

# Diagnóstico Laboratorial de la Besnoitiosis Bovina

Grupo de Investigación  
“Parasitología Molecular y  
Enfermedades Metaxénicas”



Departamento de  
Patología Animal

Universidad Zaragoza

# Besnoitiosis vacuna

- **Etiología**
  - *Besnoitia besnoiti*
- **H.D:** ¿ ?
- **H.I:** Vacuno, caprino, corzo y otros rumiantes
- **Localización:** Cutis, subcutis, tejido conectivo, fascias, serosas, mucosas

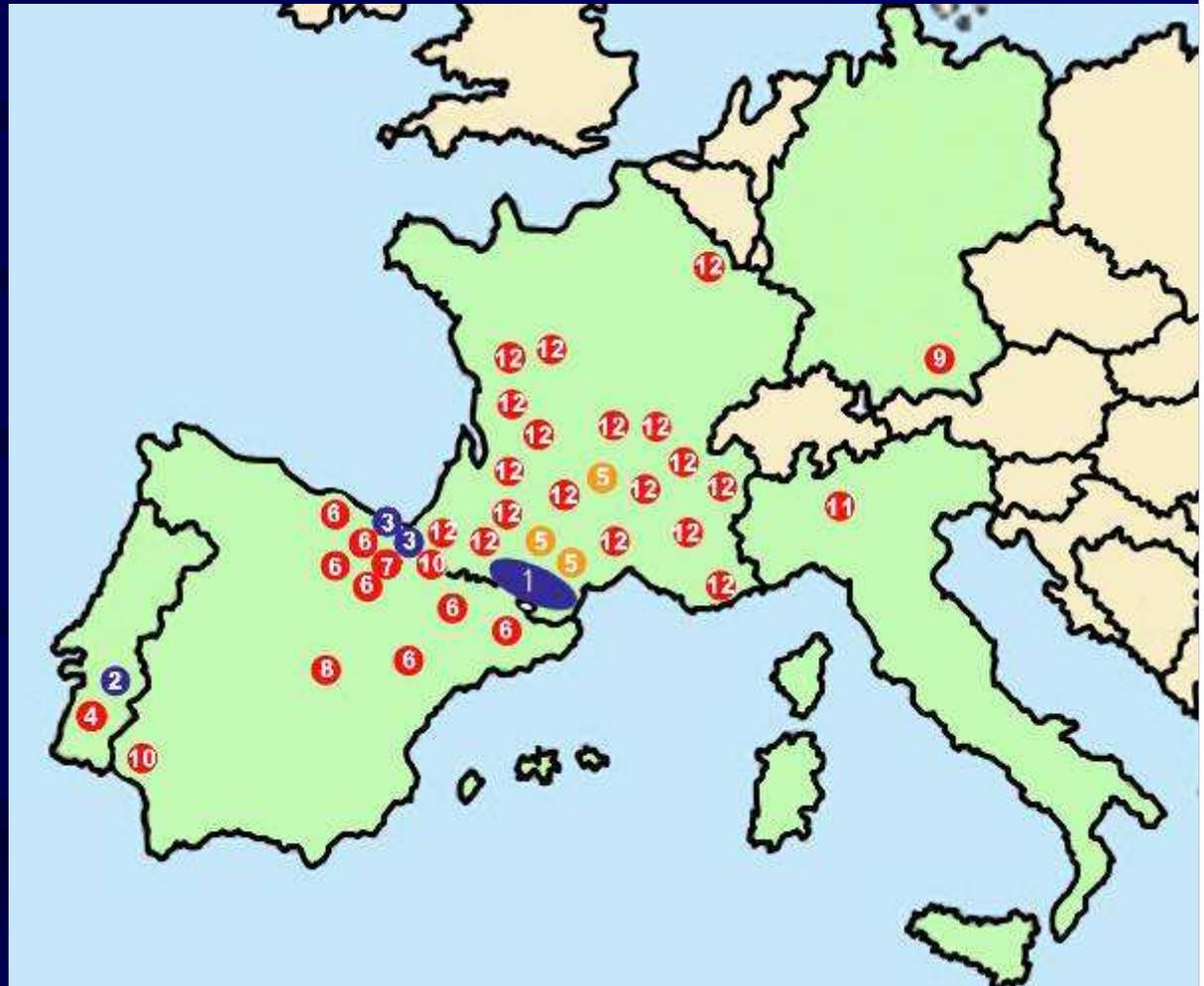
## Cronología de la Besnoitiosis en Europa

- 1.- Besnoit & Robin, 1912
- 2.- Franco & Borges, 1916
- 3.- Juste et al, 1990
- 4.- Cortes et al , 2004
- 5.- Alzieu. 2007
- 6.- Castillo, 2005
- 7.- Zacarias. 2009
- 8.- Fernández Garcia, 2009
- 9.- Rostaher, 2010
- 10.- Alvarez Garcia, sin publicar
- 11.- Gentile, sin publicar
- 12.- Jacquiet, sin `publicar

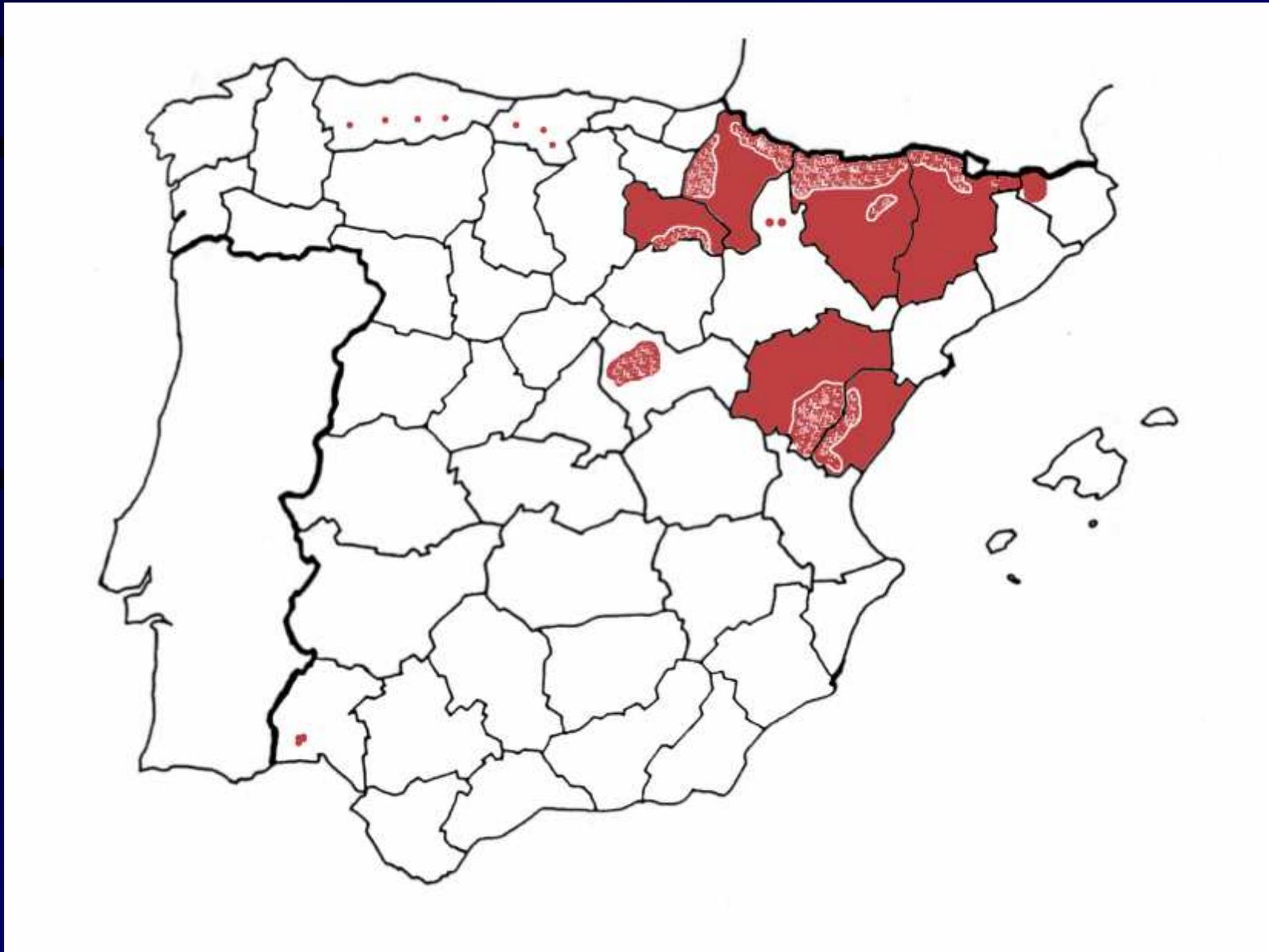
1,2 y 3.- De 1912 a 1990

4, 5.- De 1991 a 2000

6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12.- De 2001 a 2010



# Distribución Geográfica



# Ciclo Evolutivo

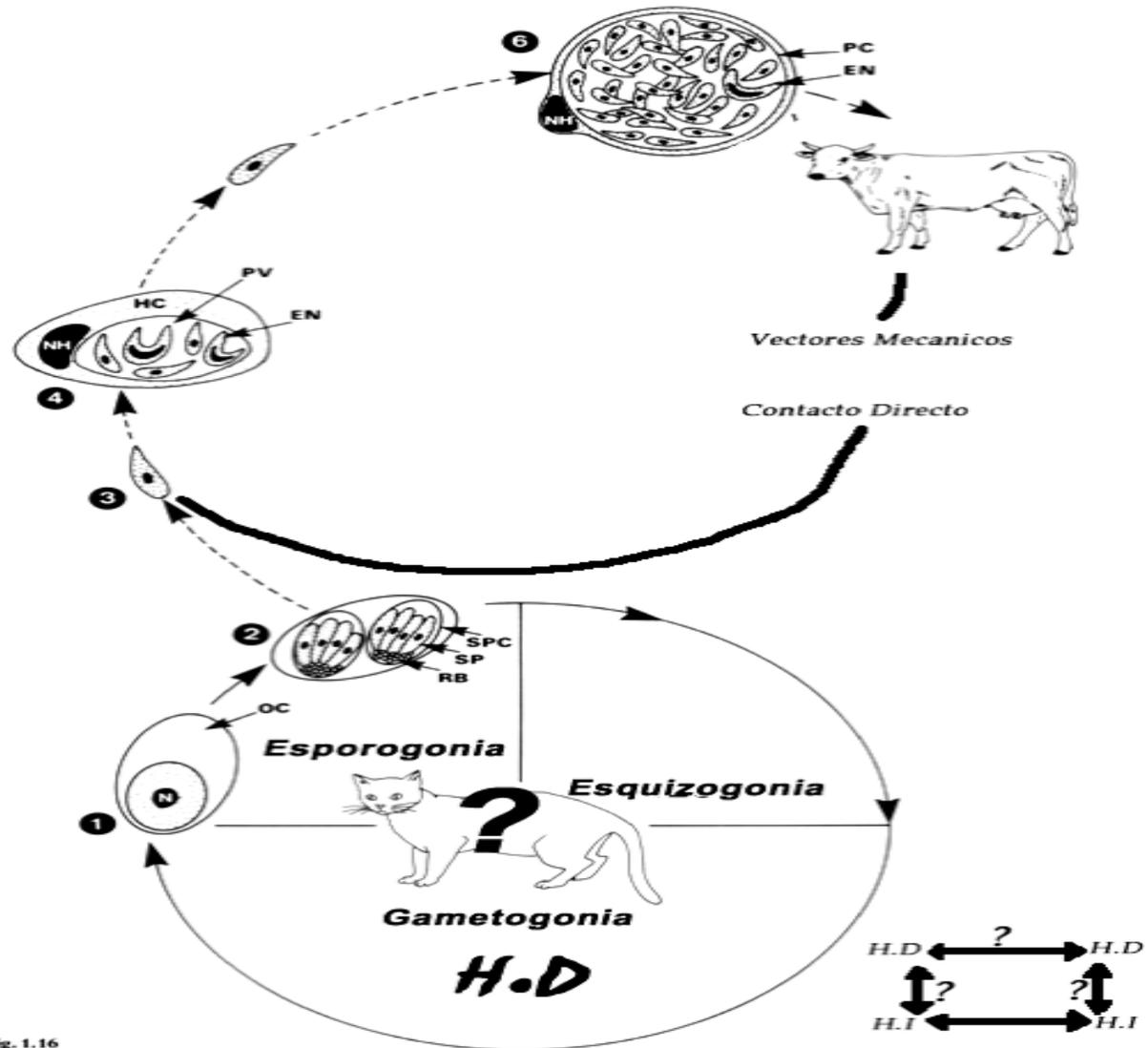


Fig. 1.16

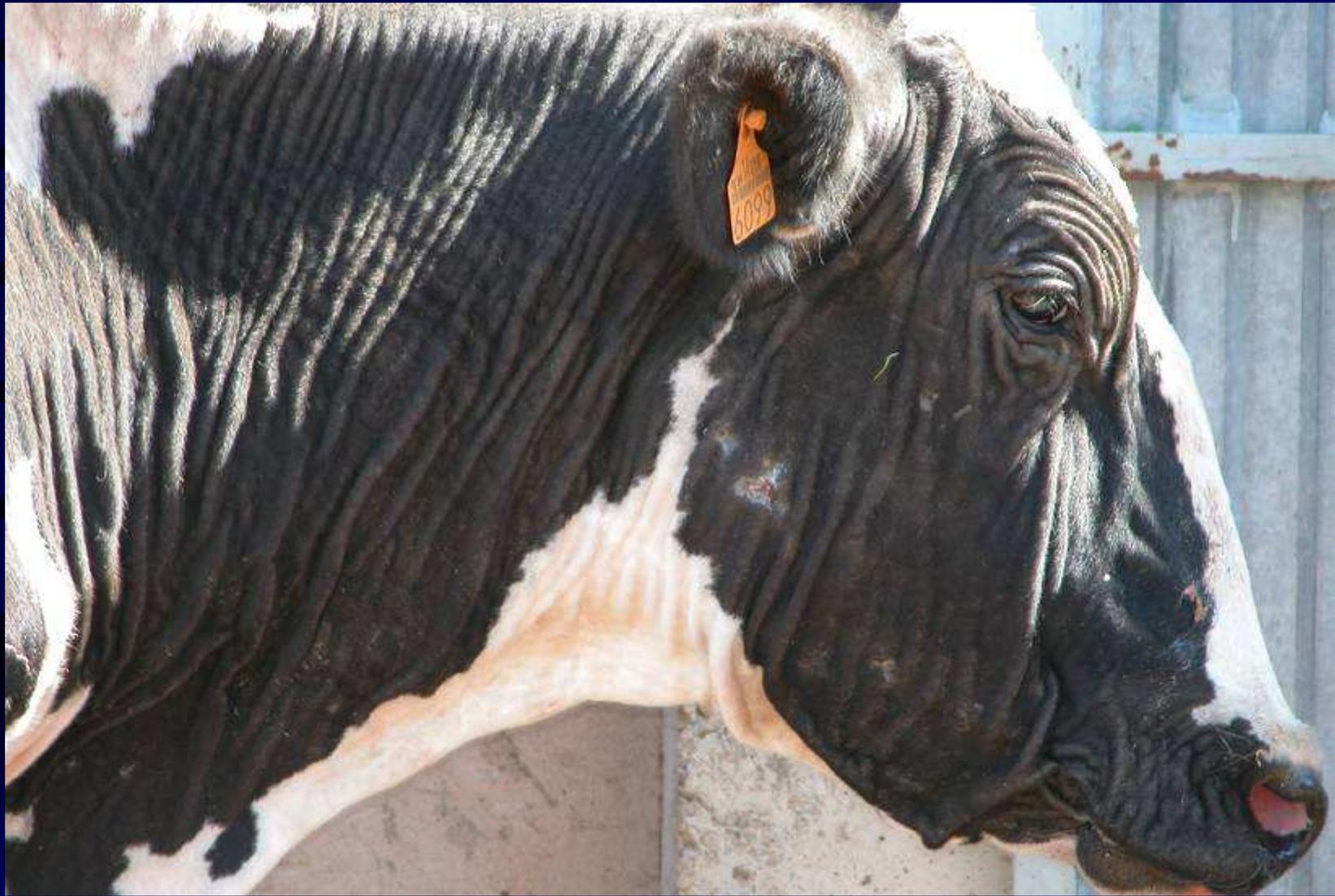
# Transmisión

- Horizontal
  - Contacto directo a través de escoriaciones de la piel y mucosas
  - Transmisión sexual (no por semen)
  - Vectores mecánicos (*Tabanidae* y *Stomoxys* spp)
- Vertical
  - Desconocida, pero poco probable

# Besnoitiosis vacuna

- **Patogenia-Clínica**

- Fase Aguda Febril (3-10 días)
- Fase Aguda de Edemas (1-4 semanas)
- Fase Crónica de depilaciones y esclerodermia



## Fase Crónica





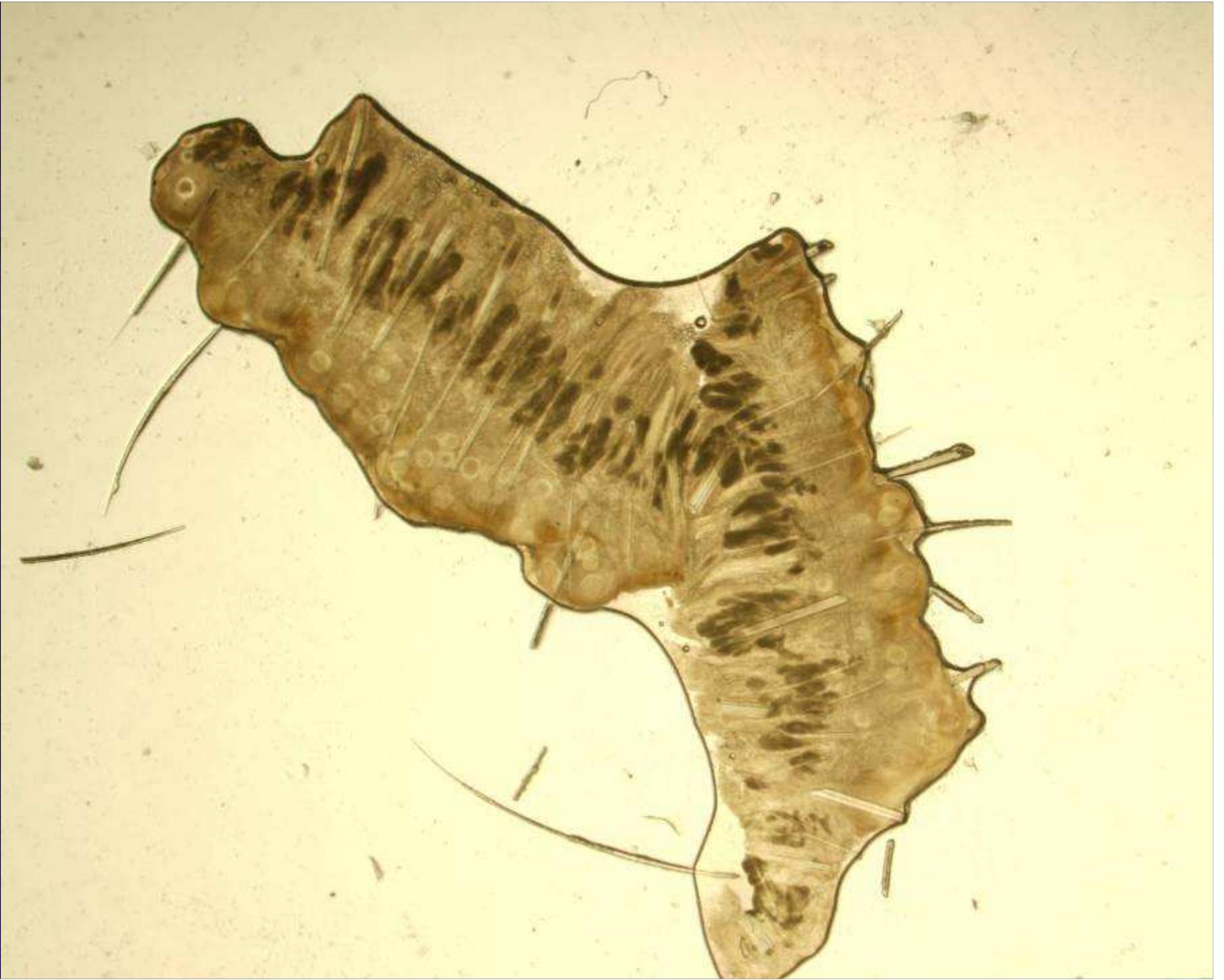


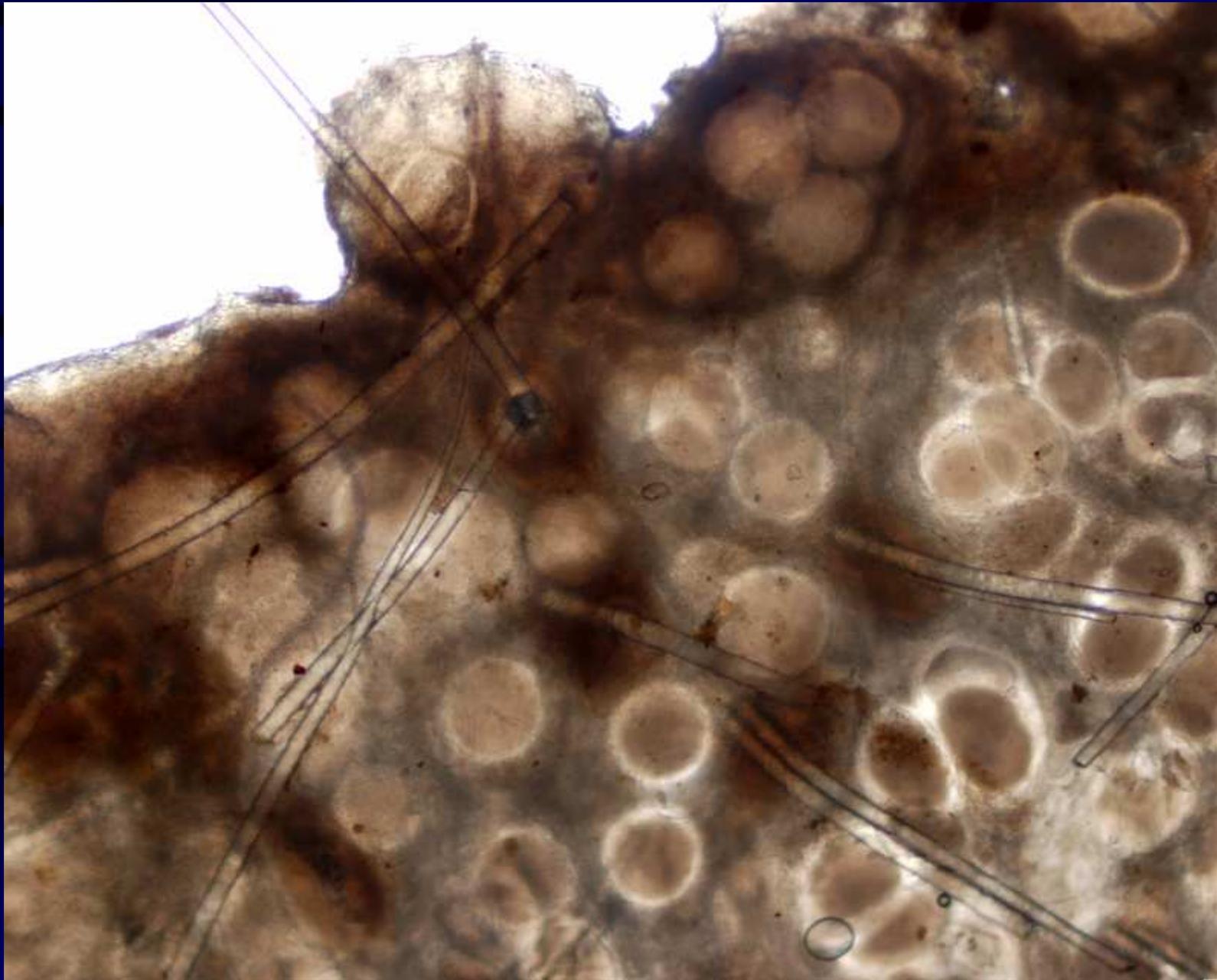


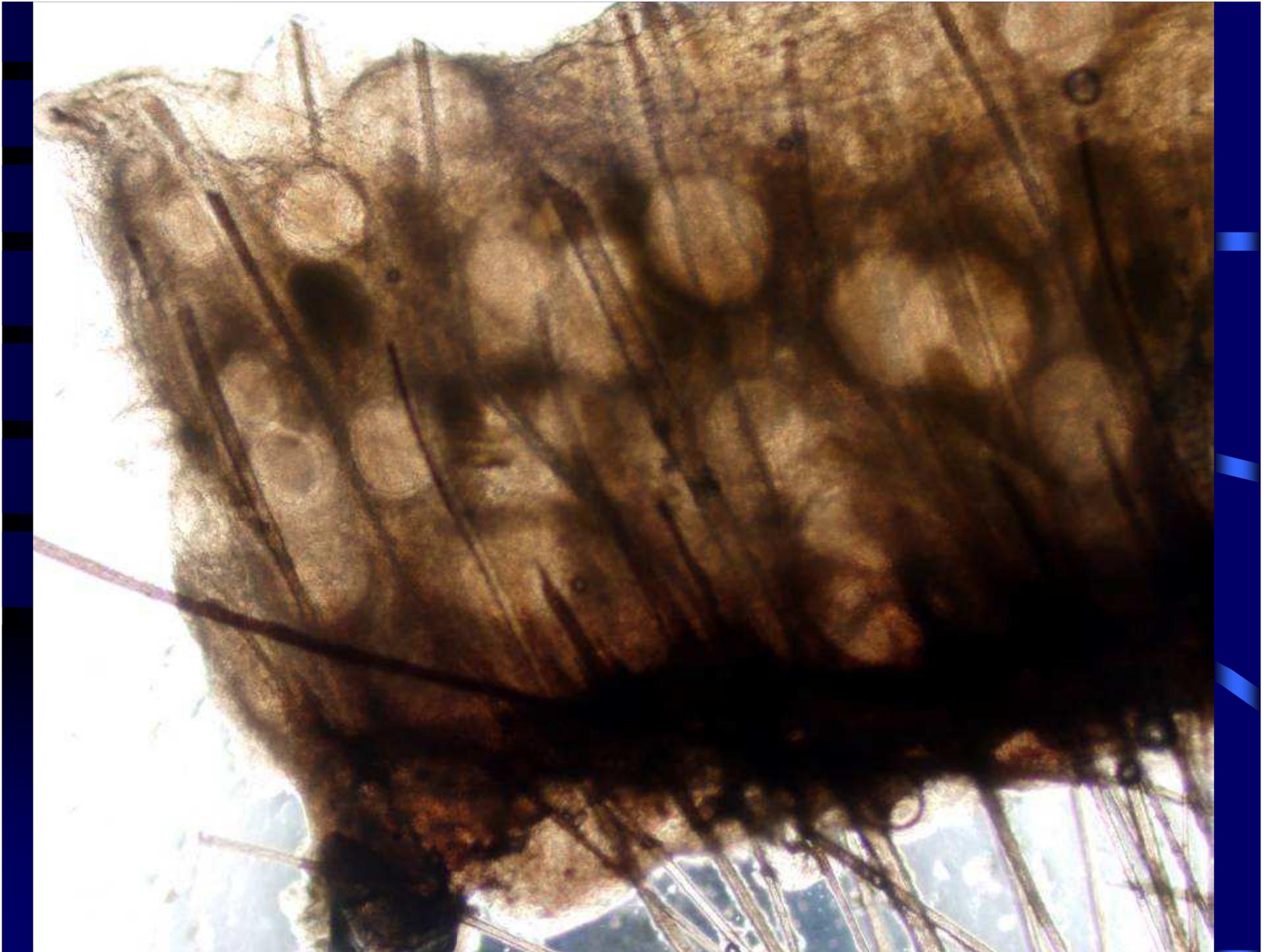


# Besnoitiosis Vacuna

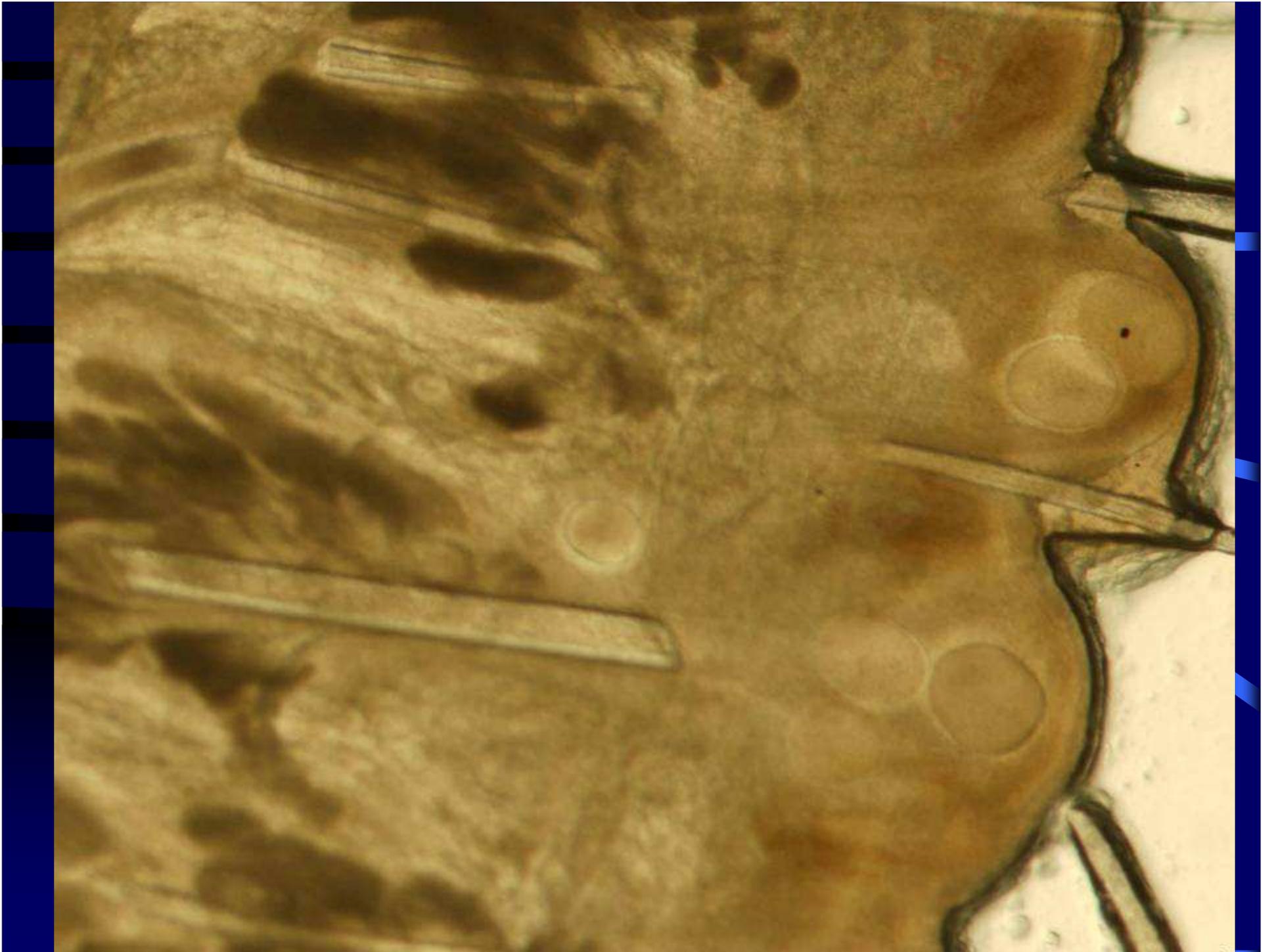
- Diagnóstico
  - Clínico
    - Aparición de edemas y cojeras
    - Alteraciones dérmicas (piel, quistes en mucosas)
  - Epidemiológico
  - Laboratorial
    - **Directo (biopsia de piel e histopatología)**
    - Serología (I F I , ELISA y Western blot)
    - DNA (Nested y Real Time PCR)

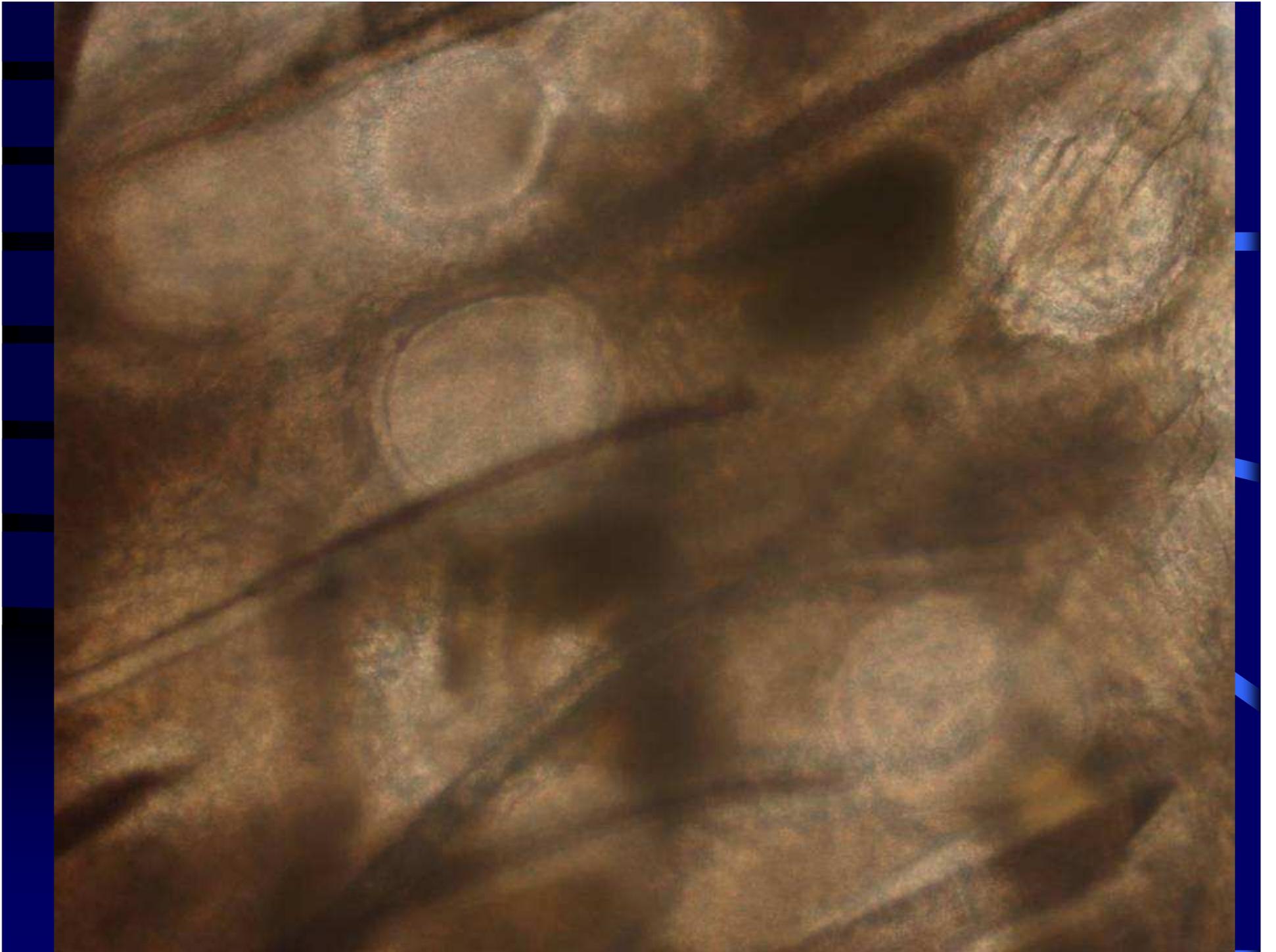




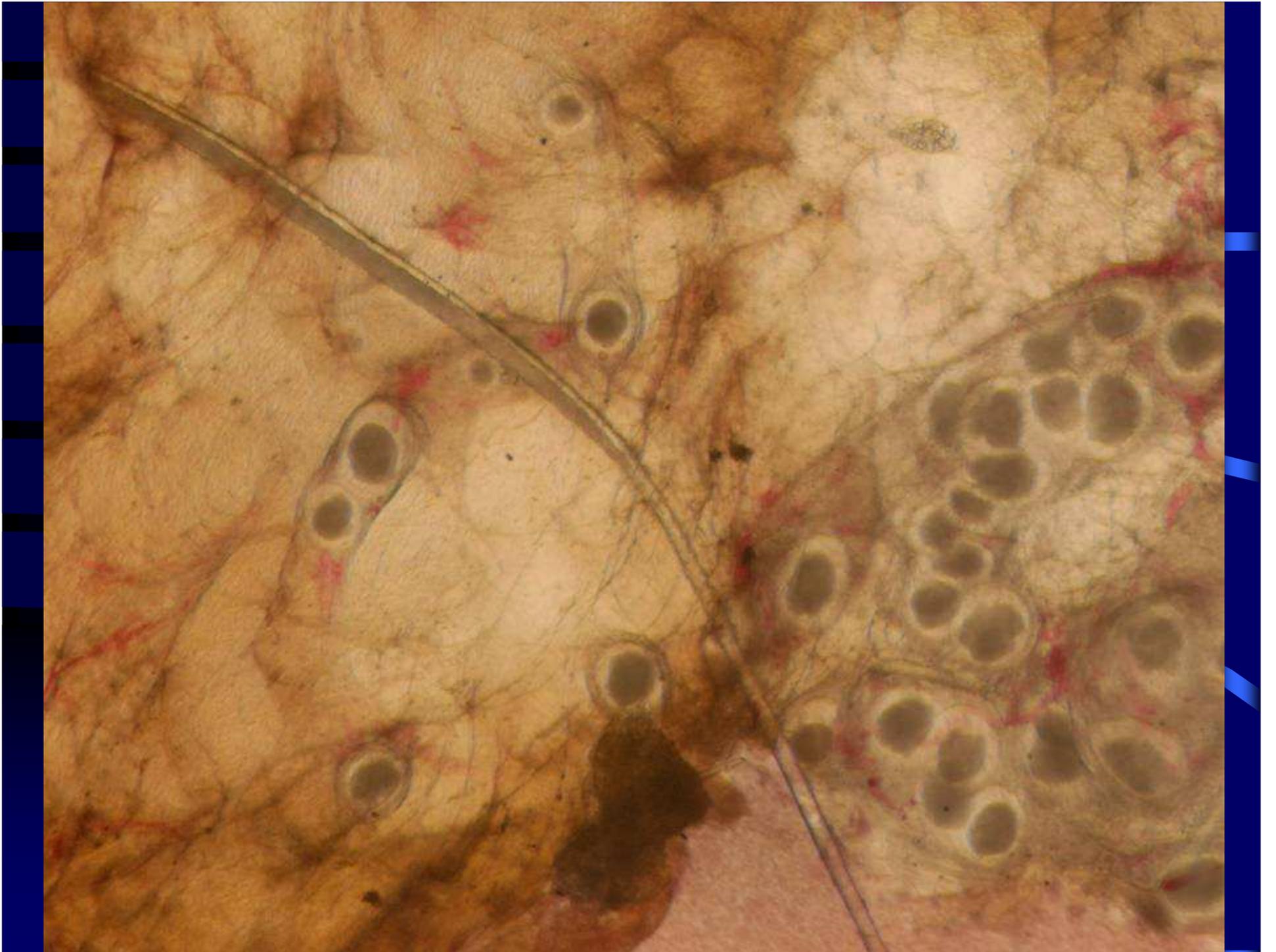




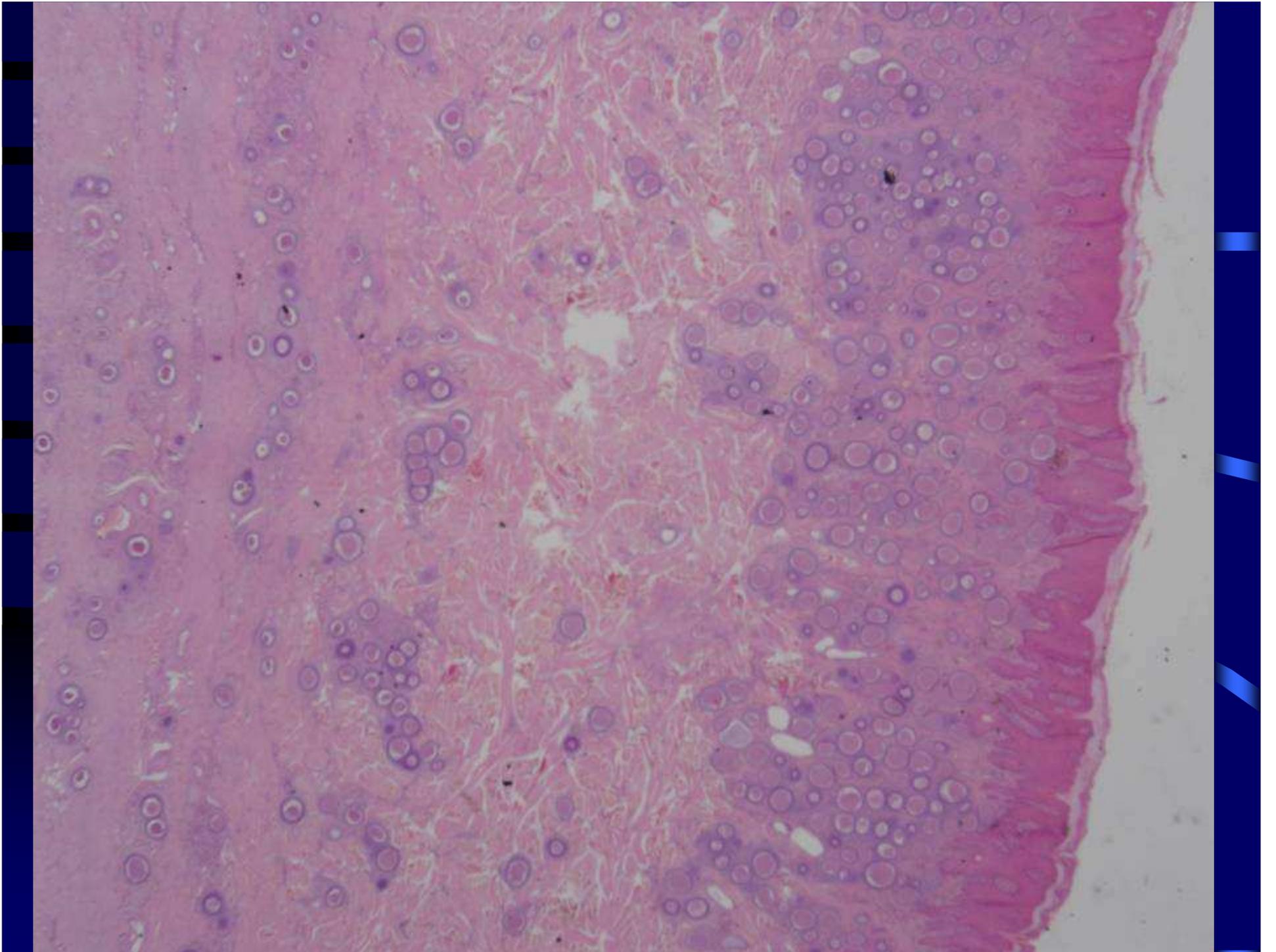


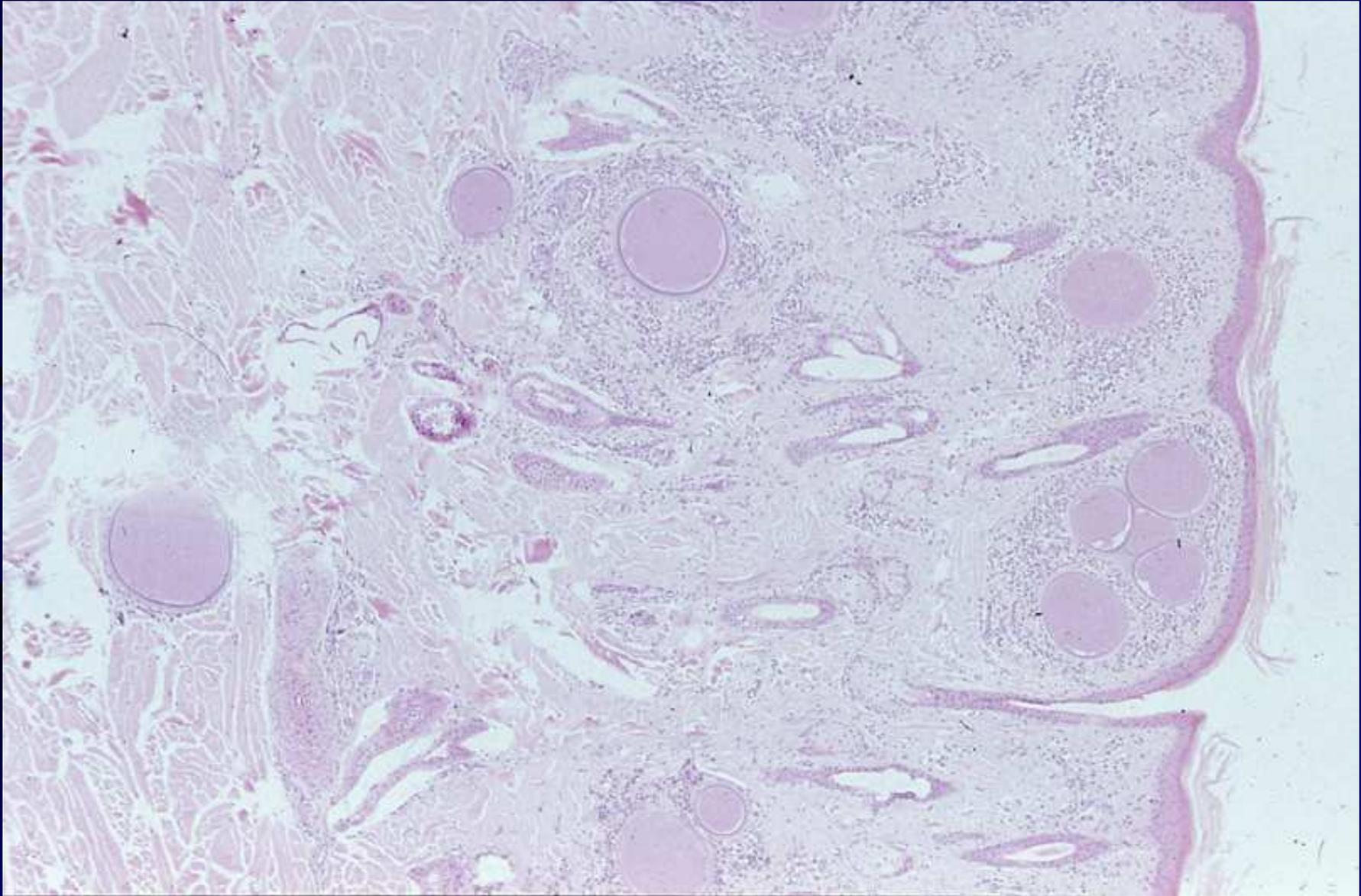


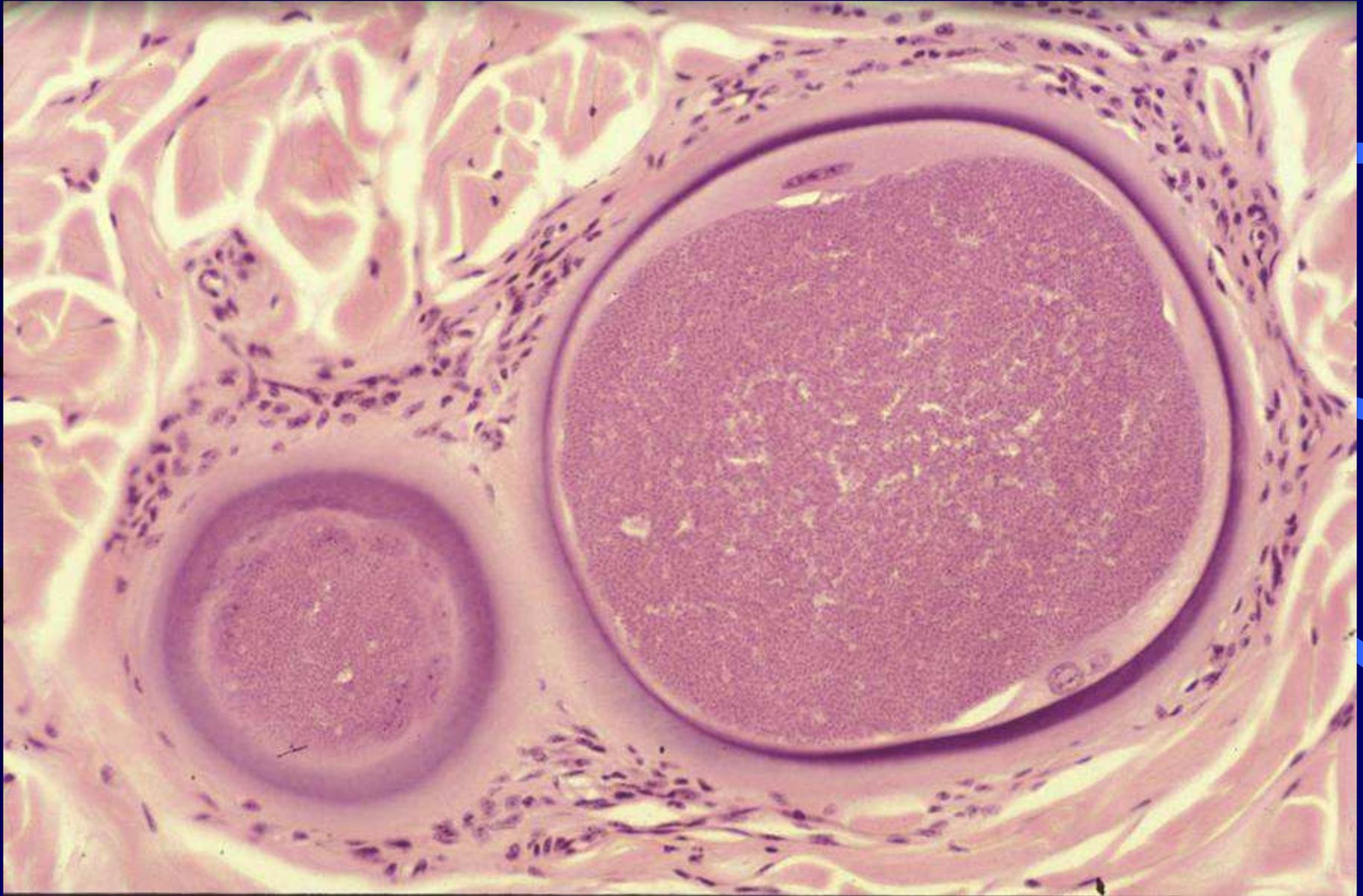


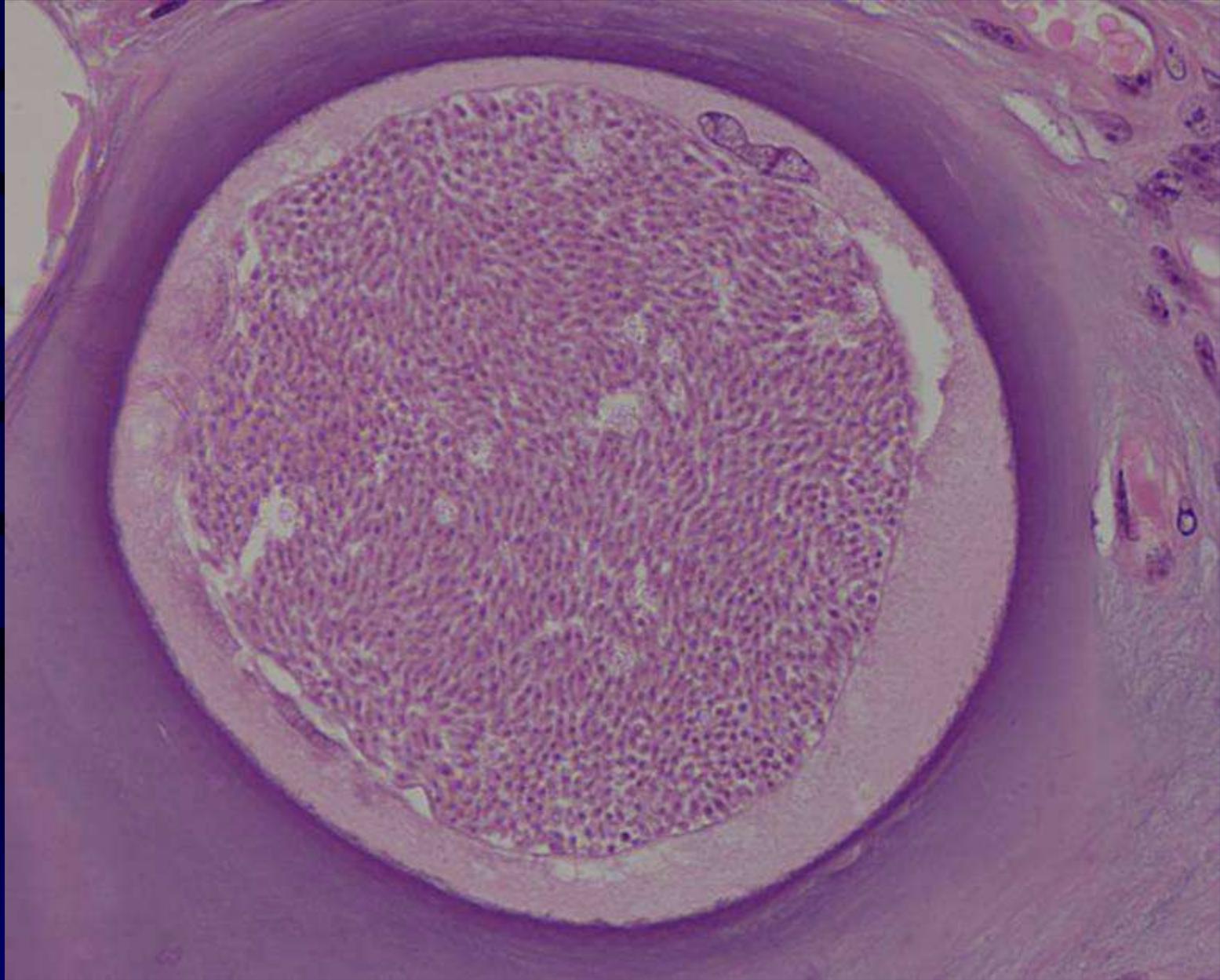












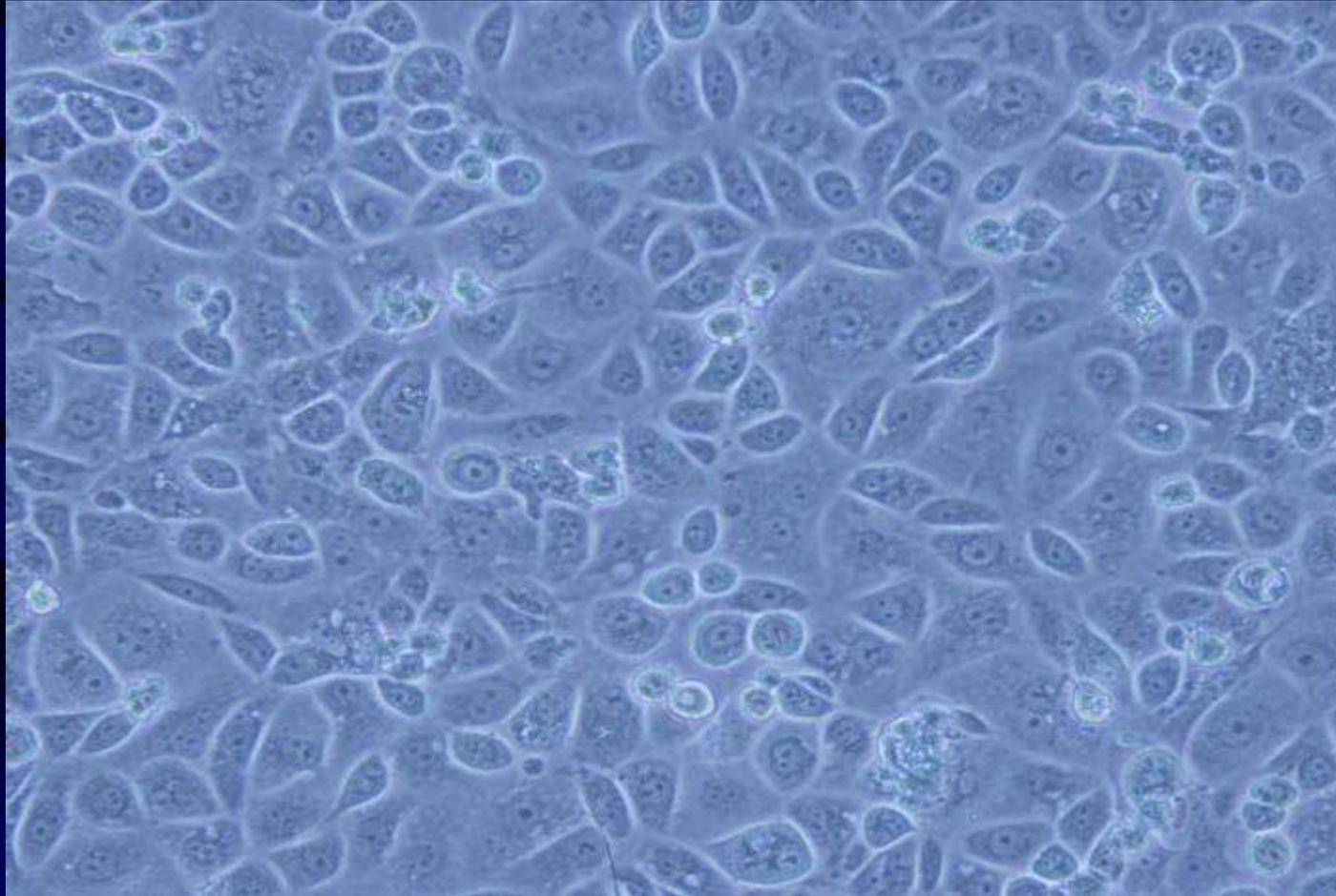
# Besnoitiosis Vacuna

- Diagnóstico
  - Clínico
    - Aparición de edemas y cojeras
    - Alteraciones dérmicas (piel, quistes en mucosas)
  - Epidemiológico
  - Laboratorial
    - Directo (biopsia de piel e histopatología)
    - Serología (I F I , ELISA y Western blot)
    - DNA (Nested y Real Time PCR)

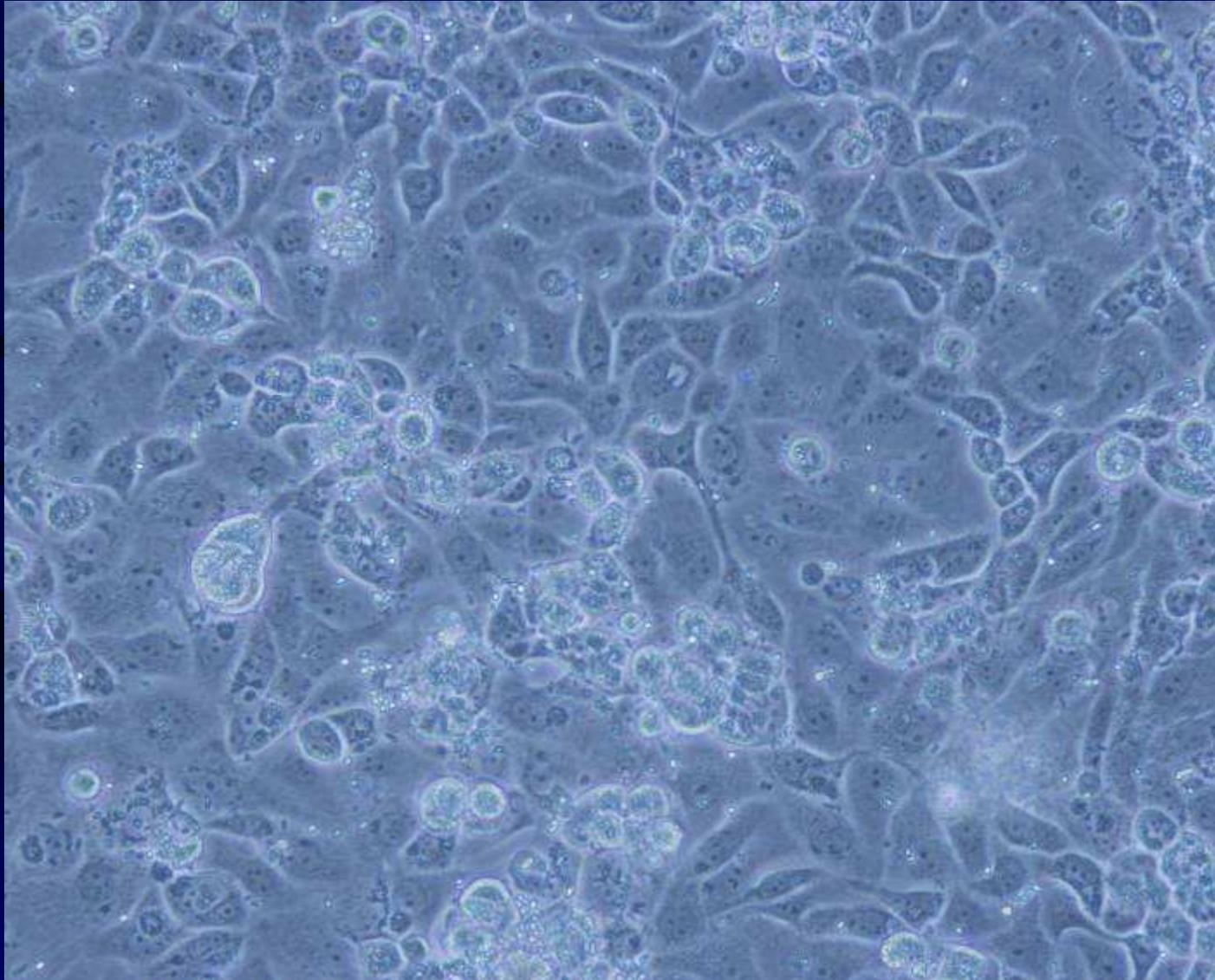
# Antígeno

- Taquizoitos
  - Cultivo celular.- Línea continua MARC - 145
- Bradizoitos

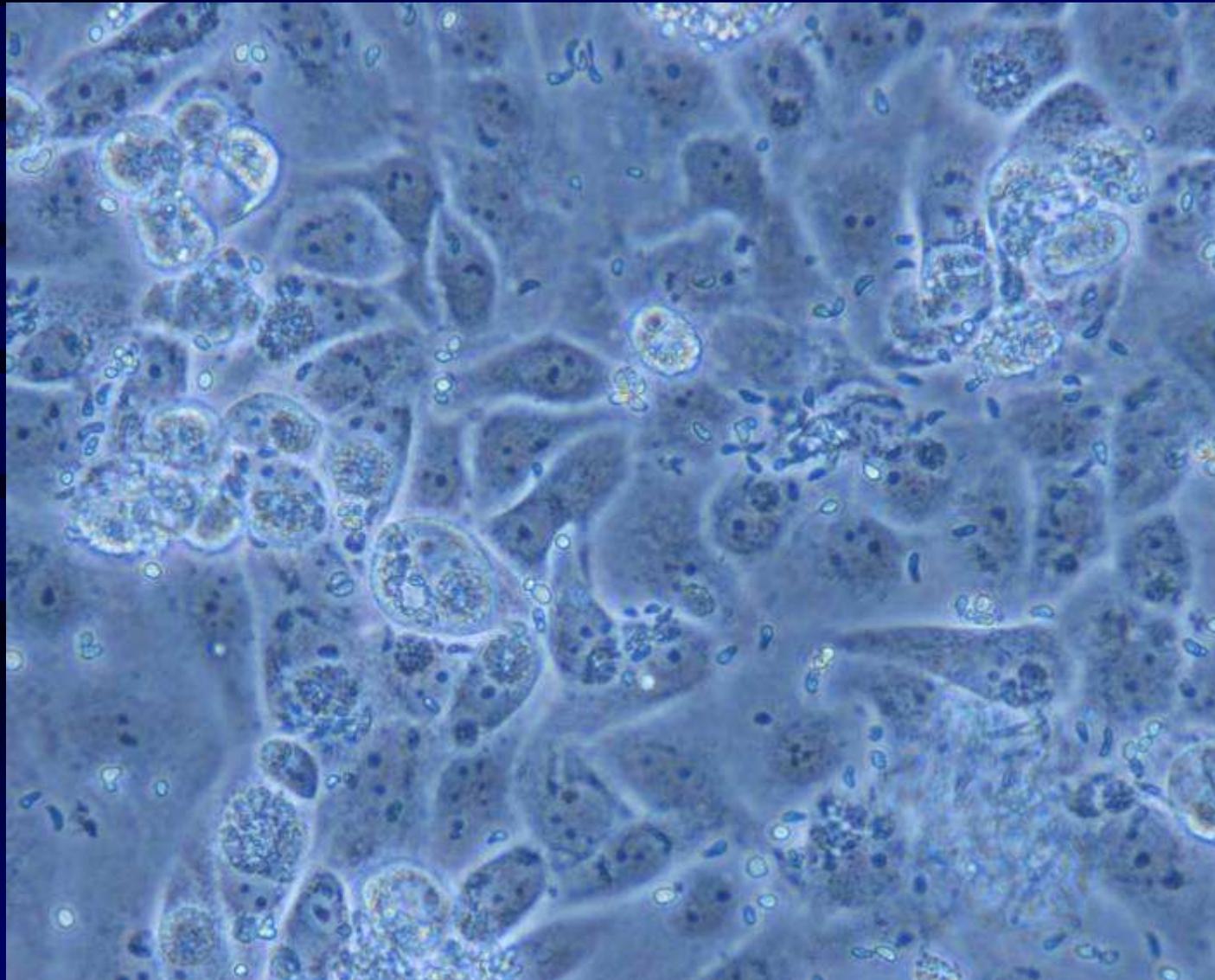
# Cultivo MARC -145/ Besnoitia

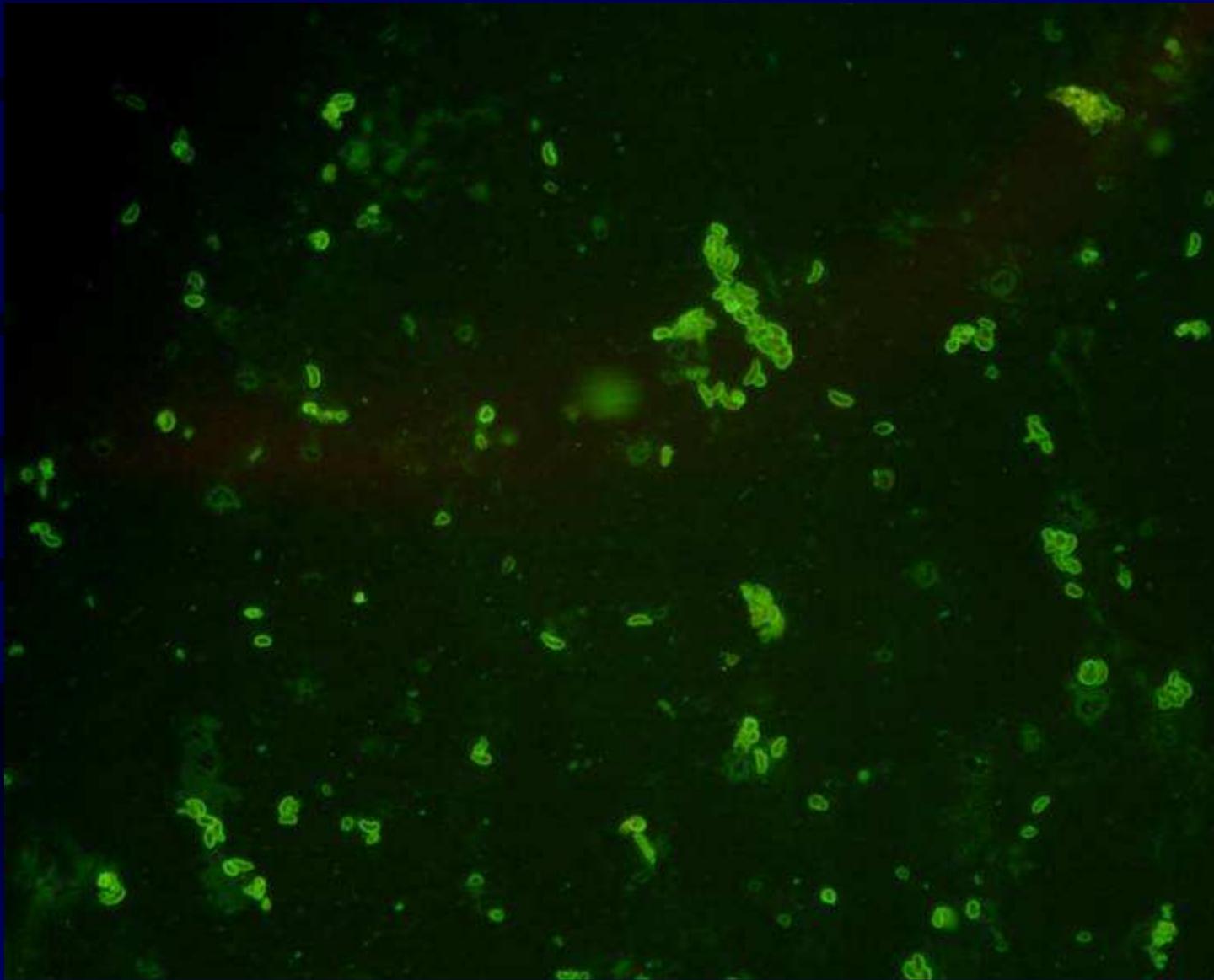


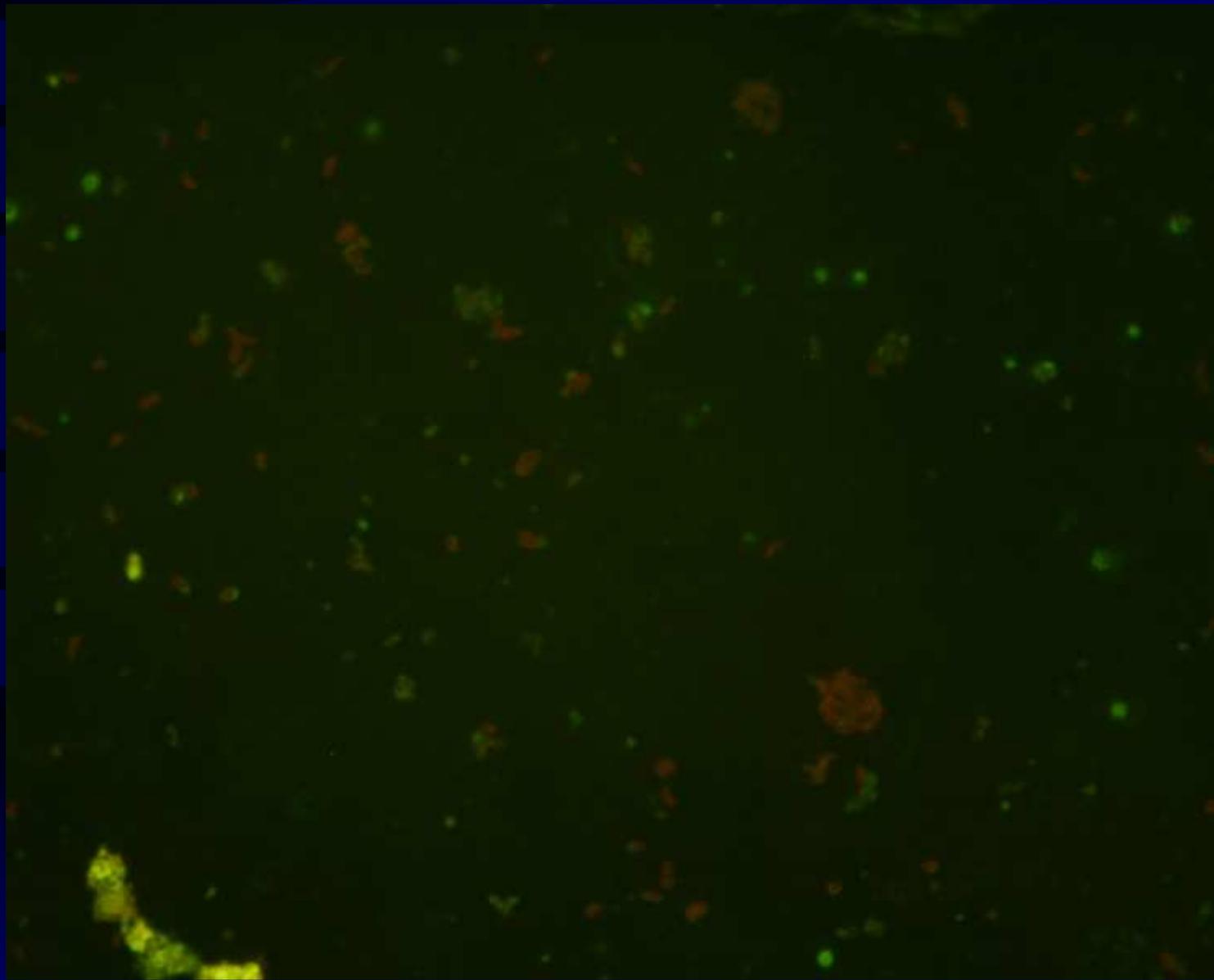
# Cultivo MARC -145/ Besnoitia



# Cultivo MARC -145/ Besnoitia







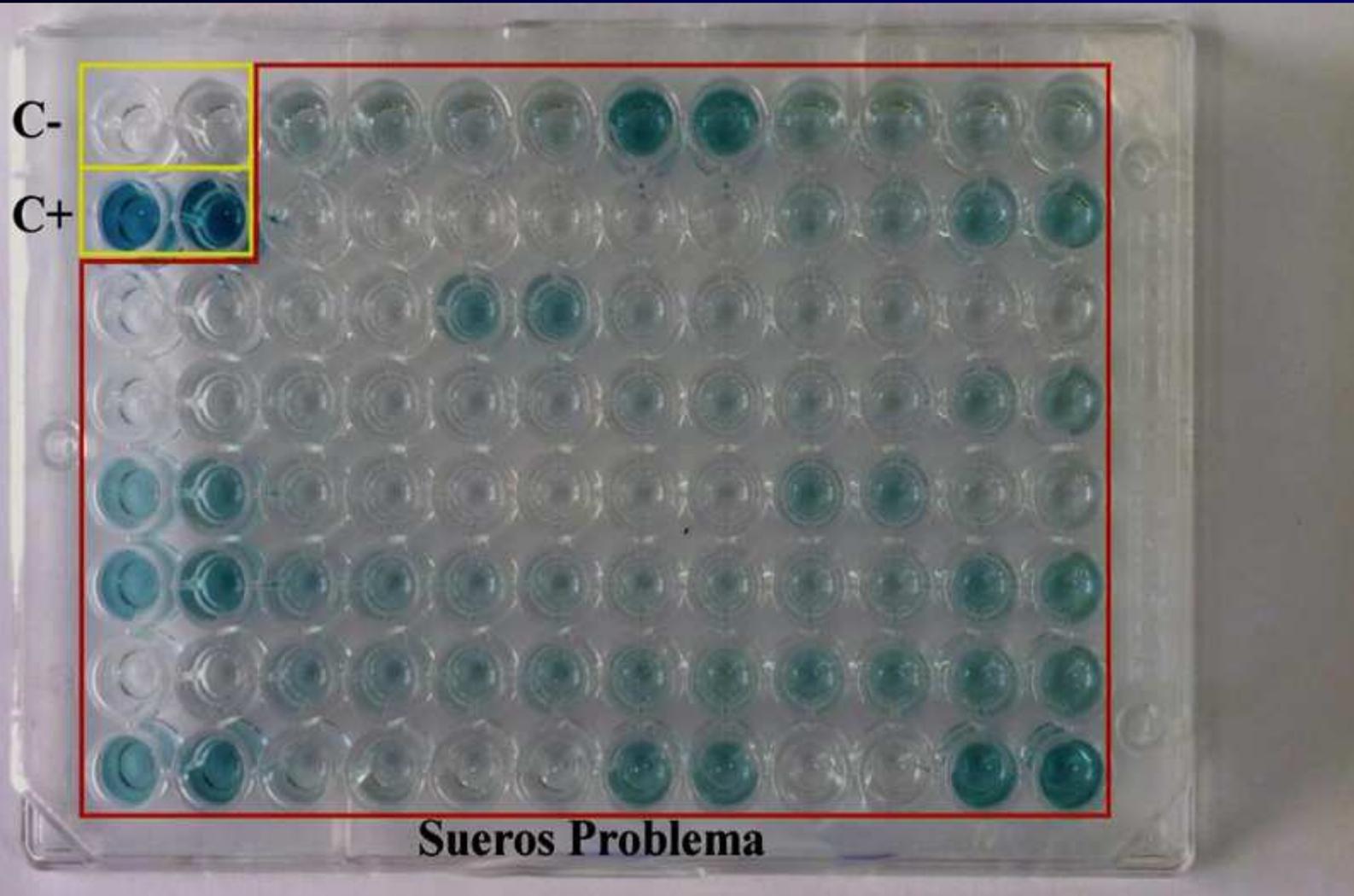
# Técnica ELISA

- Antígeno soluble total de taquizoitos

- $$\%IRPC = \frac{\text{DO405 muestra} - \text{media DO405 control}}{\text{Media DO405 control} + \text{media DO405 muestra}} \times 100$$

» IRPC = 8,1

# □ Placa ELISA



# Concordancia entre IFI y ELISA

		ELISA		
		Positivos	Negativos	Total
IFI	Positivos ( $\leq 1/200$ )	242 (43,9%)	26 (4,7%)	268 (48,6%)
	Negativos ( $> 1/200$ )	3 (0,5%)	280 (50,8%)	283 (51,4%)
Total		245 (44,5%)	306 (55,5%)	551 (100%)

Valor de Kappa (k) = 0,894 + 0,019

# Sensibilidad y Especificidad

Título	IFI		ELISA	
	Sensibilidad (%) (IC <sub>95%</sub> )	Especificidad (%) (IC <sub>95%</sub> )	Sensibilidad (%) (IC <sub>95%</sub> )	Especificidad (%) (IC <sub>95%</sub> )
Positivo $\geq$ 100	100	99,38	87,86	100
Positivo $\geq$ 200	98,58	99,32	89,66	100
Positivo $\geq$ 400	84,91	99,30	89,09	100

# Besnoitiosis Vacuna

- Diagnóstico
  - Clínico
    - Aparición de edemas y cojeras
    - Alteraciones dérmicas (piel, quistes en mucosas)
  - Epidemiológico
  - Laboratorial
    - Directo (biopsia de piel e histopatología)
    - Serología (I F I , ELISA y Western blot)
    - DNA (Nested y Real Time PCR)

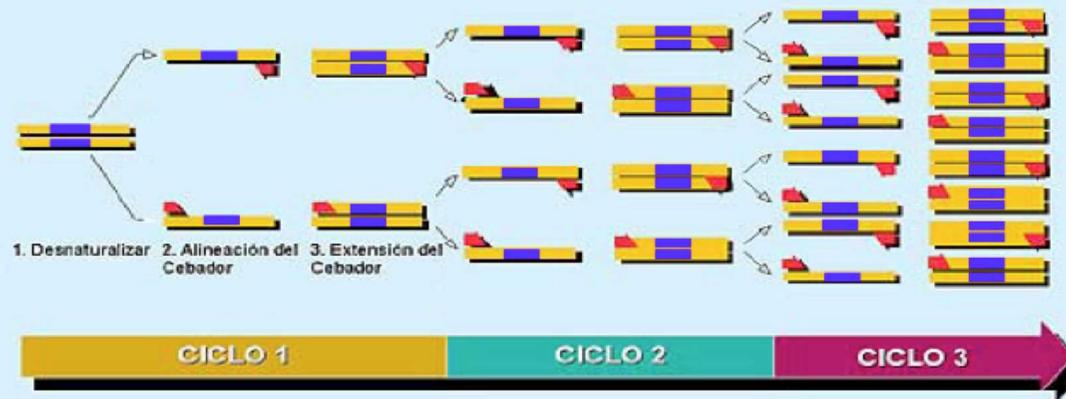
# Nested (anidada) PCR

- Esta prueba consiste en la amplificación de un fragmento de ADN mediante la replicación de una secuencia de ADN (externa) seguida de la replicación de otra secuencia (interna) integrada en la 1ª secuencia replicada.

**PCR externa, amplificación del fragmento externo (extremos amarillos) de ADN junto con el fragmento interno (azul) incluido en su interior.**

## Reacción en cadena de la polimerasa

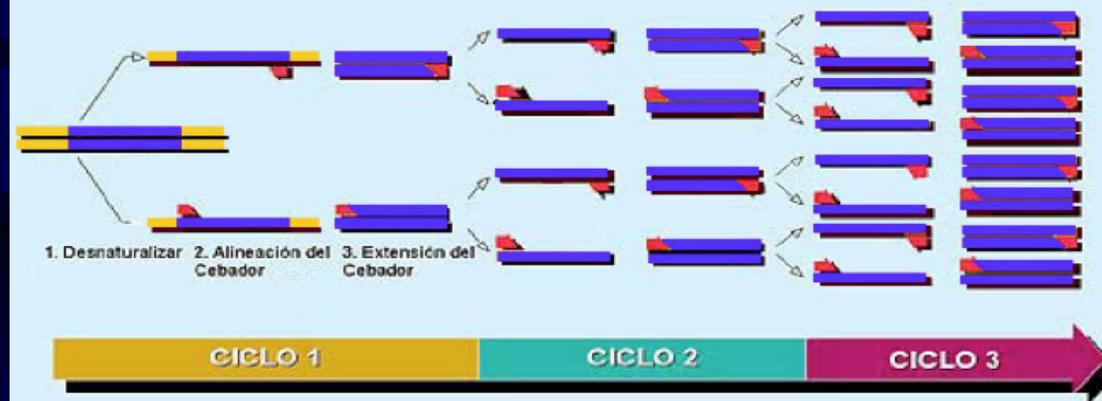
### PCR externa



# PCR interna, amplificación del fragmento interno (azul) de ADN

## Reacción en cadena de la polimerasa

### PCR interna



# Cebadores para Nested PCR

- Secuencia parcial de ITS1 - 5,8S
- PCR externa:
  - 
  - BB1F: 5'-GGTGCATTCGAGAAGTGTGCT-3' Tm: 66.53° C
  - BB1Re: 5'- TTTCGCTGCGTCCTTCATC-3' Tm: 66.39° C
  - 
  -
- PCR interna:
  - 
  - BB2F: 5'- GACAACAAGAGCATCGCCTTC-3' Tm: 65,98° C
  - BB2Re: 5'- GCCAAGACATCCATTGCTGAA-3' Tm: 67,18° C
  -

# Diagnóstico por PCR a Tiempo Real

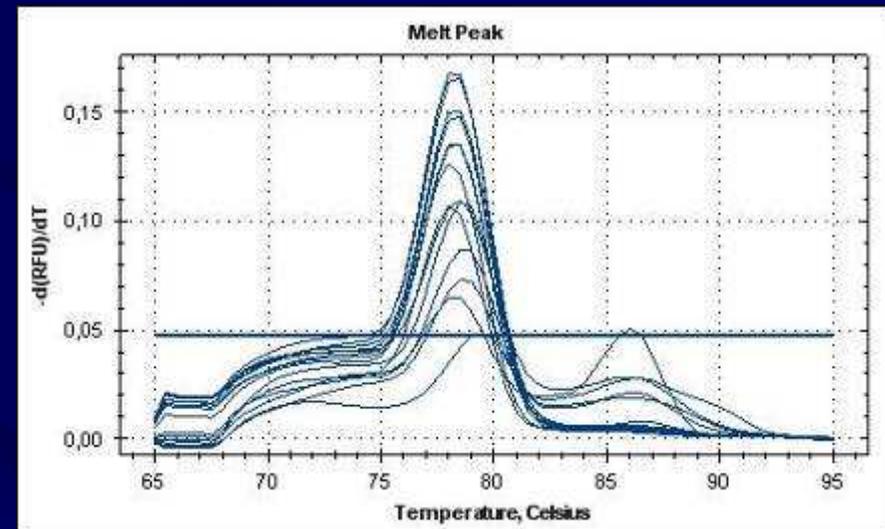
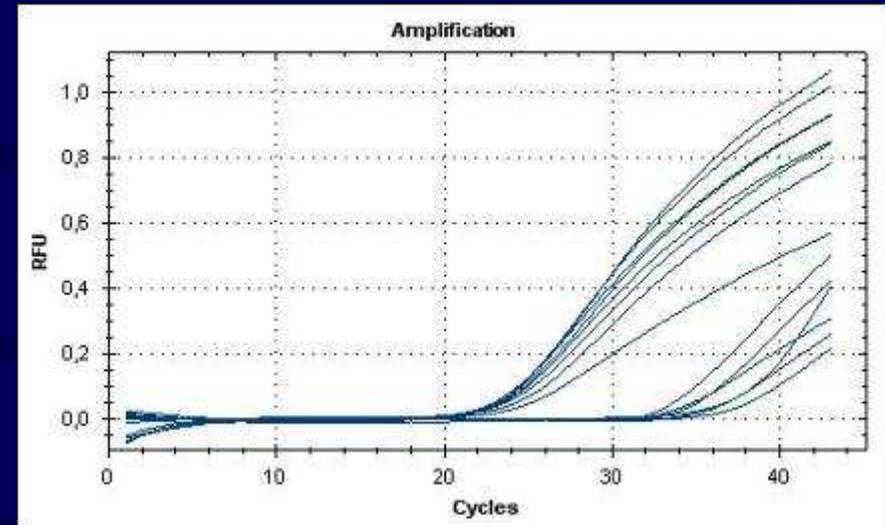
## PCR A TIEMPO REAL

La piel tiene mas copias de DNA del parásito comparado con la Sangre del mismo animal.

→  $Ct(s) > Ct(p)$

Confirmación de la temperatura Del producto de la PCR.  $T^0 = 78,5^{\circ}C$

Internal spacer of ribosomal DNA: (ITS1 rDNA) PCR para la detección de *Besnoitia besnoiti*



Muchas Gracias