

PREVALENCIA SEROLÓGICA Y MOLECULAR DE *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* Y *Anaplasma marginale* EN BÚFALOS DE AGUA MANTENIDOS EN ZONAS DE ALTA INCIDENCIA DE GARRAPATAS

José Juan Lira-Amaya, Diego Jesús Polanco-Martínez, Roberto Omar Castañeda-Arriola, Juan Alberto Ramos-Aragón, Emigdio de Jesús Lara-Hernández, Jesús Francisco Preciado-de la Torre, Carmen Rojas-Martínez, Jesús Antonio Álvarez-Martínez, Carlos Ramón Bautista-Garfias y Julio Vicente Figueroa-Millán✉

CENID-Parasitología Veterinaria, INIFAP. Carretera Federal Cuernavaca-Cuatla No. 8534 Col. Progreso, Jiutepec, C. P. 62550, Morelos, México. ²Campo Experimental “La Posta”, Km 22.5 Carretera Veracruz-Córdoba, Paso del Toro Medellín de Bravo, Veracruz, México.

✉Autor de correspondencia: igueroa.julio@inifap.gob.mx

RESUMEN. Debido a la escasa información científica en México que corrobore las infecciones hemoparasitarias en rumiantes silvestres, el objetivo del presente estudio consistió en determinar la prevalencia de babesiosis y anaplasmosis en búfalos de agua mantenidos en zonas de alta incidencia de garrapatas. Para esto, se colectaron un total de 233 muestras de sangre en cuatro unidades de producción de búfalos. Para la detección de anticuerpos circulantes anti-*Babesia* spp. y anti-*Anaplasma* spp., los sueros fueron evaluados mediante las técnicas serológicas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el ensayo inmunoenzimático (ELISA), respectivamente. El análisis molecular de las muestras fue realizado con la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) formato anidada, utilizando iniciadores específicos para cada una de las especies. Las evidencias serológicas y moleculares que se obtuvieron como resultados en el presente estudio, permiten concluir que los búfalos de agua que se encontraban alojados en las cuatro unidades de producción, no demuestran únicamente la exposición a estas especies de hemoparásitos, sino que además, son portadores de la infección causada por *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale*, demostrado por la detección específica de anticuerpos circulantes y del ADN de los hemoparásitos, respectivamente..

Palabras clave: babesiosis, anaplasmosis, IFI, ELISA, PCR

Serological and molecular prevalence of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* in water buffaloes raised in areas of high incidence of ticks

ABSTRACT. Lack of scientific information in Mexico to corroborate hemoparasitic infections in wild ruminants, led to the objective of the present study to determine the prevalence of babesiosis and anaplasmosis in water buffaloes, raised in areas of high incidence of ticks. A total of 233 blood samples were collected in four buffalo production farms. For the detection of circulating antibodies against *Babesia* spp. and *Anaplasma* spp., the sera were evaluated using Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) techniques, respectively. Molecular analysis of the samples was performed using the nested polymerase chain reaction (nPCR) using specific primers for each hemoparasite species. The serological and molecular evidences that were obtained as results in the present study allow to conclude that the water buffaloes, that were raised in the four production farms, not only demonstrate the exposure of animals to these hemoparasites species, but that they are also carriers of the infection caused by *B. bovis*, *B. bigemina* and *A. marginale*, as evidenced by the detection of specific circulating antibodies and hemoparasites DNA, respectively.

Keywords: babesiosis, anaplasmosis, IFAT, ELISA, PCR.

INTRODUCCIÓN

La aparición de ciertas enfermedades infecciosas en regiones endémicas, incluyendo las enfermedades transmitidas por vectores, representan la mayor limitante para el desarrollo de la ganadería nacional debido a las pérdidas económicas que ocasionan. Las garrapatas pueden transmitir a los animales domésticos y silvestres la mayor variedad de patógenos que cualquier otro grupo de vectores (Jongejan y Uilenberg, 2004), incluidos, los parásitos intracelulares *Babesia*

bovis y *Babesia bigemina*, agentes causales de la babesiosis bovina. Ambas especies de protozoarios se encuentran presentes en México y son transmitidas por las garrapatas *Rhipicephalus microplus* y *Rhipicephalus annulatus* (Figuroa y Álvarez, 2003). Otra de las enfermedades de importancia que se transmite por vectores y que además condiciona la subsistencia de la producción ganadera en el país es la anaplasmosis bovina, enfermedad causada por las rickettsias *Anaplasma marginale* y *Anaplasma centrale*; de las cuales, solo la primera especie ha sido reportada en el país (Rodríguez *et al.*, 2003). Para el diagnóstico inmunológico de estas enfermedades existen pruebas que han sido implementadas en diversos estudios epidemiológicos, entre ellas la prueba de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) caracterizada por su elevada sensibilidad y especificidad diagnóstica (Bautista *et al.*, 2012), y el ensayo inmunoenzimática (ELISA) cuya semi-automatización permite el análisis de un mayor número de muestras al mismo tiempo (Rodríguez *et al.*, 1999). Otras alternativas que también resultan ser altamente sensibles y específicas, son las sondas de ácidos nucleicos y la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el uso de ambas pruebas permite obtener un diagnóstico con mayor precisión de estas enfermedades (Figuroa *et al.*, 1993; Torioni de Echaide *et al.*, 1998; Figuroa y Álvarez, 2003). Además de los bovinos, también se ha demostrado la presencia de *Babesia* spp. y *Anaplasma* spp. en búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) (Ferreri *et al.*, 2008; Corona *et al.*, 2012), especie de bovinos silvestres recién introducida en el país. Debido a la escasa información científica en México que corrobore este tipo de infecciones hemoparasitarias en rumiantes silvestres, el objetivo del presente estudio consistió en determinar la prevalencia de babesiosis y anaplasmosis en búfalos de agua mantenidos en zonas de alta incidencia de garrapatas.

MATERIALES Y MÉTODO

Localización del área de estudio. La fase de campo de este estudio se desarrolló en los municipios de Sayula, Veracruz y Villahermosa, Tabasco. La zona sur del estado de Veracruz cuenta con clima sub-húmedo con lluvias en verano (100 %) y con una temperatura que oscila entre los 24 y 28 °C, la precipitación pluvial anual es de 1500 mm. El clima predominante de la región centro del estado de Tabasco es cálido húmedo-seco con presencia de lluvias durante el verano, la precipitación pluvial registrada en esta región es de 1900 mm. Mientras que la fase analítica en el laboratorio fue realizada en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CENID-PAVET, INIFAP) en Jiutepec, Morelos, el municipio cuenta con clima cálido sub-húmedo con lluvias en verano y precipitaciones pluviales que van desde 800 hasta 1200 mm.

Toma y procesamiento de muestras. Un total de 233 muestras sanguíneas de búfalos de agua fueron colectadas a conveniencia en cuatro unidades de producción, Veracruz 1 (n = 61) y Veracruz 2 (n = 63) localizadas al sur del estado de Veracruz en el municipio de Sayula, y Tabasco 1 (n = 58) y Tabasco 2 (n = 51) ubicadas en el municipio de Villahermosa. Las muestras se obtuvieron después de la punción de la vena yugular y/o caudal empleando tubos al vacío con anticoagulante (EDTA) y sin anticoagulante, lo que después de centrifugar las muestras facilitó la obtención del paquete celular que incluía los glóbulos rojos y blancos, así como también del suero.

Prueba de Inmunofluorescencia indirecta (IFI). Para la detección de anticuerpos circulantes anti-*Babesia* spp., las muestras de suero fueron incubadas en laminillas con eritrocitos infectados que fueron utilizadas como antígeno, como anticuerpo conjugado se empleó suero de cabra anti-IgG de bovino. Los lavados de las laminillas se realizaron en agitación con solución salina amortiguadora de fosfatos pH 7.2 (SSAF) y con agua destilada después de cada incubación, respectivamente (Bautista *et al.*, 2012). Por último, las laminillas se dejaron secar y se observaron en un microscopio de epifluorescencia.

Prueba de ELISA. Placas de poliestireno de 96 pozos fueron sensibilizadas con el antígeno de *Anaplasma marginale* al 1 % y posteriormente bloqueadas (Rodríguez *et al.*, 1999). En cada pozo se colocaron por triplicado 200 µl de las muestras de suero (dilución 1:100), después de la incubación (60 minutos a 37 °C) de las muestras, se realizaron lavados con solución salina amortiguadora de fosfatos pH 7.2 (SSAF)-Tween 20 al 0.05 %. La reacción inmunoenzimática se llevó a cabo empleando suero de cabra anti-IgG de bovino conjugado con fosfatasa alcalina y p-nitrofenilfosfato al 0.075 % como sustrato. Los valores de absorbancia expresados en unidades de densidad óptica (DO) se obtuvieron después de realizar la lectura de las placas en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm, mientras que, para la interpretación de los resultados, se determinaron como positivos los sueros que presentaron valores superiores al punto de corte de acuerdo a la DO. El punto de corte se calculó como el promedio de los sueros negativos +3 desviaciones estándar.

Extracción de ADN y prueba de PCR anidada. La extracción de ADN genómico de cada una de las muestras se realizó a partir del paquete celular de acuerdo al procedimiento descrito para la purificación por el método de columnas utilizando un kit comercial (UltraClean® BloodSpin® DNA Isolation Kit; MO BIO Laboratories). Para la detección molecular de *Babesia* spp., el ADN obtenido de las muestras sirvió como molde para la amplificación parcial de las secuencias específicas de *Babesia bovis* y de *B. bigemina* mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) formato anidada utilizando los iniciadores específicos descritos (Figuroa *et al.*, 1993). La detección de *A. marginale* se logró con el uso de iniciadores específicos como fue descrito anteriormente (Torioni de Echaide *et al.*, 1998), con los cuales es posible la amplificación de una porción del gene codificador de la proteína principal de superficie (MSP-5). Finalmente, los productos amplificados se visualizaron en geles de agarosa al 2 % teñidos con bromuro de etidio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En algunos países y debido a las bondades que presenta esta especie, los búfalos de agua son considerados como animales multipropósito y son destinados para la producción de carne y leche. Actualmente, esta especie de bovinos originalmente silvestres se encuentra presente en todos los continentes, se estima que la población mundial asciende a 170 millones de animales, mientras que, en el país el inventario nacional podría alcanzar las 40,000 cabezas. En México y debido al elevado potencial de producción en las regiones tropicales, se han comenzado a introducir búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) como una alternativa adicional en la producción pecuaria desde hace casi dos décadas, actividad que se está desarrollando principalmente en regiones donde existen las condiciones favorables para la proliferación de distintos agentes etiológicos causantes de enfermedades de trascendencia para la salud animal y donde las enfermedades transmitidas por garrapatas son endémicas. En el presente estudio fueron identificados animales seropositivos para ambas especies de *Babesia* (*B. bovis* y *B. bigemina*) y *A. marginale*, corroborando de esta manera que al igual que los bovinos, los búfalos de agua también son susceptibles a una gran variedad de agentes etiológicos. Los primeros trabajos realizados en el país, han mostrado la presencia de anticuerpos contra los protozoarios *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum* (Aguilar *et al.*, 2012; Alvarado-Esquivel *et al.*, 2014), este último es considerado de gran importancia dentro de la ganadería debido a los altos índices de abortos que causa en bovinos (Ojeda *et al.*, 2016). En comparación con lo que ya ha sido descrito en el estado de Veracruz, las prevalencias de anticuerpos obtenidas en la mayoría de las unidades de producción resultaron bajas (Cuadro 1), cabe mencionar que los animales que fueron muestreados para este estudio no cohabitaban en el mismo entorno con el ganado bovino (Romero *et al.*, 2016). Además de los búfalos como se demostró en este estudio, también ha sido reportada la evidencia serológica para *Babesia* spp. y

Anaplasma spp. en otras especies de rumiantes, como venados de cola blanca y ovinos (Rajput *et al.*, 2005; Cantú *et al.*, 2009; Lira *et al.*, 2014).

Cuadro 1. Prevalencia de anticuerpos obtenida en las unidades de producción de búfalos de agua para *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale*, utilizando la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el ensayo inmunoenzimático (ELISA).

Unidad de producción	IFI		IFI		ELISA	
	<i>Babesia bovis</i>		<i>Babesia bigemina</i>		<i>Anaplasma marginale</i>	
	+	%	+	%	+	%
Veracruz 1 (n = 61)	36	59.0	42	68.8	2	3.2
Veracruz 2 (n = 63)	20	31.7	20	31.7	0	0
Tabasco 1 (n = 58)	31	53.4	26	44.8	2	3.4
Tabasco 2 (n = 51)	40	78.4	46	90.2	13	25.4

+ = número de animales positivos

% = porcentaje de prevalencia

En otras regiones geográficas la babesiosis y anaplasmosis han sido descritas en búfalos anteriormente, durante un estudio realizado se encontraron presentes formas compatibles con *Babesia* spp. y *Anaplasma* spp. durante la observación microscópica de muestras de sangre provenientes de animales asintomáticos (Jacobo *et al.*, 2005). Sin embargo, a pesar de la practicidad y bajo costo, esta técnica utilizada convencionalmente presenta desventajas, entre ellas baja sensibilidad, principalmente en ausencia de signos clínicos en animales infectados, y la falta de experiencia del operador para el análisis de las muestras. La infección por *Babesia* spp. en los búfalos de agua fue detectada mediante la prueba molecular de PCR, para ello se logró la amplificación de fragmentos de ADN de *B. bovis* (275 pb) (Figura 1) y *B. bigemina* (174 pb) (no mostrados), con lo cual, fue posible determinar la prevalencia molecular de los agentes causales de la babesiosis bovina en esta especie de rumiantes silvestres (Cuadro 2), ya reportada anteriormente en otros países del mundo, incluyendo México (Ferreri *et al.*, 2008; Terkawi *et al.*, 2011; Romero *et al.*, 2016).

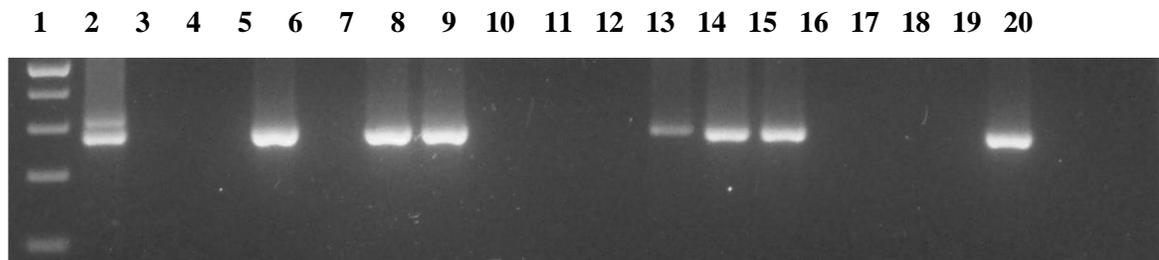


Figura 1. Fragmentos de ADN de *Babesia bovis* (275 pb) amplificados a partir de muestras de sangre de búfalos de agua. 1) marcador molecular de 100 pb; 2) control de ADN positivo *B. bovis*; 3-18) muestras de ADN extraídas de sangre de los búfalos de agua; 19-20) control de ADN negativo *B. bovis*.

Los altos valores obtenidos con las pruebas serológicas en contraste con los resultados moleculares, son indicativo de los animales con memoria inmunológica (anticuerpos específicos) de la exposición a los patógenos, lo que quiere decir que no necesariamente permanecían infectados al momento del muestreo (Álvarez y Cantó, 1985). El uso de técnicas moleculares ofrece importantes ventajas sobre el tipo de métodos convencionales que son empleados para el diagnóstico de estas enfermedades. La elevada especificidad y sensibilidad analítica de la prueba de PCR permite detectar concentraciones mínimas de ADN de los parásitos en los animales

infectados, así como también su identificación por especie (Figueroa *et al.*, 1993; Oliveira-Sequeira *et al.*, 2005).

Cuadro 2. Prevalencia obtenida en las unidades de producción de búfalos de agua para *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale*, utilizando la prueba molecular de PCR.

Unidad de producción	PCR		PCR		PCR	
	<i>Babesia bovis</i>		<i>Babesia bigemina</i>		<i>Anaplasma marginale</i>	
	+	%	+	%	+	%
Veracruz 1 (n = 61)	23	37.7	6	9.8	1	1.6
Veracruz 2 (n = 63)	13	20.6	7	11.1	4	6.3
Tabasco 1 (n = 58)	35	60.3	8	13.7	0	0
Tabasco 2 (n = 51)	21	41.1	12	23.5	1	1.9

+ = número de animales positivos

% = porcentaje de prevalencia

Por otro lado, el alto grado de conservación entre los miembros de la familia Anaplasmataceae, ha permitido que el gene codificador de la proteína MSP-5 sea ampliamente utilizado para la detección de *A. marginale*, para este estudio el tamaño de los fragmentos amplificados fue de 566 pb aproximadamente (no mostrados).

CONCLUSIÓN

Las evidencias serológicas y moleculares que se obtuvieron como resultados en el presente estudio, permiten concluir que los búfalos de agua que se encontraban alojados en las cuatro unidades de producción, no solo demuestran la exposición a estas especies de hemoparásitos, sino que además, son portadores de la infección causada por *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale*. Cabe señalar que los animales que fueron encontrados como portadores no mostraban signos clínicos evidentes de la infección, con lo que podría suponerse que los búfalos de agua son más resistentes a este tipo de enfermedades que afectan comúnmente al ganado bovino. La secuenciación de los productos de PCR es fundamental para confirmar la identidad de los parásitos con lo que ya se ha reportado en las bases de datos. Finalmente, estos resultados nos permiten sugerir un análisis epidemiológico molecular más exhaustivo, que permita determinar la tasa real de infección de *Babesia* spp. y *Anaplasma* sp. en búfalos de agua de diferentes regiones donde existe alta incidencia de garrapatas, así como determinar el potencial papel que juegan como reservorios de agentes patógenos transmitidos por vectores.

Agradecimientos

Financiado parcialmente por proyectos INIFAP No. 1031533187 y CONACyT Problemas Nacionales 2015, clave 1336.

Literatura Citada

- Aguilar, G. D., Romero, S. D., García, V. Z. y C. Cruz. 2012. Neosporosis en búfalos de agua (*Babalis bubalis*) en unidades producción del centro y sur de Veracruz, México. Pp. 858–865. In: *Memorias VII Seminario Internacional de Parasitología Animal y IX Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria. Querétaro, Querétaro.*
- Alvarado-Esquivel, C., Romero, S. D., García, V. Z., Cruz, R. A., Peniche, C. A., Ibarra, P. N., Aguilar, D. M., Pérez, D. L. A. and J. Dubey. 2014. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in water buffaloes (*Bubalis bubalis*) in Veracruz State, México and its association with climatic factors. *BMC Veterinary Research*, 10: 232.
- Álvarez, J. A. y J. G. Cantó. 1985. Epidemiología de la babesiosis. Pp. 55–72. In: Sociedad Mexicana de Parasitología. (Eds.) *Parasitología: Vol. Conmemorativo*; México, D.F.

- Bautista, G. C. R., Castañeda, A. R., Álvarez, M. J. A., Rojas, M. C., Figueroa, M. J. V. y A. Rodríguez. 2012. La vacunación simultánea de bovinos con *Lactobacillus casei* y la vacuna bivalente contra babesiosis bovina genera una mejor protección contra *Babesia bovis* y *B. bigemina* transmitidas por garrapatas en condiciones extremas de campo. *Veterinaria México*, 43 (3): 189–200.
- Cantú, C. A., Ortega, S. J. A., García, V. Z., Mosqueda, J., Henke, S. E. and E. George. 2009. Epizootiology of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in free ranging White-tailed deer in northeastern México. *Journal of Parasitology*, 95(3): 536–542.
- Corona, B., Obregón, D., Martínez, S., Espinosa, I., Fonseca, AH. y A. Roque. 2012. Detección por PCR de *Anaplasma marginale* en búfalos de la región occidental de Cuba. *Revista de Salud Animal*, 34(1): 11–18.
- Ferreri, L., Benitez, D., Dominguez, M., Rodriguez, A., Asenzo, G., Mesplet, M., Florin, C.M. and L. Schnittger. 2008. Water buffalos as carriers of *Babesia bovis* in Argentina. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1149: 149–151.
- Figueroa, J. V., Chieves, L. P., Johnson, G. S. and G. M. Buening. 1993. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Veterinary Parasitology*, 50: 69–81.
- Figueroa, M. J. V. y Álvarez, J. A. 2003. Investigaciones sobre la aplicación de técnicas moleculares en el diagnóstico y control de la babesiosis bovina. *Ciencia Veterinaria*, 9: 75–104.
- Jacobo, R. A., Cipolini, M. F., Storani, C. A., Martínez, D. E. y E. Martínez. 2005. Infección con el complejo de la tristeza en búfalos. *Comunicaciones científicas y tecnológicas*, 1-3.
- Jongejan, F. and G. Uilenberg. 2004. The global importance of ticks. *Parasitology*, 129: S3–S14.
- Lira, A. J. J., Ojeda, R. N. F., Martínez, I. F., Álvarez, M. J. A., Rojas, M. C., Vargas, U. P., Bautista, G. C. R., Pérez R. J. J. y J. V. Figueroa. 2014. Detección molecular de parásitos hemotrópicos en un rebaño de ovejas del Estado de Tabasco. Pp. 261–267. In: *Memorias del XXXVIII Congreso Nacional de Buiatría. Villahermosa, Tabasco*.
- Ojeda, C. J. J., Espinosa, A. E., Hernández, G. P. A., Rojas, M. C., y J. A. Álvarez. 2016. Seroprevalencia de enfermedades que afectan la reproducción de bovinos para leche con énfasis en neosporosis. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*. 3(8): 243–249.
- Oliveira-Sequeira, T. C., Oliveira, M. C., Araujo J. P. and F. Amarante. 2005. PCR based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. *International Journal for Parasitology*, 35: 105–111.
- Rajput, Z. I., Song hua, H. U., Arijio, A. G., Habib, M. and M. Khalid. 2005. Comparative study of *Anaplasma* parasites in tick carrying buffaloes and cattle. *Journal of Zhejiang University Science*, 6B(11): 1057–1062.
- Rodríguez, C. S. S., García, O. M. A., Cantó, A. G. J., Hernández, S. G., Santos, C. N. y R. Aboytes. 1999. Ensayo de un inmunógeno experimental inactivado contra *Anaplasma marginale*. *Técnica Pecuaria México*, 37(1): 1–12.
- Rodríguez, C. S. D., García, O. M. A., Aboytes, T. R., Cantó, A. G. J. y R. Barigye. 2003. Inmunología e inmunoprofilaxis de la anaplasmosis bovina. *Ciencia Veterinaria*, 9: 123–164.
- Romero, S. D., Mira, A., Mosqueda, J., García, V. Z., Hidalgo, R. M., Ortiz, V. N. A., Pérez, L. A., Florin, C. M. and L. Schnittger. 2016. Molecular and serological detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection in bovines and water buffaloes raised jointly in an endemic field. *Veterinary Parasitology*, 217: 101–107.
- Terkawi, M. A., Huyen, N. X., Shinuoa, C., Inpankaew, T., Maklon, K., Aboulaila, M., Ueno, A., Goo, Y.K., Yokoyama, N., Jittapalapong, S., Xuan, X. and I. Igarashi. 2011. Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes in the northeast region of Thailand. *Veterinary Parasitology*, 178: 201–207.
- Torioni de Echaide, S., Knowles D. P., McGuire T. C., Palmer G. H., Suarez C. E. and F. McElwain. 1998. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay using recombinant Major Surface Protein 5. *Journal of Clinical Microbiology*, 36 (3): 777–782.