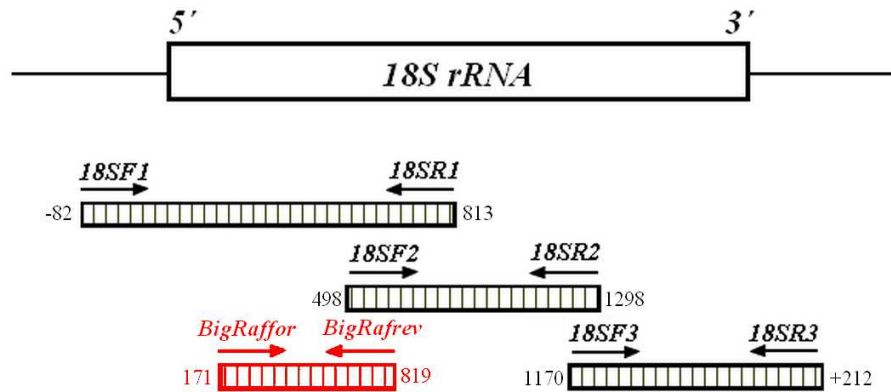


Figura 10. Esquema de los fragmentos del gen *18S rARN* de *Babesia bigemina* amplificados de las cepas de referencia mediante los oligonucleótidos 18sF1/18sR1; 18sF2/18sR2 y 18sF3/18sR3 y BiRaffor/BiRafrev. Las flechas indican la orientación de los oligonucleótidos, y el número de cada extremo la posición de los nucleótidos iniciales y finales de los fragmentos. El gen está representado por un rectángulo vacío y los fragmentos por rectángulos con barras. El fragmento rojo se amplificó también de 7 aislamientos naturales.

6.2.6.5.1.1. Diagnóstico basado en el gen *18S rARN*.

Se desarrolló una PCR para la identificación específica de cepas de referencia y para la identificación de ADN de *B. bigemina* en muestras de sangre de bovinos con babesiosis clínica, y de regiones donde la garrapata *R. microplus* es enzoótica. Para ello se diseñaron oligonucleótidos mediante el alineamiento de las secuencias del gen *18S rARN* de diferentes especies de *Babesia* (*B. bovis*, *B. microti*, *B. rodhaini*, *B. canis*, *B. orientalis*), disponibles en Genbank, lo que permitió identificar las regiones conservadas y variables del gen y diseñar los oligonucleótidos BigRaffor/BiRafrev con los que se amplificó un fragmento de 642 pb (Tabla 3, Figura 10). La especificidad de la PCR se evaluó utilizando ADN de las cepas de *B. bigemina* de referencia y ADN de la cepa BboS2P de *B. bovis*, la cepa Am2 de *A. marginale* y de leucocitos de un bovino normal. Para determinar la sensibilidad de la prueba, se realizaron diluciones seriadas en base 10 de una suspensión de EP (1 %) obtenidos de cultivos *in vitro*. De cada dilución se tomaron 100 µl de eritrocitos y se extrajo ADN mediante el método detallado en 6.2.6.1.1. Para evaluar la especificidad de los oligonucleótidos, los fragmentos de ADN de 48 muestras de aislamientos naturales se amplificaron mediante PCR y se secuenciaron.

6.2.6.5.1.2. Hibridación en fase reversa (RLBH).

Esta técnica se implementó de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Las sondas incluidas en la membrana se detallan en el Apéndice II, donde la utilizada para *B. bigemina* se denominó *sondaBbi*. Se realizó una PCR utilizando los oligonucleótidos RLB-F2/RLBR2 (5'-GACACAGGGAGGTAGTGACAAG/5'-**Biotina**-CTAAGAATTTACCTCTGACAGT) y Ehr-F/Ehr-R (5'-GGAATTCAGAGTTGGATCMTGGYTCAG/5'-**Biotina**-CGGGATCCCGAGTTTG CCGGGACTTYTTCT) para amplificar las secuencias específicas de *Babesia/Theileria* y *Ehrlichia/Anaplasma*, respectivamente. Brevemente, 10 µl del producto de PCR se diluyeron con 150 µl 2x SSPE/0,1 % SDS y se desnaturalizaron a 100 °C durante 10 min. La membrana se incubó a temperatura ambiente en ~10 ml 2x SSPE/0,1 % SDS, se ubicó en el miniblotter y sobre ella se sembraron los productos diluidos. La hibridación se realizó a 42 °C durante 60 min en una superficie horizontal. Luego, se aspiró la suspensión excedente y se sacó la membrana del blotter. La membrana se lavó dos veces con 2x SSPE/0.5 % SDS en un baño de agua con agitación, durante 10 min. Para la detección final, la membrana se incubó con 10 ml 2x SSPE/0.5 % SDS + 2.5 µl de conjugado streptavidina-peroxidasa (1,25U) a 42° C durante 30 min. Finalmente se realizaron lavados con 2x SSPE/0.5 % SDS a 42 °C durante 10 min con agitación. Se reveló mediante quimioluminiscencia en placas Hyperfilm (Amersham®). Se evaluaron las cepas de referencia BbiM1A, BbiS3-i, BbiM1P, Bbi9P1, JG29, BbiS2P-i de *B. bigemina* y las cepas BboS2P y BboR1A de *B. bovis* y Am2 de *A. marginale*.

El análisis de ADN de 30 muestras de sangre de bovinos infectados y 40 muestras de sangre de búfalos clínicamente normales, permitió calcular la concordancia de positivos y negativos con respecto a PCR y ELISA. Se determinó el índice *kappa* (*K*) y el error estándar con un intervalo de confianza de 95 % usando el software Medcalc.

El grado de acuerdo se categorizó según *K* de Cohen como *k*=0 no existe concordancia; *k*=0,4-0,5 concordancia moderada; *k*=0,5-0,6 concordancia aceptable; *k*=0,6-0,8 concordancia buena *k*= 0,8 concordancia muy buena y *k*=1 concordancia perfecta (Norman y Streiner, 2000).

6.2.6.5.2. Gen *rap-1c*.

Después de la secuenciación del gen *rap-1c* completo de las cepas BbiS1A-i y BbiS2P-i, se seleccionó y amplificó por PCR un fragmento de ADN de 287 pb de 15 cepas de referencia y de 29 muestras de sangre de bovinos infectados naturalmente por *B. bigemina*. Este fragmento,

localizado en la región 3' carboxi-terminal del gen, se amplificó mediante los oligonucleótidos rap-1cfor/rap-1crev. Los amplicones de las cepas de *B. bigemina* de referencia y 13 de las 30 muestras de ADN de bovinos infectados (5 con babesiosis aguda) fueron clonados y secuenciados.

6.2.6.5.2.1. rt-PCR. Curvas de disociación.

Después de la amplificación de fragmentos de ADN de cada una de las cepas de *B. bigemina* y las especies utilizadas como controles (Tabla 1), utilizando los oligonucleótidos rap-1cfor/rap-1crev y mediante rt-PCR, las cepas de referencia argentinas se genotipificaron mediante HRM. Para evaluar la eficiencia de la rt-PCR se realizó una curva de estándares de las cepas BbiS1A-i y BbiS2P-i, utilizando diluciones seriadas de ADN de cada cepa por duplicado. Se calculó a) un valor umbral definido como el límite a partir del cual los amplicones se incrementan en forma exponencial, b) se registró el ciclo (CT) al cual se atraviesa dicho umbral y c) se construyó una curva de eficiencia en función de las concentraciones de los estándares. También se analizó el coeficiente de variación intra-ensayo. Para ello se utilizaron 5 muestras de ADN de cada una de los clones Bbi2A1 y Bbi9P1, y se calculó el promedio de la diferencia entre ellas. Se realizaron 9 réplicas sucesivas de este procedimiento para evaluar la repetibilidad de los resultados obtenidos mediante HRM.

Para la rt-PCR se utilizó la mezcla Real-qPCR (Biodynamics) que contiene los reactivos requeridos por la PCR clásica a la que se le adiciona el fluorocromo Eva Green[®]. La prueba se realizó en un Rotor-Gen-Q-6000 (Qiagen[®]). El programa consistió de una desnaturalización inicial del ADN a 94 °C, 10 min, 40 ciclos de 94 °C 10 seg, hibridación a 62 °C, 20 seg y extensión a 72 °C 30 seg, seguido de una extensión final a 72 °C 5 min. El análisis de las temperaturas de disociación se realizó en un rango entre 83 a 93 °C, con incrementos de 0,3 °C. Las cepas Bbi2A1 y Bbi9P1 se utilizaron como haplotipos referentes para caracterizar los genotipos atenuados (*gA*) y patógenos (*gP*), respectivamente. Los resultados obtenidos se analizaron con el software del mismo equipo.

6.2.6.5.3. Gen *gp-45*.

Se analizó el gen completo de la proteína GP-45 (McElwain y col., 1991), caracterizada por la heterogeneidad de los pesos moleculares observados entre diferentes cepas de *B. bigemina*. Más

adelante, Fisher y col. (2001) lograron avanzar en su caracterización molecular, evidenciando polimorfismos entre aislamientos de diferentes regiones. Además de los oligonucleótidos descritos por estos autores, se diseñaron otros *ad hoc* para esta tesis (Figura 11).

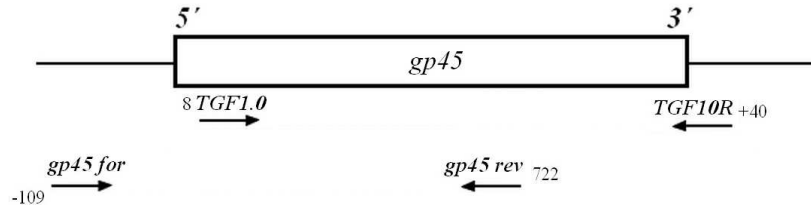


Figura 11. Esquema del gen *gp45* completo de *Babesia bigemina*. Las flechas indican la orientación de los oligonucleótidos usados para amplificar diferentes fragmentos mediante la PCR y los números la ubicación en el gen.

6.2.6.5.4. Espaciador transcritpo interno (ITS).

Se amplificó mediante PCR las regiones ITS-1 e ITS-2 adyacentes a los genes ribosomales *18S rARN*, *5.8S rARN* y *28S rARN*. En la Figura 12 se detalla la ubicación de los oligonucleótidos diseñados *ad hoc*. Los productos amplificados a partir de las cepas BbiS1A-i y BbiS2P-i y un clon de cada una, fueron clonados y secuenciados.

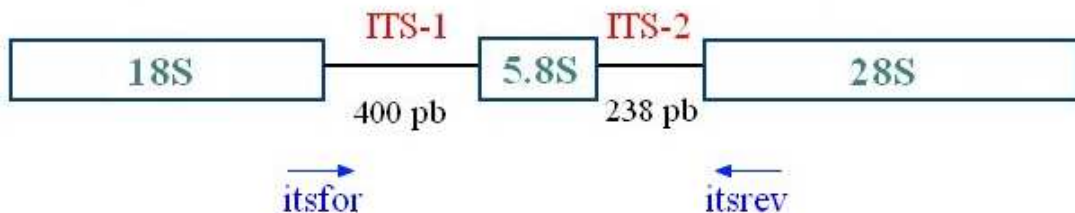


Figura 12. Esquema de los genes ribosomales y los ITS de *Babesia bigemina*. Las flechas indican la orientación de los oligonucleótidos usados para amplificar los ITS mediante la PCR. Los genes 18S, 5,8S y 28S están representados por un cuadrado vacío, y se detalla el tamaño de los ITS.

6.2.6.5.5. Secuencias repetitivas.

Para definir las secuencias repetitivas para *B. bigemina*, se utilizó el genoma completo sin anotar de una cepa australiana, secuenciada en el Instituto Sanger. Estos *contigs* están disponibles en el URL: http://www.sanger.ac.uk/Projects/B_bigemina/.

A partir de ellos se identificaron secuencias con repeticiones a través del software *Tandem Repeats Finder* 4.00 (Benson, 1999). Este software permite filtrar la búsqueda de secuencias repetitivas a través de los siguientes parámetros:

- **Parámetros de alineamiento** (*Alignment parameters*): Asume puntajes diferentes para los pares equivalentes (*match*), diferentes (*mismatch*) e inserciones/deleciones (*indel*). Cuanto menor sea el puntaje, el programa buscará secuencias con mayor cantidad de errores.
- **Score de mínimo alineamiento** (*Minimum alignment score to report repeat*): Score calculado en la secuencia repetitiva para que sea reportada como tal.
- **Tamaño de período máximo** (*Maximum period size*): Es el tamaño máximo de la secuencia repetitiva reportada.

Los parámetros utilizados para este trabajo fueron: *Match: 2 Mismatch: 7 Indel: 7; Maximum Score of Alignment to report repeat: 50 y Maximum Period Size: 500*. Para la elección de las repeticiones se buscaron secuencias con más de 7 repeticiones y de tamaño tal que los amplicones generados no superen los 400 pb. A partir de las secuencias se diseñaron oligonucleótidos *ad hoc* de las secuencias flanqueantes a las repeticiones (Tabla 4) y se evaluó la especificidad de cada uno de ellos en muestras de ADN de *B. bigemina*, *B. bovis*, *A. marginale* y muestras de ADN de sangre de bovino libre de *Babesia* spp. y/o *Anaplasma* spp. Se denominaron mediante las siglas MS y ms para mini- y microsatélites respectivamente, seguidas del número de *contig* donde fueron encontradas. Estas secuencias fueron analizadas en geles de agarosa al 4 %. Para determinar la presencia de una única copia de los mini- y microsatélites en el genoma de *B. bigemina*, se clonaron secuencias obtenidas de los clones biológicos Bbi3A1 y Bbi8P1. Se secuenciaron todas las cepas de referencia y 21 muestras de aislamientos de infecciones naturales.

6.2.6.6. Análisis de secuencias de ADN.

La edición y los alineamientos múltiples de todas las secuencias se realizaron con el programa BioEdit[®] (Hall, 1999). Se definieron haplotipos para la región hipervariable *18S rARN* de las

diferentes muestras de cepas de referencia y aislamientos. Estos haplotipos fueron analizados mediante matrices binarias, de presencia (1) y ausencia (0). Para determinar el agrupamiento entre ellos, se utilizó el método UPGMA (Sokal y Sneath, 1963), utilizando el coeficiente de Jaccard (Jaccard, 1908). Finalmente, se visualizaron mediante un dendograma, con el software NTSys versión 2.01 e (Rohlf, 1997).

Para poder identificar las diferentes regiones del gen *18S rARN* (en particular las regiones variables y conservadas), se predijo la estructura secundaria del gen a partir de la base de datos ribosomal Europea (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/rRNA/ssu/>). Esta secuencia se visualizó y terminó de diseñar manualmente con el software Rnaviz 4.5[®] (de Rijk y de Wachter, 1997). La región hipervariable V4 se diseñó de acuerdo a Wuyts, y col. (2000).

Para analizar las secuencias obtenidas del fragmento 3' de *rap-1c* se utilizó el método de distancia Neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987) mediante el software Mega 4.0.1 (Tamura y col., 2007). El modelo utilizado fue el de Kimura-2-parámetros, eliminando las inserciones y deleciones ocurridas paralelamente en las secuencias. Este modelo es una extensión del modelo básico de Jukes-Cantor y asume que la proporción de los cuatro nucleótidos es igual y que la tasa de transiciones es distinta a la de transversiones (Kimura, 1980). El soporte estadístico del árbol filogenético fue evaluado a través de un análisis de *bootstrap* con 1000 repeticiones.

En muestras de animales infectados naturalmente con *B. bigemina* (portadores crónicos) se determinó la presencia de más de un haplotipo de *rap-1c*, mientras que las muestras de animales clínicos, presentaban un solo haplotipo característico. Para evaluar la relación entre el número de haplotipos y la ocurrencia de la enfermedad de forma aguda, se obtuvieron clones moleculares de 13 de ellas. Las secuencias de *rap-1c* obtenidas de estos clones se analizaron mediante el test de Análisis de varianza molecular (del inglés AMOVA) (Excoffier y col., 1992), donde se calculó el índice de fijación (F_{st}) utilizando el software Arlequín[®] (Excoffier y col., 2005) con un test de significancia de 1000 permutaciones. El índice de fijación indica la variación de las frecuencias alélicas entre las muestras y por lo tanto, la diferencia genética entre ellas.

Para analizar las secuencias obtenidas del gen *gp-45* se utilizó el método de distancia Neighbor-joining, de acuerdo a las características descritas para el gen *rap-1c*.

Finalmente, los haplotipos obtenidos para las secuencias repetitivas de las diferentes muestras de cepas de referencia y aislamientos, fueron analizados mediante matrices binarias, de presencia (1) y ausencia (0) con el método UPGMA, al igual que lo utilizado para los haplotipos de *18s ARN*.

6.2.7. Prueba inmunoenzimática en fase sólida (ELISA).

Para cuantificar la proporción de anticuerpos contra *B. bigemina* en muestras de suero de bovinos, se utilizó un ELISA indirecto basado en antígenos nativos purificados. Se sensibilizaron placas de 96 celdas con fondo plano (COSTAR-3590[®]) con extracto proteico de merozoitos de *B. bigemina* BbiS1A-i purificados, diluidos 1:100 en solución 0,05 M carbonato/bicarbonato (pH 9,6). Las placas se incubaron a 37 °C durante 1 h y a 28 °C durante 35 min en solución de bloqueo (20 % leche descremada, 0,05 M carbonato/bicarbonato, pH 9,6). Luego de cuatro lavados con solución de lavado (PBS-T), las placas se incubaron a 28 °C durante 30 min en agitación con los anticuerpos primarios diluidos en solución PBS/0,075 M EDTA/EGTA (pH 6,3). Transcurrido ese período de incubación, se realizaron nuevamente cuatro lavados para eliminar los anticuerpos libres y evitar reacciones inespecíficas. Posteriormente las placas fueron incubadas con los anticuerpos secundarios diluidos en solución PBS-T, a 28 °C durante 40 min, en agitación. Después de 4 nuevos lavados para eliminar los anticuerpos secundarios libres, se agregaron a cada pocillo 100 µl de una solución 3 % de H₂O₂ y 0,04M de ABTS como sustrato/cromógeno y se incubaron en agitación constante durante 5 min. Finalmente se obtuvo la densidad óptica de cada reacción mediante un espectrofotómetro para microplacas preparado para emitir 405 nm (Labsystem Multiskan[®]). Los resultados se expresaron en porcentajes de positividad respecto de un suero control positivo anti-*B. bigemina* y un suero negativo de referencia internacional. Valores ≥ 35 % de positividad se consideraron pertenecientes a bovinos con antecedentes de babesiosis.

7. RESULTADOS.

7.1. Clonación biológica.

7.1.1. Obtención de clones biológicos.

La técnica microscópica para contar protozoarios intracelulares teñidos con naranja de acridina, permitió establecer en forma repetible la concentración de EP por ml de cada suspensión, así pudieron prepararse las diluciones límite usadas para obtener los clones biológicos. Este método de recuento fue evaluado por dos técnicos de laboratorio quienes realizaron idénticas diluciones a partir de la misma suspensión y completaron 5 repeticiones.

Se obtuvieron 7 clones terciarios (Bbi8P1, Bbi8P2, Bbi8P3, Bbi8P4, Bbi9P1, Bbi9P2 y Bbi9P3) a partir de 2 clones secundarios derivados de la cepa parental BbiS2P-i. Simultáneamente se obtuvieron 5 clones terciarios (Bbi2A1, Bbi2A2, Bbi2A3, Bbi3A1, Bbi3A2) a partir de 2 clones secundarios derivados a su vez de la cepa parental BbiS1A-i. La secuencia de clones obtenidos se muestran en la Figura 13. Para lograr estos clones se realizaron 160 procedimientos de clonado a partir de las dos cepas de referencia mencionadas. El tiempo transcurrido para identificar la presencia de los clones terciarios varió entre 9 y 28 días (media 17 días) para los derivados de la cepa patógena y entre 21 y 27 días (media 24) para los derivados de la cepa atenuada. La diferencia entre ambos períodos promedio no fue estadísticamente significativa ($P > 0,05$).

La probabilidad de Poisson de obtener un clon luego de dos repeticiones de clonado (clones secundarios y terciarios) fue del 97 % para la cepa BbiS2P-i y de 98 % para la cepa BbiS1A-i.

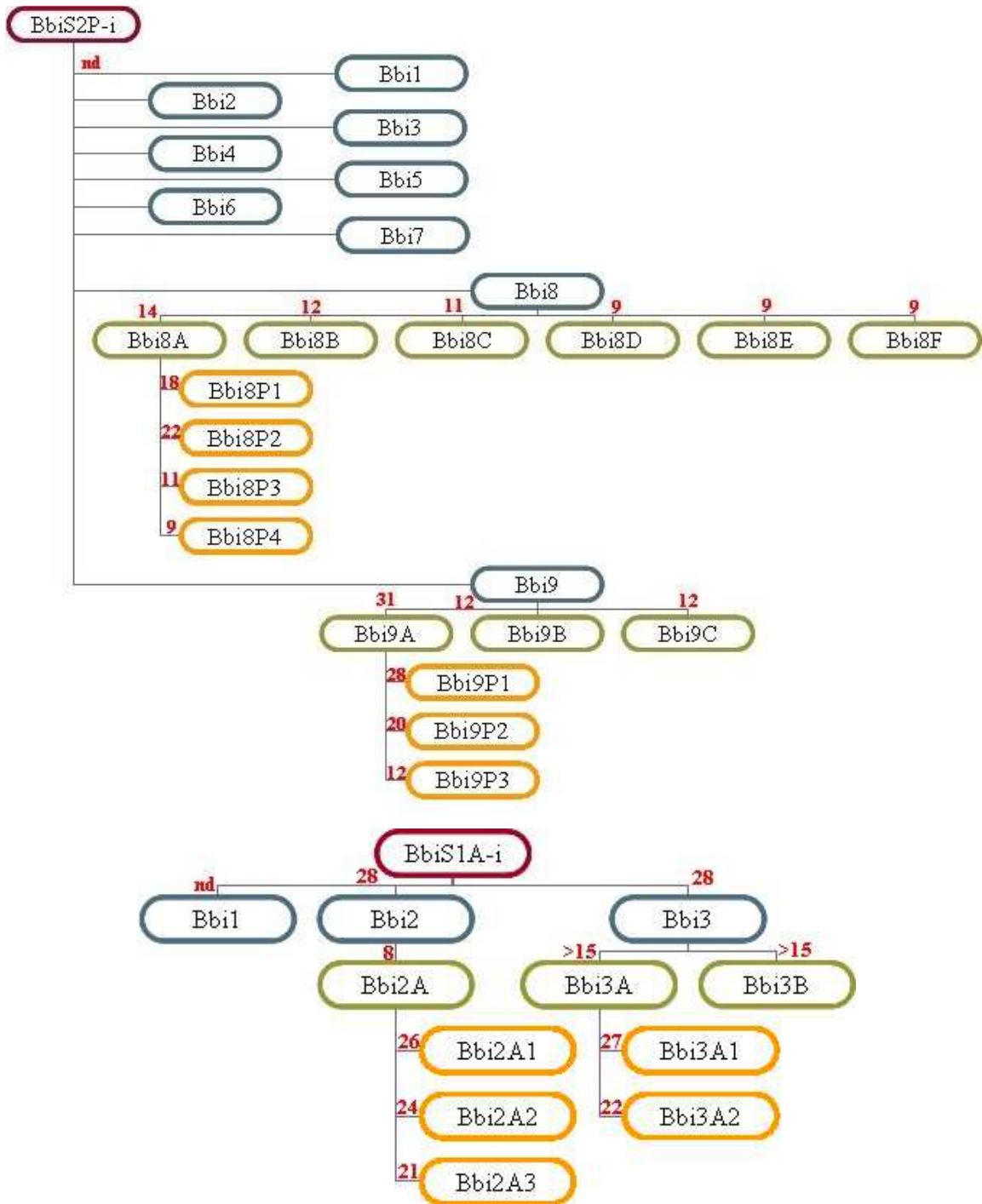


Figura 13. Secuencia de clones primarios, secundarios y terciarios obtenidos a partir de las cepas de *B. bigemina* BbiS2P-i y BbiS1A-i. El óvalo rojo corresponde a las cepas parentales, el azul a clones primarios, el verde a clones secundarios y el naranja a clones terciarios. El número de días transcurridos hasta la primera detección de un eritrocito parasitado se agregó en rojo junto al nombre del clon respectivo. nd: no determinado.

7.2. Caracterización de los clones por su fenotipo de patogenicidad.

7.2.1. *In vitro*.

La evaluación de la parasitemia máxima promedio alcanzada por los clones patógenos y atenuados primarios en tres réplicas de cultivos continuos *in vitro*, al final de cada uno de los cuatro períodos de 72 horas (subcultivos), fue de 5,6 % y 1,74 % respectivamente ($p < 0,05$). Para confirmar *in vivo* el fenotipo de los clones primarios (7.2.2.) se seleccionaron aquellos que requirieron los períodos más prolongados para su detección (patógenos Bbi8P y Bbi9P o atenuados Bbi2A y Bbi3A).

No se observaron parasitemias promedio significativamente diferentes entre los clones terciarios provenientes de la misma cepa parental. Para la confirmación *in vivo* del fenotipo expresado por los clones terciarios (7.2.2.) se siguió el mismo criterio de selección descrito en el párrafo anterior (patógenos Bbi8P1 y Bbi9P1 o atenuados Bbi2A1 y Bbi3A1).

Los resultados del Experimento 3 se muestran en 7.3.5.

7.2.2. *In vivo*.

Todos los bovinos inoculados con clones primarios y terciarios, presentaron un período prepatente promedio de 5 días post inoculación.

Los bovinos inoculados con los clones primarios Bbi8P, Bbi9P y su cepa parental BbiS2P-i patógena, mostraron parasitemias más elevadas y por ende un mayor *score* ($p < 0,05$) que los inoculados con los clones Bbi2A y Bbi3A, derivados de la cepa no-patógena BbiS1A-i. La temperatura media acumulada y la media del descenso máximo del hematocrito no fueron significativamente diferentes entre los bovinos inoculados con los clones patógenos y atenuados. La excepción fue la de los clones Bbi3A y Bbi8P que mostraron diferencias significativas en el descenso máximo del hematocrito. Los bovinos inoculados con los clones primarios Bbi8P y Bbi9P requirieron tratamiento específico para evitar la muerte por anemia, mientras que los animales inoculados con la cepa parental BbiS2P-i superaron la etapa aguda sin tratamiento alguno (Tabla 5).

Tabla 5. Parámetros clínicos obtenidos de bovinos Holando Argentino inoculados con clones primarios patógenos y no patógenos de *Babesia bigemina*, y la cepa parental BbiS2P-i.

Cepa/ Clon	Bovinos inoculados (n)	Temperatura acumulada >39,5°C Media	% depresión máxima del hematocrito Media	Parasitemia media Score	Bovinos tratados
Bbi8P	2	1,7 ± 1,2 ^a	47,0 ± 7,1 ^a	7,3 ± 4.6 ^a	2/2
Bbi9P	2	1,4 ± 1,8 ^a	37,5 ± 6,4 ^{ab}	7,3 ± 4.6 ^a	2/2
BbiS2P-i	2	2,4 ± 0,7 ^a	35,0 ± 8,5 ^{ab}	12 ± 3.5 ^a	0/2
Bbi2A	2	0,0 ± 0,0 ^a	29,5 ± 4,9 ^{ab}	2 ± 0.0 ^b	0/2
Bbi3A	2	0,3 ± 0,2 ^a	24,5 ± 10,6 ^b	1 ± 0.0 ^b	0/2

*: Los valores con letras superíndice diferentes en cada columna, tienen diferencias significativas (p < 0,05);

Los bovinos inoculados con los clones terciarios patógenos (Bbi8P1 y Bbi9P1) tuvieron un mayor descenso del hematocrito e incremento de la parasitemia que el sufrido por los clones atenuados (Bbi2A1 y Bbi3A1) y su cepa parental BbiS1A-i (p<0,05). La media de la temperatura corporal acumulada sobre 39,5 °C y la media del descenso máximo del hematocrito fueron mayores en los clones patógenos que en su cepa parental (p<0,05). Sólo el *score* de parasitemia coincidió totalmente para ambos fenotipos de cada clon o cepa parental. Los bovinos inoculados con el clon patógeno Bbi8P1 al igual que los inoculados con cepas/clones atenuados no requirieron tratamiento quimioterápico. Tampoco requirieron tratamiento uno de los bovinos inoculados con el clon Bbi9P1 y uno de los inoculados con la cepa BbiS2P-i. El clon atenuado Bbi3A1, generó una reacción más benigna que la provocada por su cepa parental (Tabla 6).

Tabla 6. Parámetros clínicos obtenidos de bovinos Holando Argentino inoculados con clones terciarios de *Babesia bigemina* y sus cepas parentales.

Cepa/Clon	Bovinos inoculados (n)	Temperatura acumulada >39,5°C Media	% depresión máxima del hematocrito	Parasitemia score Media	Bovinos tratados
Bbi8P1	3	1,0 ± 1,0 ^a	35,7 ± 8,4 ^a	10,0 ± 0,0 ^a	0/3
Bbi9P1	3	3,0 ± 2,8 ^b	36,3 ± 3,8 ^a	10,0 ± 0,0 ^a	2/3
BbiS2P-i	2	0,6 ± 0,2 ^a	33,5 ± 0,2 ^b	7,5 ± 0,0 ^a	1/2
Bbi2A2	3	1,0 ± 1,0 ^a	27,3 ± 3,8 ^b	1,3 ± 0,2 ^b	0/3
Bbi3A1	3	0,03 ± 0,1 ^c	24,0 ± 9,5 ^b	2 ± 0,0 ^b	0/3
BbiS1A-i	1	0,9 ^{nc}	31,0 ^{nc}	2 ± 0,0 ^{nc}	0/1

*: Los valores con letras superíndice diferentes en cada columna, tienen diferencias significativas ($p < 0,05$);

^{nc}: no corresponde.

Basados en los signos clínicos de los animales inoculados, los clones terciarios derivados de la cepa atenuada mantuvieron el mismo fenotipo de patogenicidad que su cepa parental, mientras que los derivados de la cepa patógena (Bbi8P1 y Bbi9P1), mostraron variaciones en su virulencia en los bovinos inoculados. Los dos animales inoculados con la cepa patógena parental BbiS2P-i también mostraron reacciones clínicas diferentes.

7.3. Caracterización molecular.

7.3.1. Gen *18S rARN*.

7.3.1.1. Diagnóstico.

7.3.1.1.1. PCR. Sensibilidad.

Los oligonucleótidos diseñados para amplificar el gen *18S rARN*, permitieron la identificación y cuantificación inequívoca a partir de la cepa BbiS1A-i de *B. bigemina*. La técnica permitió detectar una dilución de hasta 1×10^{-6} (Figura 14).

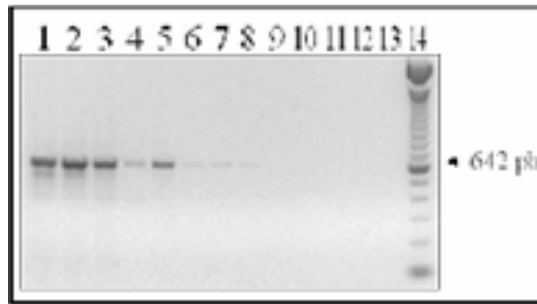


Figura 14. Amplificación del gen *18S rARN* de la cepa BbiS1A-i de *Babesia bigemina* mediante PCR a partir de suspensiones con diferentes porcentajes de eritrocitos parasitados. Columna (Col.) 1: 7 %; Col. 2: 1 %; Col. 3: 10^{-1} %; Col. 4: 10^{-2} %; Col. 5: 10^{-3} %; Col. 6: 10^{-4} %; Col. 7: 10^{-5} %; Col. 8: 10^{-6} %; Col. 9: 10^{-7} %; Col. 10: 10^{-8} %; Col. 11: BboS2P-i; Col. 12: DNA de bovino normal; Col. 13: control de reactivos y Col. 14: Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen®). Gel: agarosa al 1,5 %.

7.3.1.1.2. RLBH.

Todas las secuencias amplificadas de las diferentes cepas de *Babesia* evaluadas hibridaron con la sonda común a los géneros *Theileria* y *Babesia* (Protozoarios *Apicomplexa*) y no reaccionaron con la sonda común a *Ehrlichia/Anaplasma* (Bacterias). Después de reiterados intentos, las cepas de *B. bigemina* Bbi9P1, BbiS2P-i, BbiS1A-i, BbiS2A-i, BbiM1A no pudieron ser detectadas, mientras que las cepas JG-29, BbiS3-i y BbiM1P generaron una señal positiva específica para *B. bigemina*. Las cepas control BboS2P-i y BboR1A-i sólo hibridaron con las sondas específicas para *B. bovis* (Figura 15). Debido a la falta de hibridación de los productos de PCR específicos para *B. bigemina* con las sondas presentes en el kit comercial de RLBH, no se utilizó como marcador molecular intraespecie.

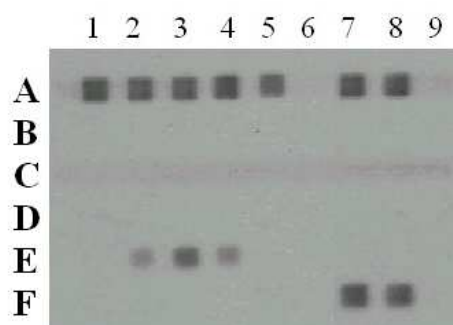


Figura 15. Membrana marcada con sondas de ADN (Isogen[®]) usada para la prueba de RLBH. A-F: filas correspondientes a las sondas unidas a la membrana (A) T/B catch all; (B) *B. felis*; (C) *B. divergens*; (D) *B. microti*; (E) *B. bigemina* y (F) *B. bovis*. 1-9: columnas con los amplicones de cada cepa de *B. bigemina*, u organismo control: (1) Bbi9P1; (2) BbiS3-i; (3) JG-29; (4) BbiM1P; (5) BbiM1A; (6) Am2 (control); (7) BboS2P-i (control); (8) BboR1A-i (control); (9) Control de reactivos.

7.3.1.1.3. Comparación de PCR con ELISA.

La presencia de *B. bigemina* en bovinos de áreas endémicas fue detectada por las dos pruebas de diagnóstico evaluadas. La proporción de muestras de sangre de bovinos infectados con *B. bigemina* fue del 83 % por PCR y la proporción de positivos al ELISA fue de 90 %. No se detectaron búfalos positivos a *B. bigemina* por ninguna de las dos pruebas. Sin embargo, si se detectaron animales positivos a *B. bovis*. Las pruebas de PCR y ELISA mostraron un índice *K* categorizado como muy bueno. Los valores de concordancia e índice *kappa* encontrados entre las pruebas se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Valores de concordancia (%) e índice *kappa* obtenido entre las pruebas de PCR y ELISA en 70 muestras de sangre obtenidas de bovinos (n=30) y búfalos (n=40) de áreas donde la babesiosis es endémica.

Pruebas	Concordancia		
	(%)	<i>Kappa</i>	Error Standard
PCR/ELISA	91	0.817	0.072

7.3.1.2. Secuenciación del gen 18S rARN.

La secuencia completa del gen 18S rARN de 10 cepas de *B. bigemina* argentinas y 5 cepas extranjeras analizadas, fue de 1693 pb. Se detectaron mutaciones en relación a la secuencia del clon de referencia JG-29 obtenida de GenBank (Apéndice II). Además, en algunas cepas, se encontró más de una secuencia del gen 18S rARN. En las cepas argentinas se encontraron ocho sitios polimórficos, cinco de ellos (618, 619, 621, 623, 643) localizados en la hélice E23-1 de la región hipervariable V4 del gen 18S rARN. Esta región fue identificada con las sondas específicas que hibridan secuencias determinadas del ADNg de *B. bigemina* presentes en el kit de RLBH. El análisis de la región polimórfica de cada cepa amplificada utilizando los oligonucleótidos BiRafF/BiRafR permitió identificar 9 haplotipos de *B. bigemina* (Tabla 8).

Tabla 8. Haplotipos determinados por los sitios polimórficos (n=9) identificados en la hélice E23-1 del gen 18S rARN de 10 cepas de *Babesia bigemina* argentina y 5 extranjeras (*). Las letras rojas representan los nucleótidos polimórficos (sitios 618, 619, 621, 623 y 643) y las letras azules representan a los nucleótidos conservados. El haplotipo del clon JG-29 fue utilizado como referente. Los haplotipos de cada cepa están representados con (x).

Haplotipos	Nucleótidos											BbiS1A-i	BbiS1A	BbiS2A-i	BbiM1A	BbiS2P-i	BbiS2P	BbiM1P	BbiM2P	BbiS3-i	BbiS3	JG-29*	BbiAVc*	BbiAH19*	BbiIvc*	BbiIMo*		
	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	643																	
1	C	C	C	T	T	T	T	G	T	T	...	T						X	X	X	X	X					X	X
2	C	C	C	T	T	T	T	G	T	T	...	G															X	X
3	C	C	C	T	C	G	T	T	T	T	...	T	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					X	
4	C	C	C	T	G	G	T	T	T	T	...	T	X	X	X	X		X	X	X								
5	C	C	C	T	T	G	T	T	T	T	...	T						X							X	X		
6	C	C	C	T	C	T	T	T	T	T	...	T		X		X												
7	C	C	C	T	C	T	T	T	T	C	...	T					X	X		X								
8	C	C	C	T	C	T	T	T	T	C	...	G							X	X	X							
9	C	C	C	T	T	G	T	T	T	T	...	C													X	X		

El haplotipo que caracterizó al clon JG-29, fue identificado en las cepas BbiIvc, BbiIMo (Israel), BbiS3-i, BbiS3, BbiM1P y BbiM2P (argentinas). Este mismo haplotipo fue detectado por la sonda del RLBH usado en este trabajo.

La cepa BbiS2P, multiplicada en terneros mostró dos haplotipos más que su derivada BbiS2P-i multiplicada *in vitro*, mientras que los dos haplotipos observados en la BbiS2P-i se mantuvieron en sus clones biológicos derivados. La cepa BbiS1A también incluyó un haplotipo más que su derivada cultivada *in vitro* BbiS1A-i. Los haplotipos de esta última se mantuvieron a su vez en los clones biológicos derivados (Tabla 9).

Tabla 9. Secuencia de la reducción de haplotipos observados entre las cepas originales obtenidas de terneros y sus derivadas multiplicadas y clonadas biológicamente *in vitro* para el gen *18S rARN*.

Cepa/clon	Haplotipos			
BbiS2P	H3	H4	H5	H7
BbiS2P-i	H3			H7
Bbi9P1	H3			H7
BbiS1A	H3	H4		H6
BbiS1A-i	H3	H4		
Bbi2A1	H3	H4		

La cepa BbiM1P mostró tres haplotipos, dos de ellos se mantuvieron en su derivada BbiM1A. Las cepas atenuadas BbiS1A y BbiM1A presentaron un patrón genético idéntico. La cepa BbiM2P mostró el mayor número de haplotipos, 5 (Tabla 8). Con esta información se construyó un dendograma (Figura 16) utilizando *B. bovis* (BboR1A) como *outgroup*.

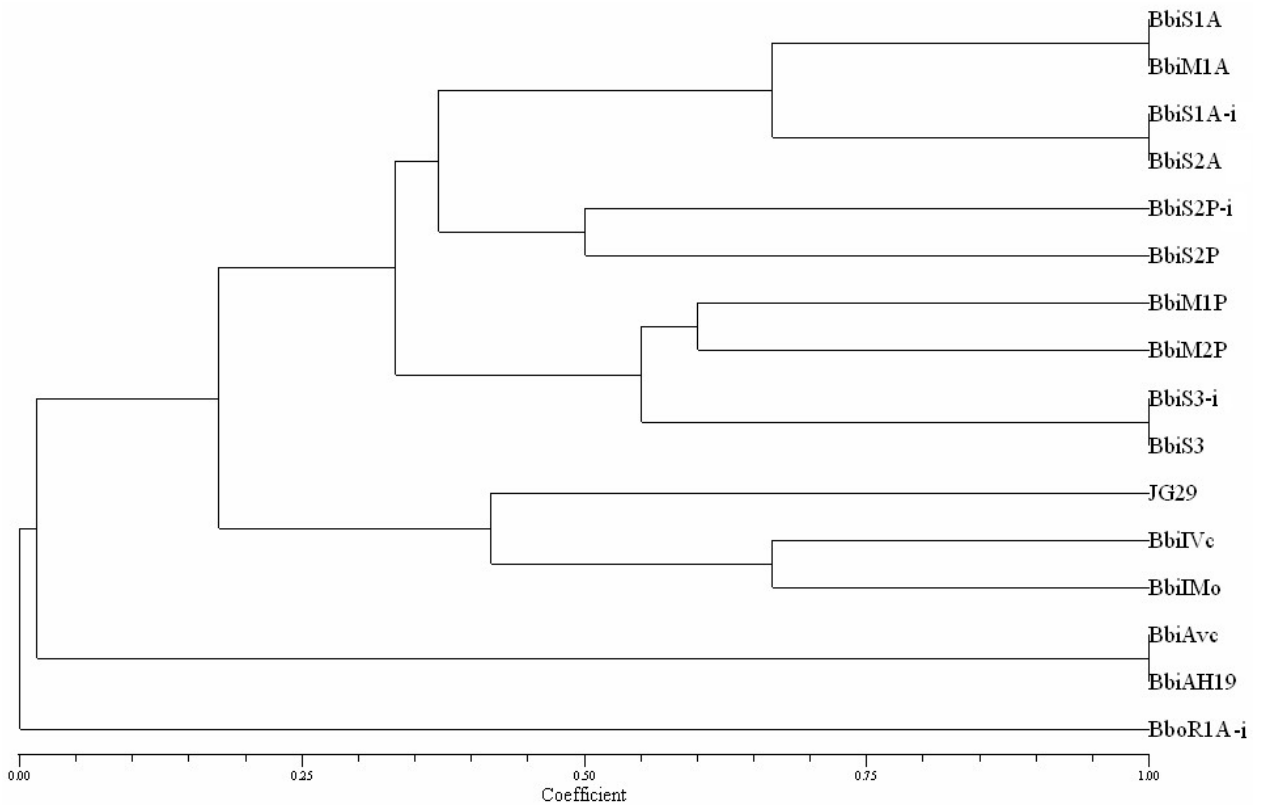


Figura 16. Dendrograma basado en la matriz binaria obtenida de los haplotipos observados en la hélice E23-1 del gen *18S rARN* secuenciado de las cepas de *Babesia bigemina* de referencia. El dendrograma fue realizado mediante UPGMA en el software NTSys 2.01 e, con BboR1A-i como *outgroup*. Los clones provenientes de BbiS1A-i y BbiS2P-i no están incluidos.

El dendrograma muestra tres clados principales constituidos por a) las cepas australianas (BbiAvc, BbiAH19) el grupo más alejado, b) las cepas israelíes (BbiIVc, BbiIMo) y el clon JG-29 y c) las cepas argentinas. Dentro de este último clado las cepas con fenotipo atenuado se agruparon separadas del clado que contiene las cepas y clones biológicos con fenotipo patógeno.

El polimorfismo genético se evidenció también en las secuencias obtenidas de muestras de sangre de bovinos infectados naturalmente con *B. bigemina* nativos de las diferentes regiones (Tabla 10). En estos se identificaron los siete haplotipos definidos en las cepas argentinas de referencia (Tabla 8) y un haplotipo (H10), no identificado en las cepas de referencia.

Tabla 10. Haplotipos determinados por los sitios polimórficos identificados en la hélice E23-1 del gen *18S rARN* en 9 bovinos infectados naturalmente. Las letras rojas representan los nucleótidos polimórficos (sitios 618, 619, 621, 623 y 643) y las letras azules los nucleótidos conservados. Las muestras están clasificadas de acuerdo a la región analizada (NEA, NOA), mientras que las muestras obtenidas de animales vacunados se identifican como post-vacunal (PV).

Haplotipos	Nucleótidos													NOA				NOA-c	NEA-c		PV													
	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	...	643	BbiS1A-i	BbiS1A	BbiS2A-i	BbiM1A	BbiS2P-i	BbiS2P	BbiM1P	BbiM2P	BbiS3-i	BbiS3	NOA17	NOA2	NOA19	NOA20	NOA3c	NEAc	NEAc	83	88			
1	C	C	C	T	T	T	T	G	T	T	...	T							x	x	x	x		x			x							
2	C	C	C	T	T	T	T	G	T	T	...	G																						
3	C	C	C	T	C	G	T	T	T	T	...	T	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
4	C	C	C	T	G	G	T	T	T	T	...	T	x	x	x	x		x	x	x				x							x	x		
5	C	C	C	T	T	G	T	T	T	T	...	T					x																	
6	C	C	C	T	C	T	T	T	T	T	...	T	x		x									x										
7	C	C	C	T	C	T	T	T	T	C	...	T					x	x		x			x						x					
8	C	C	C	T	C	T	T	T	T	C	...	G								x	x	x	x		x		x							
9	C	C	C	T	T	G	T	T	T	T	...	C																						
10	C	C	C	T	C	C	T	T	T	T	...	C													x									

El haplotipo 3 fue el de mayor distribución y se encontró en las diferentes muestras del NOA y en una muestra de un animal del NEA con signos clínicos de babesiosis. El haplotipo 10 sólo se identificó en la muestra NOA19. Los haplotipos 2 y 9 característicos de las cepas israelíes y australianas no se encontraron en las muestras de bovinos analizadas. Las dos muestras postvacunales analizadas concuerdan con los haplotipos observados en la cepa vacunal BbiS1A-i.

7.3.1.3. Estructura secundaria.

Se graficó la estructura secundaria del gen *18S rARN* y se identificaron los nucleótidos variables (Figura 17). Basados en el mapa de variabilidad del gen homólogo de *Saccharomyces cerevisiae*, se dedujo que los nucleótidos polimórficos que permitieron definir los haplotipos estaban ubicados en la hélice E23-1 de la región hipervariable V4.

Babesia bigemina X59604

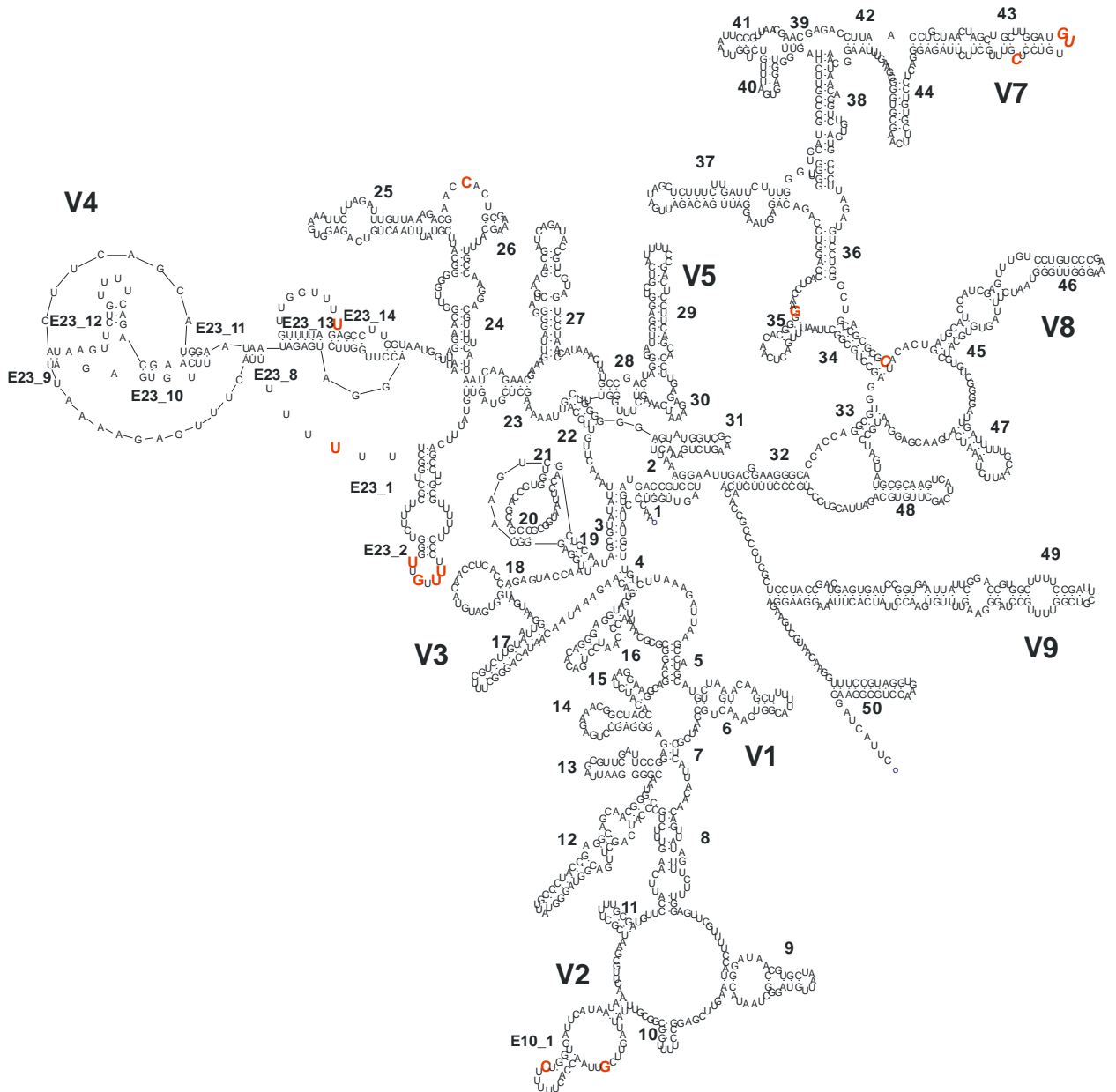


Figura 17. Estructura secundaria del gen *18S rARN* del clon JG-29 de *Babesia bigemina*. Se remarcan las regiones variables (V1-V9) del gen y las hélices E10-1 y E23-n. Los nucleótidos polimórficos se identificaron con color rojo.

7.3.2. Gen *rap-1c*.

7.3.2.1. *rap-1c*.

Las secuencias del gen completo *rap-1c* de las cepas BbiS1A-i y BbiS2P-i tuvieron un tamaño de 1533 pb, y presentaron 4 mutaciones puntuales entre ellas. Al compararlas con la secuencia del

clon JG-29 se observaron 16 sitios polimórficos (Apéndice II). Los clones biológicos presentaron una secuencia idéntica a la de sus respectivas cepas parentales.

Nueve de los 16 sitios polimórficos se encontraron en el extremo 3' carboxi-terminal, por tanto, esta región de 283 pb fue la utilizada para comparar cepas y clones biológicos.

La clonación molecular permitió identificar múltiples haplotipos en las cepas. En la cepa BbiS2P se encontró la mayor cantidad de haplotipos, denominados h1, h16, h18 y h19. El h16 fue el utilizado para realizar los alineamientos por ser el más frecuente y fue el único encontrado en BbiS2P-i. La cepa BbiS1A presentó los h20 y h21 (Figura 18), de los cuales h20 fue identificado en 6 de los 8 clones moleculares obtenidos. Las cepas BbiS3 y BbiS3-i mostraron un único haplotipo diferente (Apéndice II).

Para el alineamiento de las secuencias *rap-1c* de las cepas de *B. bigemina* de diferentes orígenes (Apéndice II) se utilizó el haplotipo más abundante de cada cepa. El análisis de distancia indicó el mayor porcentaje de variación (6,6 %) entre las cepas BbiIvc (Israel) respecto de la cepa BbiS2A-i.

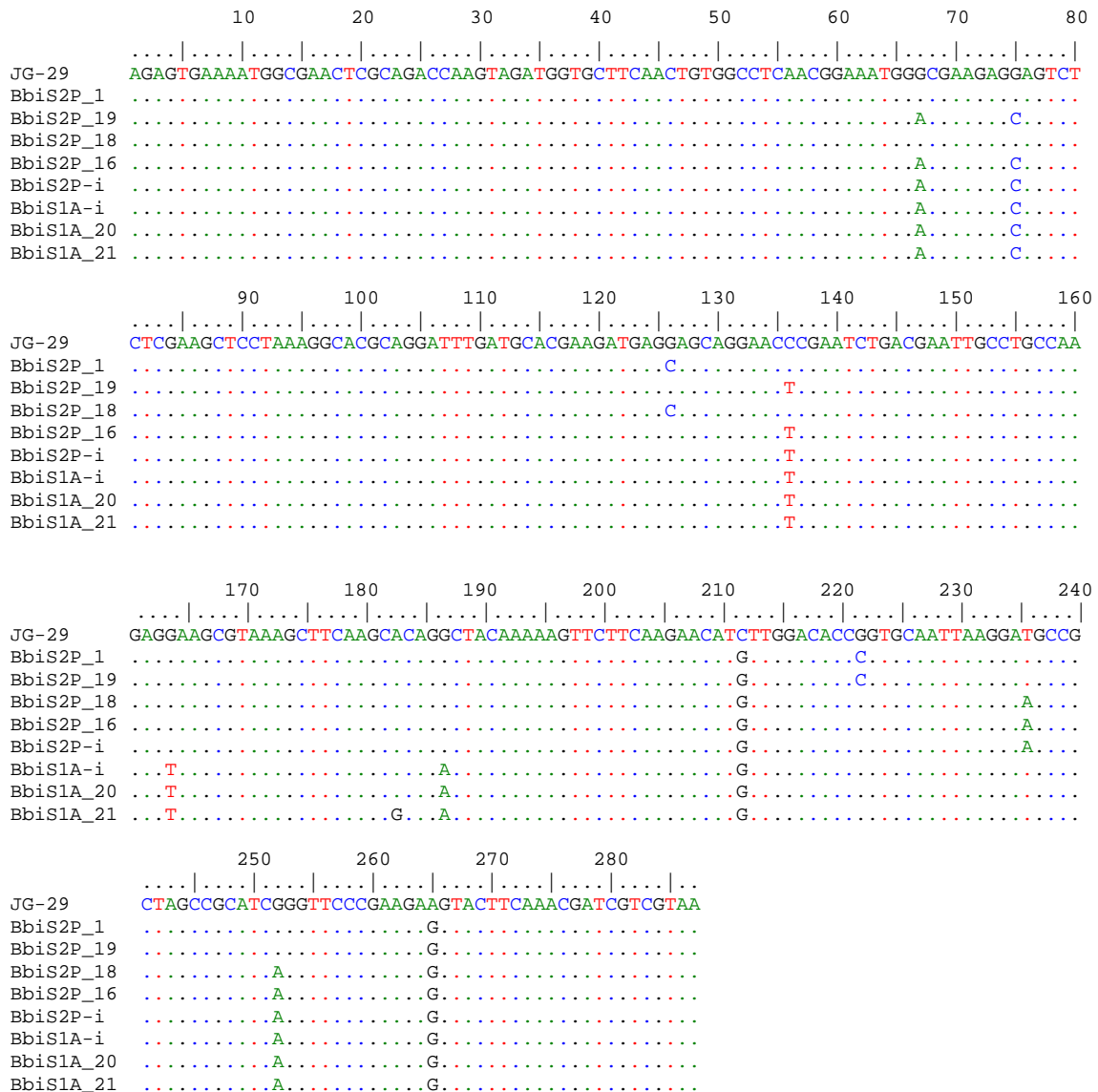


Figura 18. Alineamiento de los haplotipos de las secuencias del extremo 3' del gen *rap-1c* de las cepas BbiS2P-i y BbiS1A-i de *Babesia bigemina*. Los haplotipos h1, h16, h18 y h19 caracterizan la cepa BbiS2P y los haplotipos h20 y h21 la cepa BbiS1A.

Utilizando las secuencias del gen *rap-1c* de las cepas de referencia argentinas y extranjeras se construyó un árbol filogenético basado en el método de distancia Neighbor-joining (Figura 19).

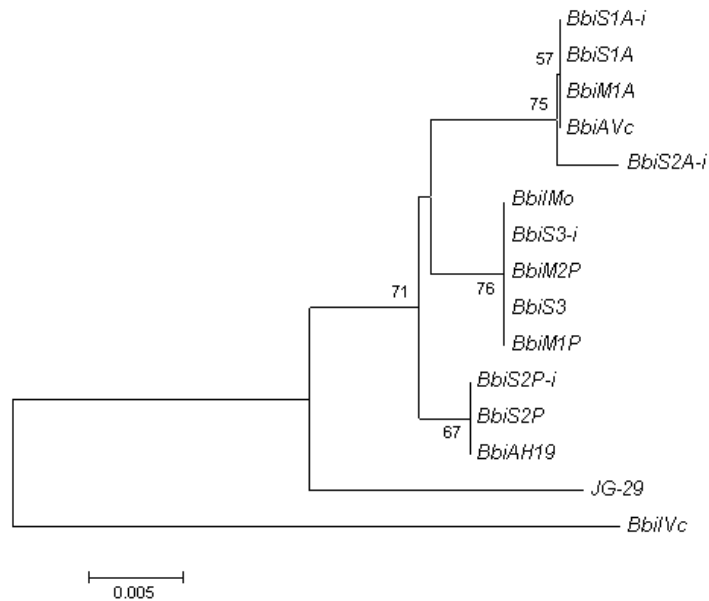


Figura 19. Árbol filogenético basado en la secuencia del extremo 3' del gen *rap-1c* de las cepas de *Babesia bigemina* de referencia. El árbol fue obtenido mediante el método de distancia Neighbor-joining, utilizando el modelo Kimura-2 parámetros. Los valores obtenidos en el análisis de *bootstrap* se detallan en las ramas.

El análisis filogenético muestra que, a excepción de las cepas vacunales BbiVc y BbiMo, todas las cepas atenuadas se agruparon en el mismo clado, mientras que las patógenas se dividieron en dos grupos. En el primero se agruparon las cepas BbiM1P y BbiM2P de Mercedes, Corrientes, las cepas BbiS3, BbiS3-i de Salta y la cepa BbiMo de Israel. En el segundo, se agruparon las cepas BbiS2P-i, BbiS2P de Salta y la cepa BbiAH19 de Australia.

7.3.2.2. *rap-1c*. Análisis de disociación de alta resolución (HRM).

7.3.2.2.1. Eficiencia de la rt-PCR.

Las curvas de estándares obtenidas después de la amplificación mediante rt-PCR con diferentes concentraciones de EP por la cepa BbiS2P-i, mostró una eficiencia de 0,94; con un valor de $R^2=0,99$ (Figura 20). La rt-PCR se realizó en sólo 35 ciclos, debido a que a partir de allí comenzó a amplificar inespecíficamente el control de reactivos.

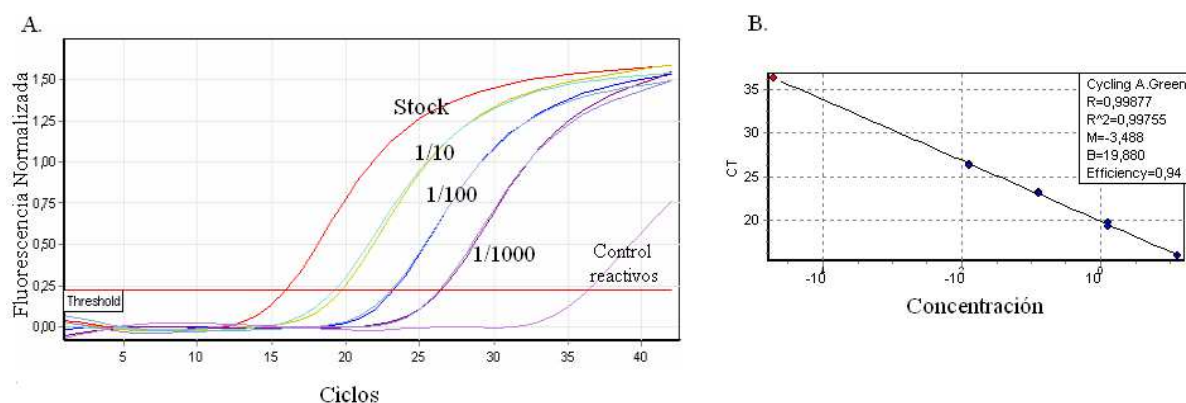


Figura 20. rt-PCR de la cepa BbiS2P-i de *Babesia bigemina*. **A.** Curvas de fluorescencia normalizadas para las muestras de diluciones seriadas realizadas a partir de la suspensión de eritrocitos parasitados por la cepa BbiS2P-i en función de los ciclos de amplificación. La línea roja horizontal indica el límite utilizado para la curva estándar. **B.** Curva estándar de ciclo umbral (CT) en función de la concentración obtenida mediante el software del Qiagen Rotor 6000[®]. Se detallan los valores de la regresión (Eficiencia= 0,94 y R²=0,99).

7.3.2.2.2. Curvas de disociación.

El análisis de las temperaturas de disociación del ADN amplificado, se realizó en un rango de temperatura de 83 a 93 °C, con incrementos de 0,3 °C. Este rango se estableció porque a temperaturas menores a 83 °C se observaron reacciones inespecíficas. Las curvas de disociación obtenidas mediante rt-PCR-HRM del gen *rap-1c* se muestran en la Figura 21 para los haplotipos de referencia del clon JG-29 y los clones biológicos Bbi2A1 y Bbi9P1.

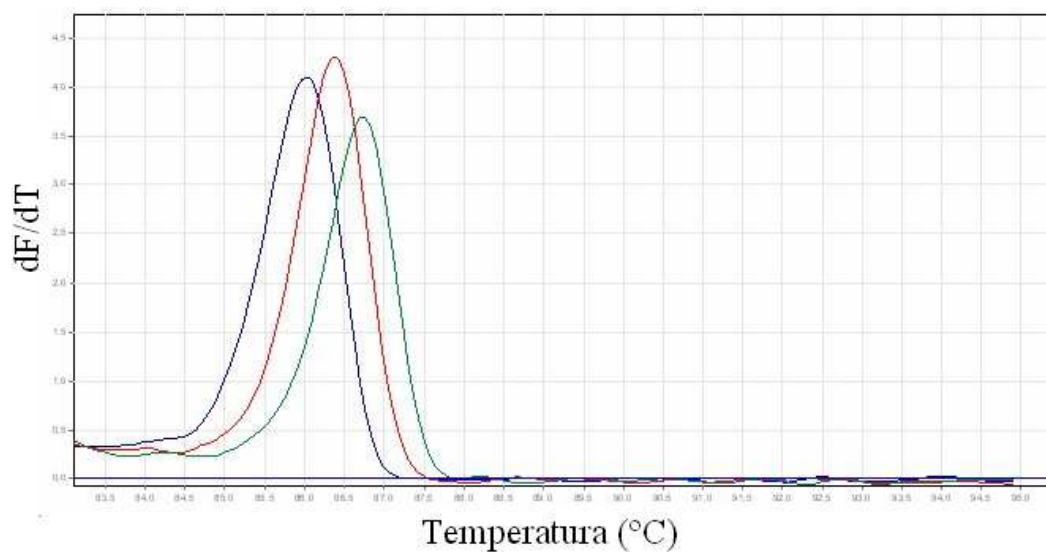


Figura 21. Curvas de disociación obtenidas para los clones Bbi2A1 y Bbi9P1 de *Babesia bigemina*. La curva se obtuvo con la primera derivada de la fluorescencia en función de la temperatura (dF/dT), en un rango de 83-93 °C. Las curvas de color azul, rojo y verde corresponden a los clones Bbi2A1, Bbi9P1 y JG-29 respectivamente.

Este análisis permitió también identificar dos genotipos (g). El gA incluyó las cepas con fenotipo atenuado y el gP aquellas con fenotipo patógeno (Tabla 11). La diferencia entre el gA y el gP fue de $0,32 \pm 0,07$ y entre gP y el genotipo de referencia JG-29 fue de $0,37 \pm 0,06$. La cepa BbiS2A-i fue la única del gA que contenía un nucleótido mutado, mientras que en el gP las cepas BbiS2P-i y BbiS2P presentaron dos mutaciones puntuales.

Tabla 11. Genotipificación de *Babesia bigemina* mediante rt-PCR-HRM del gen *rap-1c*, según su fenotipo atenuado (**gA**) o patógeno (**gP**).

Cepa	Fenotipo	Genotipo	% confianza
BbiS1A-i	atenuado	gA	94,72
BbiS1A	atenuado	gA	77,31
BbiM1A	atenuado	gA	100
BbiS2A	atenuado	gA	78,51
BbiS3-i	ND	gP	100
BbiS3	ND	gP	89,46
BbiS2P-i	patógeno	gP	90,78
BbiS2P	patógeno	gP	70,39
BbiM1P	patógeno	gP	74,36
BbiM2P	patógeno	gP	99,55
BboS2P-i	patógeno	--	--

ND: no determinado; patógeno putativo.

7.3.2.3. *rap-1c*. ADN de *B. bigemina* de bovinos infectados naturalmente.

El gen *rap-1c* fue amplificado y secuenciado clonado a partir de 13 muestras de ADN de bovinos infectados naturalmente (provenientes de 7 rodeos). Se encontraron animales portadores de *B. bigemina* con múltiples haplotipos de *rap-1c* (Tabla 12). No pudieron analizarse las muestras de bovinos utilizando la técnica de HRM, debido a la multiplicidad de haplotipos encontrados en las mismas.

Tabla 12. Número de haplotipos del gen *rap-1c* encontrados en muestras obtenidas de animales infectados naturalmente con *Babesia bigemina*, agrupadas de acuerdo a las regiones NOA (Noroeste) o NEA (Noreste) argentinos, de donde provenían. Las muestras obtenidas de animales con signos clínicos de babesiosis se identificaron con *c*. El número agregado a las siglas de cada región identifica al bovino muestreado en la misma.

Rodeo	Muestras	Haplotipos diferentes/Haplotipos totales
1	NOA1	3/6
	NOA16	4/11
2	NOA15	2/8
3	NOA18	5/8
	NOA19	2/9
	NOA20	2/5
4	NOA3 <i>c</i>	3/14
5	NOA4 <i>c</i>	3/6
	NOA5 <i>c</i>	6/11
	NOA6 <i>c</i>	3/5
6	NEA1 <i>c</i>	1/12
	NEA5 <i>c</i>	1/7
7	NEA11 <i>c</i>	1/8

Los haplotipos identificados se denominaron hn con n=1-22. En la tabla 13 se muestran los haplotipos caracterizados en las cepas de referencia argentinas y los observados en las muestras obtenidas de bovinos infectados naturalmente.

Tabla 13. Haplotipos (h1 al h13 y h16 al h22) encontrados en las cepas de referencia argentinas y en las muestras descritas en la Tabla 12. En las filas correspondientes a las cepas de referencia se aclara con una x los haplotipos encontrados, mientras que en las muestras, se aclaró el número de clones encontrados del total de clones analizados.

Cepa	h1	h2	h3	h4	h5	h6	h7	h8	h9	h10	h11	h12	h13	h16	h17	h18	h19	h20	h21	h22	Total		
BbiS1A-i																		x					
BbiS1A																		x	x				
BbiM1A																		x	x				
BbiS2A																						x	
BbiS2P-i														x									
BbiS2P	x													x		x	x						
BbiS3-i													x										
BbiS3													x										
BbiM1P													x										
BbiM2P													x										
NOA1							1			1			4									6	
NOA16		4							2				4		1							11	
NOA15	1												7									8	
NOA18			1	2								1	2		2							8	
NOA19						2							7									9	
NOA20									1	4												5	
NOA3c		2				3							9									14	
NOA4c	1										1		4									6	
NOA5c	5				1				1	1	1	1				2						11	
NOA6c								1					3		1							5	
NEA1c																12						12	
NEA5c																7						7	
NEA11c														8								8	
Frecuencia	7	6	1	2	1	5	1	1	4	5	2	1	41	8	23	2							

Los haplotipos encontrados en las cepas atenuadas de referencia no fueron observados en las muestras de bovinos infectados naturalmente. Las cepas BbiS3-i, BbiS3, BbiM1P y BbiM2P muestran el haplotipo que caracteriza a la mayoría de las muestras obtenidas de bovinos portadores de *B. bigemina*, con 41 clones encontrados en 9 muestras. Las muestras del NEA presentan un único haplotipo, aunque no es el mismo entre ellos.

Con los datos presentados en la Tabla 12 y 13 se realizó un análisis de AMOVA para estudiar la estructura poblacional de *B. bigemina* con *rap-1c*. Los resultados se muestran en la Tabla 14 para la totalidad de las muestras.

Tabla 14. Análisis de AMOVA para las 13 muestras de bovinos infectados naturalmente descritas en la Tabla 13.

Grupos	Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes variantes	Variación %
Todas las muestras	Entre muestras	12	21,683	0,188	45,09
	Dentro de las muestras	97	22,217	0,229	54,91
	Total	109	43,9		

El índice de fijación obtenido (F_{st}) fue de 0,45, indicando que no existe una diferenciación entre las muestras que permita un agrupamiento. Por otro lado, la variación entre las muestras y dentro de las muestras fue similar entre ellas (45,09 – 54,91 %). Se realizó un test de AMOVA agrupando las muestras como las provenientes del NOA y las muestras de animales con síntomas clínicos del NOA y NEA (Tabla 15).

Tabla 15. Resultados obtenidos mediante el análisis de 13 muestras de bovinos infectados naturalmente (Tabla 13) mediante AMOVA, agrupadas en 3 grupos de acuerdo a la zona muestreada y a su estatus de animal con infección subclínica o clínica.

Grupos	Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes variantes	Variación %
NOA, NEAc NOAc	Entre grupos	2	8,514	0,07725	17,58
	Entre muestras, dentro de cada grupo	10	13,169	0,13321	30,31
	Dentro de las muestras	97	22,217	0,22904	52,11
	Total	109	43,9	0,43950	

La mayor variación está dada dentro de las muestras, debido a la diversidad de haplotipos encontrados en ellas. Esto refuerza el resultado anterior (Tabla 14), demostrando que no pueden agruparse las muestras debido a su origen geográfico o a su estatus de infección (subclínica o clínica).

7.3.3. Gen *gp-45*.

La secuencia completa del gen que codifica la proteína GP45 fue amplificada en 11 de las 13 cepas de referencia evaluadas. La secuencia tuvo un tamaño de 1044 pb para las cepas BbiS1A-i, BbiS2A, BbiM1A, BbiS3-i y BbiS3; 1050 pb para las cepas BbiAvc y BbiAH19 y 1055 pb para BbiIvc, BbiIMo, JG-29, BbiM2P. No se pudieron caracterizar las cepas BbiS2P, su derivada BbiS2P-i o los clones derivados debido a que no se logró la amplificación del gen a pesar de los reiterados intentos y la utilización de oligonucleótidos diseñados *ad hoc* bajo diferentes condiciones de PCR. Las secuencias del gen *gp45* amplificadas de los clones biológicos atenuados fueron idénticas a la de su cepa parental.

El árbol filogenético obtenido para el gen *gp-45* muestra dos clados, en uno se agrupan la mayoría de las cepas argentinas y en otro las cepas extranjeras junto con la cepa BbiM2P proveniente del NEA (Figura 22).

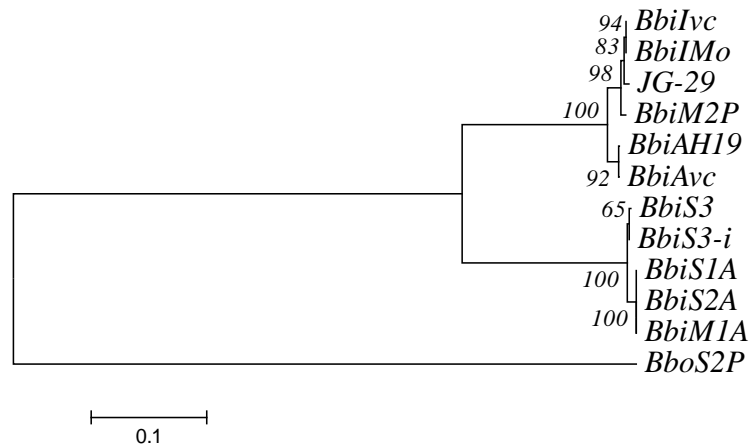


Figura 22. Árbol filogenético obtenido a través de la secuencia del gen *gp-45* para 11 cepas de referencia de *Babesia bigemina*. El árbol fue obtenido mediante el método de distancia Neighbor-joining, utilizando el modelo Kimura-2 parámetros. Los valores obtenidos en el análisis de *bootstrap* se incluyen en el árbol. Se utilizó la cepa de *B. bovis* BboS2P como *outgroup*.

7.3.4. ITS.

Los fragmentos obtenidos por PCR de las regiones ITS se muestran en la Figura 23 para 6 cepas de *B. bigemina* y para los controles negativos. A pesar de que las bandas obtenidas mediante PCR de las cepas de *B. bigemina* fueron nítidas y diferentes a las de *B. bovis*, el análisis de las secuencias de los productos de PCR y de las construcciones de los ITS para los clones Bbi2A2 y Bbi8P1 mostró la presencia de copias diferentes dentro del mismo genoma. Por esta razón no fue incluido como marcador molecular. En el Apéndice II se muestra el alineamiento de 3 clones moleculares del clon biológico Bbi2A2.

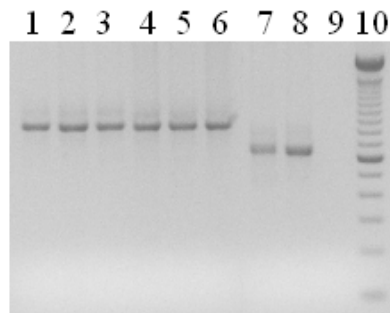


Figura 23. Fragmentos correspondiente a la región ITS de *Babesia bigemina* amplificados mediante PCR. (Columnas 1-10) 1. BbiS1A-i; 2. BbiS2P-i; 3. BbiS3-i; 4. BbiM1A; 5. BbiM1P; 6. BbiM2P; 7. BboS2P; 8. BboR1A; 9. Control de reactivos sin ADN; 10. Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen®). Gel: agarosa al 1,5 %.

7.3.5. Secuencias repetitivas.

7.3.5.1. Cepas de referencia.

A través del análisis de los fragmentos del genoma de *B. bigemina* secuenciado hasta el momento (*contigs*), se localizaron 1191 regiones con secuencias repetitivas. Se seleccionaron 27 regiones y se diseñaron oligonucleótidos para 17 de ellas que poseían secuencias con más de 7 repeticiones y fragmentos de aproximadamente 400 pb. En 8 casos, se diseñaron y evaluaron dos pares de oligonucleótidos. Todas las secuencias seleccionadas fueron amplificadas mediante PCR. Los cinco microsatélites *ms3178*, *ms4179*, *ms4135* y *ms4177*, y el minisatélite *MS2737*, fueron específicos para *B. bigemina*. El análisis de las secuencias repetitivas de 2-6 clones moleculares amplificados de las cepas clonadas Bbi3A1 y Bbi8P1 mostró una única copia para cada clon biológico.

La secuencia *ms3178*, identificada en las cepas australianas, no coincidió con la secuencia reportada en los *contigs* del genoma de *B. bigemina* publicado, por lo que no fue considerada para este estudio.

El *MS2737* fue amplificado a partir del ADN de las 15 cepas de *B. bigemina* de referencia evaluadas, mostrando un producto de tamaño similar. La secuencia nucleotídica correspondería a una región codificante para una proteína y fue diferente entre las distintas cepas. El alineamiento de las secuencias permitió observar una región absolutamente conservada entre las cepas locales, y numerosas diferencias con respecto a las cepas australianas, el clon JG29 y las cepas israelíes

debido a la presencia de deleciones y mutaciones puntuales. Las secuencias de las cepas atenuadas argentinas presentaron una mutación puntual fuera de las secuencias repetitivas cuando se la comparó con las cepas patógenas.

Los *loci* correspondientes a *ms4179*, *ms4135* y *ms4177* mostraron repeticiones de tripletes que codifican para diferentes aminoácidos, mostrando diferencias en el tamaño de la secuencia, de acuerdo a la cantidad de repeticiones encontradas (Tabla 16).

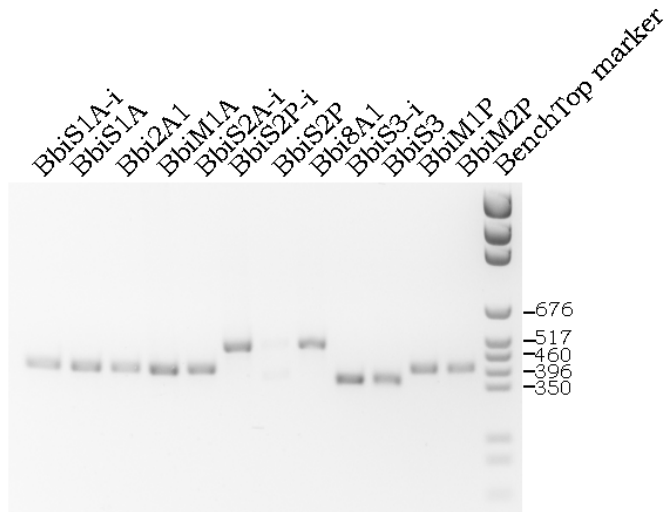
Tabla 16. Secuencias de nucleótidos obtenidas para los microsatélites *ms4135*, *ms4177* y *ms4179*. Se detallan los tripletes de nucleótidos y los aminoácidos para los que codificarían.

Microsatélite	Secuencia de nucleótidos	Aminoácidos
<i>ms4179</i>	CGT CAG CAT	R Q H
<i>ms4135</i>	GAT GGC GAA	D G E
<i>ms4177</i>	CAT TAT	H Y

La ocurrencia de estos tripletes en las diferentes cepas de *B. bigemina* permitieron determinar diferentes haplotipos (Apéndice II) utilizados para generar el dendograma.

El patrón molecular generado por el *ms4179* se caracterizó por poseer fragmentos entre 350 pb y 517 pb. La cepa BbiS2P fue la que mostró mayor diferencia con respecto al resto de cepas evaluadas, observándose una doble banda, a diferencia de su derivada BbiS2P-i, que mostró sólo la banda de mayor tamaño, al igual que lo observado en los clones biológicos derivados. Los clones biológicos atenuados mantuvieron secuencias idénticas a las de su cepa parental (Figura 24).

A)



B)

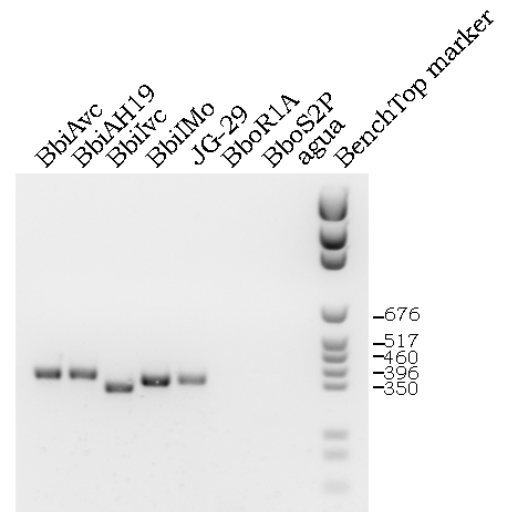


Figura 24. Fotos de geles que muestran fragmentos correspondientes al *ms4179* de *Babesia bigemina* amplificados mediante PCR. A) Cepas argentinas B) Cepas extranjeras, controles negativos (BboR1A y BboS2P) y control de reactivos sin ADN (agua). Se utilizó el marcador de peso molecular *BenchTop marker* (Promega®). Gel: agarosa al 4 %.

De acuerdo a la matriz de presencia y ausencia de haplotipos generada para los microsatélites *ms4179*, *ms4135*, *ms4177* y el minisatélite *MS2737*, se confeccionó el dendograma utilizando BboR1A-i como *outgroup*. Se generaron tres clados donde se agruparon respectivamente las cepas atenuadas, las cepas patógenas y más distantes las cepas extranjeras (Figura 25).

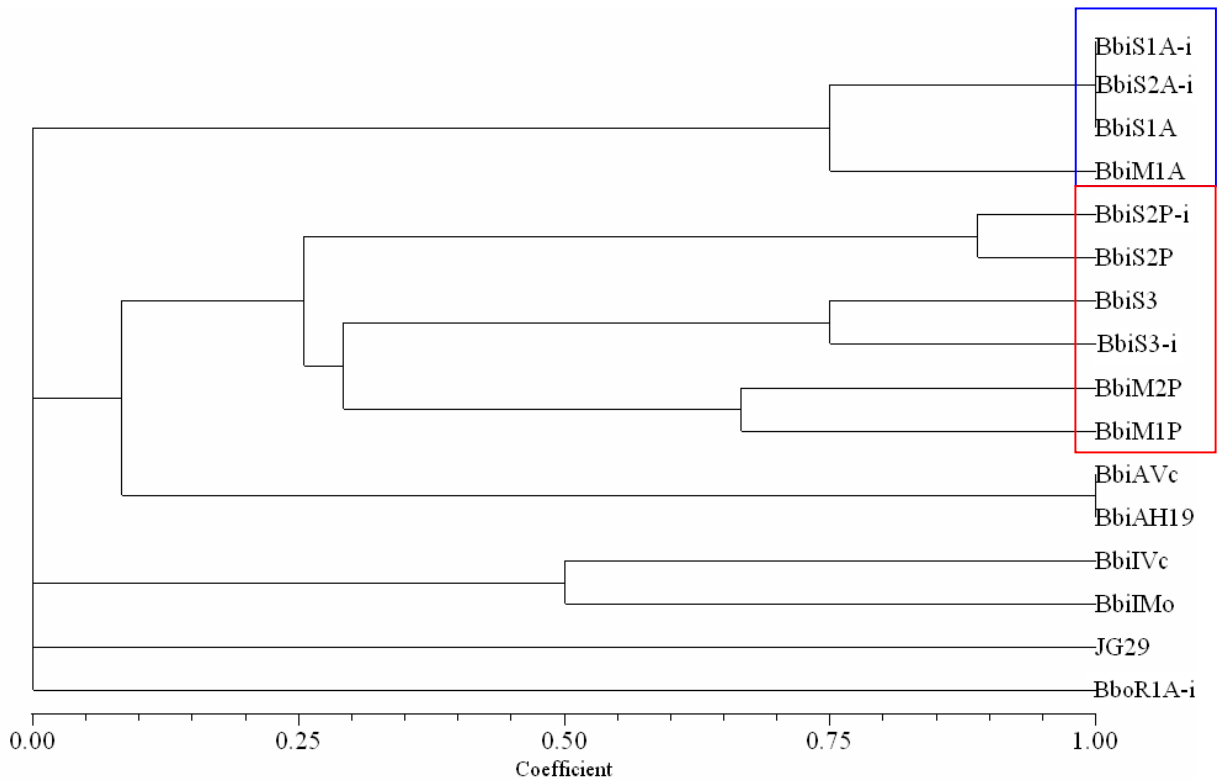


Figura 25. Dendograma construido a partir de la matriz binaria obtenida a partir de los haplotipos de los microsatélites *ms4179*, *ms4135*, *ms4177* y del minisatélite *MS2737* de las cepas de referencia de *Babesia bigemina*. Fue realizado mediante UPGMA en el software NTSys 2.01 e, con BboR1A-i como *outgroup*. Encuadradas en rojo se incluyen las cepas argentinas de referencia patógenas y en azul las atenuadas.

7.3.5.2. ADN de *B. bigemina* de bovinos infectados naturalmente.

El análisis de 19 muestras de ADN obtenidas de bovinos infectados naturalmente con *B. bigemina* mostró la presencia de las secuencias repetitivas identificadas en las cepas de referencia y nuevos haplotipos. El microsatélite *ms4177* no se utilizó para estas muestras, debido a que la presencia de más de un haplotipo generó dificultades en la obtención de secuencias. En el dendograma realizado a partir de la matriz binaria con los tres *loci* se observa una agrupación de las cepas atenuadas en un clado, mientras que las cepas patógenas BbiM1P y BbiM2P se agrupan con las muestras de bovinos de la región NEA (Figura 26). Las muestras de la región NOA no presentaron un patrón característico, sino que se encontraron dispersas, junto con las cepas BbiS3-i y BbiS3 originadas en la misma región.

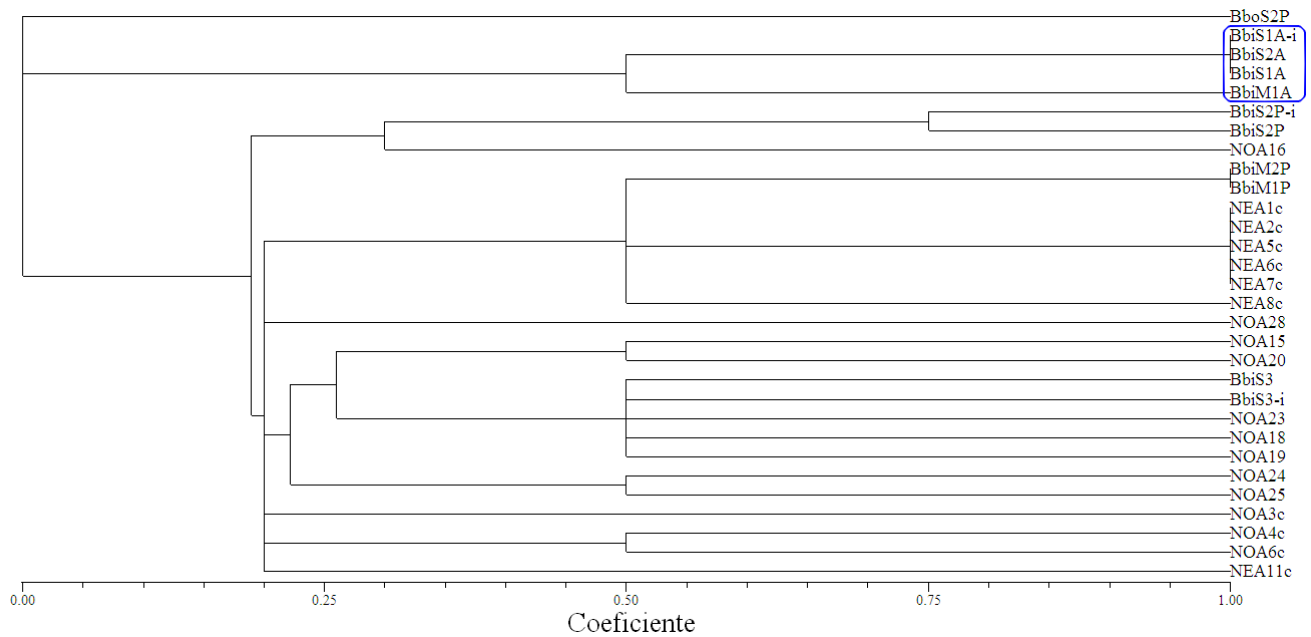


Figura 26. Dendrograma obtenido a partir de la matriz binaria obtenida con las haplotipos de los microsatélites *ms4179*, *ms4135* y del minisatélite *MS2737* de 19 aislamientos de bovinos infectados naturalmente por *Babesia bigemina*. Fue realizado mediante UPGMA en el software NTSys 2.01 e. En azul se remarcan las cepas de referencia atenuadas. Se usó la cepa BboS2P de *B. bovis* como outgroup.

7.3.6. Evaluación de la eficiencia de dos clones de *B. bigemina* para persistir *in vitro*.

Para identificar diferencias en la capacidad de persistencia de dos clones de *B. bigemina* multiplicados *in vitro* simultáneamente (Bbi9P1 y Bbi2A1), se realizó el Experimento 3 (descrito en 6.2.5.1.3.). Se utilizaron muestras de ADN extraídas durante los días 0, 7 y 14 para amplificar secuencias específicas de cada clon correspondientes a la *gp45*, y los microsatélites *ms4135* y *ms4179*. Estos marcadores permitieron establecer que el clon Bbi9P1 predominó progresivamente sobre el clon Bbi2A1 hasta la desaparición de este último el día 14. Esta observación se confirmó a través de muestras obtenidas el día 18 (Figura 27).

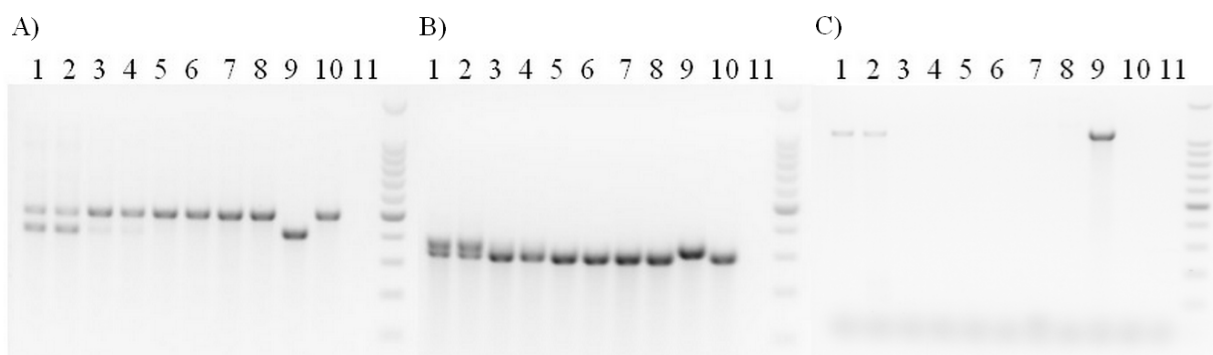


Figura 27. Amplificación de los microsatélites A) *ms4179*, B) *ms4135* y C) gen *gp45* de la mezcla de clones Bbi2A1 y Bbi9P1 de *Babesia bigemina* mediante PCR a partir de ADN extraído durante cada subcultivo. Los números iguales de las columnas de cada panel corresponden a los mismos días. Columna (Col.) Col. 1. y 2: Primer día de cultivo; Col. 3 y 4: Séptimo día de cultivo; Col. 5 y 6: Décimo cuarto día de cultivo; Col. 7 y 8: Décimo octavo día de cultivo; Col. 9: BbiS1A-i; Col. 10: BbiS2P-i; Col. 11: control de reactivos y Marcador de peso molecular 100 pb (Promega®). Gel: agarosa al 1,5 %.

8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

La clonación biológica *in vitro* a partir de cepas de referencia de *B. bigemina* permitió i) obtener poblaciones de individuos genéticamente homogéneos, ii) confirmar la variabilidad de la respuesta clínica en bovinos infectados con clones patógenos y iii) confirmar la estructura poblacional heterogénea de los aislamientos originales.

Los marcadores moleculares utilizados en este trabajo permitieron confirmar que los clones biológicos de *B. bigemina*, después de dos repeticiones del procedimiento de clonado *in vitro*, tenían características genéticas homogéneas e identidad genética con las cepas parentales mantenidas *in vitro* durante períodos prolongados.

Un punto crítico del proceso de clonación por dilución límite fue el recuento de los eritrocitos parasitados. En este trabajo se obtuvo un método fácil, preciso y repetible de recuento de eritrocitos parasitados, mediante la combinación de dos técnicas de microscopía descritas para diferentes objetivos. La primera fue la identificación de parásitos teñidos con naranja de acridina y la otra el recuento en una cámara de Neubauer, utilizando luz visible y ultravioleta en forma secuencial.

Los clones derivados de la cepa atenuada fueron menos eficientes para multiplicarse *in vitro* que los derivados de la cepa patógena, lo que se manifestó por el menor número de clones obtenidos durante la primera clonación; un tiempo significativamente mayor hasta la detección de los parásitos clonados y la pérdida de un clon atenuado (Bbi2A1) cuando se evaluó en el mismo medio que un clon patógeno (Bbi9P1). Esta diferencia también se observó durante el tercer período de clonado aunque no fue estadísticamente significativa. Esto respondería al reclonado de aquellos parásitos detectados más tardíamente después del clonado primario y secundario, durante el proceso de clonación. Esto se decidió para aumentar la probabilidad de que los parásitos seleccionados como clones, se originasen de un único eritrocito parasitado. Resultados similares fueron observados en clones patógenos de *B. bovis*, más eficientes que los atenuados para multiplicarse *in vitro* (Baravalle y col., 2012; Nevils y col., 2000). Taylor y col. (2002) también identificaron clones de *T. annulata* con diferente capacidad para multiplicarse *in vitro* y establecieron una relación positiva entre virulencia y mayor eficiencia para multiplicarse. Iyer y col. (2007) demostraron que la mayor expresión de los genes que codifican las proteínas RAP de

P. yoelii (py235) generó la invasión de un mayor número de eritrocitos *in vitro*, por parte de las cepas más virulentas.

Los clones patógenos (Bbi8P1 y Bbi9P1) y su cepa parental BbiS2P-i, mostraron variaciones en su virulencia después de la inoculación en bovinos susceptibles. Los bovinos infectados con el clon Bbi8P1, mostraron signos clínicos leves, similares a los generados por los clones atenuados, y no requirieron tratamiento quimioterápico, aunque el descenso del hematocrito promedio fue mayor ($p < 0.05$). A su vez, dos de los tres animales infectados con el clon Bbi9P1 debieron ser tratados para evitar su muerte. El comportamiento poco virulento del clon Bbi8P1 y la variabilidad del clon Bbi9P1 *in vivo*, sugiere una expresión diferencial de los genes de virulencia. Alternativamente, estos genes podrían estar regulados por el tipo de respuesta inmune generada por el hospedador. La cepa BbiS2P-i había producido, en un experimento previo, signos clínicos leves en 2 de 7 (30%) vaquillonas infectadas (Echaide y col., 1993). Esta variabilidad ha sido observada previamente en cepas de *B. bigemina* sometidas a diferentes condiciones experimentales (Aguirre y col., 1989; y Dalgliesh y col., 1981). Esto es soportado por la observación de que la respuesta inmune innata es fundamental para resistir los efectos deletéreos de la babesiosis en los bovinos menores a los 12 meses de edad. Estos casos responderían a la persistencia de esta respuesta en algunos bovinos adultos jóvenes (Goff y col., 2010).

En contraste, los clones atenuados y su cepa parental (BbiS1A-i) mantuvieron el fenotipo de baja patogenicidad en forma estable, rasgo distintivo de la cepa BbiS1A confirmado a través de su utilización como vacuna viva durante 25 años (Mangold, com. pers.).

La eficiencia de la PCR para la detección de animales con babesiosis disminuye sensiblemente cuando se utilizan muestras de sangre de bovinos portadores crónicos de *Babesia* spp. Esto sucede debido a que después que el sistema inmune controla la infección aguda, la cantidad de parásitos circulantes desciende considerablemente, dificultando su detección.

El incremento del volumen de sangre inicial para la obtención de ADN (de 200 a 800 μ l) y la elección del gen *I8S rARN* que presenta múltiples copias para estos protozoarios, aumentaron la sensibilidad de la PCR y se logró detectar hasta 10^{-6} % eritrocitos parasitados, sin afectar la especificidad. Figueroa y col. (1992) también desarrollaron una PCR con una sensibilidad similar mediante la amplificación de un fragmento desconocido del genoma de *B. bigemina*, pero a través del uso de una sonda complementaria al fragmento usado y de oligonucleótidos internos en una *nested* PCR. Estos *primers* fueron ampliamente usados para la detección de *B. bigemina*

tanto en garrapatas como en bovinos (Oliveira y col., 2008; Ojeda y col., 2010; Awad y col., 2011). Sin embargo, no fueron de utilidad en el presente trabajo porque se detectaron reacciones cruzadas con algunas cepas de *B. bovis*. Sivakumar y col. (2012) también observaron reacciones cruzadas con *B. ovata*, utilizando estos mismos *primers*.

Las secuencias completas del gen *18S rARN* de distintas cepas de *B. bigemina* mostraron múltiples sitios polimórficos, a pesar de ser considerado un gen altamente conservado entre individuos de una misma especie (Allsopp y col., 1994). Estas variaciones intraespecíficas fueron también observadas en otros hemoparásitos apicomplexa como *T. equi* y *B. caballi* cuando se utilizó la técnica de RLBH para el diagnóstico de babesiosis, a partir de muestras de equinos infectados naturalmente (Bhoora y col., 2010). Para *B. bigemina* se localizaron nucleótidos polimórficos en zonas caracterizadas por una alta frecuencia de mutaciones según el mapa de variabilidad genética obtenido por Van de Peer y col. (1997) en base al estudio de 500 especies de eucariotas diferentes, utilizando el gen *18S rARN* de *Saccharomyces cerevisiae* como base. El mayor número de sitios polimórficos en el gen *18S rARN* de *B. bigemina* se localizó en la hélice E23-1 de la región hipervariable V4, definida como una de las regiones más variables del gen (Wuyts y col., 2000). Si bien el rol de la hélice E23-1 en el ribosoma no se conoce, esta variabilidad producto de mutaciones, no afectaría la supervivencia del parásito. Esta región, comprende una secuencia de 33 nucleótidos, de los cuales 5 fueron seleccionados por su polimorfismo para establecer los haplotipos que caracterizaron las diferentes cepas de *B. bigemina*. El clon JG-29 fue el único que mostró un sólo haplotipo (H1), lo que motivó su utilización como cepa de referencia. Con la secuencia correspondiente a H1, Gubbels y col. (1999) habían desarrollado una sonda de ADN para identificar *B. bigemina* mediante RLBH. Cuando se analizaron las cepas de *B. bigemina* argentinas, este haplotipo fue identificado sólo en seis de las 15 cepas analizadas (BbiS3-i, BbiS3, BbiM1P, BbiM2P, BbiIvc y BbiIMo), lo que invalidó la aplicación de este RLBH con fines diagnóstico en Argentina. Todas las cepas de referencia locales compartieron el haplotipo H3, aunque también fue observado en la cepa BbiIvc de Israel. Simultáneamente se encontró que una misma cepa contenía más de un haplotipo y que los clones Bbi2A1 (atenuado) y Bbi9P1 (patógeno) poseían un genotipo caracterizado por los haplotipos H3-H4 y H3-H7 respectivamente, idénticos a cada una de las cepas parentales (BbiS1A-i y BbiS2P-i). Esto demuestra que durante la multiplicación *in vitro* se produjo una reducción en la estructura genética poblacional en relación a las cepas originales (BbiS1A y

BbiS2P) obtenidas de terneros, las que presentaron tres y cuatro haplotipos, respectivamente. La reducción de la diversidad genética poblacional ha sido demostrada recientemente durante el proceso de atenuación de *B. bovis* en cepas analizadas después de sucesivos pasajes en terneros esplenectomizados (Lau y col. 2011). La presencia de dos haplotipos en los clones biológicos indicaría la existencia de más de una copia del gen *18S rARN*, y que las cepas originales estarían constituidas por subpoblaciones con genotipo diferente.

Cuando Reddy y col. (1991) analizaron el gen *18S rARN* completo en el genoma del clon JG29, identificaron tres copias, dos de ellas idénticas, cuyas secuencias fueron diferentes a las de los clones argentinos. La presencia de dos haplotipos en los clones biológicos locales, sugiere que al igual que en el clon JG-29, uno de ellos está repetido y el otro está representado por una única copia. En este trabajo el gen del clon JG-29 mostró un único haplotipo porque el análisis se restringió a una región que incluyó sólo 5 sitios polimórficos.

La utilización de clones biológicos también permitió concluir que las cepas originales están constituidas por diferentes subpoblaciones, algunas de las cuales se habrían perdido como consecuencia de la adaptación a la multiplicación continua *in vitro*. Los sucesivos subcultivos sufridos por las cepas BbiS1A-i y BbiS2P-i antes de ser sometidas al proceso de clonación, sería la causa de la pérdida de algunas subpoblaciones. Sin embargo la cepa BbiS3-i mantuvo *in vitro* los tres haplotipos idénticos (H1-H2-H9) presentes en la cepa BbiS3. En este caso, el período de 80 días de adaptación *in vitro* de la cepa BbiS3-i no habría sido suficiente para reducir el número de subpoblaciones como ocurriera con las cepas BbiS1A y BbiS2P que, además de sucesivos pasajes *in vivo* se mantuvieron *in vitro* durante 150 y 230 días respectivamente.

Alternativamente se debe considerar la probabilidad de que la cepa BbiS3 estuviese constituida por una única subpoblación con tres copias diferentes del gen *18S rARN* aspecto que deberá confirmarse a través de la clonación biológica. Para *P. falciparum*, también se han observado evidencias de cambios poblacionales durante la adaptación al cultivo *in vitro*, atribuidos a la dificultad para reproducir *in vitro* las condiciones naturales de multiplicación provista por los hospedadores (Le Roux y col., 2009). La selección de subpoblaciones también fue demostrada por Baravalle y col. (2012) en cepas de *B. bovis* después de numerosos subcultivos *in vitro* o de sucesivos pasajes en terneros sin bazo.

La asociación entre los haplotipos establecidos a partir de los patrones moleculares observados entre las diferentes secuencias del gen *18S rARN* pudo ser esquematizada mediante un

dendograma. Este gen resultó un marcador molecular de utilidad para diferenciar las cepas argentinas de las extranjeras y agrupar a las primeras por su fenotipo de patogenicidad. Carson y col. (1994) también observaron diferencias en el patrón molecular obtenido entre las cepas latinoamericanas y las australianas de *B. bigemina* mediante la técnica de RAPD, diferenciandolas de acuerdo a su origen geográfico.

El haplotipo H3, mayoritario de las cepas de referencia argentinas, fue también encontrado en la mayoría de los bovinos infectados con *B. bigemina* con excepción de las muestras los bovinos NEA1c y NOA20. Por otro lado la muestra NOA3c, obtenida de un animal con babesiosis aguda, tuvo idéntico haplotipo que la cepa BbiS3 aislada de un portador sano de la misma región. A su vez la muestra NEA11c presentó dos haplotipos coincidentes con la cepa BbiM2P, ambas originadas de casos agudos y de la misma región. Esto sugiere que no hay asociación entre los haplotipos y el tiempo transcurrido desde la primo infección (aguda/crónica). El número de haplotipos dependería de la frecuencia de sucesivas re-infecciones y del grado de aislamiento de cada rodeo (ausencia de ingreso de animales de otras regiones).

Esto es particularmente cierto si consideramos que los haplotipos del *18S rARN* se mantuvieron estables 70 días después de la vacunación de bovinos con la cepa BbiS1A. Esta observación le confiere gran relevancia al gen *18S rARN* para el diseño de estudios epidemiológicos. Sin embargo deberá ser validado para establecer la variabilidad genética en bovinos naturalmente infectados. La prueba de RLBH, sería una herramienta útil para llevar adelante este tipo de estudios, pero requerirá la inclusión de sondas moleculares con todos los haplotipos encontrados para que pueda ser utilizado en diferentes regiones geográficas.

A través del gen *rap-1c* también se evidenció una reducción de la estructura genética poblacional de las cepas de *B. bigemina* después de la adaptación *in vitro*. En coincidencia con lo establecido a través del marcador *18s rARN*, también se detectó más de un genotipo en las cepas originales BbiS2P y BbiS1A, antes de su adaptación a la multiplicación continua *in vitro*. Después de ese período, las cepas sólo mostraron un genotipo. Sin embargo a diferencia del gen *18s rARN*, no se logró una clara discriminación entre las cepas argentinas y extranjeras, aunque permitió una diferenciación por fenotipo de patogenicidad. El análisis filogenético realizado por el método de Neihgboor-joining mostró un clado compuesto por las cepas con fenotipo atenuado mientras que las patógenas se agruparon en diferentes clados. Junto con las cepas atenuadas argentinas se agrupó la cepa vacunal (atenuada) australiana. Las excepciones fueron las cepas de Israel BbiIvc

y BbiIMo, que a pesar de ser cepas vacunales, se agruparon dentro en un clado patógeno (BbiIMo) o fuera del árbol (BbiIvc). Sin embargo el grado de atenuación de la patogenicidad de estas cepas no está bien establecida, porque aún cuando se atenuaron según el método descrito por Dalgliesh y col. (1981), las referencias indican que los bovinos vacunados con estas cepas debieron ser cuidadosamente controlados e incluso tratados para evitar la muerte (Shkap y col., 2005), lo que sugiere la persistencia del fenotipo virulento original.

Aunque a través del análisis por HRM del fragmento 3' del gen *rap-1c* también fue posible diferenciar dos genotipos relacionados al fenotipo de patogenicidad (*gA* y *gP*), este método sólo resultó de utilidad para las cepas ya establecidas *in-vitro* o amplificadas en terneros esplenectomizados. En el caso de las muestras extraídas de bovinos infectados naturalmente con *B. bigemina*, se amplificaron hasta seis haplotipos por muestra, lo que impidió una clara diferenciación entre ellas. La presencia de una o dos mutaciones dentro de los haplotipos, no impidió la confirmación de los fenotipos y los genotipos previamente establecidos mediante secuenciación.

Los 20 haplotipos (h) definidos por la región terminal 3' del gen *rap-1c* a partir del ADN de *B. bigemina* obtenido de cepas y de bovinos infectados naturalmente en la región NOA, indica la gran variabilidad de este marcador, independientemente del estatus de la infección. El haplotipo predominante en los bovinos muestreados en la región del NOA sobre 110 clones secuenciados fue el h13. Este no fue detectado en el NEA, sin embargo el número de muestras analizadas en esta región fue escaso y predominó el h17.

Las infecciones múltiples son comunes tanto en los vectores, como los hospedadores (Lord y col., 1999). Estos autores investigaron la heterogeneidad de las infecciones mediante genes codificantes de proteínas para *P. falciparum* en humanos y mosquitos; serotipos de *Trypanosoma*, subgénero *Nannomonas* identificados en moscas y serotipos del virus causante de la enfermedad Africana de los equinos (AHS) en cebras. Taylor y col (1997) sugirieron que la mezcla de genotipos en los hospedadores ocurre por co-infección, super-infección o mutación somática durante el curso de la infección. Los autores estudiaron la interacción y competencia de clones de *P. chabaudi* y su influencia en la infección, observando que la frecuencia relativa de ellos puede alterar el curso de la infección, así como también su transmisión. Por otro lado, Berens y col. (2007), utilizando una rt-PCR cuantitativa, demostraron la co-infección estable de dos cepas patógenas de *B. bovis* en bovinos y garrapatas. Ambas cepas de *Babesia* pudieron ser transmitidas

simultáneamente desde dos terneros infectados, a dos terneros susceptibles a través de la picadura de larvas de *R. microplus* infectadas. Estas larvas derivaban de los huevos puestos por garrapatas que se infectaron en los dos terneros iniciales, logrando cerrar el ciclo biológico.

No se han realizado estudios similares para *B. bigemina* y su vectores, sin embargo, la variedad de haplotipos definidos en muestras obtenidas de bovinos infectados naturalmente en el NOA, sugiere que también existen co-infecciones estables de *B. bigemina*, tanto en infecciones crónicas como en infecciones agudas. Una situación diferente se observó en tres muestras obtenidas de bovinos de la región del NEA, donde sólo se identificó un haplotipo por rodeo (H16 y H17) y los bovinos muestreados padecían infección aguda. Esta situación sería posible en rodeos cerrados en los que se seleccionaría un único genotipo. Estas observaciones coinciden con los estudios de Hilpertshauser y col. (2007) quienes utilizando el mismo marcador molecular, encontraron un único genotipo de *B. bigemina* durante un brote de la enfermedad. Considerando las múltiples variables involucradas en el ciclo biológico de *B. bigemina* (Ej. control de garrapatas mediante acaricidas, origen de las poblaciones de garrapatas, susceptibilidad de los hospedadores), se requiere continuar con las investigaciones para establecer la dinámica poblacional durante y después de una primo-infección por *B. bigemina*, para confirmar esta observación.

El análisis de las secuencias del gen *gp45* de las cepas de referencia mostró un alto grado de polimorfismo y generó dos clados claramente separados, entre las cepas de *B. bigemina* argentinas y las cepas extranjeras, con excepción de la cepa BbiM2P del NEA, que se agrupó con estas últimas. Las diferencias logradas durante la amplificación de las secuencias de *gp45* entre las cepas atenuadas (BbiS1A-i y BbiS1A) y la ausencia de amplificación del gen en las cepas patógenas (BbiS2P-i y BbiS2P), fue de utilidad para la caracterización de estas cepas de referencia. La amplificación de este gen permitiría distinguir la cepa BbiS1A en animales vacunados cuando se lo utiliza en conjunto con los demás marcadores, tal como se observó al evaluar un clon atenuado y patógeno en el mismo cultivo.

Esto concuerda con lo observado por Fisher y col. (2001), quienes tampoco pudieron amplificar ni clonar este gen en cepas de *B. bigemina* provenientes de Puerto Rico y Santa Cruz (Islas Vírgenes de los Estados Unidos). De acuerdo con los autores, esto podría atribuirse a la falta del gen en el genoma de algunas cepas.

Los ITS mostraron gran variabilidad y al clonar molecularmente este marcador, se encontraron varias copias, lo que dificultó su utilidad como marcador. Utilizando las mismas secuencias de *B.*

bigemina, Hilpertshauer y col. (2007) definieron 24 variantes de 7 aislamientos, arribando a la misma conclusión. Esto no ha sido uniforme para todas las especies del género. Secuencias polimórficas identificadas en los ITS permitieron a otros autores diferenciar cepas de *B. major* y *B. ovata* (Liu y col., 2008). Estos autores detectaron que aislamientos de cada hemoparásito mostraban mayor porcentaje de similitud intraespecífica que interespecífica, siendo de utilidad para su caracterización.

El análisis de los micro y minisatélites específicos de 17 *loci* permitieron seleccionar 4 secuencias específicas, útiles como marcadores de *B. bigemina*, permitiendo establecer patrones moleculares diferentes entre cepas de *B. bigemina*. Aunque De Meeûs y col., (2007) recomendaron el uso de las secuencias repetitivas de 7 *loci* para un estudio poblacional completo, existen antecedentes de la utilización de 3 minisatélites para el estudio de la estructura poblacional de *Trypanosoma brucei* (McLeod y col., 2000) y 5 microsatélites para determinar la biología y caracterización genotípica *T. gondii* (Ajzenberg y col., 2004). Perez-Llaneza y col., (2010) encontraron en el genoma completo de *B. bovis*, 3885 regiones con estas secuencias repetitivas de las que sólo seleccionaron 14 *loci* útiles para comparar diferentes cepas, utilizando el software TRF en condiciones más laxas que las desarrolladas en este trabajo.

El análisis mediante UPGMA agrupó las cepas argentinas en un clado distinto al de las extranjeras, al igual que Perez-Llaneza y col. (2010), quienes trabajaron con dos cepas argentinas de *B. bovis*, dos de Méjico y una de EEUU.

A su vez, las cepas locales se diferenciaron en dos clados según el fenotipo de patogenicidad, consolidando los resultados obtenidos con el gen *18S rARN*. Las cepas atenuadas constituyeron un clado aparte, definido fuera del de las cepas patógenas y aislamientos.

Las muestras del NEA (a excepción de la NEA11c) se agruparon junto a las cepas provenientes de Corrientes (BbiM1P y BbiM2P). Estas muestras fueron obtenidas de bovinos con signos clínicos de babesiosis, al igual que las cepas BbiM1P y BbiM2P. Esto soporta la hipótesis del predominio de un genotipo patógeno en los animales enfermos con babesiosis aguda por *B. bigemina* observado en la región del NEA, confirmando los resultados obtenidos con el gen *rap-1c*.

Los marcadores moleculares más específicos y estables evaluados en este trabajo fueron el gen *18S rARN* y los micro-minisatélites. La combinación de ellos permitió diferenciar las cepas atenuadas de las patógenas y las cepas argentinas de las extranjeras.

La diferenciación entre cepas identificadas en el NEA y NOA de animales infectados naturalmente no fue claramente observada, por ello será necesario analizar un mayor número de muestras para confirmar estas observaciones.

Perspectivas futuras:

- Caracterización molecular de *B. bigemina* diagnosticada en casos clínicos de babesiosis de diferentes áreas geográficas.
- Identificación de la cepa vacunal BbiS1A en bovinos vacunados y desafiados naturalmente con cepas silvestres.
- Confirmación de la asociación entre babesiosis agudas en rodeos con haplotipos múltiples y únicos, utilizando el gen *rap-1c*.

Conclusiones:

- Los clones de *B. bigemina* provenientes de cepas Argentinas son los únicos disponibles y facilitaron la caracterización del gen *18S rARN*.
- Los clones también permitieron analizar la pérdida de subpoblaciones cuando los aislamientos son adaptados al desarrollo *in vitro*.
- El uso combinado de los marcadores seleccionados para esta tesis, permitió caracterizar cepas de referencia de Argentina.
- Las cepas argentinas tuvieron patrones moleculares diferentes a los de las cepas extranjeras, aspecto de gran relevancia epidemiológica y sin antecedentes en nuestra región.
- El gen *rap-1c* permite diferenciar entre cepas de diferente genotipo asociado a la patogenicidad. Se comprobó la utilidad de la técnica de HRM para diferenciar cepas de referencia con diferente fenotipo.
- Se determinó que los genotipos no estarían agrupados de acuerdo a las regiones geográficas determinadas en el país.

9. BIBLIOGRAFÍA.

- Adaszek, L. y Winiarczyk, S. (2010) *Application of the SYBR Green real-time HRM PCR technique in the differentiation of the **Babesia canis canis** protozoa isolated in the areas of eastern Poland.* Parasitol. Res. 106: 1253-1256.
- Aguirre, D.H.; Mangold, A.J.; Gaido, A.B.; de Ríos, L.G. y Guglielmone, A.A. (1989) *Evaluación de la infectividad de una vacuna congelada en nitrógeno líquido elaborada en base a **Babesia bigemina** atenuada.* Rev. Med. Vet. 70: 142-145.
- Ajzenberg, D.; Bañuls, A.L.; Su, C.; Dumetre, A.; Demar, M.; Carme, B. y Darde, M.L. (2004) *Genetic diversity, clonality and sexuality in **Toxoplasma gondii**.* Int. J. Parasitol. 34: 1185-1196.
- Allred, D.R. (2001) *Antigenic variation in babesiosis is there more than one why?* Microbes and Infect. 3: 481-491.
- Allred, D.R. (2003) *Babesiosis: persistence in the face of adversity.* Trends in Parasitol. 19: 51-55.
- Allsopp, M.T.E.P.; Cavalier-Smith, T.; De Waal, D.T. y Allsopp, B.A. (1994) *Phylogeny and evolution of the piroplasms.* Parasitol. 108: 147-152.
- Allsopp, M.T.E.P. y Allsopp, B.A. (2006) *Molecular sequence evidence for the reclassification of some **Babesia** species.* Ann. N. Y. Acad. Sci. 1081: 509-517.
- Anderson, T.J.; Haubold, B.; Williams, J.T.; Estrada-Franco, J.G.; Richardson, L.; Mollinedo, R.; Bockarie, M.; Mokili, J.; Mharakurwa, S.; French, N.; Whitworth, J.; Velez, I.D.; Brockman, A.H.; Nosten, F.; Ferreira, M.U. y Day, K.P. (2000) *Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite **Plasmodium falciparum**.* Mol. Biol. Evol. 17: 1467-1482.
- Andriantsoanirina, V.; Lascombes, V.; Ratsimbaoa, A.; Bouchier, C.; Hoffman, J.; Tichit, M.; Rabarijaona, L. P.; Durand, R. y Menard, D. (2009) *Rapid detection of point mutations in **Plasmodium falciparum** genes associated with antimalarial drugs resistance by using High-Resolution Melting analysis.* J. Microbiol. Methods. 78: 165-170.

- Anziani, O.S.; Guglielmone, A.A.; Abdala, A.A.; Aguirre, D.H. y Mangold, A.J. (1993) *Protección conferida por **Babesia bovis** vacunal en novillos Holando Argentino*. Rev. Med. Vet., 74: 47-49.
- Archer, R.K. (1977) *Technical methods*. En: *Comparative clinical haematology* (Eds.: Archer, R.K. y Jeffcott, L.B.), Blackwell Scientific Publications, Londres, Inglaterra, p. 537-610.
- Ausubel, F.; Brent, R.; Kingston, R.; Moore, D.; Seidman, J.; Smith, J. y Struhl, K. (Eds) (2008) *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates y John Wiley & Sons, New York, USA.
- Awad, H.; Antunes, S.; Galindo, R.; do Rosario, V.; De la Fuente, J.; Domingos, A. y El Hussein, A.M. (2011) *Prevalence and genetic diversity of **Babesia** and **Anaplasma** species in cattle in Sudan*. Vet. Parasitol. 181: 146-152.
- Baravalle, E.; Thompson, C.; Torioni de Echaide, S.; Palacios, C.A.; Valentini, B. y Suarez, C. (2010) *The novel protein BboRhop68 is expressed by intraerythrocytic stages of **Babesia bovis***. Parasitol. Int. 59: 571-578.
- Baravalle, E.; Thompson, C.; Valentini, B.; Ferreira, M.B.; Torioni de Echaide, S.; Florin-Christensen, M. y Echaide, I.E. (2012) ***Babesia bovis** biological clones and the inter-strain allelic diversity of the Bv80 gene support subpopulation selection as a mechanism involved in the attenuation of two virulent isolates*. Vet. Parasitol. doi:10.1016/j.vetpar.2012.06.037. En Prensa.
- Beck, H.S.; Blake, D.; Darde, M.L.; Felger, I.; Pedraza Díaz, S.; Regidor-Cerrillo, J.; Gómez-Bautista, M.; Ortega-Mora, L.M.; Putignani, L.; Shiels, B.; Tait, A. y Weir, W. (2009) *Molecular approaches to diversity of populations of apicomplexan parasites*. Int. J. Parasitol. 39: 175-189.
- Benson, G. (1999) *Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences*. Nucleic Acids Res. 27: 573-580.
- Berens, S. J.; Brayton, K.A. y McElwain, T.F. (2007) *Coinfection with antigenically and genetically distinct virulent strains of **Babesia bovis** is maintained through all phases of the parasite life cycle*. Infect. Immun. 75(12): 5769-76.

- Bhoora, R.; Franssen, L.; Oosthuizen, M.C.; Guthrie, A.J.; Zweigarth, E.; Penzhorn, B.L.; Jongejan, F. y Collins, N.E. (2008) *Sequence heterogeneity in the 18S rRNA gene within **Theileria equi** and **Babesia caballi** from horses in South Africa.* Vet. Parasitol. 159(2): 112-20.
- Bhoora, R.; Quan, M.; Zweygarth, E.; Guthrie, A.J.; Prinsloo, S.A. y Collins, N.E. (2010) *Sequence heterogeneity in the gene encoding the rhoptry-associated protein-1 (RAP-1) of **Babesia caballi** isolates from South Africa.* Vet. Parasitol. 169(3-4): 279-88.
- Bock, R.; de Vos, A. y Jorgensen, W. (2004) *Babesiosis of cattle.* Parasitol. 129: 247-269.
- Boero, J.J. (1976) *Piroplasmosis.* En: Parasitosis animals. Eudeba, Buenos Aires, Argentina, p. 201-226.
- Bono, M.F.; Mangold, A.J.; Baravalle, E.; Valentini, B.; Thompson, C.; Wilkowsky, S.; Echaide, I.; Farber, M. y Torioni de Echaide, S. (2008) *Efficiency of a recombinant MSA-2c-based ELISA to establish the persistence of antibodies in cattle vaccinated with **Babesia bovis**.* Vet. Parasitol. 157: 203-210.
- Böse, R.; Jorgensen, W.K.; Dalgliesh, R.J.; Friedhoff, K.T. y De Vos, A.J. (1995) *Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis.* Vet. Parasitol. 57: 61-74.
- Brown, W.C; Norimine, J.; Knowles, D. y Goff, W.L. (2006) *Immune control of **Babesia bovis** infection.* Vet. Parasitol. 138: 75-87.
- Callow, L.L. y Mellors, L.T. (1966) *A new vaccine for **Babesia argentina** infection prepared in splenectomised calves.* Aust Vet J. 42: 464-465.
- Callow, L.L.; Mellors, L.T. y McGregor, W. (1979) *Reduction in virulence of **Babesia bovis** due to rapid passage in splenectomized cattle.* Int. J. Parasitol. 9: 333-338.
- Callow, L.L.; Rogers, R.J. y De Vos, A.J. (1993) *Tick-borne diseases: cattle-pathology and serology.* En: *Australian Standard Diagnostic Techniques for Animal Diseases* (Eds.: Corner, L.A. y Bagust, T. J.), CSIRO Information, East Melbourne, Australia, pp. 1-16.
- Callow, L.L. y Pepper, P.M. (1974) *Measurement of and correlations between fever, changes in the packed cell volume and parasitaemia in the evaluation of the susceptibility of cattle to infection with **Babesia argentina**.* Aust. Vet. J. 50: 1-5.

- Carcy, B.; Precigout, E.; Schetters, T. y Gorenflot, A. (2006) *Genetic basis for GPI-anchor merozoite surface antigen polymorphism of **Babesia** and resulting antigenic diversity*. Vet. Parasitol. 138: 33-49.
- Carson, C.A.; Brandt, H.M.; Jensen, J.B.; Bailey, C.W. y Allen, G.K. (1994) *Use of random amplified polymorphic DNA analysis to compare **Babesia bovis** and **Babesia bigemina** isolates*. Parasitol. Res. 80: 312-315.
- Cooke, B.M.; Mohandas, N. y Coppel, R.L. (2001) *The malaria infected red blood cell: structural and functional changes*. Adv. Parasitol. 50: 1-86.
- Criado-Fornelio, A.; Martinez-Marco, A.; Buling-Saraña, A. y Barba-Carretero, J.C. (2003a) *Molecular studies on **Babesia**, **Theileria** and **Hepatozoon** in Southern Europe. Part I. Epizootological aspects*. Vet. Parasitol. 113: 189-201.
- Criado-Fornelio, A.; Martinez-Marcos, A.; Buling-Saraña, A. y Barba-Carretero, J.C. (2003b) *Molecular studies on **Babesia**, **Theileria** and **Hepatozoon** in southern Europe Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history*. Vet. Parasitol. 114: 173-194.
- Criado-Fornelio, A.; Buling, A.; Asenzo, G.; Benitez, D.; Florin-Christensen, M.; Gonzalez-Oliva, A.; Henriques, G.; Silva, M.; Alongi, A. y Agnone, A. (2009) *Development of fluorogenic probe-based PCR assays for the detection and quantification of bovine piroplasmids*. Vet. Parasitol. 162: 200-206.
- Curnow, J.A. (1973a) [Studies on antigenic changes and strain differences in **Babesia argentina** infections](#). Aust. Vet. J. 49(6): 279-83.
- Curnow, J.A. (1973b) *The use of slide agglutination test to demonstrate antigenic differences between **Babesia bigemina** parasites*. Aust. Vet. J. 49: 290-293.
- Dalgliesh, R.J.; Callow, L.L.; Mellors, L.T. y McGregor, W. (1981) *Development of a highly infective **Babesia bigemina** vaccine of reduced virulence*. Aust. Vet. J. 57: 8-11.
- Dalgliesh, R. J. (1993) *Babesiosis*. En: *Immunology and Molecular Biology of Parasite Infections* (ed. Warren, S. K.), Oxford, Blackwell, p. 352-383.
- Dalrymple, B.P. (1992a) *Diversity and selection in **Babesia bovis** and their impact on vaccine use*. Parasitol. Today. 8: 21-23.
- Dalrymple, B.P.; Jorgensen, W.K.; de Vos, A.J. y Wright, I.G. (1992b) *Analysis of the composition of samples of **Babesia bovis** and the influence of different environmental conditions on genetically distinct subpopulations*. Int. J. Parasitol. 22: 731-737.

- Darzynkiewicz, Z. (1990) *Differential staining of DNA and RNA in intact cells and isolated cell nuclei with acridine orange*. *Methods Cell. Biol.* 33: 285-298.
- de Melo Ferreira, A.; Vitor, R.W.; Carneiro, A.C.; Brandao, G.P. y Melo, M.N. (2004) *Genetic variability of Brazilian **Toxoplasma gondii** strains detected by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) and simple sequence repeat anchored-PCR (SSR-PCR)*. *Infect. Genet. Evol.* 4: 131-142.
- de Meeûs, T.; McCoy, K. D.; Prugnolle, F.; Chevillon, C.; Durand, P.; Hurtrez-Boussès, S. y Renaud, F. (2007) *Population genetics and molecular epidemiology or how to "débusquer la bête"*. *Infect. Genet. Evol.* 7: 308-332.
- de Rijk, P.; Neefs, J.M.; Van de Peer, Y. y De Wachter, R. (1992) *Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences*. *Nucleic Acids Res.* 20: 2075-2089.
- de Rijk, P. y De Wachter, R. (1997) *RnaViz, a program for the visualisation of RNA secondary structure*. *Nucleic Acids Res.* 25: 4679-4684.
- de Vos, A.J.; Dalglish, R.J. y Callow, L.L. (1987) **Babesia**. En: *Immune Responses in Parasitic Infections. Immunology, Immunopathology and Immunoprophylaxis, vol. III* (Ed.: Soulsby, E. J. L.), CRC Press INC., Boca Raton, Florida, Estados Unidos de América.
- de Vos, A. J.; Jorgensen, W. K. y Molloy, J. B. (2000) *Bovine babesiosis*. En: *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*, Cuarta Edición, Office International des Epizootic, Paris, p. 412-422.
- Dowling, T. E.; Moritz, C.; Palmer, J.D. y Rieseberg, L.H. (1996) *Nucleic Acids III: Analysis of fragments and restriction sites*. En: *Molecular Systematics II Edition* (Eds.: Hillis, D.M; Moritz, C. y Mable, B.K.), Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, Estados Unidos de América, p. 249-320.
- Druilhe, P.; Daubersies, P.; Patarapotikul, J.; Gentil, C.; Chene, L.; Chongsuphajaisiddhi, T.; Mellok, S. y Langsley, G. (1998) *A primary malarial infection is composed of a very wide range of genetically diverse but related parasites*. *J. Clin. Invest.* 101: 2008-2016.
- Echaide, I.E.; De Echaide, S.T. y Guglielmone, A.A. (1993) *Live and soluble antigens for cattle protection to **Babesia bigemina***. *Vet. Parasitol.* 51: 35-40.

- Echaide, S.T.; Echaide, I.E.; Gaido, A.B.; Mangold, A.J.; Lugaresi, C. I.; Vanzini, V. R. y Guglielmone, A. A. (1995) *Evaluation of an enzyme-linked immunoabsorbent assay kit to detect **Babesia bovis** antibodies in cattle*. *Prev. Vet. Med.* 24: 277-283.
- Echaide, I.E.; Hines, S.; McElwain, T.; Suárez, C.E.; McGuire, T.C. y Palmer, G. (1998) *In vivo binding of immunoglobulin M to the surfaces of **Babesia bigemina**-infected erythrocytes*. *Infect. Immun* 66: 2922-2927.
- Echaide, S.; Mangold, A. y Lugaressi, C. (2004) *ELISA para el diagnóstico de babesiosis bovina causada por **Babesia bovis***. XIX PANVET, Buenos Aires, Argentina.
- Excoffier, L., Smouse, P. y Quattro, J. (1992) *Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data*. *Genetics* 131: 479-491.
- Excoffier, L., Laval, G. y Schneider, S. (2005) *Arlequín ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis*. *Evol. Bioinform. Online* 1: 47-50.
- Figuroa, J.V.; Chieves, L.; Johnson, G.S. y Buening, G.M. (1992) *Detection of **Babesia bigemina**-infected carriers by polymerase chain reaction amplification*. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2576-2582.
- Figuroa, J.V.; Chieves, L.P.; Johnson, G.S. y 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
- Fisher, T.; McElwain, T. y Palmer, G. (2001) *Molecular basis for variable expression of merozoite surface antigen gp45 among American isolates of **Babesia bigemina***. *Infect. Immun.* 69: 3782-3790.
- Florin-Christensen, M.; Suarez, C.E.; Hines, S.A.; Palmer, G.H.; Brown, W.C. y McElwain, T.F. (2002) *The **Babesia bovis** merozoite surface antigen 2 locus contain four tandemly arranged and expressed genes encoding immunologically distinct proteins*. *Infect. Immun.* 70: 3566-3575.
- Freeman, J.M.; Kappmeyer, L.S.; Ueti, M.; McElwain, T.; Baszler, T.V.; Echaide, I.; Nene, M.W. y Knowles, D. (2010) *A **Babesia bovis** gene syntenic to **Theileria parva** p67 is expressed in blood and tick stage parasites*. *Vet. Parasitol.* 173: 211-218.
- Gallagher, S.R. y Desjardins, P.R. (2008) *Quantification of DNA and RNA adsorption and fluorescence spectroscopy*. En: *Current Protocols in Molecular Biology* (Eds.:

- Ausubel, F.; Brent, R.; Kingston, R.; Moore, D.; Seidman, J.; Smith, J. y Struhl, K. Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons , New York, Estados Unidos de América, A3D: 1-22.
- Gasser, R.B. (1999) *PCR-based technology in veterinary parasitology*. Vet. Parasitol. 84: 229-258.
- Gerbi, S (1986) *The evolution of eukaryotic ribosomal DNA*. Biosystems. 19: 247-258.
- Gill, A.C.; Cowman, A.F.; Stewart, N.P.; Kemp, D.J. y Timms, P. (1987) *Babesia bovis: molecular and biological characteristic of cloned parasite lines*. Exp. Parasitol. 63: 180-188.
- Ginzinger, D.G. (2002) *Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream*. Exp. Hematol. 503: 503-512.
- Goff, W.L.; Bastos, R.G.; Brown, W.C.; Johnson, W.J. y Schneider, D.A. (2010) *The bovine spleen: Interactions among splenic cell populations in the innate immunologic control of hemoparasitic infections*. Vet. Immunol. Immunop. 138: 1-14.
- Gubbels, J.; de Vos, A.; Van der Weide, M.; Viseras, J.; Schouls, L.; de Vries, E. y Jongejan, F. (1999) *Simultaneous detection of bovine Theileria and Babesia species by reverse line blot hybridization*. J. Clin. Microbiol. 37: 1782-1789.
- Guglielmo, A.A. (1992) *The level of infestation with the vector of cattle babesiosis in Argentina*. Mem. Inst. Osvaldo Cruz. 87: 133-137.
- Guglielmo, A.A.; Aguirre, D.H.; Spath, E.J.A.; Gaido, A.B.; Mangold, A.J. y de Ríos, L. G. (1992) *Long-term study of incidence and financial loss due to cattle babesiosis in an Argentinian dairy farm*. Prev. Vet. Med. 12: 307-312.
- Guglielmo, A.A.; Torioni de Echaide, S.; Perez y Santaella, M.; Iglesia, J.; Vanzini, V.R.; Lugaresi, C. y Dellepiane, E.L. (1997) *Cross-sectional estimation of Babesia bovis antibody prevalence in an area of Argentina used for extensive cattle breeding as an aid to control babesiosis*. Prev. Vet. Med. 30: 151-154.
- Guglielmo, A.A. y Vanzini, V.R. (1999) *Análisis de fracasos en la prevención de anaplasmosis y la babesiosis en bovinos inoculados con vacunas vivas*. Rev. Med. Vet 80: 66-68.
- Hall, T.A. (1999) *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT*. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41: 95-98.

- Hilpertshauer, H.; Deplazes, P.; Schnyder, M.; Gern, L. y Mathis, A. (2007) *Babesia spp. identified by PCR in ticks collected from domestic and wild ruminants in Southern Switzerland*. Appl. Environ. Microbiol. 72: 6503-6507.
- Hodgson, J.L. (1992) *Biology and Transmission of Babesia bigemina in Boophilus microplus*. Trop. Vet. Med. 653: 42-51.
- Iyer, J.K.; Amaladoss, A.; Genesan, S. y Preiser, P. (2007) *Variable expression of the 235 kDa rhoptry protein of Plasmodium yoelii mediate host cell adaptation and immune evasion*. J. Mol. Microbiol. 65: 333-346.
- Jacobo, R.A.; Cipolini, M.F; Storani, C.A., Martinez, D.E. y Martinez, E.I. (2004) *Infeción con el complejo tristeza del bovino en búfalos*. Rev. Med. Vet. 85: 203-204.
- Jaccard, P. (1908) *Nouvelles recherches sur la distribution florale*. Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat. 44: 223-270.
- Khosravinia, H. y Ramesha, K.P. (2007) *Influence of EDTA and magnesium on DNA extraction from blood samples and specificity of polymerase chain reaction*. Afr. J. Biotechnol. 6: 184-187.
- Kimura, M. (1980) *A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences*. J. Mol. Evol. 16(2): 111-20.
- Lau, A.O.; Kalyanaraman, A.; Echaide, I.; Palmer, G.; Bock, R.; Pedroni, M.J.; Rameshkumar, M.; Ferreira, M.B.; Fletcher, T.I. y McElwain, T.F. (2011) *Attenuation of virulence in an apicomplexan hemoparasite results in reduced genome diversity at the population level*. BMC Genomics. 12: 1-13.
- Lehtinen, L.E.; Birkenheuer, A.J.; Droleskey, R.E. y Holman, P.J. (2008) *In vitro cultivation of a newly recognized Babesia sp. in dogs in North Carolina*. Vet. Parasitol. 151: 150-157.
- LeRoith, T.; Brayton, K.; Molloy, J.; Bock, R.; Hines, S.; Lew, A. y McElwain, T. (2005) *Sequence variation and immunologic cross-reactivity among Babesia bovis merozoite surface antigen 1 proteins from vaccine strains and vaccine breakthrough isolates*. Infect. Immun. 73: 5388-5394.
- LeRoux, M.; Lakshmanan, V. y Daily, J.P. (2009) *Plasmodium falciparum biology: analysis of in vitro versus in vivo growth conditions*. Trends Parasitol. 25: 474-481.
- Levy, M. y Ristic, M.G. (1980) *Babesia bovis: continuous cultivation in a microaerophilous stationary phase culture*. Science. 207: 1218-1220.

- Lew, A. y Jorgensen, W. (2005) *Molecular approaches to detect and study the organism causing bovine tick borne diseases: babesiosis and anaplasmosis*. Afr. J. Biotechnol. 4: 292-302.
- Li, J.; Gutell, R.R.; Damberger, S.H.; Wirtz, R.A.; Kissinger, J.C.; Rogers, M.J.; Sattabongkot, J. y McCutchan, T.F. (1997) *Regulation and trafficking of the three distinct 18s ribosomal RNAs during development of the malaria parasite*. J. Mol. Evol. 269: 203-213.
- Liu, J.; Yin, H.; Liu, G.; Guan, G.; Miling, M.; Liu, A.; Liu, Z.; Li, Y.; Ren, Q.; Dang, Z.; Gao, J.; Bai, Q.; Zhao, H. y Luo, J. (2008) *Discrimination of **Babesia major** and **Babesia ovata** based on ITS1-5.8S-ITS2 region sequences of rRNA gene*. Parasitol. Res. 102: 709-713.
- Lombardero, O.J.; Schiffo, H.P. y Bettinotti, C.A. (1978) *Tristeza y premunición* En: Primer Simposio de Actualización Veterinaria del Nordeste. Publicación de la Facultad de ciencias veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina, p. 7-38.
- Lord, C.C.; Barnard, B.; Day, K.P.; Hargrove, J.W.; McNamara, J.J.; Paul, R.E.L.; Trenholme, K. y Woolhouse, M.E.J. (1999) *Aggregation and distribution of strains in microparasites*. Phil. Trans. R. Soc. Lond. 354: 799-807.
- Mackenstedt, U.; Gauer, M.; Fuchs, P.; Zapf, F.; Schein, E. y Mehlhorn, H. (1995) *DNA measurements reveal differences in the life cycles of **Babesia bigemina** and **Babesia canis**, two typical members of the genus **Babesia***. Parasitol. Res. 81: 595-604.
- MacLeod, A.; Tweedie, A.; Welburn, S.C.; Maudlin, I.; Turner, M.R. y Tait, A. (2000) *Minisatellite marker analysis of **Trypanosoma brucei**: Reconciliation of clonal, panmitic, and epidemic population genetic structures*. Proc. Nat. Acad Sci. USA. 97: 13442-13447.
- Madrugá, C.R.; Leal, C.R.; Ferreira, A.M.; Araujo, F.R.; Bonato, L.V.; Kessler, R.H.; Schenk, M.A. y Soares, C.O. (2002) *Genetic and antigenic analysis of **Babesia bigemina** isolates from five geographical regions of Brazil*. Pesquisa Vet. Brasil. 22: 153-160.
- Mahoney, D.F. y Ross, D.R. (1972). *Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis*. Aust. Vet. J. 48, 292-298.

- Mahoney, D.F.; Wright, I.G. y Mirre, G.B. (1973). *Bovine babesiosis: the persistence of immunity to **Babesia argentina** and **Babesia bigemina** in calves (**Bos taurus**) after naturally acquired infection*. Ann. Trop. Med. Parasitol. 67: 197-203.
- Mahoney, D.F. (1973) *Babesiosis of cattle*. Australian meat research comitee review, 12: 1-21.
- Mahoney, D.F.; Kerr, J.D.; Goodger, B.V. y Wright, I.G. (1979). *The immune response of cattle to **Babesia bovis** (syn. **B. argentina**)*. Studies on the nature and specificity of protection. Int. J. Parasitol. 9: 297-306.
- Mangold, A.J.; Bermudez, A.C.; Anziani, O.S.; Abdala, A. y Guglielmone, A. (1992) *Efectos clínicos de **Babesia bigemina** vacunal o patógena en novillos Holando Argentino*. Rev Med Vet. 73: 43-45.
- Mazuz, M.L.; Molad, T.; Fish, L.; Leibovitz, B.; Wolkomirsky, R.; Fleiderovitz, L. y Shkap, V. (2012) *Genetic diversity of **Babesia bovis** in virulent and attenuated strains*. Parasitology 139(3): 317-323.
- McCarthy, L.R. y Senne, J.E. (1980) *Evaluation of acridine orange stain for detection of microorganisms in blood cultures*. J. Clin. Microbiol. 11: 281-285.
- McCutchan, T.F.; Li, J.; McConkey, G.A.; Rogers, M.J. y Waters, A.P. (1995) *The cytoplasmic ribosomal RNAs of **Plasmodium spp.*** Parasitol. Today. 11: 134-138.
- McElwain, T.F.; Perryman, L.E.; Musoke, A.J. y McGuire, T.C. (1991) *Molecular characterization and immunogenicity of neutralization-sensitive **Babesia bigemina** merozoite surface proteins*. Mol Biochem. Parasitol. 47: 213-222.
- Molloy, J.B.; Bowles, P.M.; Jeston, P.J.; Bruyeres, A.G.; Bowden, J.M.; Bock, R.E.; Jorgensen, W.K.; Blight, G.W. y Dalgliesh, R.J. (1998) *Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to **Babesia bigemina** in cattle*. Parasitol. Res. 84: 651-656.
- Nei, M. y Kumar, S. (2000) *Population trees from genetic markers*. En: *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, New York, Estados Unidos de América, p. 265-289.
- Nevils, M.A.; Figueroa, J.V.; Turk, J.R.; Canto, G.J.; Le, V.; Ellersieck, M.R. y Carson, C.A. (2000) *Cloned lines of **Babesia bovis** differ in their ability to induce cerebral babesiosis in cattle*. Parasitol. Res. 86: 437-443.

- Niu, Q.; Luo, J.; Liu, Z.; Ma, M.; Liu, A.; Gao, J.; Ren, Q.; Li, Y.; Qiu, J. y Yin, H. (2009) *Differentiation of two ovine **Babesia** based on the ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) sequences*. Exp. Parasitol. 121: 64-68.
- Norman, G.R. y Streiner, D.L. (2000) *Nonparametric Statistics. Measures of associations for categorical data*. En: Bioestadística. (Eds. Norman, G.R. y Streiner, D.L.) Ontario, Canadá, pp. 163-169.
- Odongo, D.O.; Oura, C.A.L.; Spooner, P.R.; Kiara, H.; Mburu, D.; Hanotte, O.H. y Bishop, R.P. (2006) *Linkage disequilibrium between alleles at highly polymorphic mini- and micro-satellite loci of **Theileria parva** isolated from cattle in three regions of Kenya*. Int. J. Parasitol. 36(8): 1-10.
- Ojeda, J.J.; Orozco, L.; Flores, R.; Rojas, C.; Figueroa, J.V. y Alvarez, J.A. (2010) *Validation of an attenuated live vaccine against babesiosis in native cattle in an endemic area*. Transbound. Emerg. Dis. 57: 84-86.
- Oliveira, M.C.S.; Oliveira-Sequeira, T.C.G.; Regitano, L.C.A.; Alencar, M.M.; Néo, T.A.; Silva, A.M. y Oliveira, H. N. (2008) *Detection of **Babesia bigemina** in cattle of different genetic groups and in **Rhipicephalus (Boophilus) microplus** tick*. Vet. Parasitol. 155: 281-286.
- Oura, C.A.L.; Odongo, D.O.; Lubega, G.W.; Spooner, P.R.; Tait, A. y Bishop, R.P. (2003) *A panel of microsatellite and minisatellite markers for the characterization of field isolates of **Theileria parva***. Int. J. Parasitol. 33: 1641-1653.
- Oura, C.A.L.; Asimwe, B.B.; Weir, W.; Lubega, G.W. y Tait, A. (2005) *Population genetic analysis and sub-structuring of **Theileria parva** in Uganda*. Mol. Biochem. Parasitol. 140: 229-239.
- Palmer, D.A.; Buening, G.M. y Carson, C.A. (1982) *Cryopreservation of **Babesia bovis** for *in vitro* cultivation*. Parasitology. 84: 567-572.
- Palumbi, S.R. (1996) *Nucleic Acids II: The polymerase chain reaction*. En: *Molecular Systematics II Edition* (Eds.: Hillis, D.M; Moritz, C. y Mable, B.K.), Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, Estados Unidos de América, p. 205-247.
- Patel, V. (2009) *High-resolution melt analysis applications*. Genet. Eng. Biotechnol. 29: 1-3.
- Perez-Llaneza, A.; Caballero, M.; Baravalle, E.; Mesplet, M.; Mosqueda, J.; Suarez, C.E.; Echaide, I.; Katzer, F.; Pacheco, G.; Florin-Christensen, M. y Schnittger, L. (2010)

- Development of a tandem repeat-based multilocus typing system distinguishing **Babesia bovis** geographic isolates.* Vet. Parasitol. 167(2-4): 196-204.
- Pfeffer, M.; Wiedmann, M. y Batt, C.A. (1995) *Applications of DNA amplification techniques in veterinary diagnostics.* Vet. Res. Comm. 19: 375-407.
- Ragozo, A.M.A.; Pena, H.F.; Yai, L.E.O.; Su, C. y Gennari, S.M. (2010) *Genetic diversity among **Toxoplasma gondii** isolates of small ruminants from Brazil. Novel genotypes revealed.* Vet. Parasitol. 170: 307-312.
- Read, A.F. y Taylor, L.H. (2001) *The ecology of genetically diverse infections.* Science. 292: 1099-1102.
- Reddy, G.R.; Chakrabarti, D.; Yowell, C.A. y Dame, J.B. (1991) *Sequence microheterogeneity of the three small subunit ribosomal RNA genes of **Babesia bigemina**: expression in erythrocyte culture.* Nucleic Acids. Res. 19: 3641-3645.
- Regidor-Cerrillo, J.; Pedraza-Díaz, S.; Gómez-Bautista, M. y Ortega-Mora, L.M. (2006) *Multilocus microsatellite analysis reveals extensive genetic diversity in **Neospora caninum**.* J. Parasitol. 92: 517-524.
- Riek, R.F. (1964) *The life cycle of **Babesia bigemina** (Smith and Kilborne, 1983) in the tick vector **Boophilus microplus** (Canestrini).* Aust. J. Agr. Res. 15: 802-821.
- Rohlf, F.J. (1997) *NTSYS-PC. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.0.* Applied Biostatistics Inc., Setauket, Nueva York, Estados Unidos de América.
- Saitou, N. y Nei, M. (1987) *The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees.* Mol. Biol. Evol. 4: 406-425.
- Shkap, V.; Leibovitz, B.; Krigel, Y.; Hammershlag, J.; Marcovics, A.; Fish, L.; Molad, T.; Savitsky, I. y Mazuz, M. (2005) *Vaccination of older **Bos taurus** bulls against bovine babesiosis.* Vet. Parasitol. 129: 235-242.
- Schuster, F.L. (2002) *Cultivation of **Babesia** and **Babesia**-like blood parasites: Agents of an Emerging zoonotic disease.* Clin. Microbiol. Rev. 15: 365-373.
- Simuunza, M.; Bilgic, H.; Karagenc, T.; Syakalima, M.; Shiels, B.; Tait, A. y Weir, W. (2011) *Population genetic analysis and sub-structuring in **Babesia bovis**.* Mol. Biochem. Parasitol. 177: 106-115.
- Sivakumar, T.; Altangeret, K.; Battsetseg, B.; Battur, B.; Aboulaila, M.; Munkhjargal, T.; Yoshinari, T. y Yokohama, N. (2012) *Genetic detection of **Babesia bigemina** from*

- Mongolian cattle using apical membrane antigen-1 gene-based PCR assay.* Vet. Parasitol. 187: 17-22.
- Smith, R.D. (1984) *Epidemiology of babesiosis.* En: *Malaria and babesiosis: research findings and control measures* (Eds.: Ristic, M.; Ambroise-Thomas, P. y Kreier, J.P.) Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Países Bajos.
- Sokal, R.R. y Sneath, P.H.A. (1963) *Principles of numerical taxonomy.* (Ed.: Freeman) San Francisco, Estados Unidos de América, p. 359.
- Späth, E.J.A.; Guglielmo, A.A.; Signorini, A.R. y Mangold, A.J. (1994) *Estimación de las pérdidas económicas directas producidas por la garrapata **Boophilus microplus** y las enfermedades asociadas en la Argentina.* Therios 23: 341-539.
- Suárez, C.E.; Palmer, G.H.; Florin-Christensen, M.; Hines, S.A.; Hoetzel, I. y McElwain, T.F. (2003) *Organization, transcription, and expression of rhostry associated protein genes in the **Babesia bigemina** rap-1 locus.* Mol. Biochem. Parasitol. 127(2): 101-112.
- Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M. y Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24: 1596-1599.
- Taylor, L.H.; Walliker, D. y Read, A.F. (1997) *Mixed-genotype infections of malaria parasites: within host dynamics and transmission success of competing clones.* Proc. R. Soc. Lond. 264: 927-935.
- Taylor, L.H.; Welburn, S.C. y Woolhouse, M.E.J. (2002) ***Theileria annulata**: Virulence and transmission from single and mixed clone infections in cattle.* Exp. Parasitol. 100: 186-195.
- Taylor, C.F. (2009) *Mutation scanning using high-resolution melting.* Biochem. Soc. Trans. 37: 433-437.
- Tebele, N.; Skilton, R.A.; Katende, J.; Wells, C.W.; Nene, V.; McElwain, T.; Morzaria, S.P. y Musoke, A.J. (2000) *Cloning, characterization, and expression of a 200-kilodalton diagnostic antigen of **Babesia bigemina**.* J. Clin. Microbiol. 38: 2240-2247.
- Terkawi, M.A.; Jia, H.; Gabriel, A.; Goo, Y.K.; Nishikawa, Y.; Yokoyama, N.; Igarashi, I.; Fujisaki, K. y Xuan, X. (2007) *A shared antigen among **Babesia** species: ribosomal phosphoprotein P0 as a universal babesial vaccine candidate.* Parasitol. Res. 102: 35-40.

- Thompson, K.C.; Todorovic, R.A. e Hidalgo, R.J. (1977) *Antigenic variation of **Babesia bigemina***. Res.Vet. Sci. 23: 51-54.
- Thompson, K.C.; Todorovic, R.A. y Hidalgo, R.J. (1978) *The immune responses to antigenic variants of **Babesia bigemina** in the bovine*. Res. Vet. Sci. 24: 234-237.
- Uilenberg, G. (1995) *International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health*. Vet. Parasitol. 57: 19-41.
- Van de Peer, Y.; Jansen, J.; De Rijk, P y De Wachter, R. (1997) *Database on the structure of small ribosomal subunit RNA*. Nucleic Acids Res. 25(1): 111-116.
- Vega, C.A.; Buening, G.; Green, T.J. y Carson, C.A. (1985) *In vitro cultivation of **Babesia bigemina***. Am. J. Vet. Res. 46: 416-420.
- Vega, C.A.; Buening, G.M.; Rodriguez, S.D. y Carson, C.A. (1986) *Cloning of in vitro propagated **Babesia bigemina***. Vet. Parasitol. 22: 223-233.
- Vogl, S. (2004) *Molekular-phylogenetische Differenzierung von **Babesien** des Rindes*. Tesis doctoral, 1-160.
- Wilkowsky, S.; Moretta, R.; Mosqueda, J.; Gil, G.; Echaide, I.; Lía, V.; Falcon, A.; Florin-Christensen, M. y Farber, M. (2009) *A new set of molecular markers for the genotyping of **Babesia bovis** isolates*. Vet. Parasitol. 161: 9-18.
- Wuyts, J.; de Rijk, P.; Van de Peer, Y.; Pison, G.; Rousseeuw, P. y De Wachter, R. (2000) *Comparative analysis of more than 3000 sequences reveals the existence of two pseudoknots in area V4 of eukaryotic small subunit*. Nucleic Acids Res. 28: 4698-4708.
- Young, A.S. y Morzaria, S.P. (1986) *Biology of **Babesia***. Parasitol.Today. 2: 211-219.

APÉNDICE I.

I.1. Reactivos químicos.

Los reactivos químicos utilizados en los diferentes métodos y para la preparación de las diferentes soluciones están descritos en la Tabla I.1.

Tabla I.1. Reactivos químicos y marcas.

Reactivo	Marca
ABTS	Sigma
Acido acético glacial	Cicarrelli
Adenina	Sigma
Agar	Sigma
Agarosa	Invitrogen
Agua bidestilada (libre de nucleasas)	Gibco
Ampicilina	MP
Bicarbonato de Sodio	Cicarelli
Bromuro de etidio	Gibco
Carbonato de Sodio	Cicarelli
Citrato de sodio	BDH
CaCl ₂	Cicarrelli
Dextrosa	Sigma
DMSO	Sintorgan
EDTA	Gibco
EGTA	Sigma
Estreptomina	Biogenesis
Etanol	Merck
Extracto de levadura	Oxoid
Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 v/v)	Invitrogen
Giensa	Merck
Glicerol	Merck

H ₂ O ₂	Raudo
HEPES	Sigma
IPTG	Invitrogen
Isopropanol	Merck
KCl	Cicarrelli
KPO ₄ H ₂	Cicarrelli
Leche en polvo descremada	Svelty
Metanol	Cicarrelli
MgSO ₄ 7.H ₂ O	Cicarrelli
NaCl	Cicarrelli
NaHCO ₃	Cicarrelli
NH ₄ Cl	Cicarrelli
Na ₂ PO ₄	Cicarrelli
Penicilina	Klonal
Peptona	Oxoid
PVP	Fluka
SDS	Gibco
SSPE	Invitrogen
Tris base	Gibco
Tris	ICN
Tween-20	Merck
X-Gal	Invitrogen

I.2. Soluciones.

La composición de las soluciones empleadas en los distintos métodos está descripta en la Tabla I.2.

Tabla I.2. Nombre y composición de soluciones.

Solución	Composición
VyM	0,108 mM CaCl ₂ 5,36 mM KCl 0,4 mM KH ₂ PO ₄ 0,62 mM MgSO ₄ 7H ₂ O 4,04 mM Na ₂ HPO ₄ 131,89 mM NaCl 113,7 mM Dextrosa 0,25 mM Adenina 0,50 mM Guanosina
Solución lisis Glóbulos rojos	0,14 M NH ₄ Cl 0,017 M Tris-ClH
Solución lisis Celular	0,05 M Tris-ClH 0,1 M EDTA 0,1 M NaCl 2 % SDS
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ PO ₄ 1,47 mM KPO ₄ H ₂
PBS-T	0,05 M PBS 0,05 % Tween-20
TAE 50X (11)	242g Tris base 57,1ml Ácido acético glacial 37,2g EDTA pH 8,5

Solución de carga para ADN (3X)	0,25% Azul de bromofenol 30% Glicerol
Solución Tris-HCl	125 mM Tris 150 mM NaCl, pH 8,0
Solución de sustrato/cromógeno ELISA	0,05 M citrato de sodio/ácido cítrico, pH 4,5 0,04 M ABTS 3% H ₂ O ₂

APÉNDICE II.

II.1. RLBH.

Las secuencias nucleotídicas de las sondas específicas de géneros y especies utilizadas en el RLBH se detallan en la Tabla II.1. Las letras para indicar los sitios degenerados son: R = A / G, W = A / T, K = G / T.

Tabla II.1. Sondas ubicadas en las 36 líneas de la membrana del RLBH.

Línea	Especie	Secuencia de la sonda 5' - 3'
1	<i>Ehrlichia/Anaplasma catch-all</i>	GGG GGA AAG ATT TAT CGC TA
2	<i>Anaplasma centrale</i>	TCG AAC GGA CCA TAC GC
3	<i>Anaplasma marginale</i>	GAC CGT ATA CGC AGC TTG
4	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	TTG CTA TAA AGA ATA ATT AGT GG
5	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	TTG CTA TGA AGA ATA ATT AGT GG
6	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	TTG CTA TAA AGA ATA GTT AGT GG
7	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	TTG CTA TAG AGA ATA GTT AGT GG
8	<i>Ehrlichia ruminantium</i>	AGT ATC TGT TAG TGG CAG
9	<i>Anaplasma bovis</i>	GTA GCT TGC TAT GRG AAC A
10	<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	ACC TTT TGG TTA TAA ATA ATT GTT
11	<i>Ehrlichia sp Omatjenne</i>	CGG ATT TTT ATC ATA GCT TGC
12	<i>Ehrlichia canis</i>	TCT GGC TAT AGG AAA TTG TTA
13	<i>Theileria/Babesia catch-all</i>	TAA TGG TTA ATA GGA RCR GTT G
14	<i>Babesia felis</i>	TTA TGC GTT TTC CGA CTG GC
15	<i>Babesia divergens</i>	ACT RAT GTC GAG ATT GCA C
16	<i>Babesia microti</i>	GRC TTG GCA TCW TCT GGA
17	<i>Babesia bigemina</i>	CGT TTT TTC CCT TTT GTT GG
18	<i>Babesia bovis</i>	CAG GTT TCG CCT GTA TAA TTG AG
19	<i>Babesia rossi</i>	CGG TTT GTT GCC TTT GTG
20	<i>Babesia canis canis</i>	TGC GTT GAC GGT TTG AC
21	<i>Babesia canis vogeli</i>	AGC GTG TTC GAG TTT GCC
22	<i>Babesia major</i>	TCC GAC TTT GGT TGG TGT


```
BbiS1A-i .....
BbiS1A .....
BbiS2A .....
BbiM1A .....
BbiS2P-i .....
BbiS2P .....
BbiS3-i .....
BbiS3 .....
BbiM1P .....
BbiM2P .....

          490      500      510      520      530      540      550      560
JG29      GTACAACCTCACCAGAGTACCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATAT
BbiAVc .....
BbiAH19 .....
BbiIVc .....
BbiIMo .....
BbiS1A-i .....
BbiS1A .....
BbiS2A .....
BbiM1A .....
BbiS2P-i .....
BbiS2P .....
BbiS3-i .....
BbiS3 .....
BbiM1P .....
BbiM2P .....

          570      580      590      600      610      620      630      640
JG29      TAAACTTGTTGCAGTAAAAAGCTCGTAGTTGTATTCAGCCTCGCGTTTTTCCCTTTTGGTGGGTCTTTTCGCTGGCT
BbiAVc .....G.T.....
BbiAH19 .....G.T.....
BbiIVc .....YK.K.....
BbiIMo .....YK.K.....
BbiS1A-i .....SG.T.....
BbiS1A .....SG.T.....
BbiS2A .....SK.T.....
BbiM1A .....SK.T.....
BbiS2P-i .....CK.T.Y.....
BbiS2P .....BK.T.Y.....
BbiS3-i .....YK.K.Y.....
BbiS3 .....CK.K.Y.....
BbiM1P .....GG.T.....
BbiM2P .....BK.T.Y.....

          650      660      670      680      690      700      710      720
JG29      TTTTTTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTC AAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGA
BbiAVc ..Y.....
BbiAH19 ..Y.....
BbiIVc ..K.....
BbiIMo ..K.....
BbiS1A-i .....
BbiS1A .....
BbiS2A .....
BbiM1A .....
BbiS2P-i .....
BbiS2P .....
BbiS3-i ..K.....
BbiS3 ..K.....
BbiM1P .....
BbiM2P ..K.....

          730      740      750      760      770      780      790      800
JG29      CCTTGGTTCATTTTGGTTGGTTTTGAGCCTTGGTAATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCATTTCGTATTTAACTGTCAGA
BbiAVc .....C.....
BbiAH19 .....C.....
BbiIVc .....C.....
```

BbiIMoY.....
BbiS1A-i
BbiS1A
BbiS2A
BbiM1A
BbiS2P-iY.....
BbiS2PY.....
BbiS3-i
BbiS3Y.....
BbiM1P
BbiM2PY.....

810 820 830 840 850 860 870 880
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
JG29 GGTGAAATTCCTAGATTTGTTAAAGACGAACCACTGCGAAAGCATTGCGCAAGGACGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAG
BbiAVc
BbiAH19
BbiIVc
BbiIMoS.....
BbiS1A-i
BbiS1A
BbiS2A
BbiM1A
BbiS2P-i
BbiS2P
BbiS3-i
BbiS3
BbiM1P
BbiM2P

890 900 910 920 930 940 950 960
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
JG29 TTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCCCTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATTGGAGGTCGTCATTTT
BbiAVc
BbiAH19
BbiIVc
BbiIMo
BbiS1A-i
BbiS1A
BbiS2A
BbiM1A
BbiS2P-i
BbiS2P
BbiS3-i
BbiS3
BbiM1P
BbiM2P

970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
JG29 CCGACTCCTTCAGCACCTTGAGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGAGTATGGTCGCAAGTCTGAAACTTAAAGG
BbiAVc
BbiAH19
BbiIVc
BbiIMo
BbiS1A-i
BbiS1A
BbiS2A
BbiM1A
BbiS2P-i
BbiS2P
BbiS3-i
BbiS3
BbiM1P
BbiM2P

1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
JG29 AATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAACCTCACCAGGTCCAGACA

BbiAVc
BbiAH19
BbiIVc
BbiIMo
BbiS1A-i
BbiS1A
BbiS2A
BbiM1A
BbiS2P-i
BbiS2P
BbiS3-i
BbiS3
BbiM1P
BbiM2P

 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
JG29 GAGTAAGGATGACAGATTGATAGCTCTTCTTCTTATTCTTTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGAT
BbiAVc
BbiAH19
BbiIVc
BbiIMo
BbiS1A-i
BbiS1A
BbiS2A
BbiM1A
BbiS2P-i
BbiS2P
BbiS3-i
BbiS3
BbiM1P
BbiM2P

 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
JG29 TTGCTGGTTAATTCGTTAACGAACGAGACCTTAACCTGCTAACTAGCTGCTTGGATKKTGTCTCCTCGTTTGTCTTCTTAG
BbiAVcC.....
BbiAH19C.....
BbiIVcS.....
BbiIMoS.....
BbiS1A-i
BbiS1A
BbiS2A
BbiM1A
BbiS2P-i
BbiS2P
BbiS3-i
BbiS3
BbiM1P
BbiM2P

 1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
JG29 AGGGACTCCTGTGCTTCAAGCGTGGGGGAAGTTTAAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCTGGGCTGCAC
BbiAVc
BbiAH19
BbiIVc
BbiIMo
BbiS1A-i
BbiS1A
BbiS2A
BbiM1A
BbiS2P-i
BbiS2P
BbiS3-i
BbiS3
BbiM1P
BbiM2P

```
          1370      1380      1390      1400      1410      1420      1430      1440
JG29      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
BbiAVc    GCGCGCTACACTGATGCATCCATCGAGTTTGTCTGTCCCGAAAGGGTTGGGTAATCTTTAGTGTGCATCGTGTCCGGGA
BbiAH19   .....
BbiIVc    .....
BbiIMo    .....
BbiS1A-i  .....
BbiS1A    .....S.....
BbiS2A    .....
BbiM1A    .....
BbiS2P-i  .....
BbiS2P    .....M.....
BbiS3-i   .....
BbiS3     .....M.....
BbiM1P    .....M.....
BbiM2P    .....M.....
```

```
          1450      1460      1470      1480      1490      1500      1510      1520
JG29      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
BbiAVc    TTGATTTTGGCAATTCTAAATCATGAACGAGGAATGCCTAGTATGCGCAAGTCATCAGCTTGTGCAGATTACGTCCCTGC
BbiAH19   .....
BbiIVc    .....
BbiIMo    .....
BbiS1A-i  .....
BbiS1A    .....
BbiS2A    .....
BbiM1A    .....
BbiS2P-i  .....
BbiS2P    .....
BbiS3-i   .....
BbiS3     .....
BbiM1P    .....
BbiM2P    .....
```

```
          1530      1540      1550      1560      1570      1580      1590      1600
JG29      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
BbiAVc    CCTTTGTACACACCGCCCGTCTCCTACCGATCGAGTATCCGGTGAATTATTCGGACCGTGGCTTTCCGATTCTGTCG
BbiAH19   .....
BbiIVc    .....
BbiIMo    .....
BbiS1A-i  .....
BbiS1A    .....
BbiS2A    .....
BbiM1A    .....
BbiS2P-i  .....
BbiS2P    .....
BbiS3-i   .....
BbiS3     .....
BbiM1P    .....
BbiM2P    .....
```

```
          1610      1620      1630      1640      1650      1660      1670      1680
JG29      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
BbiAVc    GTTTTGCCTAGGGAAGTTTGTGAACCTTATCACTTAAAGGAAGGAGAAGTTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGC
BbiAH19   .....
BbiIVc    .....
BbiIMo    .....
BbiS1A-i  .....
BbiS1A    .....
BbiS2A    .....
BbiM1A    .....
BbiS2P-i  .....
BbiS2P    .....
BbiS3-i   .....
BbiS3     .....
```


BbiM1P
 BbiM2P

1690
|....|..
 JG29 GGAAGGATCATT
 BbiAVc
 BbiAH19
 BbiIVc
 BbiIMo
 BbiS1A-i
 BbiS1A
 BbiS2A
 BbiM1A
 BbiS2P-i
 BbiS2P
 BbiS3-i
 BbiS3
 BbiM1P
 BbiM2P

II.3. *rap-1c*.

Alineamiento de la secuencia nucleotídica del gen *rap-1c* de las cepas BbiS1A-i, BbiS2P-i y la cepa mejicana JG-29.

JG29	ATGATTCACTACGCTTGCCTCATTATCGCACTTTGCGCCTTGTCACCTGCGCTCTGTAGCCGAGTGCCTACGGCCAGCA	80
BbiS1A-iG.....	80
BbiS2P-iG.....	80
JG29	TGCCATGATCATGGCCCTGACCACACTGTGAGCCTGCGGTTGATCCCGTCGACGACGACACCAAGCAGCTTCTCGAAG	160
BbiS1A-i	160
BbiS2P-i	160
JG29	ACAGCGAACAGATTGAGAAGGCCATGCAGGAGGAAATCGGACTGATCAACGATGACTCCATTGCCGAAATGTGCCTCGGC	240
BbiS1A-i	240
BbiS2P-i	240
JG29	AGCAAGGACGAGCACCATTGCGCATCGCAAATCGCTGCCTACGTTGCGCGTTGCAAGGAAGGCAACTGCCTCACCATCGA	320
BbiS1A-iG.....	320
BbiS2P-iG.....	320
JG29	TGCCGTGGGAAAACCGCAAAACAAGGCCACAAACAGCTCGTCTGCCTGACCCCTACCAGCTTACGCGCGGTTCTGT	400
BbiS1A-iG.....	400
BbiS2P-iG.....	400
JG29	TGTTCAAGAACTGCCGGCGCAACGAGAGCAGGCACTGGATGGACAGGTTCTGGATGCGTTTCAAGAGGGGAGGGCGTTAC	480
BbiS1A-i	480
BbiS2P-i	480
JG29	GCTGCTTACTACAGCTTACAGCCTCAACCTGTTGAGGCGCAACCTGTTCCCTCGGCGACGACAAAAATGCCCTGCATGGCTT	560
BbiS1A-iG.....	560
BbiS2P-iG.....	560
JG29	CGTGCAGAAGTACTTCTACATGACCGCCATATACTACAAGACATACTTGTCGCTGGATGCCATCAACGCCAAAATATTTA	640
BbiS1A-i	640
BbiS2P-iT.....	640
JG29	ACAAAATCGCCTTGGCGAAGCACATTCTGGGACCTAAGATCAAAAGGGCGGTTGAGGAAGATCGTCGAGGCCAACAAAGCCG	720
BbiS1A-iC.....	720
BbiS2P-iC.....	720
JG29	AGCGCGCTCCAAGCGAACGACGTCAAAGCCATACGCCCCCTGGCCTACGGTTACAGGCAGTACATGGCCAGCCAAAATCCC	800
BbiS1A-i	800
BbiS2P-i	800


```

          90      100      110      120      130      140      150      160
JG-29      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiAVc      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiAH19     .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiIVc      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiIMo      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiS1A-i    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiS1A      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiS2A      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiM1A      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiS2P-i    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiS2P      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiS3-i     .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiS3       .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiM1P      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiM2P      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
    
```

```

          170      180      190      200      210      220      230      240
JG-29      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiAVc      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiAH19     .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiIVc      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiIMo      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiS1A-i    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiS1A      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiS2A      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiM1A      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiS2P-i    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiS2P      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiS3-i     .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiS3       .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiM1P      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiM2P      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
    
```

```

          250      260      270      280
JG-29      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiAVc      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiAH19     .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiIVc      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiIMo      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiS1A-i    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiS1A      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiS2A      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiM1A      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiS2P-i    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiS2P      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiS3-i     .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiS3       .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiM1P      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiM2P      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
    
```

II.4. ITS.

Alineamiento de la secuencia nucleotídica de los clones moleculares obtenidos para las regiones intergénicas ITS-1 y 2 para el clon biológico Bbi2A2.

Clon1 Bbi2A2	AGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACATTATTGTTTCCGTTTCGGCGTGCGCTGGTGC	80
Clon2 Bbi2A2	80
Clon3 Bbi2A2	80
Clon1 Bbi2A2	CAGTGGTCCGGACTCGTCCGGCGCGTTTTTCTAAAATGCGTTCCCTTT-GGGCCTCCACTGCGTCTTGCGCCAGCAACGC	159
Clon2 Bbi2A2	160
Clon3 Bbi2A2	160

ITS-1

Clon1 Bbi2A2	GCCCTTGCCCTTTTGCTCGGGCTGCCGGCGTTTTCGCTGGGGCGTTGCCTCCTCTCACCCCGTGCTCGCGTTGTCGTCGC	239
Clon2 Bbi2A2C.....T	240
Clon3 Bbi2A2TG.....C.....T	240
Clon1 Bbi2A2	-TCTTGCA--GCGTGTCTGCGAGCGGGTTCGCCCCCGTCCGTCGCTAGCATGTCGCGGTTTATTGCCGTGTCGTCGG	316
Clon2 Bbi2A2	G..A..TGAT.....C.....	320
Clon3 Bbi2A2	G..A..TGAT.....C.....	320
Clon1 Bbi2A2	CAGCGGTCGGGGGATGTCGCTGCGCCGTGTGTGCGAGCGACCGCCGTGTCTCAGCGTTGCTGTGTCTCGGCCGCTTTTG	396
Clon2 Bbi2A2T.....A.....CG.....T.....	400
Clon3 Bbi2A2T.....A.....CG.....T.....	400
Clon1 Bbi2A2	GTGTGTTGCAACTCCGCGCCTCT-GGCGTCTTTGTAACCTTTAAACTTTTTCAGCGATGGATGTCCTGGCTCACACAACGATG	475
Clon2 Bbi2A2T.T.T.....	480
Clon3 Bbi2A2T.T.T.....	480
Clon1 Bbi2A2	AAGGACGCAGCGAATTGCGATACGCAGTATGACTTGCAGACTTCTGCGATTTACCAGACCTCTGAACGTAACAAACACAC	555
Clon2 Bbi2A2	560
Clon3 Bbi2A2	560
Clon1 Bbi2A2	CGCCTCTGCTCGCACGCGTACTCCCGTTTTCAGTGAGCCCAATCTGAGGCCCGCCCATTTATAACAGCTACTGAG	635
Clon2 Bbi2A2G..G.....	640
Clon3 Bbi2A2	640
Clon1 Bbi2A2	TGCTCTAGTGCCTTTTTCAGCTGCTGGTTTGAATGTGTCCGTGCTCCTCGCGAGTGGGCGTCGTTTGTGCGCCCTAATTTCT	715
Clon2 Bbi2A2	C.....A.....C.....C.....C.A.....C.....	720
Clon3 Bbi2A2	720
Clon1 Bbi2A2	GTGAACGCTTTCGCGGCTTTGGCCCTGCACGTGTTGGAGCGCCTGCTGTAGTTTCCACTCACTTTCGCTCCTGTGCGCGGT	795
Clon2 Bbi2A2T.....	800
Clon3 Bbi2A2T.....	800
Clon1 Bbi2A2	GCCGCGCTTGTGGTTTTGCGGCTGGGCCGCTTTTTTTTGTCTCCTGAGATCGGGTGAGGCCATCCGCCGAATTTAAGCAT	
Clon2 Bbi2A2	..T.....T..AC.....	
Clon3 Bbi2A2C.....T..AC.....	

ITS-2

II. 5. Secuencias repetitivas.

Alineamiento del minisatélite *ms4135* de las cepas de referencia.

	10	20	30	40	50	60	70	80
Contig4135	MALPRDLPSEDESEELDGDEED--DDDDDDDDDDDD--GEDDDEDADDEDDDGEDELDLDDGSDEEEEDAGTKKGASWGKKL							
JG29DG...E..NE...DEG...G.-E.L...YGD.S.....							
BbiAVc							
BbiH19							
BbiIVc-GE--..G...GE...-DG.EEG.DE.L...YGD.S.....							
BbiIMo-G.G...G...-DG.EEG.DE.L...YGD.S.....							
BbiS1A-iDG...G...GE...-DG.EEG.DE.L...YGD.S.....							
BbiS1ADG...G...GE...-DG.EEG.DE.L...YGD.S.....							
BbiS2ADG...G...GE...-DG.EEG.DE.L...YGD.S.....							
BbiM1ADG...G...GE...-DG.EEG.DE.L...YGD.S.....							
BbiS2P-i-----G...-DG.EEG.DE.L...YGD.S.....							
BbiS2P-----G...-DG.EEG.DE.L...YGD.S.....							
BbiS3-iDG...GE..NE...-EG...G.-E.L...YGD.S.....							
BbiS3DG...GE...G.E-EG...G.-E.L...YGD.S.....							
BbiM1PD.....G.--.EG...EE...-ED.EEG.DE.L...YGD.S.....D.....							
BbiM2PD.....G.--.EG...EE...-ED.EEG.DE.L...YGD.S.....D.....							
	90	100						
Contig4135	GAYYDEGSEESSDDEDINDRI							
JG29							
BbiAVc							
BbiH19							
BbiIVc							
BbiIMo							
BbiS1A-i							
BbiS1A							

BbiS2A
 BbiM1A
 BbiS2P-i
 BbiS2P
 BbiS3-i
 BbiS3
 BbiM1P
 BbiM2P

Alineamiento del minisatélite *ms4177* de las cepas de referencia.

	10	20	30	40	50	60
Contig4177	MDLFFFYHHHHHHHHHHHHHHHHYHRHNHPYVLVRS	SHRYMCLPSYTFVYVYT-EIGRNIRCLPTSE				
JG29	...L...Y...---	...R...IT...			...W...	
BbiAVc	
BbiH19	
BbiIvc	...L...Y...---	...R...IT...			...W...	
BbiIMo	...L...Y...---	...R...IT...			...W...	
BbiS1A-i	...L...Y...---	...R...IT...			...W...	
BbiS1A	...L...Y...---	...R...IT...			...W...	
BbiS2A	...L...Y...---	...R...IT...			...W...	
BbiM1A	...L...Y...---	...R...IT...			...W...	
BbiS2P-i	...L...Y...---	...R...IT...			...W...	
BbiS2P	...L...Y...---	...R...IT...			...W...	
BbiS3-i	...L...Y...--Y...	...R...IT...			...W...	
BbiS3	...L...Y...--Y...	...R...IT...			...W...	
BbiM1P	...L...Y...-Y...	...R...IT...			...W...	
BbiM2P	...L...Y...-Y...	...R...IT...			...W...	

Alineamiento del minisatélite *ms4179* de las cepas de referencia.

	10	20	30	40	50	60	70	80
Contig4179	LLL	QHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	---					ILSVFQRHRTHS
BbiJG29	...H.R...							...L...
BbiAVc
BbiH19
BbiIvc	...H...							...L...
BbiIMo	...H...							...L...
BbiS1A-i	...H.R...		HHHHHHHHHHHH					...L...
BbiS1A	...H.R...		HHHHHHHHHHHH					...L...
BbiS2A	...H.R...		HHHHHHHHHHHH					...L...
BbiM1A	...H.R...		HHHHHHHHHHHH					...L...
BbiS2P-i	...H.R...R...R...		RHHHHHHHHHHRRHHRRHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH				
BbiS2P	...H.R...R...R...		HH-----				
BbiS3-i	...H.R...R...R...						
BbiS3	...H.R...R...R...						
BbiM1P	...H.R...		HHHHHHHHHHHHHH					...L...
BbiM2P	...H.R...		HHHHHHHHHHHHHH					...L...
		90						
Contig4179	LNCRLTPFLKTP							
BbiJG29							
BbiAVc							
BbiH19							
BbiIvc							
BbiIMo							
BbiS1A-i							
BbiS1A							
BbiS2A							
BbiM1A							
BbiS2P-i							
BbiS2P	...P...R...							
BbiS3-i	...P...R...							
BbiS3	...P...R...							

BbiM1P
BbiM2P

Alineamiento del minisatélite *MS2737* de las cepas de referencia.

```
          10      20      30      40      50      60      70      80
Contig2737  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
JG29        .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiAvc      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiH19      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiIVc      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiIMo      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiS1A-i    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiS1A      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiS2A      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiM1A      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiS2P-i    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiS2P      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiS3-i     .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiS3       .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiM1P      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
BbiM2P      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
```

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por haber bendecido este camino y por los amigos que puso en él.

A Atilio Mangold, a Ignacio Echaide y Susana Torioni de Echaide por confiar en mí, por la paciencia y por todo lo que me han enseñado. Gracias por el apoyo tanto en lo profesional como en lo personal.

A María Eugenia Baravalle, por su ayuda y amistad incondicional durante estos años. A Mirta Castelli, por su amistad, cariño y por su humor, por hacer del laboratorio un ambiente especialmente agradable.

A Victor Vanzini y Alberto Guglielmone por su colaboración y ejemplo de profesionalidad. A Santiago Nava por su ayuda en el análisis de los resultados. A los integrantes y compañeros del laboratorio de Inmunología y Parasitología del INTA-Rafaela por hacer de ese espacio un lugar de amigos: Nerina Aguirre, Paola Amherdt y Liliana Aguirre por su ayuda y por prestar el oído. A Pablo Salusso por su ingenio a la hora de solucionar problemas, a Estefanía Ugarte y Mariano Mastropaolo, por su ayuda y aliento. A Paula Ramírez por su ayuda con los cultivos *in vitro*. A Fernando Seguro, Mariano Ferreira y Ramón Mansilla por su colaboración en los trabajos con los animales. A Cecilia Camussone por su ayuda y compañía y a Ariel Amadio, por su colaboración en el árido e irresistible camino de la bioinformática.

A Trichi Valentini por su apoyo en los primeros años de trabajo y por entrenarme con los cultivos *in vitro* de *Babesia*.

A Marisa Farber, Romina Petrih y Paula Ruybal, del Inta-Castelar, por su ayuda con los marcadores moleculares y en el entrenamiento en la técnica de RLBH.

A la Estación Experimental-INTA Rafaela por darme la posibilidad de realizar mi trabajo en sus instalaciones, al FONCyT por las beca otorgada. A la Universidad Nacional del Litoral y a los miembros de la Comisión Asesora del Doctorado, que me permitieron presentar este trabajo para obtener el título de Doctor en Ciencias Biológicas.

A Hernán, mi esposo, por el aguante incondicional, por el oído, por el empuje y el cariño con el que me acompañó en este tiempo. A mis padres y hermanos, que me acompañaron y acompañan en este camino, por estar siempre que los necesito. Sin ellos, no hubiera podido.

A mi amiga del alma Julia, por los mensajes de aliento, a Marina y Daniel, por hacerme parte de su familia y a mis suegros y cuñados por el cariño.