

Solari Ma. A.(1)

(1) Dra. en Medicina Veterinaria.

DESARROLLO Y EVALUACION DEL DIAGNOSTICO DE ADN PARA HEMOPARASITOS (*BABESIA BOVIS* Y *BABESIA BIGEMINA*) EN VACUNOS Y EN *BOOPHILUS MICROPLUS*

FPTA 31

Periodo Ejecución: Jun., 1994-Jun., 1995

1. INTRODUCCION

La magnitud de las pérdidas económicas debidas a los hemoparásitos, ha sido estimada entre US\$ 6 y 9 anuales por vacuno (Guglielmo, A. *et al.*, 1991). Si bien a nivel nacional estas pérdidas no han sido cuantificadas, existe la convicción de que la garrapata y los hemoparásitos que ésta transmite implican pérdidas económicas graves (Ugarte, R. 1992).

Se están desarrollando planes tendientes a reforzar las actividades de control y erradicación de la garrapata (*Boophilus microplus*), ejecutados por la Dirección General de Servicios Ganaderos, (proyecto 840, Sanidad Animal/BID), por productores y por los profesionales no oficiales que trabajan en el área.

La estrategia que se está siguiendo se basa en el modelo conceptual desarrollado por la División de Parasitología, según el cual se pretende disminuir las poblaciones de garrapata en zonas endémicas (al norte del Río Negro) y eliminarlas totalmente en las no endémicas (al sur del Río Negro).

En el transcurso de la estrategia, siempre será necesario disponer de métodos diagnósticos apropiados, a los efectos

de mantener una vigilancia epidemiológica adecuada. Hasta el momento en que este proyecto fue planteado, las técnicas disponibles no satisfacían las necesidades existentes.

2. CARACTERIZACION DEL PROYECTO

Dados los antecedentes referidos, a comienzos de 1992 la División de Parasitología de la Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) define la necesidad de complementar el diagnóstico de los hemoparásitos, con técnicas más precisas y automatizables que las convencionales.

Mundialmente, gracias al desarrollo de la investigación en el campo de la biología molecular, se están utilizando metodologías con las características antes mencionadas. Tal es el caso de la amplificación *in vitro* de ADN, PCR (Polymerase Chain Reaction; Reacción en Cadena de la Polimerasa) (Saiki, R.K. *et al.* 1985). Con la finalidad de cumplir con el cometido antes planteado, fue necesario trabajar conjuntamente con la Unidad de Biología Molecular de INIA, en la Estación Experimental «Las Brujas».

La ventaja práctica del diagnóstico realizado por PCR es que el ADN resiste muy bien la desecación, eliminándose por consiguiente la necesidad de mantener una cadena de frío para el transporte de la muestra hasta un centro de referencia. La estabilidad del ADN permite asimismo diferir el envío de estas según las dificultades de transporte existentes en algunas zonas del país.

Simplificando la obtención, mantenimiento y remisión de las muestras, se obviarían varios pasos tradicionales en la remisión de material (tubos, disponibilidad de anticoagulante, cadena de frío, urgencia de traslado), avance que es

especialmente trascendente. Por otro lado, dicha simplificación puede extrapolarse a otras patologías donde se realice el diagnóstico en el área de biología.

Con el desarrollo del presente proyecto, se buscó resolver el problema anteriormente planteado, lo cual será de gran utilidad a la ganadería nacional. A nivel predial, los productores también se verán beneficiados ya que podrán conocer realmente la situación de riesgo de sus animales y actuar en consecuencia, optimizando los recursos económicos y los esfuerzos.

BIOTECNOLOGIA Y SANIDAD ANIMAL

El estudio del material genético de agentes infecciosos a través de técnicas de ADN recombinante ha permitido grandes progresos en el área de diagnóstico, control epidemiológico y fabricación de vacunas.

Conocida parte de la secuencia de ADN de un agente infeccioso, es posible detectarlo en una muestra a través de la amplificación de ésta, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Centenares de grupos a nivel mundial se encuentran abocados a la secuenciación del ADN de agentes infecciosos y la información generada es recopilada en la base mundial de secuencias de ADN, el Gene-Bank. Esta base de datos es de libre acceso y por lo tanto la capacidad de aprovecharla depende exclusivamente de contar con técnicos formados en esta disciplina. El presente trabajo es un ejemplo en este sentido.

El mismo procedimiento se puede realizar con todos los agentes infecciosos de importancia económica. La gran sensibilidad de estos métodos permiten hacer diagnóstico en muestras obtenidas a través de técnicas poco invasivas como por ejemplo el diagnóstico de *Brucella ovis* a partir de muestras de orina. Esto permite controlar masivamente animales que concurren a exposiciones, remates u otros posibles focos de diseminación de agentes infecciosos.

La ventaja práctica del diagnóstico realizado por PCR es que el ADN resiste muy bien la desecación, eliminándose por consiguiente la necesidad de mantener una cadena de frío para el transporte de la muestra hasta un centro de referencia. La estabilidad del ADN permite asimismo diferir el envío de estas según las dificultades de transporte existentes en algunas zonas del país. Esto se demostró en un trabajo realizado en la Unidad de Biotecnología de INIA donde se consiguió diagnosticar *Babesia bovis* en papel con manchas de sangre de ganado infectado experimentalmente, luego de un año de haber sido colectadas. Asimismo, el estudio de la secuencia de ADN permite reconocer diferencias entre cepas de acuerdo a su origen geográfico. Esto ayuda a identificar fallas en los sistemas de control de la introducción de agentes exóticos o que han sido erradicados.

Al mismo tiempo, la evolución hacia la automatización y el aumento de la capacidad de recuperación y procesamiento rápido de muchas muestras, permitirá llegar a conclusiones epidemiológicas más rápido y acertadamente a partir de estudios poblacionales.

Para el grupo de trabajo de la División de Parasitología, el área de biología molecular era totalmente nueva, por lo que fue necesario comenzar un programa de capacitación (adiestramiento de laboratorio, diversos utilitarios informáticos, equipos sofisticados, etc.).

3. OBJETIVOS DEL PROYECTO

Específicamente dentro del Orden Apicomplexa, se estudiaron las especies de hemoparásitos *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* con múltiples herramientas disponibles en biología molecular. En este marco, se desarrollaron diversos objetivos, el principal de los cuales fue desarrollar y poner a punto un método de diagnóstico complementario de babesias en vacunos y garrapata que sea confiable y eficaz.

Paralelamente, se realizó un estudio aplicado en el análisis de la viabilidad de las poblaciones atenuadas en la garrapata.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, es su sigla en inglés) alude al proceso *in vitro* de amplificación de una o más secuencias de ADN, entendiéndose como amplificación a la generación de cadenas idénticas a la original.

El proceso se basa en dos tramos iniciadores («primers») complementarios a los extremos de la secuencia que se quiere amplificar. Una vez que los iniciadores se alinean a los extremos del tramo

referido, la polimerasa comienza a sintetizar el ADN que falta entre ambos tramos.

Este proceso se repite, resultando en determinado número de cadenas nuevas. El número de repeticiones se regula a través de la temperatura, que incide sobre la forma que adopta la molécula y -por lo tanto- en la posibilidad o no que el proceso continúe. Se usan polimerasas termoestables.

Los iniciadores -oligonucleótidos de alrededor de 20 nucleótidos de largo- son los que «identifican» el tramo de ADN que quiere amplificarse, el cual (en general) no es mayor a 3000 pares de bases. Una cadena puede reproducirse hasta un millón de veces, lo que facilita la determinación de su tamaño, secuencia de nucleótidos, etc..

La gran ductilidad y las amplias posibilidades de aplicación de la técnica la destacan como uno de los grandes avances científicos a nivel mundial, en los últimos años.

En este proyecto, la técnica sirve para diferenciar distintos parásitos, dado que se han identificado secuencias de ADN características y se cuenta con sus iniciadores.

Conceptualmente las actividades desarrolladas se pueden agrupar en:

- * definición de iniciadores específicos para *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*.
- * diagnóstico en bovinos y en garrapata (*Boophilus microplus*),
- * estudio de viabilidad en *Boophilus microplus* de las cepas atenuadas y
- * estudios de alternativas sencillas y prácticas para envío y procesamiento de material.

El trabajo en el área de biología molecular se desarrolló con el respaldo y apoyo de la Unidad de Biotecnología del INIA «Las Brujas». El área biológica y aplicada se ha desarrollado en la División de Parasitología de la Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) «Miguel C. Rubino», del Ministerio de Ganadería y Agricultura (MGAP).

4.2. Definición de iniciadores («primers»)

Se buscaron secuencias de ADN de *Babesia bovis* existentes en los bancos de genes internacionales. Se seleccionó la secuencia BBMER60 (Carlos Suarez *et al.*, 1991) que codifica para una proteína de membrana de merozoito.

A partir de esa secuencia se diseñó un par de iniciadores de 25 nucleótidos de longitud, denominados BBMER#1 y BBMER#2 que amplificarían un segmento de ADN de 1056 pares de bases.

Un trabajo similar se hizo para *Babesia bigemina*, cuyos iniciadores fueron descritos por Figueroa J., *et al.*, 1992.

4.3. Puesta a punto del diagnóstico en vacunos

La identidad del fragmento amplificado de *Babesia bovis* fue corroborada, comparando el mapa de restricción supuesto, con el obtenido cortando el producto con determinadas enzimas de restricción.

Las bandas obtenidas en cada babesia son diferentes, por lo que cada iniciador es específico. Esto fue comprobado con material de ADN referencia de A. marginale, A. centrale, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y ADN de bovinos libres de hemoparásitos.

En el estudio de sensibilidad se determinó una banda visible a partir de 0,08 fentogramos de ADN y se estima que equivale a 40 parásitos.

Sensibilidad que detecta parasitemias de 0,0005 % de eritrocitos infectados tanto para *Babesia bovis* como para *Babesia bigemina*.

4.4. Puesta a punto del diagnóstico en el vector

Para el diagnóstico de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en el vector se utilizaron los mismos iniciadores «externos», diseñados para vacunos y los resultados no fueron los mismos que se habían obtenido a partir de sangre infectada.

Por esto se decidió modificar la metodología utilizando iniciadores internos («nested primers»). Estos nuevos pares de iniciadores están comprendidos entre los externos, y fueron específicos para cada babesia, lográndose el objetivo planteado.

Se amplificó el ADN de *Babesia bovis/Babesia bigemina* de diferentes estadios de garrapata infectada (adultos, huevos y larvas), utilizando primero los iniciadores «externos» y con lo producido se reamplificó con los «internos», obteniéndose las bandas esperadas. Como control negativo se utilizó ADN de garrapatas (adultos, huevos y larvas) sin infectar, de una cepa mantenida en el DILAVE «Miguel C. Rubino» desde 1977.

4.5. Estudio de viabilidad de las cepas atenuadas en *Boophilus microplus*

Se ha estudiado la interrupción de la transmisión de determinadas poblaciones de babesias «atenuadas», que se utilizan rutinariamente en la producción de hemovacuna para la premunición del ganado. Estudios anteriores indican que no existe transmisión vertical de estas cepas en la garrapata. Dado que estos resultados surgen en condiciones restringidas (única parasitemia e infestación) se hace necesario ampliar esta información.

4.6. Obtención práctica del material para procesar

Se confirmó la posibilidad de obtener el material para estudiar de una forma práctica y al alcance de cualquier persona que está actuando en la campaña. Los hematozoarios en el vacuno están presentes únicamente en el eritrocito, por lo que el material para detectarlo es la sangre y es necesario mantenerla en ciertas condiciones hasta el momento del diagnóstico. Se ha probado en diversos tipos de papel y en tela mantenidos en temperatura ambiente, lográndose reproducir los resultados obtenidos con los materiales tratados en forma tradicional.

5. RESULTADOS

Al momento se cuenta con la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que diagnostica ADN específico de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* tanto en el bovino como en el *Boophilus microplus*.

Este método es el primero a nivel mundial con la sensibilidad y especificidad necesaria para verificar la transmisión vertical a través del vector, *Boophilus microplus*, y fue presentado en el Congreso Mundial de Veterinaria de 1994 y publicado en el *Brazilian Journal of Parasitology*.

El logro de este objetivo coloca al Uruguay en una posición destacada ya que es primero y único en la región en disponer de esta metodología. También es un aporte original a la comunidad científica ya que hasta el momento no había sido descrita la técnica de diagnóstico en la garrapata.

En cuanto al estudio aplicado en el análisis de la viabilidad de las poblaciones atenuadas en la garrapata, han surgido resultados alentadores respecto a la interrupción del ciclo natural en la garrapata de las cepas atenuadas. Estos resultados minimizan la interrogante actual, de los ganaderos que utilizan la hemovacuna, los cuales muchas veces manifiestan su temor de inmunizar el ganado por la posibilidad de infectar artificialmente las poblaciones de garrapata.

Está pendiente la fijación de parámetros de trabajo para lograr conocer tasa de infección, para lo cual se necesita realizar un seguimiento de la dinámica, con un número elevado de muestras para poder inferir estos resultados. A partir de la situación actual, se ha diseñado un nuevo proyecto y presentado a ser financiado, con el objetivo de avanzar en estas investigaciones ya que son fundamentales para la aplicación de éstas técnicas en el medio.

6. DIVULGACION

El equipo de investigación del proyecto, participó en jornadas de intercambio, con intervención de profesionales y miembros de laboratorios de la región, con el objeto de informar acerca del trabajo, intercambiar experiencia y programar tareas comunes de beneficio mutuo:

- * Jornadas auspiciadas por IICA-PROCISUR, INIA «Las Brujas» y CICV-INTA, Buenos Aires.
- * Jornada organizada por la Universidad de la República, Solís.
- * VII Congreso Argentino de Ciencias Veterinarias, 8-11 de noviembre de 1994. Bs. As, Argentina.
- * Presentación del poster «Use of the Polymerase Chain Reaction for the diagnosis of *Babesia bovis* in cattle and in tick *Boophilus microplus*».
- * Mesa Redonda del Programa Hemoparásitos, Red de Laboratorios de Diagnósticos e Investigación en América Latina, FAO, presentación de logros.

También se redactaron cuatro artículos científicos, publicados en revistas indexadas y arbitradas.

7. ACCIONES DE FUTURO

Se ha desarrollado un nuevo método de diagnóstico de *Babesia bovis* en vacuno y en vector, a través de la amplificación *in vitro* de una secuencia de ADN de este parásito. Dicho método puede ser utilizado para diferenciar *Babesia bovis* de *Babesia bigemina* así como de otros hemoparásitos bovinos debido a su absoluta especificidad.

La interpretación de los resultados no es técnico-dependiente lo que disminuye los errores de interpretación y, además, permite una mayor capacidad de procesamiento de muestras. A partir de estos resultados, el grupo piensa llevar a cabo trabajos aplicados a:

- 1) estudios de epidemiología molecular en apoyo a las actividades de lucha contra la garrapata (campaña sanitaria),
- 2) identificar a nivel de establecimiento los animales enfermos en etapa prepatente y
- 3) estudiar el comportamiento de las cepas atenuadas utilizadas en hemovacunas (transmisión vertical en la garrapata).

Destacamos que este proyecto dio lugar a otro, financiado por IAEA (1996-1998) donde se acondicionó el laboratorio para el diagnóstico de PCR y se aplico

en la investigación de la viabilidad de diferentes babesias (virulentas y atenuadas) en la garrapata. El resultado de estas investigaciones contribuye en mejorar la utilización de las hemovacunas en la ganadería.

Este proyecto ha sido pionero y los resultados representan un importante aporte a la comunidad, siendo únicos en la región. La División de Parasitología continúa sirviendo de apoyo y referencia para los profesionales involucrados en éstos temas, con especial énfasis en el diagnóstico aplicado. Este rol ha sido especialmente destacado por la FAO.

Impreso en los Talleres Gráficos de
Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur S.R.L.
Montevideo, Uruguay

Depósito Legal 314.477/00
Edición Amparada al Decreto 218/996