



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
MAESTRÍA EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL
SUSTENTABLE

Desarrollo y estandarización de la técnica de amplificación isotérmica basada en horquillas (LAMP) para el diagnóstico de *Babesia bigemina*

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestra en Salud y Producción Animal Sustentable

Presenta

M.V. Andrea Paola Lizarazo Zuluaga

Dirigido por

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Asesores

Dra. Bertha Isabel Carvajal Gámez

Dra. Minerva Camacho Nuez

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón

Dr. Efraín Vicente Benavides Ortiz

Santiago de Querétaro, Qro., octubre de 2017



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
MAESTRÍA EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL
SUSTENTABLE



Desarrollo y estandarización de la técnica de amplificación isotérmica basada en horquillas (LAMP) para el diagnóstico de *Babesia bigemina*

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestra en Salud y Producción Animal Sustentable

Presenta

M.V. Andrea Paola Lizarazo Zuluaga

Dirigido por

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Asesores

Dra. Bertha Isabel Carvajal Gámez

Dra. Minerva Camacho Nuez

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón

Dr. Efraín Vicente Benavides Ortiz

Santiago de Querétaro, Qro., octubre de 2017



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable

Desarrollo y estandarización de la técnica de amplificación isotérmica basada
en horquillas (LAMP) para el diagnóstico de *Babesia bigemina*

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestra en Salud y Producción Animal Sustentable

Presenta

M.V. Andrea Paola Lizarazo Zuluaga

Dirigido por

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

SINODALES

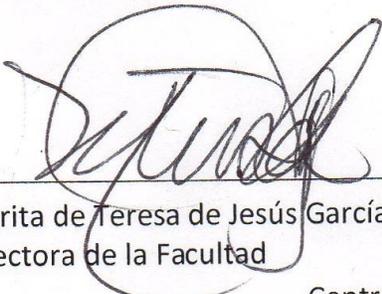
Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito
Presidente

Dra. Bertha Isabel Carvajal Gámez
Secretario

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón
Vocal

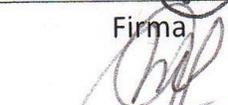
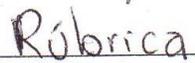
Dra. Minerva Camacho Nuez
Suplente

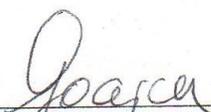
Dr. Efraín Vicente Benavides Ortiz
Suplente


Dra. Margarita de Teresa de Jesús García Gasca
Directora de la Facultad


Firma

Firma

Firma

Firma

Rúbrica
Firma


Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro
Octubre de 2017
México

RESUMEN

La babesiosis bovina es una enfermedad transmitida por garrapatas causada por protozoarios parásitos del género *Babesia*. Esta enfermedad se caracteriza por ocasionar alta morbilidad y mortalidad a nivel mundial. De las especies de *Babesia* que afectan a los bovinos, *B. bovis* y *B. bigemina* son las especies con mayor prevalencia e importancia económica en el mundo debido al impacto ocasionado en la industria de producción de carne y leche. Las estrategias efectivas de control de la enfermedad deben incluir la detección de animales reservorios y la detección temprana y específica de la enfermedad utilizando técnicas de diagnóstico rápidas, económicas, sensibles y específicas. La técnica de amplificación isotérmica basada en horquillas (LAMP) es una reacción molecular de un paso que amplifica una secuencia de DNA blanco con alta sensibilidad y especificidad bajo condiciones isotérmicas en el lapso de una hora, no requiere de equipos especiales y los resultados pueden ser observados por viraje colorimétrico. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar y estandarizar la técnica de LAMP para la detección de *Babesia bigemina* y su visualización utilizando azul de hidroxinaftol. La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Inmunología y Vacunas de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro y la metodología empleada incluyó: 1) el diseño y síntesis de cebadores como punto crítico del desarrollo de la técnica; 2) la estandarización de las condiciones de amplificación y visualización; 3) la evaluación de la sensibilidad y especificidad diagnóstica y, 4) la detección de distintas cepas de *B. bigemina* del mundo. Se diseñaron cebadores a partir de las secuencias conservadas del gen *ama-1* de *Babesia bigemina*. Los resultados mostraron que, a 63°C en una hora y en condiciones estandarizadas, la técnica amplifica DNA de *B. bigemina* logrando el viraje colorimétrico característico. La evaluación de la sensibilidad indicó que se logra amplificar DNA a un 0.00000001% de parasitemia y se demostró que esta técnica amplifica DNA de *B. bigemina* de manera específica. Adicionalmente, la técnica fue capaz de amplificar DNA de 10 cepas de *B. bigemina* de tres países distintos. Se concluye que la técnica de LAMP desarrollada aquí es capaz de amplificar de manera específica y sensible DNA de *B. bigemina*, no presenta

reacción cruzada con organismos relacionados y el producto es observado al término de 60 minutos de reacción por viraje colorimétrico. El presente es el primer reporte de LAMP que utiliza secuencias conservadas entre cepas del gen *ama-1*, demuestra los resultados por cambios de coloración utilizando azul de hidroxinaftol y prueba la capacidad de diagnóstico de cepas de otras partes del mundo. La técnica es una alternativa rápida y económica para el diagnóstico de la enfermedad causada por *B. bigemina*.

Palabras clave: *Babesia bigemina*, diagnóstico molecular, LAMP, azul de hidroxinaftol.

SUMMARY

Bovine babesiosis is a tick-borne disease caused by protozoan parasites of the genus *Babesia*. This disease is characterized by high morbidity and mortality worldwide. Of the *Babesia* species that affect cattle, *B. bovis* and *B. bigemina* are the most prevalent and economically important species in the world due to the impact on the meat and milk production industry. Effective disease control strategies should include detection of reservoir animals and early and specific disease detection using rapid, economical, sensitive and specific diagnostic techniques. The Loop-Mediated Isothermal Amplification technique (LAMP) is a one-step molecular reaction that amplifies DNA sequence with high sensitivity and specificity under isothermal conditions within one hour, requires no special equipment and the results can be observed through the naked eye by colorimetric turning. The objective of the present work was to develop and standardize the LAMP technique for the detection of *Babesia bigemina* and its visualization using hydroxynaphthol blue. The research was carried out in the Laboratory of Immunology and Vaccines of the Faculty of Natural Sciences of the Universidad Autónoma de Querétaro and the methodology used included: 1) the design and synthesis of primers as a critical point in the development of the technique; 2) standardization of amplification and visualization conditions; 3) the evaluation of diagnostic sensitivity and specificity and, 4) the detection of different strains of *B. bigemina* in the world. Primers were designed from the conserved sequences of the *babesia bigemina ama-1* gene. The results showed that, at 63 °C in one hour and under standardized conditions, the technique amplifies *B. bigemina* DNA achieving the characteristic colorimetric change. Sensitivity evaluation indicated that DNA was amplified at a 0.00000001% parasitemia and it was demonstrated that this technique amplifies DNA of *B. bigemina* in a specific way. Additionally, the technique was able to amplify DNA from 10 strains of *B. bigemina* from three different countries. It is concluded that the LAMP technique developed here is able to amplify *B. bigemina* DNA specifically and has high sensitivity, does not cross-react with related organisms and the product is observed at the end of 60 minutes of reaction per colorimetric turn. The present report is the first LAMP report that uses conserved sequences between strains of the *ama-1* gene, demonstrates the results by changes of coloration using

hydroxynaphtol blue and has the diagnostic capacity of strains from other parts of the world. The technique is a fast and economical alternative for the diagnosis of *B. bigemina* disease.

Key words: *Babesia bigemina*, molecular diagnosis, LAMP, hydroxynaphtol blue.

DEDICATORIAS

Este trabajo de investigación, se lo dedico primeramente a quien gobierna mi vida y pone en ella los momentos, las personas, los retos, las puertas, los logros alcanzados. DIOS a ti te debo todo.

A quienes siempre han creído en mí y me han dado la fuerza, los principios y la templanza para emprender con entusiasmo y compromiso cada nuevo reto y proyecto de mi vida, este trabajo se lo dedico a MIS PADRES. Gracias por el amor, las enseñanzas y todo el apoyo.

A mi hermanito, el que siempre ha creído en mi, sabes que por ti lo daría todo Fredy Lizarazo.

A Francisco Guzmán, esposo mio, haces que la vida sea mas fácil, pones en ella alegría y color... Gracias, te amo infinitamente.

A quienes han participado en mi formación profesional, Dr. Efrain Benavides y Dr. Juan Mosqueda, a ustedes les agradezco por la paciencia, por creer en mi y por enseñarme a ser mejor profesional y mejor persona.

AGRADECIMIENTOS

Para expresar mis agradecimientos a quienes hicieron de mi estancia en este bello país una gran experiencia necesitaría más papel, una disculpa para los que no mencione aquí.

Mis agradecimientos van dirigidos principalmente a Dios, a mis padres y a mi hermano porque siempre han estado ahí para mí, apoyándome en cada nuevo reto que emprendo, enseñándome cómo enfrentar la vida y seguir caminando a pesar de los tropiezos, guiándome como una persona con valores y principios definidos. Los amo!

A la Universidad Autónoma de Querétaro, profesores, compañeros y personal administrativo. Agradezco por haberme permitido ser parte de la UAQ, por la oportunidad de participar activamente durante los dos años de estudio, por el apoyo económico brindado, gracias a ustedes hoy digo que soy 100% UAQ.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología agradezco enormemente por el apoyo económico, es un privilegio haber sido una becaria más a la que le dan la oportunidad de formarse, de seguir soñando y de aprender y crecer.

A todo el equipo de Investigadores, maestrantes y doctorandos que me acompañaron en mi estancia de investigación en el Instituto de Biotecnología del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria en Buenos Aires, Argentina. Gracias por todo el apoyo.

ÍNDICE

RESUMEN	i
SUMMARY	iii
DEDICATORIAS	v
AGRADECIMIENTOS	vi
ÍNDICE	vii
ÍNDICE DE CUADROS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Babesiosis bovina	3
2.1.1 Definición	3
2.1.2 Historia.....	3
2.1.3 Taxonomía.....	5
2.1.4 Estructura de los parásitos apicomplexos.....	7
2.1.5 Patogenia.....	9
2.1.6 Signos clínicos	10
2.1.7 Epidemiología	11
2.1.8 Distribución	14
2.1.9 Impacto económico.....	16
2.1.10 Tratamiento y control	20
2.2 <i>Babesia bigemina</i>	24
2.2.1 Ciclo de vida	24
2.2.2 Transmisión	29
2.2.3 Genoma y características del gen <i>ama-1</i>	30

2.2.4 Diagnóstico	31
2.3 Técnica de Amplificación Isotérmica basada en Horquillas (LAMP)	42
2.11.1 Fundamento.....	44
2.11.2 Factores críticos para la amplificación	46
2.11.4 Interpretación visual con azul de hidroxinaftol	48
2.11.5 Avances y técnicas integradas.....	50
OBJETIVOS	54
3.1 Objetivo general.....	54
3.2 Objetivos específicos	54
METODOLOGÍA.....	55
4.1 DNA genómico.....	55
4.2 Diseño de cebadores	55
4.3 Estandarización y optimización de la reacción de LAMP	57
4.3 Determinación de la especificidad y sensibilidad	59
4.4 Evaluación de la prueba de LAMP para la detección de cepas de <i>B. bigemina</i> de distintas zonas geográficas.....	61
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	62
5.1 Diseño de cebadores	62
5.2 Estandarización y optimización de la reacción de LAMP	75
5.3 Evaluación de la especificidad y sensibilidad de la prueba de LAMP	79
5.4 Validación de la prueba de LAMP con DNA de cepas de <i>B. bigemina</i> de distintas zonas geográficas.....	86
5.5 Estimación del costo de la prueba por animal.....	88
5.6 Ventajas de LAMP	91
CONCLUSIONES.....	95
LITERATURA CITADA.....	96

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Velocidad de transmisión y el fenómeno de la estabilidad enzoótica para los hemoparásitos de ganado en un escenario de terneros entre el nacimiento y los cuatro años de edad.	13
2	Vectores de <i>Babesia bigemina</i> y <i>Babesia bovis</i> .	15
3	Fármacos usados para el control de la Babesiosis bovina	21
4	Vacunas desarrolladas de uso comercial contra la babesiosis bovina.	25
5	Comparación de las principales técnicas de diagnóstico de babesiosis.	34
6	Principales genes y métodos moleculares usados para el diagnóstico de <i>Babesia bigemina</i>	41
7	Concentración y volumen necesarios para la reacción de LAMP.	60
8	Secuencias de cebadores para el diagnóstico de B. bigemina mediante PCR anidada.	61
9	Secuencias y características de cuatro juegos de cebadores diseñados inicialmente.	69
10	Diferencias en la síntesis de los cebadores.	72
11	Características específicas de los cebadores..¡Error!	Marcador no
	definido.	
12	Concentraciones necesarias para la amplificación	73
13	Estimación del costo de reactivos por prueba. Estimación hecha en pesos mexicanos en Junio del 2017.	89
14	Comparación de la técnica de LAMP con la técnica de PCR anidada	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Primer dibujo de Babesia publicado por Babes.	4
2	Estructura de los parásitos apicomplexos basada en <i>Plasmodium</i> spp.	8
3	Distribución mundial de la Babesiosis bovina en el 2015	16
4	Distribución mundial de la garrapata <i>Rhipicephalus microplus</i> .	17
5	Esquema de pérdidas asociadas a las enfermedades transmitidas por garrapatas. Modificada de: Benavides <i>et al.</i> (2016).	18
6	Ciclo de vida de <i>Babesia bigemina</i> . Adaptada de: Mosqueda <i>et al.</i> (2012).	28
7	Formas de transmisión de <i>Babesia bigemina</i> en la garrapata y el bovino (Walker, s.f).	30
8	Regiones del DNA blanco y cebadores empleados en la técnica de LAMP.	44
9	Representación esquemática del método de LAMP.	49
10	Comparación de la sensibilidad usando diluciones seriadas de DNA.	50
11	Esquema de procedimientos realizados en la estandarización de técnica.	58
12	Distribución mundial de las cepas de <i>B. bigemina</i> utilizadas para el diseño de los iniciadores.	64
13	Secuencia consenso utilizada en el diseño de iniciadores.	65
14	Alineamiento múltiple de la secuencia consenso.	67
15	Imagen característica de las pruebas realizadas con diferentes juegos de cebadores y bajo diversas condiciones de amplificación.	70
16	Reacción de LAMP con el juego de cebadores 4 para el diagnóstico de <i>B. bigemina</i> .	71
17	Ubicación de los cebadores en la doble cadena de DNA y distancia en número de bases entre cada una	74
18	Reacción de LAMP para evaluar los iniciadores en DNA de <i>Babesia bigemina</i> .	76
19	Evaluación de la temperatura de amplificación..	78
20	Determinación del tiempo de incubación.	80

21	Prueba de especificidad de la técnica de LAMP con DNA de distintos organismos	
22	Evaluación de la sensibilidad diagnóstica de la técnica de LAMP.	84
23	Prueba de sensibilidad de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa anidada.	85
24	Detección de cepas de <i>B. bigemina</i> mediante la técnica de LAMP.	87

INTRODUCCIÓN

La técnica de LAMP fue desarrollada en el año 2000 por Notomi *et al.* y es una reacción de amplificación de un paso que amplifica una secuencia de DNA blanco con alta sensibilidad y especificidad bajo condiciones isotérmicas. Esta prueba amplifica el DNA blanco a 10^9 copias en menos de una hora. LAMP emplea una DNA polimerasa (*Bst*) que es una enzima con actividad de desplazamiento de la cadena. También utiliza dos cebadores internos (FIP, BIP) y dos cebadores externos (F3, B3) que reconocen seis regiones separadas dentro de una secuencia del DNA blanco. La técnica tiene alta especificidad porque la reacción de amplificación ocurre únicamente cuando las seis regiones del DNA blanco son correctamente reconocidas por los cebadores.

Cuando los ácidos nucleicos son amplificados por el método de LAMP, se produce una turbidez derivada del precipitado de pirofosfato de magnesio conforme la reacción va progresando (Mori *et al.*, 2001). En la polimerización del DNA por la DNA polimerasa, el ion de pirofosfato es liberado de los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) como un subproducto. Cuando se producen grandes cantidades de este ion, este reacciona con el ion de magnesio contenido en el buffer de reacción formando un precipitado. En el 2009, Goto, Honda, Ogura, Nomoto y Hanaki, reportaron un ensayo colorimétrico simple para la detección de la reacción de LAMP usando un metal indicador llamado azul de hidroxinaftol (HNB). El HNB es un indicador que se agrega al tubo antes de la reacción y demuestra los cambios en las concentraciones del ion Mg^{2+} . La técnica de LAMP puede detectar DNA a diluciones de $\leq 1:10^8$ (160 copias/tubo) usando HNB a $120 \mu M$ sin que este interfiera con la síntesis de DNA. Los cambios de color van del violeta, en una reacción negativa, al azul cielo en una positiva. La ventaja de utilizar HNB es porque: 1) no se requiere abrir el tubo de la reacción para determinar si ésta es positiva o negativa; 2) el resultado puede ser diferenciado fácilmente a simple vista, y 3) no es necesario realizar técnicas como electroforesis para confirmar la amplificación (Goto *et al.*, 2009).

La babesiosis bovina es una de las enfermedades infecciosas con mayor importancia económica en el mundo. Esta enfermedad es causada por un protozoo parásito intraeritrocítico del género *Babesia* (Babes, 1888; Bock *et al.*, 2004). La babesiosis es transmitida por garrapatas del género *Boophilus*, recientemente clasificadas como *Rhipicephalus* (Smith *et al.*, 1893; Yu *et al.*, 2013). Existen muchas especies de *Babesia* que infectan animales domésticos, silvestres y al hombre. Sin embargo, de las especies de *Babesia* que afectan a los bovinos, *B. bovis* y *B. bigemina* son las que presentan mayor prevalencia e importancia económica en el mundo debido al impacto ocasionado en la industria de producción de carne y leche. Las pérdidas económicas son atribuidas no solo a las pérdidas de producción y el costo de tratamientos, sino también a las restricciones comerciales y los costos relacionados con el control del vector (Schnittger *et al.*, 2012).

El impacto negativo de la babesiosis bovina tiene lugar en zonas endémicas; la ocurrencia de brotes graves ocurre cuando se rompe la estabilidad enzoótica resultando en consecuencias catastróficas para los rebaños. El diagnóstico oportuno y adecuado de animales infectados o enfermos es esencial para el control de la enfermedad. La importancia del diagnóstico radica en el uso de pruebas sensibles y específicas que permitan detectar infecciones de manera temprana para establecer medidas de tratamiento o control (Bock *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2000; Suarez y Noh, 2011; Zintl, Gray, Skerrett, y Mulcahy, 2005). La mayoría de las técnicas utilizadas actualmente para el diagnóstico de *B. bigemina* poseen limitantes; la formación y la pericia del laboratorista, el momento de la toma de muestra después de la infección, la baja sensibilidad y especificidad y finalmente, el costo y duración del diagnóstico (Criado-Fornelio, Martínez-Marcos, Buling-Saraña, y Barba-Carretero, 2003; Iseki *et al.*, 2007). Por estas razones, el desarrollo de la técnica para el diagnóstico de *B. bigemina* que supere estas limitantes es necesario.

Por todo lo anterior, el objetivo del presente proyecto de investigación es desarrollar y estandarizar la técnica de LAMP para el diagnóstico de *Babesia bigemina*.

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Babesiosis bovina

2.1.1 Definición

La babesiosis bovina es una de las enfermedades infecciosas con mayor importancia económica en el mundo. Es una enfermedad causada principalmente por un protozooario parásito intraeritrocítico del género *Babesia* (Smith *et al.*, 1893; Starcovici, 1893) y es transmitida por garrapatas del género *Rhipicephalus*, anteriormente clasificadas como *Boophilus* (Smith *et al.*, 1893; Murrell y Barker, 2003). Existen muchas especies de *Babesia* que infectan a animales domésticos, silvestres y al hombre. Sin embargo, las especies de mayor importancia en los bovinos son *Babesia bovis*, *B. bigemina* y *B. divergens* (Bock *et al.*, 2004).

La enfermedad ha sido llamada popularmente como fiebre del agua roja, fiebre de la garrapata, fiebre española, fiebre de Texas, ranilla roja, piroplasmosis, entre otros (Benavides, 2002; Florin-Christensen, Suarez, Rodríguez, Flores, y Schnittger, 2014).

2.1.2 Historia

Esta enfermedad fue introducida al nuevo mundo por colonizadores que traían consigo ganado bovino. Los primeros reportes datan desde 1860, durante el periodo de la guerra civil norteamericana. Para la época, el estado de Oklahoma era uno de los principales productores de ganado en el país y los brotes de Babesiosis o fiebre de Texas como era llamada ocurrieron principalmente en Kansas ocasionando grandes pérdidas económicas e incluso, a causa de esto, en 1861 se dictaminó la primera legislatura estatal que prohibía la entrada de ganado al estado (Clark, 1951). En 1870, los archivos de Australia mostraron como la fiebre de garrapata fue endémica en el área de Darwin; su introducción se atribuye a la entrada de ganado bovino salvaje o “Banteng” desde Timor y posiblemente Bali entre 1829 y 1849 donde la fiebre de garrapata y la garrapata *Rhipicephalus microplus* eran enzoóticas (Angus, 1996).

Los estudios sobre la babesiosis se remontan a 1888 cuando Victor Babes descubrió microorganismos al interior de eritrocitos de bovinos de Rumania y asociado a esto, hemoglobinuria bovina y fiebre del agua roja (Babes, 1888). Posteriormente, encontró algo similar en eritrocitos de ovinos (Babes, 1892). La figura 1 corresponde a reimpresiones de la primera publicación hecha por Babes describiendo en dibujos las fases eritrocíticas del protozoario.

En 1893, el agente de la fiebre de Texas de los bovinos en Estados Unidos fue llamado *Pyrosoma* por Smith y colaboradores, quienes también fueron los primeros en demostrar la transmisión de la enfermedad de un artrópodo a un huésped mamífero, al descubrir que la fiebre de Texas era ocasionada por un protozoario y transmitida por la garrapata *Boophilus annulatus* a los bovinos. El mismo año, Starcovici, le asignó a este parásito el nombre de *Babesia bigemina*.

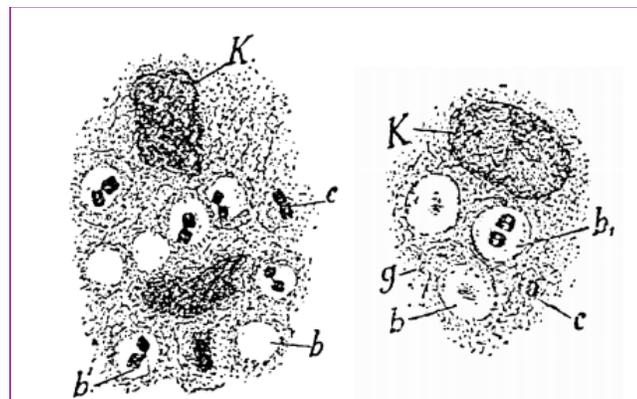


Figura 1. Primer dibujo de Babesia publicado por Babes. Tomado de Mihalca et al. (2010).

Posteriormente, y luego de haberse reportado babesiosis en otras partes del mundo, la nomenclatura confusa de las Babesias bovinas fue resuelta y hoy se reconocen cuatro especies principales: *Babesia bovis* (sinónimos: *B. argentina*, *B. berbera*, *B. colchica*), *Babesia bigemina*, *Babesia divergens* (sinónimos: *B. caucasica*, *B. occidentalis*, *B. karelica*) y *B. major* (Angus, 1996).

Desde entonces han sido propuestos otros nombres, pero el más conocido es *Piroplasma*. El nombre "Piroplasma" viene originalmente del hecho de que los parásitos después de la multiplicación son a menudo en forma de pera. El antiguo

nombre de Piroplasma aun sobrevive así como el hecho de que la babesiosis es llamada comúnmente como piroplasmosis (Uilenberg, 2006).

Las especies que se encuentran principalmente involucradas en las pérdidas económicas en las explotaciones bovinas son *B bigemina* y *B bovis* (Bock *et al.*, 2004).

2.1.3 Taxonomía

El género *Babesia* pertenece al phylum Apicomplexa, un linaje eucariótico caracterizado por la presencia de un complejo apical y un citoesqueleto único distinto del de otros eucariotas. Aunque ya se ha reportado el genoma completo de diferentes especies pertenecientes a este phylum (*Plasmodium*, *Theileria*, *Babesia*), la relación filogenética entre los grupos apicomplexos transmitidos por vectores está poco documentada (Chauvin *et al.*, 2009).

Desde el descubrimiento del género a finales del siglo XIX, se han descrito muchas especies asociadas con varios animales salvajes y domésticos y las especies de garrapatas que actúan como vectores, principalmente las de animales domésticos. La descripción y clasificación de *Babesia* spp. (y su diferenciación con *Theileria*, un organismo estrechamente relacionado) se realizó inicialmente basado en las características morfológicas y el ciclo biológico, notablemente el patrón de montaje o ensamblaje de los merozoitos en los eritrocitos (Chauvin *et al.*, 2009).

La subclase piroplasmida fue bautizada así debido a la particular forma de pera de los estadios que se encuentran en sangre del huésped vertebrado. *Babesia* se puede diferenciar de otros piroplasmidos como *Plasmodium* spp. y *Haemoproteus* spp. debido a que éste no genera ningún tipo de pigmentación en la célula infectada (Uilenberg, 2006). El género fue definido de acuerdo a los sitios de multiplicación en el huésped vertebrado y la forma de transmisión dentro de la garrapata. *Babesia* solamente se multiplica en los eritrocitos del huésped vertebrado y ocurre transmisión transovárica en el vector. Esta restricción ha sido confirmada con técnicas moleculares y se incluyó a *Babesia* spp. como un grupo monofilético el cual se desarrolla en una amplia variedad de huéspedes vertebrados (principalmente

mamíferos, pero también aves) y garrapatas (principalmente duras pero también en garrapatas blandas) (Criado-Fornelio *et al.*, 2003; Chauvin *et al.*, 2009).

Antes de la aplicación de metodologías moleculares, no menos de 111 especies de *Babesia* habían sido descritas y hasta ahora, la clasificación taxonómica de piroplasma se ha basado casi exclusivamente en las características morfológicas y biológicas (Schnittger *et al.*, 2012). Particularmente, la forma de transmisión y la existencia o ausencia de esquizontes son características fenotípicas valiosas para distinguir *stricto sensu* (s.s) la *Babesia*. Por lo tanto, el género *Babesia* (s.s) se define por la ausencia de esquizontes y la presencia de transmisión transovárica (Uilenberg, 2006).

Las características fenotípicas que a menudo ayudan en la identificación y diferenciación de las especies durante la inspección microscópica y que han demostrado ser de valor taxonómico restringido son el tamaño del piroplásmido y el número de células hijas que se forman por la división de merozoitos. Es así que los piroplasmas se pueden dividir en theilerias, babesias pequeñas (trofozoitos de <1-2,5 µm) y babesias grandes (2,5-5µm). Sin embargo, la identificación de especies puede verse obstaculizada debido a cambios en la forma y el tamaño de estadios parasitarios en el eritrocito y debido a la observación de algunas especies de piroplásmidos que difieren en forma y tamaño cuando infectan diversos huéspedes vertebrados (pleoformismo). Esa caracterización morfológica es consistente con la clasificación filogenética basada en secuencias del gen 18S de la subunidad pequeña del ribosoma, el cual muestra que las babesias pequeñas y grandes pertenecen a dos clústeres diferentes y las pequeñas babesias están muy relacionadas con *Theileria* spp. (excepto para *B. divergens*) (Homer *et al.*, 2000).

Es así como, según las investigaciones de Criado-Fornelio *et al.*, en el 2003, se incluye a *B. bovis* y *B. bigemina* dentro del grupo de *Babesia* s.p. (s.s) compuesto por especies que afectan principalmente a ungulados.

La clasificación taxonómica de *Babesia* propuesta por Levine y actualmente disponible en la base de datos "Taxonomy" (Levine, 1971; Centro Nacional para la Información Biotecnológica. NCBI, 2017) es:

Reino: Protista

Subreino: Protozoa

Phylum: Apicomplexa

Clase: Aconoidasida

Subclase: Piroplasmida

Familia: Babesiidae

Género: *Babesia*

2.1.4 Estructura de los parásitos apicomplexos

Al ser un parásito apicomplejo, *Babesia* posee los organelos característicos de los microorganismos pertenecientes a dicho filo. La figura 2 muestra la estructura de un merozoito donde se puede visualizar el complejo apical, que se ha descrito como una prominencia conoide situada en un extremo de los parásitos apicomplexos (Mitchell *et al.*, 2004). En dicho complejo se sitúan las roptrías, los gránulos densos (*Plasmodium*) o cuerpos esféricos (*Babesia* spp.), las micronemas, los anillos polares y el conoide. Las roptrías son las vesículas más grandes del complejo apical y descargan sus secreciones mediante ductos estrechos. Las micronemas son producidas y translocadas de la cisterna de Golgi hacia el complejo apical mediante los microtúbulos. Una vez en el complejo apical, se sitúan cerca de la punta de las roptrías. Los gránulos densos se sintetizan cerca de la Cisterna de Golgi, pero a diferencia de las micronemas, no son transportados al complejo apical. Durante la invasión de la célula blanco tanto las roptrías como las micronemas descargan su contenido en la región donde el parásito está penetrando (Blackman y Bannister, 2001).

Otra característica adicional de estos parásitos apicomplexos es que poseen un plástido que es un organelo semiautónomo cuyo origen se supone a partir de un evento endosimbiótico secundario ocurrido durante su evolución. Este plástido ha sido denominado apicoplasto y posee un genoma que codifica para diversas proteínas (Brayton *et al.*, 2007).

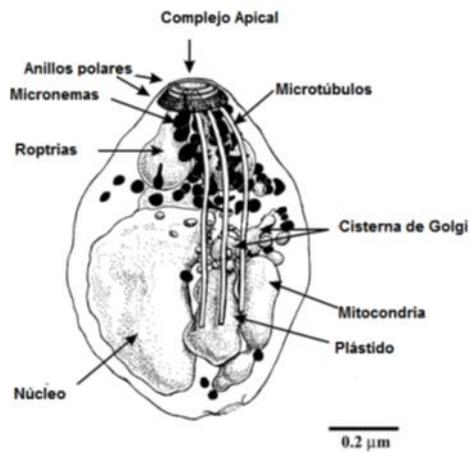


Figura 2. Estructura de los parásitos apicomplexos basada en *Plasmodium* spp. Adaptada de: Mitchell *et al.* (2004).

La morfología de la *Babesia* varía según el estadio evolutivo dentro del eritrocito y de la garrapata. En el eritrocito existe una forma típica a la observación microscópica: un corpúsculo único o en pares, con forma redondeada u ovalada. *B. bigemina* es clasificada como una especie grande ya que puede llegar a ocupar gran parte del eritrocito, sus dimensiones son 4-5 x 2 μm aproximadamente, generalmente se visualiza en sus formas pareadas con una apariencia piriforme y unidas formando un ángulo agudo (Barré y Uilenberg, 2010).

En la garrapata, el protozooario tiene morfología diferente. Durante la fase sexual de su ciclo biológico, en el lumen intestinal de la garrapata los parásitos salen de los eritrocitos para formar los gametocitos, que adquieren una forma esférica o polimórfica que se caracteriza por tener protuberancias en forma de flagelos, conocidos como *Strahlenkorper* o cuerpos radiados. Los gametocitos tienen un diámetro de aproximadamente 4-7 μm . Posteriormente se forma el cigoto, que es el resultado de la unión de los gametocitos, el cual tiene una forma esférica con un tamaño inicial aproximado de 3 μm de diámetro y que posee además en su morfología algo que asemeja a una punta de una flecha o de espina. El quineto, una fase móvil que migra por la hemolinfa presenta una forma alargada en forma de bastón, tiene una medida inicial aproximada de 7-8 μm , alcanzando 12-15 x 3 μm en su estado maduro. Finalmente el esporozoito, que es la última fase del parásito

en la garrapata se encuentra en las glándulas salivales y tiene una morfología piriforme con extremo apical amplio y un polo posterior estrecho (Young y Morzaria, 1986; Hodgson, 1992).

2.1.5 Patogenia

Los mecanismos de patogenicidad del protozoario varían dependiendo del agente causal. En la babesiosis se pueden desarrollar diferentes tipos de acciones patógenas, tales como: acción mecánica (rotura de glóbulos rojos); acción tóxica por la liberación y excreción de productos tóxicos tras el metabolismo de los zoítos, demostrada a nivel de SNC y acción expoliadora en cuanto compite por determinadas sustancias del organismo hospedador (hemoglobina) (Navarrete *et al.*, 1999).

En general, las citocinas y otros agentes farmacológicamente activos tienen una función importante en la respuesta inmune contra *Babesia* (Ahmed, 2002). *B. bovis* es más patógena que *B. bigemina*. En las infecciones ocasionadas por *Babesia bovis*, las consecuencias están relacionadas con el tiempo y la cantidad producida, pero su sobreproducción contribuye al progreso de la enfermedad causando vasodilatación, hipotensión, aumento en la permeabilidad capilar, edema, colapso vascular, desórdenes de coagulación, daño endotelial y éstasis circulatorio (Wright *et al.*, 1989; Ahmed, 2002). Aunque la éstasis es inducida en la microcirculación por agregación de eritrocitos a los capilares, probablemente el daño más perjudicial ocurre en el cerebro y los pulmones ocasionando un síndrome de distrés respiratorio asociado a la infiltración de neutrófilos, aumento de la permeabilidad vascular y edema (Brown y Palmer, 1999). La anemia hemolítica es progresiva durante todo el curso de la enfermedad.

La patogénesis ocasionada por *B. bigemina* se relaciona con una hemólisis intravascular rápida y masiva producida por la infección de los eritrocitos por parte de los esporozoitos. Es por esto que la presencia de hemoglobinuria es más consistente comparada con la ocasionada por *B. bovis* (Demessie y Derso, 2015).

Los animales que se recuperan continúan siendo infectivos para las garrapatas por hasta un año para *B. bovis* y por 4 a 7 semanas para *B. bigemina*.

Los animales que se recuperan de una infección aguda naturalmente o después de un tratamiento, lo cual toma varias semanas, y continúan en un ambiente con presencia del vector, se mantienen persistentemente infectados (portadores) y resistentes al desarrollo de la enfermedad tras la infección con la misma cepa por años (Brown y Palmer, 1999). Los animales jóvenes que se recuperan y se mantienen en ambientes libres de garrapatas presentan parasitemias recurrentes por 1 a 2 años con *B. bovis* y por periodos más cortos y menos recurrentes con *B. bigemina* (Mahoney, 1969).

Los casos que no son fatales toman varias semanas en recuperarse, pero generalmente lo logran en su totalidad. los animales que se tornan portadores asintomáticos continúan siéndolo por años; no obstante, la duración depende de la raza del animal (Mahoney, 1969; Johnston *et al.*, 1978).

2.1.6 Signos clínicos

En general, las infecciones con *Babesia* cursan con grados variables de severidad que pueden estar asociados a la edad del huésped (los animales menores de 9 meses usualmente son asintomáticos), estado inmunológico, infecciones concurrentes con otros patógenos, factores genéticos, especie (*B. bovis* es más virulenta) y cepa. Las manifestaciones más comunes en la babesiosis aguda son fiebre, anemia, hemoglobinuria, letargia, anorexia e ictericia. Sin embargo, en el estado crónico, la enfermedad generalmente es asintomática (The Center for Food Security and Public Health, 2008; Schnittger *et al.*, 2012).

Los casos clínicos ocurren cuando animales jóvenes vírgenes (que nunca han estado en contacto con el parásito) lo adquieren durante la alimentación de la garrapata. No obstante, los terneros pueden infectarse pero no desarrollan la enfermedad (Bock *et al.*, 2004). Los signos clínicos de la enfermedad también varían ampliamente de acuerdo a la especie; aunque estos parásitos están filogenéticamente relacionados y transmitidos por el mismo vector, los casos

ocasionados por *B. bovis* se caracterizan por hipotensión, síndrome de estrés respiratorio y signos neurológicos como movimientos involuntarios de los miembros posteriores debido a la acumulación de eritrocitos infectados en las capilaridades del pulmón y del cerebro. Además, los niveles de parasitemia son bajos (menos del 1%) (Brown y Palmer, 1999).

La enfermedad causada por *B. bigemina* no es tan grave, las parasitemias son altas (10% e incluso 30%) y debido a que el principal mecanismo de patogenicidad se asocia a la destrucción masiva de eritrocitos, la signología más evidente es anemia severa, las mucosas pálidas, la fiebre y la hemoglobinuria. Y contrario a las infecciones por *B. bovis*, generalmente no se presenta afección cerebral, la fase aguda no es tan severa y la recuperación es más rápida (Brown y Palmer, 1999; Manual terrestre: OIE - World Organisation for Animal Health, 2014).

La enfermedad aguda generalmente cursa con 3 a 7 días de fiebre (>40°C) que generalmente se presenta varios días previos a la detección de signos clínicos más obvios. Inapetencia, depresión, taquipnea y debilidad son algunos de estos signos. Se presenta hemoglobinuria y hemoglobinemia (menos común en infecciones por *B. bovis*), anemia e ictericia principalmente en casos prolongados. En casos avanzados, se observa debilidad muscular, temores, recumbencia, disnea y finalmente el animal entra en un estado de coma. La fiebre que se presenta durante la infección puede causar abortos y los toros reducen su fertilidad por 6 a 8 semanas. En infecciones subagudas, los signos clínicos son menos pronunciados y con frecuencia difíciles de detectar (Bock *et al.*, 2004; The Center for Food Security and Public Health, 2008).

2.1.7 Epidemiología

El concepto de estabilidad enzoótica (endémica o epizoótica) fue descrito por Mahoney en 1969 como una condición que implica una alta incidencia del organismo patógeno en el bovino, pero raramente se presenta una enfermedad. Actualmente se conoce como la situación epidemiológica de una población en la cual la presentación clínica de la enfermedad es escasa, a pesar de la alta velocidad de transmisión de la infección o como el estado donde la relación entre el huésped, el

agente, el vector y el medio ambiente es tal que no se genera una enfermedad clínica o rara vez ocurre (Perry, 1996). Con respecto a la Babesiosis, esto ocurre cuando el número de garrapatas es alto y los bovinos son expuestos a la infección durante los primeros 9 meses de vida. Este evento ocasiona que los animales sean resistentes a desarrollar una enfermedad clínica al generar inmunidad (Jonsson *et al.*, 2008).

Cuando el ambiente no favorece la infestación continua con un número suficiente de garrapatas necesarias para mantener el estado inmunitario en el hato, ya sea, debido al uso de acaricidas o cuando los animales inmunológicamente resistentes son reemplazados por animales adultos que no han tenido contacto previo con el parásito, de genotipos susceptibles o que se introducen a zonas endémicas desde zonas libres, e incluso cuando animales resistentes se someten a condiciones de estrés, la estabilidad enzoótica se pierde o se genera un estado de inestabilidad enzoótica, definida como la situación donde existe un desbalance huésped-parásito que resulta en poca frecuencia de transmisión de los hemoparásitos entre la población, afectando la inmunidad del huésped y por lo tanto, la presentación clínica de la enfermedad. En situaciones de inestabilidad enzoótica la presencia de los parásitos es variable y difícil de predecir (Benavides, 2002; Jonsson *et al.*, 2008; Benavides *et al.*, 2016).

Poblacionalmente, se encuentran diversas situaciones que contrastan la presencia del parásito con la presentación o no de la enfermedad en los animales. Lo anterior es influenciado por cuatro principales situaciones epidemiológicas: 1) estabilidad enzoótica, 2) inestabilidad enzoótica, 3) casos esporádicos (situación epidemiológica en la cual el hábitat no es favorable para la supervivencia de la garrapata, pero se pueden dar introducciones accidentales de manera esporádica) y 4) ausencia del problema. En el cuadro 1 se puede observar cómo, a medida que disminuye la cantidad de garrapatas, desciende la velocidad de transmisión de los organismos que ellas transmiten y, de esta forma, aumenta la proporción de animales que se infectarán después de los nueve meses de edad; estos animales sufrirán de enfermedad clínica aguda, con riesgo de morir. Cuando solo el 29% de

los animales ha recibido la infección por el hemoparásito a los nueve meses de edad, se observa una velocidad de transmisión baja, que resultará en que el 49% de los animales se infectará entre los 9-48 meses de edad, estando en riesgo de enfermar o morir. A esa misma velocidad de transmisión, el 22 % de esa población no recibirá ninguna infección hasta los cuatro años de edad (Mahoney, 1977; Benavides *et al.*, 2016).

Cuadro 1. Velocidad de transmisión y el fenómeno de la estabilidad enzoótica para los hemoparásitos de ganado en un escenario de terneros entre el nacimiento y los cuatro años de edad.

Porcentaje de infección a los nueve meses	Condición	Promedio aproximado de garrapatas/día	Proporción de enfermos o muertes por infección	Sin infección hasta los 4 años de edad
100%	Estabilidad enzoótica	50	0	0
92%	Inestabilidad enzoótica	20	8%	0
74%	Inestabilidad enzoótica	10	26%	0
29%	Inestabilidad enzoótica	2	49%	22%
12%	Inestabilidad enzoótica	1	39%	49%
1%	Casos esporádicos	0.2%	11%	88%

Tomado de: Benavides, *et al.* (2016). Adaptado de: Mahoney (1977).

La anterior situación explica lo que ocurre en regiones donde las garrapatas son relativamente permanentes sobre el ganado, como por ejemplo la mayoría de regiones del trópico americano, donde existen diversos grados de infestación de los animales con la garrapata, pero la ocurrencia de brotes es escasa. En regiones donde el clima es favorable para la garrapata, la intensidad de infestación del ganado es determinada por diversos factores que incluyen desde componentes de clima y localidad geográfica, hasta aspectos de manejo del ganado en los potreros, la raza e inmunidad del ganado, entre otros. Muchos de estos factores están bajo el manejo del hombre y otros dependen de la localidad y el clima, lo que afecta la

calidad nutricional del forraje, el microclima de la pradera y la densidad y comportamiento de los animales en la pradera (Benavides *et al.*, 2016).

El genotipo del huésped también es un factor importante en la situación epidemiológica de la enfermedad. Las razas *Bos indicus* tienden a presentar menor porcentaje de infección y los signos clínicos son más leves comparados con las razas *Bos taurus*. Este fenómeno es debido a la relación evolutiva entre los bovinos *Bos indicus*, el sector y *Babesia* spp. (Callow, 1979; Bock *et al.*, 2004). En el centro y sur de América se reporta que los animales “criollos” (cruces de *Bos indicus* con *Bos Taurus* son altamente resistentes a las garrapatas comparados con otras razas europeas (Guglielmone, 1995).

2.1.8 Distribución

La distribución geográfica de la babesiosis causada por *B. bigemina* y *B. bovis* se centra en áreas que proveen condiciones ecológicas favorables para la multiplicación de garrapatas principalmente en áreas tropicales y subtropicales (Benavides, 2012). Aunque la babesiosis bovina es transmitida por varias especies de garrapata (Cuadro 2), *Rhipicephalus microplus* es la garrapata más ampliamente distribuida. En la figura 3 se señala la distribución de la enfermedad en el 2015 y en la figura 4 la distribución del vector a nivel mundial. La presencia original de la garrapata incluye el sur y sureste de Asia, este y sureste de África, Islas Comores, Madagascar y Mascareñas, parte del norte, centro y sur de América, norte y este de Australia, Nueva Calcedonia y Polinesia Francesa (Barré y Uilenberg, 2010). Por lo tanto, se asume que ésta coincide con la distribución de *Babesia bigemina*. *Babesia bovis* presenta una distribución similar, pero se encuentra menos distribuida en África debido a la presencia de la garrapata *Rhipicephalus decoloratus* la cual no está implicada en la transmisión de *B. bovis* e interfiere con la distribución de *R. microplus* en zonas más secas y frías (Bock *et al.*, 2004).

En cuanto a la situación en el continente Americano y de acuerdo con el Sistema Mundial de Información Sanitaria de la OIE, la babesiosis bovina no se encuentra en Chile, y ha estado ausente en Belice desde el 2013 (Organización Mundial de Sanidad Animal. OIE, 2015). En Canadá no están presentes las garrapatas

consideradas como vectores de este organismo; en Estados Unidos, desde 1943 se instituyó una campaña de erradicación de garrapatas (Graham y Hourrigan, 1977), por lo que este país se considera libre de babesiosis, sin embargo, actualmente se sabe que existen o han existido reintroducciones accidentales para las cuales existe un programa de vigilancia (Lohmeyer *et al.*, 2011). Asimismo, se encuentra restringida a ciertas áreas subtropicales y tropicales de México. Infortunadamente, en otros países y regiones de América tropical y subtropical, la garrapata *R. microplus* es endémica y constituye, como se ha señalado, el principal vector de *B. bigemina* y *B. bovis* (Benavides *et al.*, 2016).

Cuadro 2. Vectores de *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*.

Especie de <i>Babesia</i>	Principales vectores
<i>Babesia bigemina</i>	<i>Rhipicephalus microplus</i> , <i>Rhipicephalus decoloratus</i> , <i>Rhipicephalus annulatus</i> , <i>Rhipicephalus geigy</i> y <i>Rhipicephalus evertsi</i>
<i>Babesia bovis</i>	<i>Rhipicephalus microplus</i> , <i>Rhipicephalus annulatus</i> y <i>Rhipicephalus geigy</i>
Modificado de: Bock <i>et al.</i> (2004).	

El cambio climático puede llegar a modificar la distribución geográfica de las garrapatas, como resultado de los cambios en las condiciones de temperatura y humedad haciendo que, regiones que previamente no eran favorables para la supervivencia de las fases no parasíticas en el suelo, ahora se encuentren dentro del *preferendum* requerido para cada especie de garrapata. La cobertura vegetal de los territorios y el historial acumulado de temperatura y humedad, además de otros factores climáticos, contribuyen a la determinación de esa condición (Estrada-Peña *et al.*, 2006). En el caso de incrementarse la distribución de la garrapata *R. microplus* a nuevas áreas, es posible que la ocurrencia de brotes esporádicos o frecuentes de Babesiosis aumente con un grado diverso de mortalidad y morbilidad, dependiendo de la edad y la inmunidad previa de la población animal (Benavides *et al.*, 2016).

En virtud del cambio climático, las garrapatas a través de sus hospederos están alcanzando zonas en las que antes no estaban presentes y, debido a las modificaciones del ecosistema, se están estableciendo y sobreviviendo. La

evidencia en el ámbito mundial permite señalar que diferentes especies de garrapatas se han movido desde los trópicos hacia el norte y a zonas más altas. Esto indica que las garrapatas están ampliando su espectro geográfico de distribución. Por ende la presentación de enfermedades como la babesiosis constituye un riesgo creciente (Süss *et al.*, 2008; Benavides *et al.*, 2016).

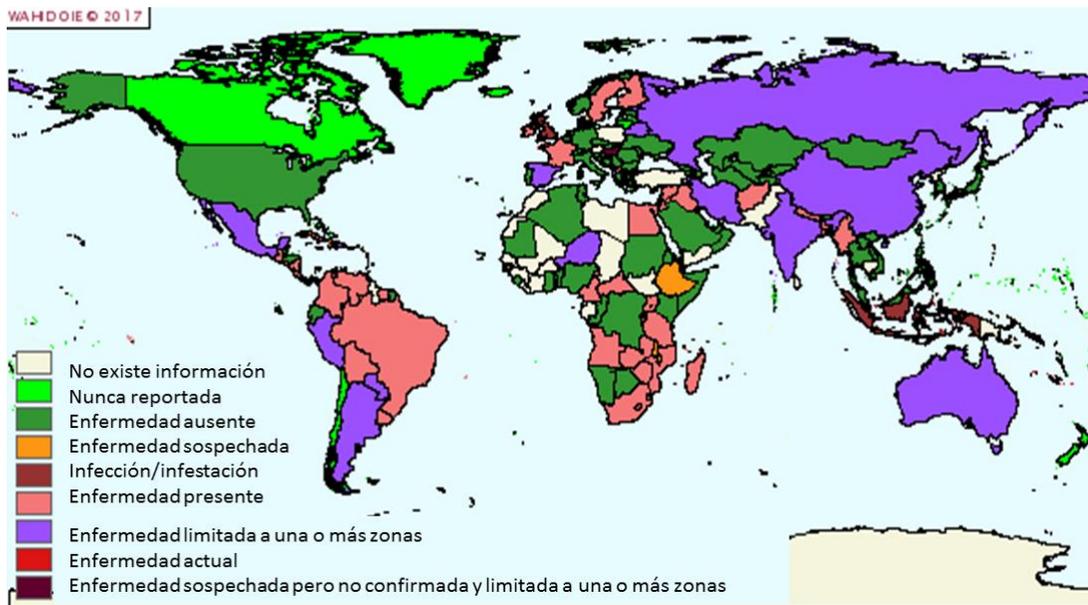


Figura 3. Distribución mundial de la Babesiosis bovina en el 2015 (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2015).

La expansión de la ganadería, la creciente demanda de productos de origen animal, así como la intensificación de los sistemas productivos y la dinámica del comercio de animales vivos, están favoreciendo las posibilidades de la introducción de las garrapatas en territorios donde normalmente no estaban. Pero aún más, las modificaciones ecosistémicas están haciendo que la garrapata del bovino en el hemisferio se establezca en zonas de altura en países ecuatoriales y se mueva más al sur y al norte en países subtropicales, donde las razas de origen europeas más susceptibles son la base genética para la producción de carne y leche (Benavides *et al.*, 2016).

2.1.9 Impacto económico

Desde el punto de vista económico, la babesiosis bovina es considerada como la enfermedad transmitida por vectores más importante en la producción bovina

(Bock *et al.*, 2004). El costo de la babesiosis bovina está relacionado con mortalidades, abortos, disminución de la producción de carne y leche, medidas de control (tratamiento de la enfermedad, acaricidas y vacunas), así como pérdida del potencial de producción y restricciones comerciales. Además, es también un obstáculo para el mejoramiento genético del ganado bovino presente en zonas endémicas de la enfermedad, ya que limita la introducción de ganado genéticamente superior que es susceptible a la misma (Schnittger *et al.*, 2012).



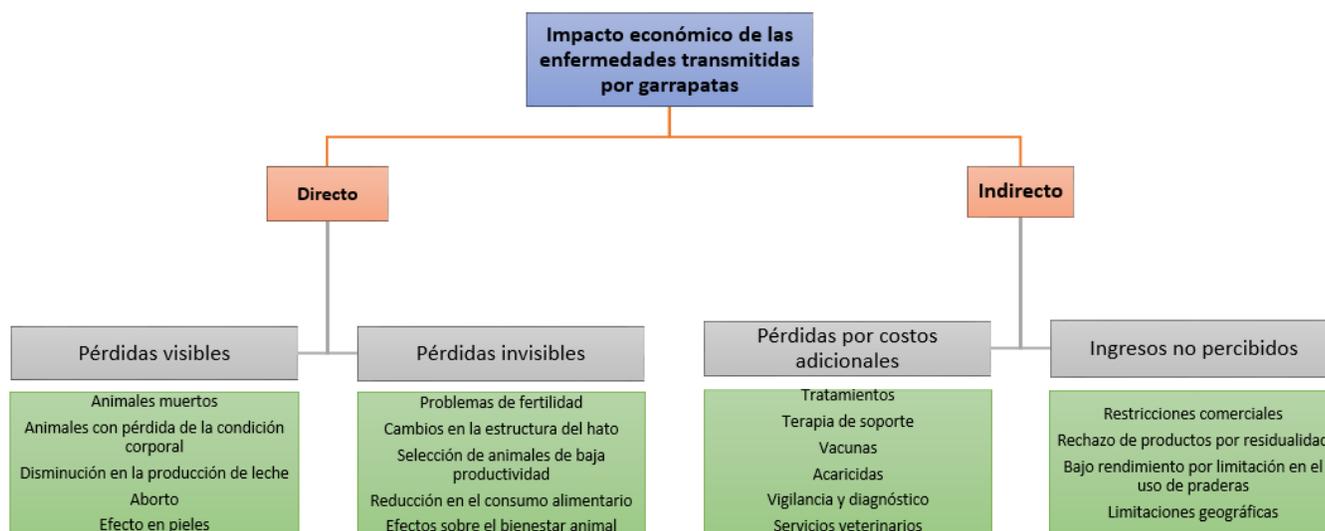
Figura 4. Distribución mundial de la garrapata *Rhipicephalus microplus*.
(Barré y Uilenberg, 2010).

Benavides *et al.*, (2016) proponen que, el impacto económico está fuertemente ligado a la epidemiología de la enfermedad y se puede distribuir en pérdidas directas e indirectas (Figura 5). Las pérdidas directas son proporcionales a la ocurrencia de enfermedad, que está asociada con la introducción o incremento de la población de garrapatas y con la proporción de animales parasitados que desarrollen enfermedad; es decir, con el escenario epidemiológico en el cual se ubique la población animal. Sin embargo, el problema y el efecto negativo ocurren cuando las poblaciones de garrapatas aumentan y cuando corresponde al primer contacto con

el hemoparásito. Así pues, en situaciones de primera introducción o de inestabilidad enzootica (ver en la sección de epidemiología) y en animales susceptibles es mayor la pérdida directa, debido a que los casos clínicos pueden terminar en mortalidad dramática, pero también se producen pérdidas directas como consecuencia del retraso en el crecimiento de los animales, abortos en el último tercio de la gestación, efectos reproductivos en machos y hembras, y otros efectos por causa de la presencia de garrapatas como daño en piel y molestia permanente que afecta el comportamiento y bienestar del animal, entre otros.

Figura 5. Esquema de pérdidas asociadas a las enfermedades transmitidas por garrapatas. Modificada de: Benavides *et al.* (2016).

Por otro lado, el impacto económico indirecto proviene, en parte, del costo del tratamiento para casos clínicos, pero principalmente por los gastos incurridos en el control de las garrapatas y otros vectores, haciendo especial énfasis en los acaricidas. Complementariamente, el impacto económico indirecto puede estar



asociado con limitaciones para emplear razas de mayor productividad en zonas endémicas, restricciones comerciales de animales entre zonas y países, residuos de acaricidas en productos de origen animal (leche y carne), entre otros. Las pérdidas se concentran inicialmente a nivel de individuos y granja, pero se agregan a nivel regional según sea la epidemiología de la enfermedad, generando las pérdidas directas en cadena, tanto en la economía sectorial como en la regional. En

esa misma línea, dado el endemismo de la garrapata en regiones tropicales y subtropicales, las pérdidas indirectas son cuantiosas, debido a actividades de gestión de riesgos basadas en el uso de acaricidas; en zonas donde no están las garrapatas, los costos de control se incrementan por la necesidad de vigilancia y medidas preventivas para el ingreso. Aunque raramente se cuantifican, se deben destacar las pérdidas indirectas por ingresos no percibidos o por las ineficiencias en el sistema de producción primaria o a lo largo de la cadena que están vinculadas a las medidas de gestión de riesgos, las cuales además de los costos de control, incluyen ineficiencias, como la necesidad de emplear animales de menor selección en los sistemas productivos por ser genéticamente más resistentes a la garrapata, o consecuencias diversas debido al riesgo de ocurrencia de residuos de acaricidas en carne o leche, entre otros (Benavides *et al.*, 2016).

A pesar de que la enfermedad es importante en áreas tropicales y subtropicales del mundo, desde los años 90's, existen pocas cifras confiables que estimen las pérdidas económicas globales (Uilenberg, 1995). Pensando en esto, es posible que sea poco útil o se subestime el hecho de nombrar algunas cifras, sobre todo porque dependen de factores inciertos como las variaciones climáticas anuales, las fluctuaciones en los tipos de cambio y la inflación. Sin embargo, los estimativos globales más recientes datan así: USD 3,24 billones en Brasil (Grisi *et al.*, 2014), en Tanzania USD 47,32 millones (Kivaria, 2006), AUD170 millones en Australia (Playford, 2005), USD 499 millones en India (Minjauw y McLeod, 2003). Lo que se sabe es que actualmente, las garrapatas y las enfermedades que transmiten están presentes en más del 80% de los bovinos a nivel mundial (Manjunathachar *et al.*, 2014).

Finalmente, existen otros factores que afectan las pérdidas económicas. A) La distribución geográfica: *B. bigemina* es moderadamente patógena para el animal adulto, pero está ampliamente distribuida en regiones tropicales y subtropicales de todos los continentes y *B. bovis*, que es altamente patógena, especialmente para razas europeas, está casi tan ampliamente distribuida como *B. bigemina* excepto por amplias áreas de África; B) Tipo de ganado: debido a la presión de la selección

natural y al hecho de que aquellos animales que han vivido durante mucho tiempo con garrapatas locales y enfermedades transmitidas por garrapatas, han desarrollado una resistencia innata o una capacidad innata para desarrollar una buena respuesta inmune a la garrapata y/o a las enfermedades que estas transmiten, la mayoría de las enfermedades transmitidas por garrapatas son particularmente importantes para el ganado exótico; C) Métodos de control disponibles y su costo: esto también está estrechamente relacionado con el tipo y el valor del ganado involucrado y el tipo de sociedad. ¿El productor puede pagar gastos de tratamiento y control? ¿La susceptibilidad y el valor del ganado involucrado justifican costosos métodos de control? (si están disponibles) y, D) virulencia de la cepa: puede haber diferencias pronunciadas de virulencia entre aislados o cepas de un hemoparásito transmitido por garrapatas, pero las cepas de baja y alta virulencia generalmente ocurren en una misma región. *B. bigemina* puede ser una excepción; Se considera de poca importancia en Australia, pero los casos fatales son frecuentes en África del este, por ejemplo. Sin embargo, también puede ser en parte una cuestión de comparación con la más patógena *B. bovis* (al menos más patógena para el ganado europeo), que es dominante en Australia, y ausente en gran parte de África, lo cual puede deberse a que la especie más común de *Boophilus* en África no es vector de *Babesia bovis*, sólo de *Babesia bigemina* (Uilenberg, 1995).

2.1.10 Tratamiento y control

En áreas donde existe una inoculación continua de *Babesia* spp. por garrapatas infectadas, los animales probablemente estarán en contacto con el parásito durante los primeros 10 a 12 meses de vida, etapa en la cual ellos típicamente no presentan ninguna manifestación clínica. Estos parásitos son capaces de establecer infecciones persistentes en esos animales convirtiéndolos en portadores con una fuerte inmunidad adquirida y resistencia a la enfermedad (Mahoney, 1969; Florin-Christensen *et al.*, 2014). Aunque la estabilidad enzootica es la condición ideal para evitar aplicar medidas de control, esta situación es rara; y si existiera, podría ser alterada fácilmente por factores como las variaciones del clima, el genotipo de los huéspedes y las estrategias de manejo (Florin-Christensen *et al.*, 2014). En

regiones de inestabilidad enzoótica, o cuando los animales son trasladados de una región libre de garrapatas a una región endémica, la inmunización profiláctica es un método efectivo para prevenir los brotes de babesiosis (Bock *et al.*, 2004).

Teniendo esto en consideración, el control de la babesiosis bovina debe ir acompañado de: manejo y control de las garrapatas, inmunizaciones, drogas anti-*Babesia*, y un monitoreo del estatus inmunológico y de la presencia del patógeno en el hato (Suarez y Noh, 2011).

Profilaxis Sanitaria

El control de la babesiosis bovina se realiza principalmente a través de terapias quimioterapéuticas intensivas y debe ir acompañado con la eliminación de la garrapata. En áreas donde la erradicación de la garrapata no es factible o deseable, se implementa el uso de repelentes o acaricidas y esto puede reducir la incidencia de la enfermedad (World Organisation for Animal Health, 2013). No obstante, el desarrollo de resistencia a los acaricidas es un problema que debe tenerse en cuenta. Las modificaciones a nivel ambiental también pueden destruir el hábitat de las garrapatas, pero en algunos casos se torna difícil y/o ecológicamente indeseable. En áreas endémicas, los animales enfermos pueden ser tratados con drogas anti-*Babesia* y el tratamiento generalmente tiene éxito si los animales son diagnosticados de forma temprana. Hay una gran variedad de drogas reportadas que son usadas para tratar la babesiosis (Cuadro 3), pero el uso de varias de estas ha sido restringido debido a problemas de residualidad y de efectos secundarios (The Center for Food Security and Public Health, 2008).

Cuadro 3. Fármacos usados para el control de la Babesiosis bovina

Fármaco	Nombres comerciales	Usos y ventajas
Derivados de las Diamidinas		
Diaceturato de diaminazeno	Berenil, Ganaseg, Trypazen, Veriban, Babezene. Dimisol, Baxin, Diminazen, Ganaplus, Hemoparasin, Ranibest T.P.B, Vivazene	Rápida actividad contra <i>B. bovis</i> , <i>B. bigemina</i> ; es bien tolerado
Amicarbalida	Diampron, Pirodia	Rápida actividad contra <i>B. bovis</i> , <i>B. bigemina</i> ; es bien tolerado

Imidocarb	Imizol, Hemoxin, Imicar, Imicol, Imidocarb LH, Imidogan, Imidopar, Isomix MK, Tikpirem, Imidox.	Rápida actividad contra <i>B. bovis</i> , <i>B. bigemina</i> ; es bien tolerado
Fenamidina	Phenamidine	Mayor actividad contra <i>B. bigemina</i>
Derivados de las Quinolinas		
Sulfato de Quinorium	Babesan, Ludobal, Acaprin, Pirevan	Mayor actividad contra <i>B. bigemina</i>
Derivados de Acridina		
Euflavina	Gonacrinem, Euflavine	Rápida actividad contra <i>B. bovis</i> , <i>B. bigemina</i> , pero es irritante
Azul de tripano	Trypan Blue	Actividad contra <i>B. bigemina</i> , pero es irritante y genera cambios en la coloración de la leche y la canal.
Antibióticos		
Oxitetraciclina	Terramicina LA, Oxitetraciclina (50,100 o 200), Oxitetraciclina L.A. (MK, Calox), Tetrabac, Tetradur. Emicina, Lapimicina.	Mitiga las reacciones de la vacuna contra la <i>Babesia</i>
Modificado de: Penzhorn, (2013).		

El Imidocarb y el Diminazene son las únicas drogas con propiedades profilácticas a corto plazo. El tratamiento con Imidocarb (1,2-3mg/Kg) podría prevenir las infecciones por *B. bovis* por al menos 4 semanas e infecciones por *B. bigemina* por al menos 8 semanas. El diaceturato de diminazeno (3,5mg/kg) podría proteger al animal contra los dos patógenos por una y dos semanas respectivamente. Desafortunadamente, el uso profiláctico de Imidocarb podría interferir con el desarrollo de la inmunidad después de una inmunización debido a que el efecto residual de la droga podría eliminar o suprimir la infección (Penzhorn, 2013). También se afirma que, la quimioprofilaxia con Imidocarb ayuda a proteger al animal de la enfermedad clínica mientras éste desarrolla una respuesta inmune. Cuando se desarrolla la enfermedad, es posible que sea necesaria la implementación de terapias de soporte y de transfusión sanguínea (The Center for Food Security and Public Health, 2008).

Finalmente, el control biológico del vector, el uso de razas genéticamente resistentes de *Bos Indicus*, el control en el movimiento de los animales y el manejo de praderas también podrían disminuir la incidencia de la enfermedad (Benavides *et al.*, 2016).

Vacunación

Actualmente, existe un gran número de investigadores trabajando en el desarrollo de vacunas efectivas contra la Babesiosis bovina. En un documento de la organización mundial para la salud animal (OIE) (World Organisation for Animal Health, 2013), enlista las vacunas que están siendo objetivo de investigación así:

- Vacunas vivas: la mayoría de vacunas vivas son elaboradas a base de cepas atenuadas especialmente seleccionadas y son producidas en terneros o *in vitro*. Sin embargo, estas deben ser usadas con precaución ya que pueden ser virulentas en animales adultos, estar contaminadas con otros agentes patógenos o dar lugar a reacciones de hipersensibilidad.
- Vacuna muerta: preparada a partir de sangre de terneros infectados por *B. divergens*; Poca información disponible sobre el nivel y la duración de la inmunidad conferida.
- Vacunas recombinantes: a pesar de los esfuerzos a nivel mundial, su desarrollo sigue siendo un desafío.
- Vacuna de subunidades: hasta la fecha no hay ninguna disponible.
- Otras vacunas: se han desarrollado vacunas experimentales que contienen antígenos producidos *in vitro*, pero el nivel y la duración de la protección contra el desafío heterólogo no están claros.

En el documento de Florin-Christensen y colaboradores. (2014), se resaltan las principales metodologías para el desarrollo y el uso de cada una de las vacunas disponibles. En el cuadro 4 se resumen las vacunas que están o han estado comercialmente disponibles para el control de la Babesiosis bovina y la Anaplasmosis causada por *Anaplasma marginale* (incluida en los agentes causales de la fiebre de la garrapata).

2.2 Babesia bigemina

2.2.1 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *B. bigemina* es un ciclo típico de los apicomplexos caracterizado por merogonia, gametogonia y esporogonia y los eritrocitos son su única célula blanco en el huésped vertebrado. En la figura 6 se resumen las etapas del ciclo que se describen a continuación.

Desarrollo en el huésped vertebrado

Los esporozoitos son inyectados junto con la saliva de la ninfa de *R. microplus* al interior del huésped, **(A)** infectan directamente las células rojas de la sangre, con ayuda de un complejo apical especializado y todas las fases parasíticas se desarrollan en estas células. **(C)** El parásito produce dos merozoitos o células hijas por fisión binaria las cuales abandonan la célula huésped causando lisis celular y, **(F)** cada una entra en otra célula roja para continuar con la merogonia (donde se observan trofozoitos previo a la formación de merozoitos) **(B)**.

Cuadro 4. Vacunas desarrolladas de uso comercial contra la babesiosis bovina.

País	Vacuna/Institución	Composición*	Referencias
Argentina	VACUNA CONTRA LA BABESIOSIS Y LA ANAPLASMOSIS/INTA-Rafaela	Bbo, Bbi, Acent	Echaide <i>et al.</i> (1993a, b)
	BIOJAJA/Laboratorio Litoral Biológico	Bbo, Bbi, Acent	Mangold <i>et al.</i> (1996) http://www.veterinariargentina.com/revista/2013/08/tristeza-bovina-vacunaproducida-en-el-chaco-argentina/ http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=nyin=1454yio=12690
	VACUNA CONTRA LA BABESIOSIS Y LA ANAPLASMOSIS / INTA-Mercedes	Bbo, Bbi, Acent	http://inta.gov.ar/documentos/vacunas-para-la-babesiosis-y-anaplasmosis-tristeza-.-noticias-y-comentarios-503/at_multi_download/file/INTA_Vacuna%20Babesiosis%20y%20Anaplasmosis%20Not%20y%20com%20504.pdf
Australia	COMBAVAC 3 IN 1 CONCENTRATE/Queensland Department of Agriculture Fisheries and Forestry	Bbo, Bbi, Acent	Bock y de Vos (2001), Dalgliesh <i>et al.</i> (1990) http://www.daff.qld.gov.au/__data/assets/pdf_file/0003/53868/Tick-Fever-BCombavac-3-in-1-Live-Tick-Fever-Vaccine-Specifications.pdf
	TRIVALENT TICK FEVER VACCINE/ DAFF-TFC, Wacol	Bbo, Bbi, Acent	Standfast <i>et al.</i> (2003), Bock <i>et al.</i> (2004) http://www.daff.qld.gov.au/__data/assets/pdf_file/0008/61388/Tick-Fever-A2-Trivalent-Tick-Fever-Vaccine-Specifications.pdf
Brasil	EMBRAVAC®/HEMOPAR/ Hemopar	Bbo, Bbi, Acent	Kessler <i>et al.</i> (1987) http://www.catalogosnt.cnptia.embrapa.br/catalogo20/catalogue_of_products_and_services/arvore/CONT000fmt0bvzi02wyiv8003d0p31bvkqp1.html
	ERITROVAC N2®/Hemopar	Bbo, Bbi, Acent	http://www.hemopar.com.br/index.php/produtos.html
Colombia	ANABASAN®/ Limor de Colombia SA	Bbo, Bbi, Acent	Benavides <i>et al.</i> (2000) http://corpomail.corpoica.org.co/BACFILES/BACDIGITAL/45107/s2dF1DFA3755B2E7DB298E703DD8F72FAF0_1.pdf http://www.limorcolombia.com/biotecnologia.htm
Israel	Kimron Veterinary Institute	Bbo, Bbi, Acent	Dalgliesh <i>et al.</i> (1981), Pipano (1981, 1995, 1997), Pipano <i>et al.</i> (2002)
Malawi	Central Veterinary Laboratory, Lilongwe	Bbo, Bbi, Acent	Tjornehoj <i>et al.</i> (1997) http://www.fao.org/docrep/015/an381e/an381e01.pdf
México	VACUNA CONTRA LA BABESIOSIS BOVINA/Cenid-Pavet- INIFAP	Bbo, Bbi	Cantó Alarcón <i>et al.</i> (2003) http://utep.inifap.gob.mx/tecnologias/1.%20Bovinos%20Leche/4.%20Sanidad/VACUNA%20CONTRA%20LA%20BABESIOSIS%20BOVINA.pdf

Sudáfrica	FROZEN AFRICAN REDWATER VACCINE FOR CATTLE (BABESIA BIGEMINA)/ Onderstepoort Veterinary Institute (OVI)	Bbi	de Waal (1996) http://www.obpvaccines.co.za/Cms_Data/Contents/OBPDB/Folders/Product/~contents/JBY2362URFG26QT6/RedwaterAfrican.pdf
	FROZEN ASIATIC REDWATER VACCINE FOR CATTLE (BABESIA BOVIS/ OVI)	Bbo	de Waal (1996) http://www.obpvaccines.co.za/Cms_Data/Contents/OBPDB/Folders/Product/~contents/PR22ENFFGZ9V7NZA/RedwaterAsian.pdf
Uruguay	HEMOVAC C / Cibeles	Bbo, Bbi, Acent	Solari <i>et al.</i> (1992) http://www.cibeles.com.uy/es/?pg=vet_productos
	HEMOVACUNA/ DILAVE Miguel C Rubino	Bbo, Bbi, Acent	http://www.mgap.gub.uy/dgsg/dilave/Parásitolog%C3%ADa/Publicaciones/8_Epidemiolog%C3%ADa%20y%20perspectivas%20en%20el%20control%20de%20hemopar%C3%A1sitos.pdf
<p>*Bbo: Babesia bovis, Bbi: Babesia bigemina, Acent: Anaplasma centrale.</p> <p>Todas las vacunas usan eritrocitos infectados de terneros esplenectomizados con excepción de la vacuna de INTA-Rafaela (Argentina) cuya producción es <i>in vitro</i>.</p> <p>Modificado de: Florin-Christensen <i>et al.</i> (2014).</p>			

La multiplicación del parásito es asincrónica y, por tanto, en un extendido sanguíneo puede observarse diferentes estadios del parásito. Los merozoitos de *B. bigemina* se observan como estructuras grandes, tanto como el radio de la célula infectada. La multiplicación continúa hasta la muerte del huésped o usualmente hasta que el sistema inmune del huésped pone fin a la multiplicación del parásito (Uilenberg, 2006; Chauvin *et al.*, 2009).

Desarrollo en el huésped invertebrado

La garrapata se infecta cuando ingiere glóbulos rojos infectados con *B. bigemina*. **(G)** El estadio infectivo para la garrapata son considerados como pre-gametocitos los cuales comienzan a desarrollarse una vez son ingeridos (Mackenstedt *et al.*, 1995). Pocas horas después de la ingestión, aparecen cuerpos alargados o alongados con forma de flecha. Estas estructuras, que al parecer son gametocitos, son llamadas cuerpos radiados o “strahlenkorper” (Chauvin *et al.*, 2009). **(H)** En el lumen del tracto digestivo de las garrapatas, estos gametocitos se desarrollan en gametos masculinos y femeninos. Los microgametos se fusionan con los macrogametos para formar cigotos móviles (Mehlhorn y Shein, 1984). Los cigotos, estructuras elongadas de 8 a 10µm de longitud, poseen un organelo con forma de punta flecha que les facilita la penetración celular.

Una vez esta punta toca la célula del intestino medio de la garrapata, la célula se invagina alrededor del punto de contacto del organelo y el cigoto es internalizado **(I)**. **(J)** Dentro de la célula del intestino medio, el organelo con forma de punta de flecha se desintegra y el cigoto es transformado en un estadio motil llamado ooquineto. La meiosis, la cual indica el inicio de la esporogonia en los organismos apicomplexos, probablemente ocurre en este estadio porque el ooquineto es haploide. **(K)** El ooquineto escapa del epitelio del intestino medio e invade a través de la hemolinfa, a diferentes órganos de la garrapata, incluyendo los ovarios. **(L)** La invasión de los ovarios en las garrapatas resulta en muchos huevos infectados con *Babesia* (transmisión transovárica) y la infección pasa a través del ovario y el huevo a la siguiente generación **(M)**. **(N)** El subsecuente desarrollo de *Babesia* incluye

multiplicación asexual, esporogonia y el desarrollo de numerosos quinetos (esporoquinetos) (Uilenberg, 2006; Chauvin *et al.*, 2009).

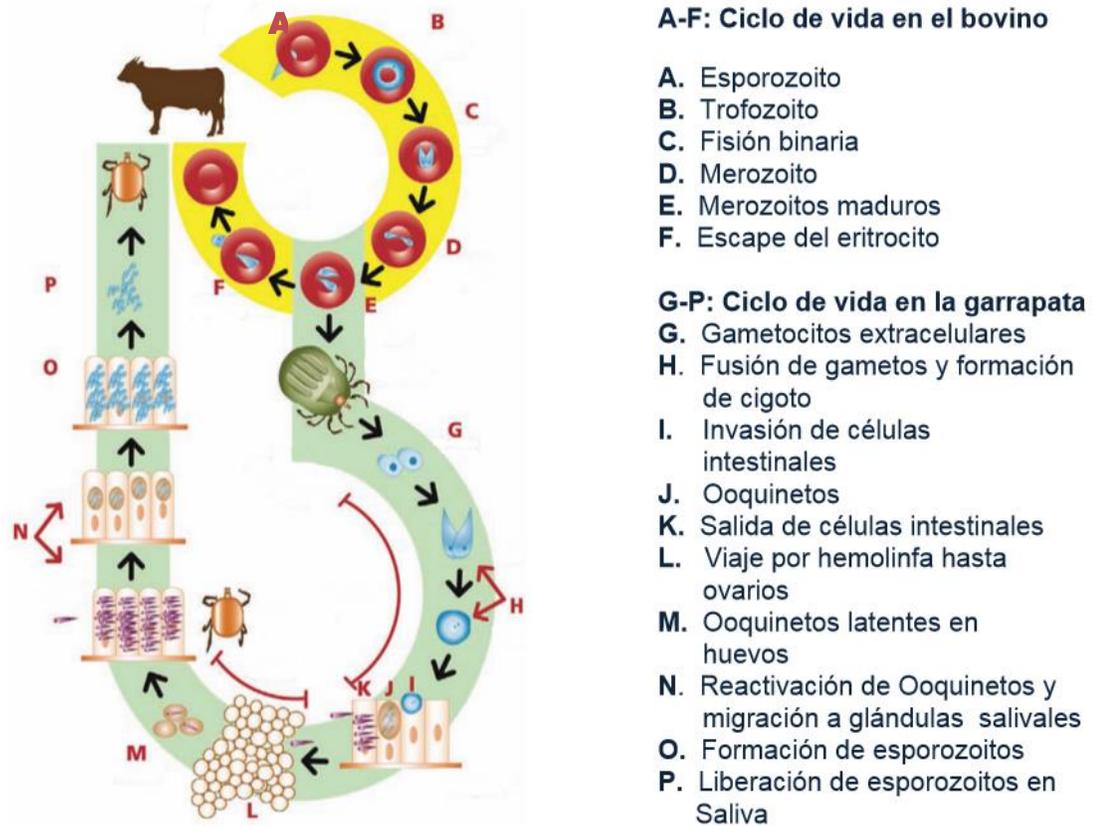


Figura 6. Ciclo de vida de *Babesia bigemina*. Adaptada de: Mosqueda *et al.* (2012).

Por lo general, es la garrapata hembra que se infecta y la esporogonia se lleva a cabo ninfas y adultos de la siguiente generación. **(O)** Algunos quinetos también invaden las glándulas salivales de la garrapata donde se producen esporozoitos como final del ciclo en el huésped invertebrado. **(P)** Debido a que los esporozoitos representan el estadio o fase infecciosa para el bovino, cuando la garrapata se adhiere a un nuevo huésped, la maduración de los esporozoitos se da en el huésped infectado con la saliva de la garrapata. No obstante, el desarrollo de los esporozoitos se puede dar en las fases larvarias de la garrapata y aparecer con capacidad infectiva 9 días después del inicio de la alimentación de la larva. Finalmente, la transmisión ocurre a través del estadio de ninfa e incluso por garrapatas machos y hembras adultas (Mackenstedt *et al.*, 1995; Uilenberg, 2006; Chauvin *et al.*, 2009).

2.2.2 Transmisión

La transmisión de *Babesia* spp. es un proceso complejo conformado por tres elementos: el vector, el parásito y el huésped (Figura 7). Existe una serie de factores que pueden modificar las interacciones del ciclo de vida, por ejemplo, la infección del vector, la edad de la garrapata, edad del huésped y las condiciones meteorológicas. La garrapata se infecta durante las últimas 16 a 24 horas de su alimentación sobre el huésped, cuando las teleoginas (garrapatas ingurgitadas) están muy próximas a terminar su ciclo de vida para caer al suelo e iniciar la fase de oviposición (Benavides, 1985).

En el caso de *B. bigemina* las fases transmisoras son las ninfas y los adultos, con un periodo de incubación que oscila entre 12 a 18 días (Bishop y Adams, 1973). Los machos de *R. microplus* transmiten *B. bigemina* y este mecanismo de transmisión es altamente favorecido por la longevidad de este estadio y por la facilidad que tienen de pasar de un bovino a otro (Benavides, 1985).

Una característica común de los parásitos apicomplexos transmitidos por vectores es la existencia de estadios celulares específicos involucrados en su transmisión entre el huésped vertebrado y el vector. Llámense gametocitos (vertebrados a vector) o esporozoitos (vector a vertebrados), este mecanismo está poco caracterizado en las especies de *Babesia* y los estudios de transmisión que involucre la eficiencia, tasa, condiciones que inducen a fases transmisibles, expresión génica diferencial, etc., son necesarios para el conocimiento del desarrollo del parásito (Chauvin *et al.*, 2009).

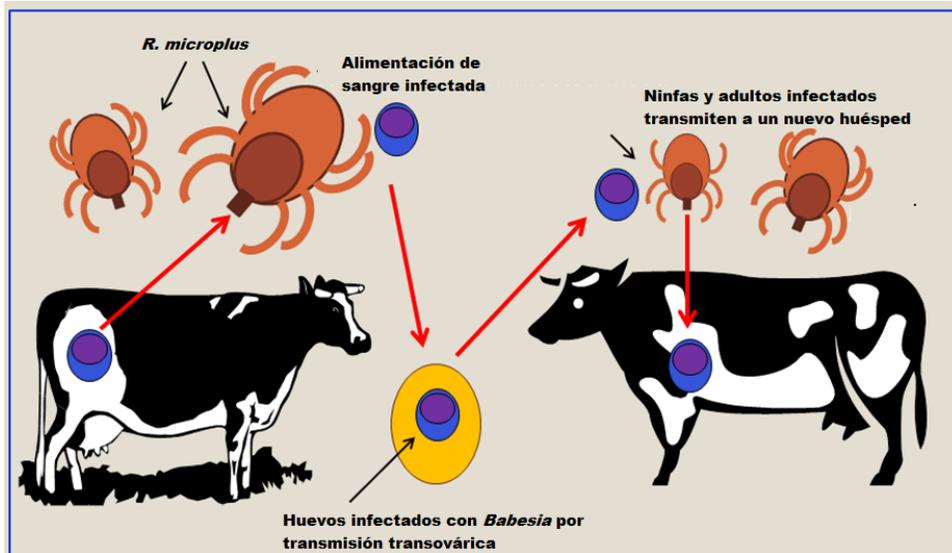


Figura 7. Formas de transmisión de *Babesia bigemina* en la garrapata y el bovino (Walker, s.f).

Las especies de *Babesia* también pueden transmitirse entre animales por inoculación directa de sangre, moscas picadoras y fómites contaminados con sangre infectada podrían actuar como vectores mecánicos, aunque se piensa que este método de transmisión tiene poca importancia. Como se mencionó en epidemiología, *B. bigemina* se mantiene en poblaciones de ganado que se han recuperado de una enfermedad aguda durante unos meses. La recrudescencia de la parasitemia puede ocurrir a intervalos irregulares. Los terneros pueden infectarse in útero; Sin embargo, esto parece requerir cambios patológicos en la placenta, y la infección transplacentaria parece ser accidental y rara (The Center for Food Security and Public Health, 2008).

2.2.3 Genoma y características del gen *ama-1*

El genoma completo de *Babesia bigemina* aún no ha sido reportado en una revista indexada. Sin embargo, el Instituto Sanger, entidad que está secuenciando el genoma, tiene publicado en su sitio web datos que han permitido la caracterización, comparación del genoma e identificación de genes y predicción de secuencias codificantes y proteínas. Se estima que el genoma nuclear de *B. bigemina* tiene un tamaño de 10 Mb (un millón de pares de bases) distribuido en 4

cromosomas (Ray *et al.*, 1992; Babesia bigemina - Wellcome Trust Sanger Institute, 2016).

Tomando como base la información mencionada y la de organismos relacionados como *Plasmodium* y *B. bovis*, Torina *et al.* (2010) compararon genes de organismos relacionados con el genoma de *B. bigemina*, e identificaron secuencias conservadas correspondientes al gen *ama-1*. Toda la región codificante del gen *ama-1* se amplificó y secuenció a partir de tres cepas italianas. El gen tiene una longitud completa de 1788 pb y codifica un producto de 595 aminoácidos. La proteína de la cepa italiana tiene un peso de 65.9 kDa.

Las cepas evaluadas por el grupo de investigadores demostraron un alto grado de similitud a nivel de secuencias nucleotídicas entre la cepa australiana, que es la cepa de referencia, con cepas de Italia, México y Argentina. El porcentaje de homología a nivel de nucleótidos es del 99.98% y a nivel de aminoácidos del 99.99%. La variación a nivel nucleotídica muestra 54 mutaciones puntuales a lo largo del gen de las cuales 36 son mutaciones sinónimas y 18 cambios no sinónimos (Torina *et al.*, 2010).

El Antígeno 1 de la membrana Membrana Apical (AMA-1) es una proteína producida en el complejo apical de varios organismos apicomplexos y tiene un papel en el proceso de invasión de los glóbulos rojos del huésped. A pesar de que la función de AMA-1 aún no es bien entendida, su localización celular, su expresión específica de fase, y la secreción durante la invasión de las células del huésped indican que esta proteína tiene un papel clave en la penetración de glóbulos rojos por el parásito (Torina *et al.*, 2016).

2.2.4 Diagnóstico

El diagnóstico de la babesiosis bovina es una importante herramienta para controlar y prevenir la diseminación de la enfermedad. Durante la fase aguda de la enfermedad, el número de parásitos en el interior de los eritrocitos incrementa y pueden ser detectados microscópicamente. Sin embargo, en animales infectados

crónicamente donde ocurre la forma subclínica de la enfermedad, este método es poco útil y se deberá utilizar métodos más sofisticados (Mosqueda *et al.*, 2012).

El uso de técnicas efectivas está dirigido a cubrir 5 propósitos generales: 1) identificación de especies de hemoparásitos y cepas involucradas en la enfermedad; 2) determinación de la distribución y evaluación del riesgo de enfermedad en un hato, a nivel regional o nacional; 3) certificación del estado de infección de los animales por requerimientos comerciales o en programas de erradicación; 4) identificación o confirmación de la causa de brotes y muertes y, 5) identificación de artrópodos específicos como vectores o de los estadios transmitidos por éstos (Böse *et al.*, 1995).

Técnicas sensibles y específicas para la detección del patógeno proveen herramientas para la identificación de animales enfermos que requieren una terapia rápida y apropiada y para la prevención de la enfermedad mediante la regulación del movimiento de animales. Además, para el entendimiento de la epidemiología de la enfermedad incluyendo los factores que influyen sobre la inmunidad de los animales es necesario el desarrollo de técnicas definidas. Durante casi todo el siglo XIX, el diagnóstico de la enfermedad aguda se basó en la sinología clínica y la identificación de los organismos intraeritrocíticos, sin embargo, investigadores ya reportaban que las investigaciones epidemiológicas se veían limitadas por la falta de pruebas de diagnóstico adecuadas para un gran número de bovinos portadores y vectores artrópodos y, expresaban la necesidad del desarrollo de técnicas mejoradas que ofrecieran mayores oportunidades en la investigación de la enfermedad (Palmer, 1991).

Debido a las similitudes clínicas y epidemiológicas de la babesiosis bovina con otras enfermedades causadas por hemoparásitos, es imprescindible el diagnóstico etiológico y específico en aras de tomar decisiones adecuadas para el tratamiento y establecimiento de medidas correctivas y de control en el mediano y largo plazo (Benavides *et al.*, 2012). Las técnicas de diagnóstico son usadas, principalmente, para identificar el parásito causal de la enfermedad aguda y para detectar infección en portadores sanos con fines de control regulatorio de la enfermedad (Bock *et al.*,

2004). Adicionalmente, todas las estrategias de control requieren de información epidemiológica de la prevalencia e incidencia de la enfermedad en zonas afectadas.

Para el diagnóstico certero de la babesiosis causada por *B. bigemina*, necesita considerarse las cuatro fases de la infección: la primera fase es la baja parasitemia durante la fase de incubación de la enfermedad haciendo que la infección no sea detectable y el diagnóstico temprano es crucial para el tratamiento exitoso de la enfermedad. La segunda fase es la infección aguda donde los parásitos son fácilmente detectables en extendidos de sangre. El diagnóstico certero es importante, especialmente cuando existen infecciones mixtas con otros hemoprotozoarios. La tercera fase es la recuperación, cuando el monitoreo de la disminución de la parasitemia permite evaluar la efectividad del tratamiento. La cuarta fase es el periodo variable que ocurre varios meses después de la infección cuando el animal se vuelve portador y ha desarrollado anticuerpos contra *B. bigemina*. En esta fase la parasitemia es extremadamente baja y por esto la infección es difícil de detectar. El reconocimiento y la diferenciación entre la fase de portador y una infección temprana es importante. Esta es también la fase donde los anticuerpos específicos proveen información importante en estudios epidemiológicos (Morzaria *et al.*, 1992).

El método tradicional de diagnóstico de la enfermedad está basado en la identificación del parásito en frotis sanguíneos. Las técnicas de detección de ácido desoxirribonucleico (DNA) son más sensibles que los frotis sanguíneos, pero no son útiles para la detección de la enfermedad en la fase aguda. Además, no es adecuada para la aplicación en campo debido a que requiere equipamiento de laboratorio especializado (Castellano, 1994).

El test ideal que la industria pretende es uno que sea específico en la búsqueda de ciertos patógenos, fácil de realizar, bajo en costos y que no requiera equipos especializados (Castellano, 1994). Sin embargo, el método de detección apropiado dependerá del propósito del diagnóstico, si la detección del antígeno o el anticuerpo es relevante para una investigación particular, detección de parásitos, diagnóstico

de infecciones activas, estudios de prevalencia o evidencia de exposición al parásito (Lew y Jorgensen, 2005).

Las ventajas y desventajas de las técnicas mayormente utilizadas se explican a continuación y se encuentran resumidas en el cuadro 5.

Cuadro 5. Comparación de las principales técnicas de diagnóstico de babesiosis.

Técnica	Características	Ventajas	Desventajas
Examen microscópico	Extendidos sanguíneos, riñón, cerebro, hígado, bazo, hemolinfa de garrapata, etc y tinción.	Rápido, práctico, portable, identificación morfológica, confirmación de casos clínicos	Aplicación en etapas agudas de la enfermedad, experiencia del microscopista, no detecta portadores
PCR	Amplificación de una secuencia específica de DNA en el genoma del organismo	Alta sensibilidad, detección de animales portadores, confirmación de casos clínicos, diferenciación entre cepas, detección múltiple	Equipos sofisticados y costosos, personal especializado, mayor tiempo empleado.
IFAT	Detección de anticuerpos e interpretación por fluorescencia	Determina estado inmunitario tras vacunación, bajo costo por muestra, sensible y sencilla	Reacciones serológicas cruzadas (<i>B. Bigemina</i>), bajo rendimiento de las muestras y subjetividad, depende de la calidad del antígeno, personal entrenado y microscopio especial
ELISA	Detección de anticuerpos. Antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable	Determina estado inmunitario tras vacunación, alta sensibilidad y especificidad, alto número de muestras por día	No existe validación para <i>B. Bigemina</i> , no es portable

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa; IFAT: Inmunofluorescencia indirecta;

ELISA: Enzimoimmunoensayo

Adaptado de: Böse *et al.*, 1995; Mosqueda *et al.*, 2012; Manual terrestre: OIE - World Organisation for Animal Health, 2014.

Examen microscópico directo

El parásito puede ser visto en extendidos delgados de sangre, cerebro, riñón, hígado y bazo de animales muertos recientemente y en garrapatas (Bock *et al.*, 2004). El examen microscópico de extendidos sanguíneos es el método tradicional de identificación de *Babesia*. Consiste en la tinción de extendidos finos o de gotas gruesas de sangre con la coloración Giemsa, Romanowsky (tinción de Giemsa al 10% con solución salina tamponada con fosfato (PBS) o tampón de Sörenson a un pH de 7,4). La sensibilidad de la gota fina es tal que permite detectar parasitemias de incluso 1 parásito en 10⁶ eritrocitos (Manual terrestre: OIE - World Organisation for Animal Health, 2014).

Mediante esta técnica, *B. bigemina* se caracteriza por ser grande, de forma irregular, igualando a veces el diámetro del eritrocito. La forma pareada se une en un ángulo agudo dentro de los eritrocitos maduros, en forma de pera, pero con un extremo distal puntiagudo. Cada par es de aproximadamente 3 a 5 μm de largo y 1,5 μm de ancho y, generalmente aparecen con dos puntos teñidos de rojo que corresponde al material nuclear de cada parásito (Bock *et al.*, 2004).

La diferenciación entre especies es buena en extendidos delgados y pobre en gruesos. Sin embargo, los extendidos delgados son adecuados en infecciones agudas y no para la detección de animales portadores donde las parasitemias son relativamente bajas. La distinción entre *B. bovis* y *B. bigemina* es difícil cuando se producen cambios morfológicos en el parásito. Además, los parásitos degenerados de ambas especies pueden parecerse a *Anaplasma marginale*. Esto es probable que ocurra cuando se toman muestras después del tratamiento farmacológico contra la fiebre de garrapata (Bock *et al.*, 2004).

El diagnóstico normalmente no es confirmado en el laboratorio debido a especímenes mal preparados o enviados. En otras ocasiones, las muestras son buenas pero la confirmación no es posible debido a factores propios de la enfermedad. *Babesia* puede ser difícil de detectar durante la etapa de recuperación cuando la parasitemia cae rápidamente, y cuando las muestras se toman uno o dos días después de un tratamiento específico (Bock *et al.*, 2004).

La interpretación de los resultados en *B. bigemina* a menudo es difícil debido a que este parásito se puede encontrar en animales clínicamente sanos. Una infección es significativa cuando el 1% o más células rojas están infectadas. Una parasitemia menor al 1% se considera significativa si hay evidencia de cambios anémicos o existe historia sugestiva de fiebre de garrapata (Bock *et al.*, 2004).

La identificación directa en una infección aguda de los organismos intraeritrocíticos contribuye a la identificación de animales que presentan una infección activa y elimina variables que hacen confuso los resultados de las pruebas serológicas como la detección de anticuerpos calostrales, anticuerpos vacunales o anticuerpos de animales que se recuperan de la enfermedad aguda

espontáneamente o por un tratamiento farmacológico. La detección directa de bovinos portadores infectados de forma persistente es limitada y, por tal motivo, la técnica no es la adecuada cuando se quiere evaluar la significancia epidemiológica de animales portadores. (Palmer, 1991).

Aunque el examen microscópico es hasta ahora el método más económico y rápido usado para el diagnóstico del parásito, requiere de habilidad para la identificación de las diferentes formas del parásito, posee baja sensibilidad, necesita de un buen microscopio con objetivos y oculares que den una ampliación de más de 500 diámetros y de personal entrenado que sea capaz de diferenciar entre especies de *Babesia* (Smith *et al.*, 1893; Demessie y Derso, 2015).

Métodos inmunológicos

Los métodos serológicos o inmunológicos son útiles para estudios epidemiológicos, para el diagnóstico de infecciones subclínicas y para evaluar la necesidad de vacunación, pero raramente detectan animales portadores. Además, con frecuencia se presentan reacciones cruzadas entre diferentes especies de *Babesia* o respuestas inmunes específicas débiles que generan falsos negativos o falsos positivos (Araújo *et al.*, 1998).

Estos métodos consisten en la detección de anticuerpos e incluyen principalmente la inmunofluorescencia indirecta (IFAT) y el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Aunque la IFAT ha sido catalogada como la técnica estándar para el diagnóstico, su uso es limitado debido a la sensibilidad, especificidad (baja para el caso de *B. bigemina*, presenta reacciones cruzadas contra anticuerpos frente a *B. bovis* cuando se presenta infecciones mixtas), interpretación subjetiva y el bajo rendimiento (World Organisation for Animal Health, 2014).

El ELISA ha sustituido en gran parte a la IFAT debido a que ofrece mayor sensibilidad, objetividad en la interpretación de resultados y mayor capacidad en cuanto a número de muestras procesadas. La mayoría de pruebas usan proteínas recombinantes del merozoito de *B. bigemina*. Los ELISA para la detección de anticuerpos contra el antígeno crudo de *B. bigemina* suelen tener poca especificidad

(Terkawi *et al.*, 2011; Manual terrestre: OIE - World Organisation for Animal Health, 2014). Los ELISA competitivos desarrollados y validados en Australia y EE. UU. parecen ser los únicos que se utilizan sistemáticamente. A diferencia de *B. bovis*, en cuya infección se considera que los animales quedan como portadores de por vida tras la infección, en el caso de *B. bigemina* la infección podría desaparecer y los anticuerpos podrían disminuir por debajo del umbral de negatividad en cuestión de meses tras la infección (Goff *et al.*, 2008). Pueden obtenerse resultados inconcluyentes situados alrededor del umbral de negatividad, y este fenómeno supone un reto diagnóstico en animales en los que los títulos están disminuyendo al desaparecer la infección. (Manual terrestre: OIE - World Organisation for Animal Health, 2014).

La técnica ha sido adaptada con el uso de proteínas de las roptrias (RAP-1) (Terkawi *et al.*, 2011) y de la proteína AMA-1 la cual no presenta reacción cruzada y resulta ser una adaptación prometedora para el uso del ELISA (Torina *et al.*, 2016). A pesar de esto según el manual de la Organización Mundial de Sanidad Animal, todavía no se dispone de un ELISA bien validado para *B. bigemina*.

También se ha utilizado la fijación del complemento, tests inmunocromatográficos y se han descrito ensayos de aglutinación (látex y pruebas de aglutinación con tarjeta) como otros métodos de diagnóstico serológicos pero estas pruebas no son muy recomendadas (Mahoney, 1962; Goodger y Mahoney, 1974; Kim *et al.*, 2008; Manual terrestre: OIE - World Organisation for Animal Health, 2014).

Resumiendo, estos ensayos han sido poco aceptados por el alto número de falsos positivos que puede arrojar particularmente en regiones con infecciones múltiples o mixtas y por los falsos negativos especialmente en animales portadores.

Métodos moleculares

Los métodos moleculares son considerados métodos indirectos debido a que detectan ácidos nucleicos del parásito. Sin embargo, la sensibilidad y especificidad de estos métodos es muy alta, permite la diferenciación entre especies y actualmente existen diferentes técnicas para detectar el parásito en el huésped

vertebrado y en sus vectores (Mosqueda *et al.*, 2012). El cuadro 6 resume los principales métodos moleculares reportados para el diagnóstico de *B. bigemina*.

Sondas de DNA

Las sondas de ácido desoxirribonucleico fueron el primer método desarrollado para detectar DNA en sangre parasitada con *Babesia*. La técnica consiste en el aislamiento, la purificación y la clonación de DNA al cual se le agrega un marcador que inicialmente era radiactivo. La cadena única de DNA marcada es usada para hibridar con el DNA presente en un tejido o una membrana, el alineamiento del DNA permite la hibridación con DNA complementario. Así, el reconocimiento de la secuencia deseada se realiza de manera específica. La detección se lleva a cabo mediante autoradiografía, quimioluminiscencia o un sustrato colorimétrico (Mosqueda *et al.*, 2012).

El primer reporte del uso de sondas de DNA para el diagnóstico de *B. bigemina* fue en 1990 por (Buening *et al.*, 1990); también han sido usadas para detectar *Babesia* en tejidos de garrapata (Hodgson, 1992). Sin embargo, este método pierde ventajas al tomar varios días para ser completada, requerir técnicos especializados y etiquetado continuo de las sondas (Mosqueda *et al.*, 2012).

Reacción en cadena de la polimerasa

La primera descripción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar *Babesia bigemina* fue reportada por Figueroa *et al.* en 1992. Las técnicas de PCR han demostrado ser muy sensibles en la detección del parásito en animales portadores o persistentemente infectados. Los niveles de detección son tan bajos como tres eritrocitos parasitados en 20µl de células empaquetadas (o 1 por cada 10⁹ células). Una gran ventaja que ofrece el PCR es que permite la identificación del parásito en etapas tempranas de la enfermedad ofreciendo la oportunidad de implementar de manera oportuna una terapia correctiva (Demessie y Derso, 2015). La cuantificación de la infección mediante estas técnicas permite definir adecuadamente la infección persistente en animales portadores (Palmer, 1991).

Se han descrito varias técnicas de PCR que pueden detectar y diferenciar especies de *Babesia*. A pesar de que tiene bajo número de copias en el genoma, la

mayoría de reportes utilizan como gen blanco la subunidad pequeña del ribosoma o el gen *18s*. El número de copias de los genes que se emplean para la amplificación de DNA tiene un impacto especial en la sensibilidad de la técnica, pues la capacidad de detección es directamente proporcional al número de repeticiones de una secuencia. Sin embargo, esto se limita debido a la cantidad de secuencias génicas disponibles en las bases de datos. No obstante, los datos obtenidos de muchas publicaciones demuestran que la PCR es mucho más sensible que el diagnóstico por microscopía y los niveles de parasitemia detectados oscilan entre 0,001-0,0000001% (Criado-Fornelio, 2007).

A pesar de las ventajas de estas técnicas, la mayoría tienen un alto costo, toman tiempo para emitir el resultado, necesitan un procesamiento posterior para la interpretación de resultados y no están al alcance de todos los laboratorios (Lew y Jorgensen, 2005)

Transferencia de línea inversa (RLB)

Es una técnica en la cual se hibridan productos de PCR a sondas de oligonucleótidos específicas de especie unidas a una membrana. La principal ventaja de la técnica es que permite la detección simultánea de varias especies parásitos, cepas, muestras, etc. y que la membrana puede ser reusada hasta 20 veces. Sin embargo es un procedimiento que toma mucho tiempo y es relativamente costoso (Criado-Fornelio, 2007; Mosqueda *et al.*, 2012). El primer reporte del uso de la técnica RLB demostró que este es un método versátil que permite, en su caso, la detección simultánea de parásitos transmitidos por garrapatas en sangre de bovino (Gubbels *et al.*, 1999).

PCR en tiempo real

La PCR tiempo real o qPCR consiste en la amplificación de DNA como lo hace la PCR tiempo final con la diferencia de que detecta la fluorescencia producida por una molécula reportera que aumenta a medida que la reacción avanza y cuantifica la amplificación ya que determina el número de copias de la reacción. Esto ocurre debido a la acumulación del producto de PCR de cada ciclo de amplificación. Estas moléculas reporteras fluorescentes (por ejemplo, el colorante SyBR Green que se

intercala en la doble cadena de DNA) facilitan el monitoreo de la reacción y evitan un proceso posterior para la interpretación de resultados, lo cual ahorra tiempo y recursos. A pesar de esto, es una técnica costosa (dos o tres veces más que una PCR tiempo final) que requiere de equipos y reactivos especiales (Criado-Fornelio, 2007). El primer reporte de qPCR para el diagnóstico de *B.bigemina* demostró una mayor sensibilidad de la prueba comparada con PCR punto final (Buling *et al.*, 2007).

PCR anidada

La PCR anidada es una adaptación de la técnica de PCR punto final o convencional que utiliza un par de cebadores adicionales y consiste en dos reacciones de amplificación donde el segundo par de cebadores es usado en el segundo paso de amplificación. La técnica es útil para la identificación de animales portadores y es más sensible que una PCR tiempo final pero es más costosa, toma mayor tiempo y el riesgo de contaminación es mayor (Mosqueda *et al.*, 2012).

Otras técnicas moleculares usadas para el diagnóstico de *B. bigemina* incluyen el diagnóstico múltiple (Figuroa *et al.*, 1993), la amplificación aleatoria de ADN polimórfico RADP (Carson *et al.*, 1994), la composición de PCR con la técnica Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) (Cacciò *et al.*, 2000), el uso de PCR “hot start” (Martins *et al.*, 2008), el uso de PCR tiempo real junto con sondas de Transferencia de Energía de Resonancia Fluorescente (FRET) (Criado-Fornelio *et al.*, 2009), la combinación de PCR con microarreglos de DNA (El-Ashker *et al.*, 2015), el uso de genes mitocondriales como blanco diagnóstico que ha mejorado la qPCR (Qurollo *et al.*, 2017), entre otras. A pesar de las ventajas que ofrece los métodos de PCR, en la actualidad no se prestan bien para pruebas a gran escala y son poco prometedoras para sustituir a las pruebas serológicas como método de elección para los estudios epidemiológicos. Las PCR son útiles como pruebas confirmativas, y en algunos casos como pruebas reguladoras (Manual terrestre: OIE - World Organisation for Animal Health, 2014).

La disponibilidad de nuevas técnicas para la identificación de *Babesia bigemina* proporciona nuevas oportunidades de investigación, especialmente en

epidemiología. La capacidad de identificar y cuantificar la infección en portadores y vectores artrópodos permitirá determinar las variables, incluyendo el uso de acaricidas y la vacunación, que afectan el desarrollo de la inmunidad individual de los animales y los rebaños. Una mejor comprensión de la inmunidad de los rebaños debería conducir a un mejor control de la babesiosis en las áreas enzoóticas de todo el mundo (Palmer, 1991).

La detección temprana del estado inmunológico de los animales en áreas endémicas es un elemento esencial en el control de la babesiosis. Para detectar estos casos de riesgo, se requieren métodos mejorados de diagnóstico que permitan evaluar la estabilidad enzoótica de forma eficiente, y así determinar si la vacunación es necesaria (Mosqueda *et al.*, 2012).

Además de la importancia diagnóstica descrita, la aplicación de métodos efectivos de diagnóstico es particularmente importante en las siguientes circunstancias: a) introducción de animales de zonas libres a zonas endémicas; b) emigración de animales desde áreas libres de garrapatas dentro de una región endémica; c) Difusión de garrapatas fuera de su límite geográfico normal en temporadas anormalmente favorables; d) introducción accidental de garrapatas a zonas no endémicas a través de los animales; e) reducción local de la infestación de garrapatas en un área endémica mediante control artificial seguido de relajación de las medidas de control y, f) ocurrencia ocasional en bovinos infectados debido a la ruptura de la inmunidad y la re-exposición (Mahoney, 1977).

Cuadro 6. Principales genes y métodos moleculares usados para el diagnóstico de *Babesia bigemina*

Técnica	gen blanco	Referencia
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	Secuencia genómica	Figueroa <i>et al.</i> (1992)
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	<i>Citocromo b</i>	Salem <i>et al.</i> (1999)
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	<i>ama-1</i> (antígeno 1 de la membrana apical)	Sivakamur <i>et al.</i> (2012)
PCR múltiple y PCR anidada (nPCR)	Secuencia genómica	Figueroa <i>et al.</i> (1993)

PCR anidada (nPCR)	18s (gen de la subunidad pequeña del ribosoma)	Guerrero <i>et al.</i> (2006)
PCR y nPCR	<i>rap 1a</i> (proteína 1a asociada a las roptrías) / ITS (Espacio de transcripción interna)	Cao <i>et al.</i> (2012)
PCR anidada (nPCR) y PCR semianidada (snPCR)	<i>rap-1c</i> (proteína 1c asociada a las roptrías)	Mahmoud <i>et al.</i> (2015)
PCR dúplex (punto final y anidada)	18s (gen de la subunidad pequeña del ribosoma)	Costa-Junior <i>et al.</i> (2006)
PCR dúplex	ITS (Espacio de transcripción interna)	Liu <i>et al.</i> (2014)
PCR anidado (nPCR)- Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP)	<i>β tubulina</i>	Cacciò <i>et al.</i> (2000)
PCR en tiempo real (qPCR)	<i>Citocromo b</i>	Buling <i>et al.</i> (2007)
PCR en tiempo real (qPCR)	genoma mitocondrial/ subunidad grande del ribosoma (<i>Isu</i>)	Quorollo <i>et al.</i> (2017)
Transferencia de línea inversa (RLB)	18s (gen de la subunidad pequeña del ribosoma)	Gubels <i>et al.</i> (1999)
PCR "hot start"	<i>Babesipsina</i> ("putative aspartic proteinase babesipsin")	Martins <i>et al.</i> (2008)
PCR- Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP)	<i>Citocromo b</i>	Criado-Fornelio <i>et al.</i> (2009)

Finalmente, la identificación de secuencias conservadas entre cepas, como las reportadas del gen *ama-1*, y su uso como blanco para el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico, ofrece nuevas alternativas para el control mejorado de la enfermedad (Mosqueda *et al.*, 2012).

2.3 Técnica de Amplificación Isotérmica basada en Horquillas (LAMP)

La técnica de LAMP consiste en realizar una reacción de amplificación de ácidos nucleicos en un solo paso bajo condiciones isotérmicas con alta sensibilidad y especificidad. La metodología fue desarrollada en el año 2000 por Notomi *et al.* y el mecanismo está fundamentado en tres pasos principales: un paso inicial en donde

se forma una estructura tallo-horquilla en el que las secuencias de ambos extremos de DNA se derivan del iniciador interno y que servirá como material de partida de la reacción; un subsecuente paso de ciclado donde un iniciador interno hibrida con la horquilla e inicia la síntesis de DNA por desplazamiento de la cadena produciendo una estructura tallo-horquilla y una nueva estructura tallo-horquilla donde el tallo es del doble de largo; y, un paso final de elongación donde se forman varias repeticiones invertidas del DNA blanco y una estructura en forma de coliflor con múltiples horquillas, ampliando la cantidad de DNA blanco a 10^9 copias en menos de una hora. LAMP emplea la enzima DNA polimerasa con actividad de desplazamiento de la cadena junto con dos cebadores internos (FIP, BIP) y cebadores externos (F3, B3) que reconocen seis regiones separadas dentro de una secuencia de DNA blanco (Figura 8). La técnica tiene alta especificidad porque la reacción de amplificación ocurre únicamente cuando las seis regiones del DNA blanco son correctamente reconocidas por los cebadores. Adicionalmente, la técnica ha sido optimizada incluyendo los llamados cebadores Loop (LF, LB) los cuales reconocen las estructura de horquilla en los amplicones y aumentan la sensibilidad de LAMP (Nagamine *et al.*, 2002).

La eficiencia de amplificación del método de LAMP es extremadamente alta debido a que no hay pérdida de tiempo en cambios térmicos al ser una reacción isotérmica y es poco probable que ocurra la inhibición de la reacción en la última etapa de amplificación (Mori, Nagamine, Tomita, y Notomi, 2001).

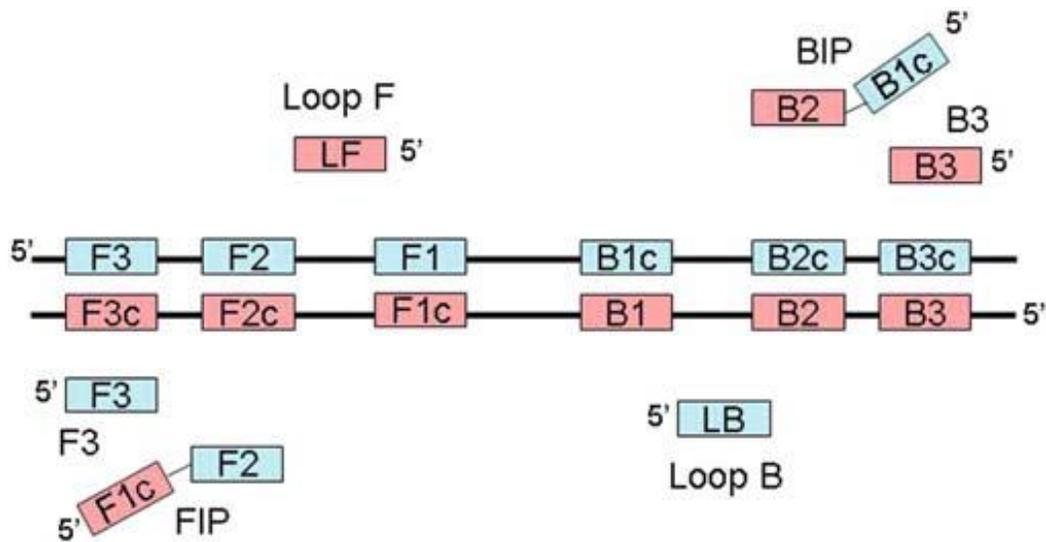


Figura 8. Regiones del DNA blanco y cebadores empleados en la técnica de LAMP.

(Mori y Notomi, 2009).

Este método sintetiza de 10 a 20 μg de DNA específico para una mezcla de reacción de 25 μl en 30 a 60 minutos (Mori *et al.*, 2001).

2.11.1 Fundamento

Los cebadores internos son llamados por sus siglas en ingles “Forward Inner Primer” (FIP) y “Backward Inner Primer” (BIP) respectivamente y cada uno contiene dos secuencias distintas correspondientes a las secuencias sentido y antisentido del DNA blanco, uno para el cebado en la primera etapa y el otro para el auto-cebado en etapas posteriores. Para facilitar la explicación, y como se muestra en la Figura 9 las secuencias (típicamente de 23-24 nucleótidos) dentro de ambos extremos de la región blanco para la amplificación del DNA son llamadas F2c y B2, respectivamente. Dos secuencias internas (típicamente de 23-24 nucleótidos), ubicadas a 40 nucleótidos del extremo de F2c y B2 son llamados F1c y B1 y dos secuencias (de 17 a 21 nucleótidos) fuera de los extremos de F2c y B2 son designados como F3c y B3. Dada esta estructura, las secuencias FIP y BIP son diseñadas de la siguiente manera: FIP contiene F1c, un espaciador de TTTT y la secuencia F2 complementaria a F2c. BIP contiene la secuencia B1c (o B1 según la literatura), un espaciador de TTTT y la secuencia complementaria a B2 (B2c según

otras fuentes de literatura) [1]. Los dos cebadores externos son B3 y F3, esta última es complementaria a F3c. La reacción de LAMP es iniciada con la adición de la polimerasa de DNA de *Bacillus stearothermophilus* (en adelante *Bst* polimerasa) y llevada a cabo en un rango de 60-65°C durante 1 hora (Notomi *et al.*, 2000).

El mecanismo y las etapas de reacción esperadas son ilustradas en la Figura 9. El cebador interno FIB hibrida con F2c en el DNA blanco e inicia la síntesis de la cadena complementaria. El cebador externo F3, el cual tiene menor concentración y número de bases comparado con FIP, hibrida lentamente con F3c en el DNA blanco e inicia el desplazamiento de la cadena de DNA, liberando la cadena complementaria ligada a FIP, lo cual forma una estructura en forma de horquilla en uno de los extremos [4]. Este DNA monocatenario sirve como templado o plantilla para que se inicie la síntesis de DNA a partir de BIP y el subsecuente desplazamiento de la cadena desde donde B3 está hibridado, llevando a la producción de una estructura en forma de campana [6], que es convertida rápidamente en DNA tallo-horquilla por la síntesis de DNA por autocebado [7]. Este DNA tallo-horquilla servirá como material de inicio para los ciclos de la reacción de LAMP, la segunda etapa de la técnica (Notomi *et al.*, 2000).

Para iniciar los ciclos de LAMP, FIP hibrida con la horquilla en la estructura tallo-horquilla [7] generando un DNA tallo-horquilla intermediado por un agujero con una copia invertida adicional de la secuencia blanco en el tallo y una horquilla formada en el extremo opuesto a través de la secuencia BIP [8]. La síntesis y el desplazamiento de la cadena de DNA auto-cebada da una estructura complementaria al DNA tallo-horquilla original [10], un DNA tallo-horquilla con un tallo doblemente alargado (copias dobles de la secuencia blanco) y una horquilla en el extremo opuesto [9]. Ambos productos servirán posteriormente como plantilla para la reacción de desplazamiento desde donde BIP está hibridado en los ciclos subsecuentes, parte que corresponde a la etapa de elongación. Por tanto, en LAMP la secuencia blanco es amplificada 3 veces cada medio ciclo (Notomi *et al.*, 2000).

Los productos finales son una combinación de DNA tallo-horquilla con tallos de varias longitudes y estructuras en forma de coliflor con múltiples horquillas formadas

por la unión entre invertidos repetidos alternativamente en la misma cadena de la secuencia blanco [16-18] (Notomi *et al.*, 2000).

El uso de cuatro cebadores (reconocimiento de seis secuencias distintas) en los pasos iniciales y dos cebadores (reconocimiento de cuatro secuencias distintas) durante los pasos subsecuentes asegura alta especificidad en la amplificación. Por otra parte, los cuatro cebadores iniciales son usados simultáneamente para iniciar la síntesis de DNA desde el DNA original no amplificado para generar DNA tallo-horquilla para los siguientes ciclos de la técnica durante los cuales la secuencia blanco es reconocida por cuatro secuencias (Notomi *et al.*, 2000).

2.11.2 Factores críticos para la amplificación

Características de los cebadores:

Temperatura de fusión (T_m): la temperatura de fusión debe conservarse en ciertos rangos. Las secuencias F2 y B2 en FIP y BIP se eligen de manera que sus valores T_m caigan entre 60 y 65°C, temperatura óptima para la *Bst* polimerasa. Los valores de T_m de F1c y B1C son ligeramente superiores a los de F2 y B2 con el fin de que se forme la estructura en forma de horquilla inmediatamente después de la liberación del DNA de cadena sencilla del molde, esto es de 64°C a 66°C. El valor de T_m de los p cebadores externos (F3 y B3) es menor que la de F2 y B2 para asegurar que la síntesis ocurra primero a partir de los cebadores internos que de los externos. Para los cebadores loops la temperatura ideal es de 64-66°C (65°C) (Notomi *et al.*, 2000; Eiken Chemical Co., Ltd).

Estabilidad en el extremo de los cebadores: el extremo de los cebadores sirve como punto de inicio de la síntesis de DNA y por lo tanto debe tener cierto grado de estabilidad. El extremo 3' de F2/B2, F3/B3 y LF/LB y el extremo 5' de F1c/B1c son diseñados de tal manera que la energía libre es igual o menor a -4 Kcal/mol. El extremo 5' de F1c después de la amplificación corresponde al extremo 3' DE F1, así que la estabilidad es importante. La reacción ocurre hacia un cambio negativo de energía libre (ΔG). El alineamiento entre el cebador y el gen diana es una reacción equilibrada, y la reacción de alineamiento procede con un ΔG menor.

Contenido de GC: los cebadores son diseñados con un contenido de GC de 40 a 65% (idealmente 50-60%).

Distancia entre los cebadores (Eiken Chemical Co., Ltd):

- Distancia entre el extremo de F2 y el extremo de B2 (la región amplificada por el método de LAMP): 120 a 160 bases.
- Distancia entre el extremo 5' de F2 y el extremo 5' de F1 (la porción que forma la horquilla): 40 a 60 bases.
 - Distancia entre F2 y F3: 0 a 60 bases

Tamaño del DNA blanco: debido a la actividad de desplazamiento de la cadena, el tamaño ideal del fragmento de DNA blanco es de 130 a 200pb. Incluyendo los cebadores externos, el tamaño deberá ser menor a 300pb.

Concentración de cebadores: la concentración de los cebadores externos con respecto a los internos varía de 1/4 a 1/10.

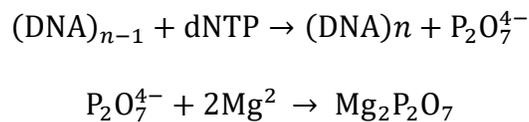
Desestabilizantes de la hélice: la adición de productos químicos que desestabilizan la doble hélice eleva notablemente la eficiencia de amplificación. La adición de 0.5 a 1.5 M de betaina o L-prolina reduce el apilamiento de las bases, reduce la tasa de reacción y aumenta la selectividad reduciendo la amplificación de secuencias irrelevantes.

La reacción de LAMP es acelerada con el uso de los cebadores loop, estos hibridan con las estructuras tallo-horquilla excepto en las horquillas que han sido hibridadas con los cebadores internos. Estos cebadores loop actúan en la fase de elongación. El cebador loop llamado loop B, (Figura 9), hibrida con una región horquilla (12) antes del inicio de la síntesis de la cadena. Luego, el DNA sintetizado de este cebadorloop es desplazado desde el extremo 3' del DNA blanco generando la estructura (15), la cual no está presente en el LAMP original. Otra estructura tallo-horquilla es hibridada por el cebador interno FIP desde donde se comienza la síntesis de la cadena. La estructura 10 y la estructura 8 y 11 son también reusadas en la reacción. El cebador loop hibrida en estructuras libres de cebadores internos

generadas en la reacción resultando en una drástica amplificación (Notomi *et al.*, 2000) .

2.11.4 Interpretación visual con azul de hidroxinaftol

Mori *et al.* (2001) afirmaron que cuando los ácidos nucleicos son amplificados por el método de LAMP, se produce una turbidez derivada del precipitado de pirofosfato de magnesio conforme la reacción va progresando. En la polimerización del DNA por la DNA polimerasa, el ion de pirofosfato es liberado de los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) como un subproducto. Cuando se producen grandes cantidades de este ion, este reacciona con el ion de magnesio contenido en el buffer de reacción formando un precipitado. Este proceso es esquematizado en la siguiente ecuación:



Si el precipitado se genera de acuerdo a la ecuación, la turbidez aumenta en correlación con el DNA producido. La turbidez de la reacción comienza a incrementar después de 15 minutos de haberse iniciado la prueba y continua un incremento gradual hasta los 30 minutos de reacción. El resultado de la reacción, una turbidez detectable visualmente, coloca a la técnica como un método simple para detectar la amplificación de ácidos nucleicos (Mori *et al.*, 2001).

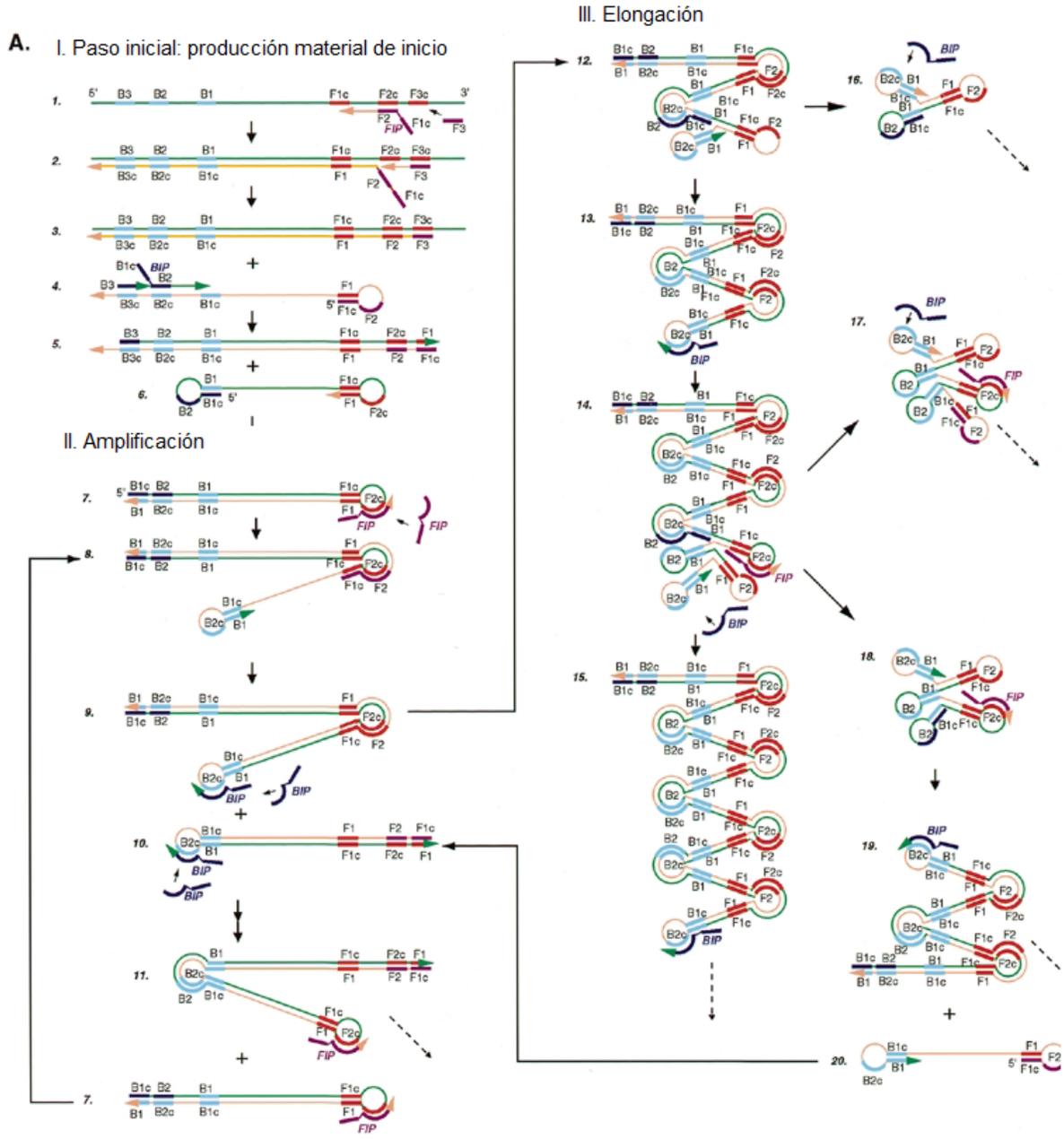


Figura 9. Representación esquemática del método de LAMP.

(Notomi *et al.*, 2000)

Con base en este fenómeno, se han desarrollado múltiples formas de detección visual de la positividad de la reacción. En el 2009, Goto *et al.* reportaron un ensayo colorimétrico simple para la detección de la reacción de LAMP usando un metal indicador llamado azul de hidroxinaftol (HNB). El HNB es un indicador que se agrega al tubo previo a la reacción y demuestra los cambios en las concentraciones del ion

Mg² ya que la *Bst* polimerasa sintetiza DNA bajo condiciones alcalinas (pH 8.8 a 75°C). Los cambios de color del HNB dependen del pH de la solución; cuando la solución contiene 8 mM de Mg² y no tiene dNTPs, su color es magenta. Al interactuar los iones de pirofosfato con los iones de Mg², la concentración de este último disminuye a medida que avanza la reacción de LAMP. Cuando se añaden dNTPs a la solución, el color cambia de magenta a violeta. Este cambio de color es producido por la quelación de los iones Mg² ocasionada por los dNTPs.

La técnica de LAMP usando HNB a 120 µM puede detectar DNA a diluciones de ≤1:10⁸ (160 copias/tubo) y no interfiere con la síntesis de DNA. Los cambios de color del violeta en una reacción negativa a azul cielo en una positiva se visualizan en la figura 10. La superioridad del HNB con respecto a otros métodos de visualización como el SYBR Green es porque 1) no se requiere abrir el tubo de la reacción para determinar si ésta es positiva o negativa lo que reduce el riesgo de contaminación cruzada; 2) la sensibilidad es igual a la de SYBR Green y 3) el resultado puede ser diferenciado fácilmente a simple vista (Goto *et al.*, 2009).



Figura 10. Comparación de la sensibilidad usando diluciones seriadas de DNA.
(Adaptada de (Goto *et al.*, 2009).

Tubo 1: dilución 1:10³ (1.58 x 10⁷ copias/tubo); tubo 2: dilución 1:10⁴; tubo 3: dilución 1:10⁵; tubo 4: dilución 1:10⁶; tubo 5: dilución 1:10⁷; tubo 6: dilución 1:10⁸; tubo 7 dilución 1:10⁹ y tubo 8: control negativo.

2.11.5 Avances y técnicas integradas

La técnica convencional para observar el producto amplificado es la electroforesis. Esta muestra un patrón típico en forma de barrido que se asemeja a una escalera de fragmentos de DNA. Esto es debido a lo siguiente: el fragmento más pequeño (monómero) se extiende desde el extremo 5' de la parte F1c de FIP

hasta el extremo 5' de B1c. Se producen multímetros y polímeros a partir de esa estructura monomérica con tamaños de unos pocos cientos hasta la formación de un frotis de DNA de alto peso molecular de varias kilobases de tamaño, como lo ejemplifica Notomi *et al.* (2000).

Desde que LAMP fue inventado en el año 2000, se han desarrollado diferentes métodos que han añadido varias mejoras a la metodología y aplicabilidad de la técnica. Notomi y colaboradores, también en el año 2000, lograron amplificar ácido ribonucleico (RNA) y producir DNA complementario (cDNA). En este método, el material genético utilizado es RNA en lugar de DNA. Se incluye una transcriptasa inversa (RTasa) para sintetizar cDNA a partir de RNA y éste es finalmente utilizado en la reacción de LAMP. En el mismo tubo de reacción, se añade RTasa, RNA, *Bst* polimerasa, cebadores y buffer y se incuba la mezcla en condiciones isotérmicas similares al método LAMP convencional.

Dos años después, con el objetivo de acelerar la reacción, (Nagamine *et al.*, 2002) agregaron a la técnica dos cebadores llamados cebadores Loop que hibridan con la estructura tallo-horquilla excepto en las horquillas donde han hibridado los cebadores internos, el mecanismo fue explicado anteriormente pero el uso de éstos oligonucleótidos disminuye el tiempo de la reacción.

En el 2004, Mori *et al.* que previamente reportaron como la técnica genera turbidez por las reacciones químicas ocasionadas al mezclar los reactivos, diseñaron un aparato capaz de medir la turbidez en tiempo real ocasionada por el pirofosfato de magnesio en múltiples muestras simultáneamente arrojando resultados cuantitativos de la cantidad de ácidos nucleicos presentes en la muestra. Este método es más sensible (10^2 copias de templado de DNA) y específico comparado con el LAMP normal.

Posteriormente, (Iseki *et al.*, 2007) introdujeron el concepto de LAMP múltiple en donde la prueba es capaz de detectar simultáneamente dos o más patógenos amplificando sus respectivos templados o fragmentos de DNA en el mismo tubo de reacción. En este método dos o más sets de cebadores son usados en la misma reacción. Los cebadores especie específicos del gen blanco se diseñan de la forma

habitual excepto por los FIPs y BIPs que se modifican insertando un sitio de restricción de la endonucleasa en lugar de TTTT entre F1c y F2 y B1c y B2. Como resultado, se generarán amplicones específicos de especie de diferente tamaño debido a la digestión posterior de la enzima de restricción después de la reacción de LAMP.

Con el objetivo de solventar las desventajas que se han reportado para LAMP (falsos positivos, uso de bromuro de etidio para la visualización en gel de electroforesis, entre otras), Kiatpathomchai *et al.*, (2008) y Jaroenram *et al.* (2009) fueron los primeros en reportar una variación de la técnica que utiliza tiras de flujo lateral (LFD). Después de realizar la técnica de LAMP sin inactivación de la enzima, se agrega una sonda de isotiocianato de fluoresceína (FITC) a la reacción y se incuba a 63°C por 5 minutos. Posteriormente, se introduce la tira LFD dentro del tubo de reacción para detectar la hibridación amplicón-sonda. Esta tira detecta el producto de LAMP marcado con biotina (los cebadores internos) que ha hibridado con la sonda de FITC acoplado con un anticuerpo anti FITC marcado con oro coloidal. El resultado de este triple complejo es atrapado en la línea del test mientras que un resultado negativo es atrapado en la línea de control. Este método no requiere de instrumentación especial, la duración total del experimento es de 65 minutos y la sensibilidad de detección es similar a otros métodos moleculares comúnmente usados.

En lo que respecta a *Babesia bigemina*, se reportó un estudio en el que combinaron LAMP con LFD para la detección del gen *citocromo b*. La técnica resultó altamente específica y sensible, detecta 0,85 fg de DNA de *B. bigemina*, 100 veces más sensible que un PCR convencional (Yang *et al.*, 2016).

Cuando la cantidad de pirofosfato de magnesio no puede ser controlada adecuadamente, puede tornarse difícil la detección de los amplicones visualmente. Dirigido a la detección de los amplicones efectivamente y a evadir procesos que consumen tiempo como la electroforesis en gel de agarosa y la tinción con bromuro de etidio, (Chou *et al.*, 2011) integraron la técnica de LAMP con la Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia (FRET). La sonda de FRET está

diseñada para reconocer la región del Loop de los amplicones y es añadida al reagente convencional para LAMP e incubada a 90°C por 60 a 120 minutos. Al finalizar la reacción, el producto puede ser detectado a simple vista o por fluoroespectofotómetro. Sin embargo, esta técnica integrada es de difícil diseño y el proceso es más largo que un LAMP normal.

Cuando se realizan técnicas de diagnóstico molecular, el primer paso es realizar la extracción del DNA blanco. Este proceso, además de que consume tiempo, puede contribuir a la contaminación por moléculas como proteínas o RNA. La técnica de LAMP, integrada con perlas magnéticas (Wang *et al.*, 2011) emplea sondas específicas conjugadas con perlas magnéticas y el DNA blanco es reconocido de manera específica e hibridado a la superficie de las perlas, las cuales posteriormente son purificadas, concentradas y amplificadas mediante LAMP. Este ensayo no requiere de electroforesis en gel de agarosa y los amplicones pueden ser detectados usando un espectofotómetro arrojando un resultado semicuantitativo. No obstante, el límite de detección es menor al del PCR convencional.

Otra tecnología integrada implementada es el ensayo electroquímico combinado con un potencióstato portable (Nagatani *et al.*, 2011). Esta técnica permite y mediante este, la amplificación es monitoreada usando un software. En el proceso se requiere un reagente electro activo como azul de metileno, este es combinado con el DNA amplificado.

OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

- ✓ Desarrollar y estandarizar la técnica de Amplificación Isotérmica Basada en Horquillas (LAMP) para el diagnóstico de *Babesia bigemina*.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Diseñar cebadores específicos que amplifiquen secuencias conservadas entre diferentes cepas de *B. bigemina* mediante LAMP.
- ✓ Optimizar las condiciones de amplificación del DNA de *B. bigemina* mediante la técnica de LAMP y su visualización.
- ✓ Determinar la sensibilidad y especificidad de LAMP.
- ✓ Evaluar la prueba de LAMP en muestras de DNA de diferentes cepas.

METODOLOGÍA

4.1 DNA genómico

El DNA genómico fue extraído de sangre de bovinos infectados de manera experimental con *B. bigemina*, cepa Chiapas. La sangre se mantuvo a -20°C en el laboratorio. La extracción se realizó con el kit Illustra Blood Genomic Prep Mini Spin Ultra de GE Healthcare® y el kit Wizard® Genomic DNA Purification de Promega según las indicaciones de los fabricantes.

4.2 Diseño de cebadores

De acuerdo a las indicaciones del manual del programa de diseño de cebadores para LAMP (PrimerExplorer, 2016) y a las especificaciones reportadas por Notomi y colaboradores (2000), se diseñaron cebadores especie-específicos sobre secuencias conservadas entre cepas del gen *ama-1* de *B. bigemina*. El procedimiento requirió de diferentes pasos descritos a continuación:

1. Selección del gen candidato: Con base en la revisión de literatura, se seleccionó un gen ya caracterizado y con las propiedades ideales para el uso en técnicas diagnósticas como lo es poseer secuencias específicas de *B. bigemina* y conservadas en todas las cepas secuenciadas a la fecha. Para ampliar sobre las características del gen, ver en la sección 2.2.1.
2. Búsqueda de secuencias de distintas cepas: se obtuvieron las secuencias para este gen de tres formas: 1) de las cepas reportadas en la base de datos de secuencias genéticas GenBank (Centro Nacional para la Información Biotecnológica. NCBI, 2016) disponible en línea en www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/; 2) de las reportadas en la investigación de (Valdez Espinosa, 2015) y 3) de una cepa de Australia la cual está disponible en el sitio web Wellcome Trust Sanger Institute (<http://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/protozoa/babesia-bigemina.html>).

3. Alineamiento múltiple: Una vez obtenidas las secuencias de todas las cepas reportadas, se realizó un alineamiento múltiple con el programa Clustal Omega) (2016) disponible en línea en (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) del Instituto Europeo de Bioinformática. En el Anexo 1 se encuentra el alineamiento de las secuencias completas y parciales encontradas.
4. Selección de la región conservada en las secuencias: sobre el alineamiento múltiple. Se identificó una región de la secuencia del gen que está altamente conservada (99%) entre todas las cepas y aislados. A esta se le consideró como secuencia consenso.
5. Diseño de cebadores: los cebadores fueron diseñados usando dos metodologías: en la primera, las secuencias fueron ubicadas manualmente sobre la secuencia consenso y sus parámetros fueron verificados con el programa OligoAnalyzer versión 3.1 del IDT (Integrated DNA Technologies); por esta vía, se seleccionaron las que cumplieron con la mayoría de las especificaciones mencionadas en el numeral 2.11.2 del presente texto. En la segunda, se utilizó el programa PrimerExplorer versión 5.0 (PrimerExplorer, 2016) desarrollado especialmente para LAMP a partir de la secuencia consenso y se seleccionó uno de los juegos arrojados por el software.
6. Verificación de Identidad: Una vez diseñados los cebadores, cada uno fue analizado con la herramienta bioinformática “Basic Local Alignment Tool” versión 2.6.0 (BLAST, 2016) con el fin de verificar que las secuencias no hibridaran o facilitaran la amplificación de otras especies u otros organismos relacionados.
7. Síntesis de cebadores: los cebadores fueron sintetizados por la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México y por la empresa T4Oligos.
8. Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa: los cebadores fueron evaluados primero por la técnica de PCR para verificar la correcta hibridación, tanto de los cebadores externos como de los internos. La PCR fue llevada a cabo en una mezcla de 25 µl que contenía: 1 µl de DNA, 9.5 µl

de agua libre de nucleasas, 1 µl de cebador forward (F3 o FIP) a una concentración final de 20 pM, 1 µl de cebador backward (B3 o BIP) a una concentración final de 20 pM y 12.5 µl de Master Mix 2X (Promega, Madison, WI, USA). La reacción se realizó en 34 ciclos bajo las siguientes condiciones: 2 minutos a 94°C como paso inicial, 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de alineamiento a 61°C, 40 segundos de extensión a 72°C, y 7 minutos de extensión final a 72°C en un termociclador marca Bio-Rad. El producto amplificado fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 2% corrido a 50 voltios por 40 minutos, teñido con GelRed® y visualizado en un foto-documentador (Bio-Rad®).

4.3 Estandarización y optimización de la reacción de LAMP

La prueba fue estandarizada utilizando DNA extraído de sangre de un animal infectado experimentalmente con *B. bigemina* cepa Chiapas. El volumen inicial de la reacción de LAMP fue de 25µl y las cantidades en concentraciones usadas fueron tomadas de los procedimientos estandarizados previamente en el laboratorio y de las instrucciones del fabricante de la enzima. Incluyó una concentración final de: 0.4 µM de cebadores internos (FIP y BIP), 0.2 µM de cebadores externos (F3 y B3), 10 mM de desoxiribonucleótidos trifosfato (dNTPs), 0.8 M de betaina, 1x de buffer, 6mM de MgSO₄, 8U de *Bst* polimerasa, 250 µM de azul de hidroxinaftol (HNB) y 1 µl del DNA blanco. La enzima, el buffer y el MgSO₄ fueron de la marca New Engly Biolabs®.

Inicialmente, los productos de LAMP fueron evaluados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a un voltaje de 50v por 26 minutos. Para esto, se mezclaron 10 µl del producto de LAMP con 2 µl de Buffer de carga 6x que contenía 0.5% de GelRed®. El gel fue visualizado con ayuda de un foto-documentador (Bio-Rad®).

El primer paso en el desarrollo de la técnica, posterior a la realización de la PCR para comprobar la hibridación de los cebadores individuales, fue la preparación de los reactivos. En los intentos iniciales, cada reactivo era agregado por separado en el momento de hacer la prueba. Posteriormente se preparó, como lo sugieren

(Tanner y Evans, 2014) dos mix de reactivos: el primero contiene todos los juegos de cebadores y, el segundo, abarca la mayoría de los reactivos. En el cuadro 7 se aprecia en corchetes los reactivos que se incluyeron en cada mix.

Para la estandarización de cada juego de cebadores, se realizaron varios procedimientos con el fin lograr una hibridación y amplificación de la prueba. Estos pasos, resumidos en la figura 11, fueron aplicados en orden independiente o en combinación de algunos.

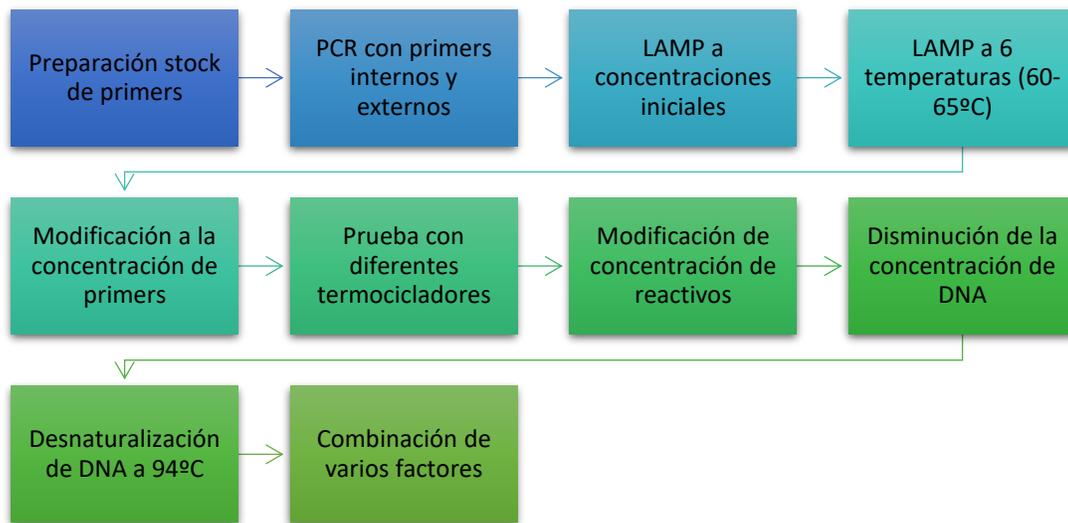


Figura 11. Esquema de procedimientos realizados en la estandarización de la técnica.

La reacción fue evaluada a 6 distintas temperaturas de alineamiento (60 a 65°C). Para confirmar la reacción se utilizó un control positivo de una prueba de LAMP para *B. bovis* previamente desarrollada en el laboratorio y como control negativo una muestra sin DNA de *Babesia bigemina*.

Una vez obtenida una reacción positiva, se procedió a la estandarización de la técnica y a la evaluación de los siguientes factores:

1. Concentración de los cebadores: este aspecto se determinó con base en los reportes de literatura e investigaciones previas del laboratorio. Se hizo una prueba de LAMP para evaluar la relación de los cebadores internos con

respecto a los externos a una relación externos: internos de 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 y 1:6.

2. Tiempo de incubación: La reacción fue probada a diferentes tiempos de incubación estableciendo, de acuerdo a la observación visual y a los resultados de la electroforesis del producto amplificado, el tiempo mínimo necesario para interpretar un resultado positivo. Los tiempos evaluados fueron 15, 30, 45 y 60 minutos. Se utilizó un solo equipo para la reacción y en otro equipo, configurado a 80°C, se introdujeron las muestras una vez terminado su tiempo de incubación para inactivar la enzima.
3. Temperatura de incubación: este aspecto fue evaluado con el fin de establecer la temperatura adecuada para la reacción. Así pues, se realizó la técnica a 60, 61, 62, 63, 64 y 65°C. Para efectuarlo, se utilizó el termociclador con un gradiente de temperatura.
4. Visualización por colorimetría: utilizando azul de hidroxinaftol, se realizó una comparación de la visualización del producto amplificado a diferente temperatura, concentración y tiempo de incubación y se estandarizaron las condiciones necesarias para obtener la coloración ideal.

En el cuadro 7, se presentan las concentraciones iniciales y finales utilizadas una vez estandarizada la técnica, las cantidades usadas fueron seguidas de acuerdo a investigaciones publicadas con anterioridad (Tanner y Evans, 2014; Trangoni *et al.*, 2015).

4.3 Determinación de la especificidad y sensibilidad

La sensibilidad diagnóstica de la técnica se determinó realizando 12 reacciones a diferente concentración de DNA blanco. Para evaluar esto, se partió de una muestra de DNA extraída de un bovino infectado experimentalmente que tenía el 2% de parasitemia y a partir de este, se realizaron diluciones seriadas en agua libre de nucleasas hasta alcanzar una parasitemia aproximada de 10^{-9} .

Para comparar la sensibilidad de la técnica con la sensibilidad de la PCR anidada, que es la técnica de oro molecular para el diagnóstico de Babesiosis por *B. bigemina*, se tomaron como referencia los cebadores, procedimientos y

programas reportados por la OIE (World Organisation for Animal Health, 2014) y por Figueroa *et al.* (1993). Los cebadores utilizados se muestran en el cuadro 8. El programa usado fue el siguiente: desnaturalización de DNA a 95°C por un minuto, un minuto de alineamiento de cebadores a 65°C, 1.5 minutos de extensión a 73°C por un total de 35 ciclos, con una extensión final de 15 minutos a 72°C.

Cuadro 7. Concentración y volumen necesarios para la reacción de LAMP.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
Primer F3	100 µM	0,2 µM
Primer B3	100 µM	0,2 µM
Primer FIP	100 µM	1,6 µM
Primer BIP	100 µM	1,6 µM
Primer FLP	100 µM	0,8 µM
Primer BLP	100 µM	0,8 µM
dNTPs	10mM	1,4 mM
Betaina	4 M	0,8 M
Buffer	10x	1x
MgSO₄	100mM	6 mM
Bst polimerasa	8000 U/µl	8 U/µl
HNB	3mM	120 µM
DNA	-	-
Agua	-	csp* 25 µl

Los corchetes indican que los reactivos señalados fueron mezclados en una solución de trabajo
 * Cantidad suficiente para

La visualización de la amplificación se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa (100V) al 1,5% teñidos con RedGel® y analizado mediante un fotodocumentador (Bio-Rad®).

Por otra parte, para evaluar la especificidad de la prueba de LAMP, se realizó la técnica con DNA genómico de los organismos que pudiesen estar presentes en

una muestra de DNA de *B. bigemina* o bien con DNA genómico de fuentes de contaminación o reacción cruzada. Los DNA utilizados fueron de: *Babesia bovis*, *Anaplasma marginale*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma centrale*, *Trypanosoma theileri*, bovino sano, humano, garrapata *Rhipicephalus microplus* y *Neospora caninum*. Las muestras de DNA de cada especie fueron verificadas previamente con la técnica de PCR y PCR anidado.

Tipo	Secuencia (5'-3')
Externo sentido	CAT-CTA-ATT-TCT-CTC-CAT-ACC-CCT-CC
Externo antisentido	CCT-CGG-CTT-CAA-CTC-TGA-TGC-CAA-AG
Interno sentido	CGC-AAG-CCC-AGC-ACG-CCC-CGG-TGC
Externo antisentido	CCG-ACC-TGG-ATA-GGC-TGT-GTG-ATG

Cuadro 8. Secuencias de cebadores para el diagnóstico de *B. bigemina* mediante PCR anidada.

4.4 Evaluación de la prueba de LAMP para la detección de cepas de *B. bigemina* de distintas zonas geográficas.

Una vez estandarizada la técnica, esta se evaluó para detectar cepas de diferentes partes del mundo. El experimento se realizó con DNA de cepas de México: Chiapas, Colima, Jalisco, Nayarit y Querétaro, que estaban disponibles en el laboratorio de Inmunología y Vacunas de la Universidad Autónoma de Querétaro; cepas de Argentina: S1a, S2p y S3p proporcionadas por el laboratorio de hemoparásitos del Instituto de Biotecnología del Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) en Castelar (Argentina) y, una cepa de Colombia perteneciente a un animal de campo infectado naturalmente suministrada por el Dr. Efraín Benavides Ortiz del grupo de investigación en Epidemiología y Salud Pública de la Universidad de La Salle, Bogotá (Colombia).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Diseño de cebadores

Los oligonucleótidos fueron diseñados a partir de secuencias del gen *ama-1* de *Babesia bigemina*. Gracias al primer reporte hecho por (Torina *et al.*, 2010), donde demuestra el alto grado de similitud entre secuencias nucleotídicas (99,98%) del gen *ama-1* de *B. bigemina*, investigaciones posteriores han usado este gen como blanco de diagnóstico en estudios epidemiológicos. Sivakumar *et al.* (2012) desarrollaron una PCR anidada basada en el gen *ama-1* para detectar *B. bigemina* en bovinos en Mongolia debido a que las secuencias del gen son altamente conservadas y demostraron que la técnica no amplificaba otro parásito en sangre de bovinos sugiriendo alta especificidad de la prueba. También, en el 2015, Elsify *et al.* (2015) desarrollaron un estudio epidemiológico en Egipto y demostraron, además de la presencia del hemoparásito en las regiones estudiadas, un alto grado de conservación entre aislados del país.

Aunque el genoma de otras especies de *Babesia* contienen secuencias de *ama-1* que son homólogas entre sí, ya se demostró que existe cierto grado de diversidad entre diferentes géneros apicomplexos (Tonukari, 2010). Por ejemplo, en *B. microti* se caracterizó el gen y se determinó un alto grado de conservación dentro de la especie y una diversidad característica con otras especies de *Babesia*, incluyendo *B. bigemina* (Moitra *et al.*, 2015). Sin embargo, las herramientas diagnósticas altamente específicas de especie son de suma importancia, especialmente cuando existen infecciones con especies estrechamente relacionadas del parásito; las técnicas que utilicen secuencias de *ama-1* como blanco diagnóstico, son una excelente alternativa (Sivakumar *et al.*, 2012a).

Con respecto al desarrollo de la técnica de LAMP para el diagnóstico de *B. bigemina*, ninguna de las tres investigaciones reportadas previamente usaron a *ama-1* para el diseño de los cebadores de diagnóstico (Iseki *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2016). Por lo cual, el presente trabajo se posiciona como la primera investigación que utiliza esta región conservada para el diagnóstico molecular mediante LAMP de la babesiosis bovina ocasionada por *B. bigemina*.

Se obtuvieron las secuencias nucleotídicas de 32 cepas pertenecientes a 7 países alrededor del mundo. En la figura 12 se muestra la distribución y el número de cepas de cada país. De las 6 cepas del continente americano, 2 pertenecen a México, 1 a Brasil y 4 a Argentina; 1 cepa de Australia, país de Oceanía; del continente europeo se reportan 8 cepas de Italia; 13 cepas del continente africano, específicamente Sudáfrica; y, finalmente 3 cepas de Turquía, país intercontinental de Asia y Europa.

Las secuencias del gen *ama-1* obtenidas fueron utilizadas para seleccionar la región más conservada entre las cepas mediante un alineamiento múltiple. Vale la pena mencionar que, como se observa en el anexo 1, no todas las cepas de la base de datos están completamente secuenciadas, por lo que solo se pudo comprobar verdaderamente el grado de conservación en una región del gen. La base de datos GenBank es una de las principales bases de datos disponible en la web y abierta para cualquier usuario (Baxevanis, 2001), la base de datos GenBank es una de las principales bases de datos disponible en la web y abierta para cualquier usuario. Esta base de datos se actualiza cada 24 horas con la información subida a otras bases de datos en otros servidores en distintas partes del mundo, lo que facilita la búsqueda de secuencias reportadas. De 1788pb que contiene el gen, se analizó una región de 674 pb. Muchas de las cepas reportadas no están completamente secuenciadas y esto, aunado a los estrictos requerimientos para el diseño de cebadores para LAMP, impidió usar la secuencia completa del gen como molde para el diseño de cebadores.

El alineamiento múltiple de todas las cepas se muestra en el anexo 1. Este alineamiento permitió analizar lo siguiente: de las 32 cepas, 18 son secuencias completas del gen y las demás son secuencias parciales. La región completamente secuenciada del gen es de 674pb en todas las cepas con una homología del 94.22%. En esta secuencia parcial existen 39 mutaciones puntuales (5,78%).

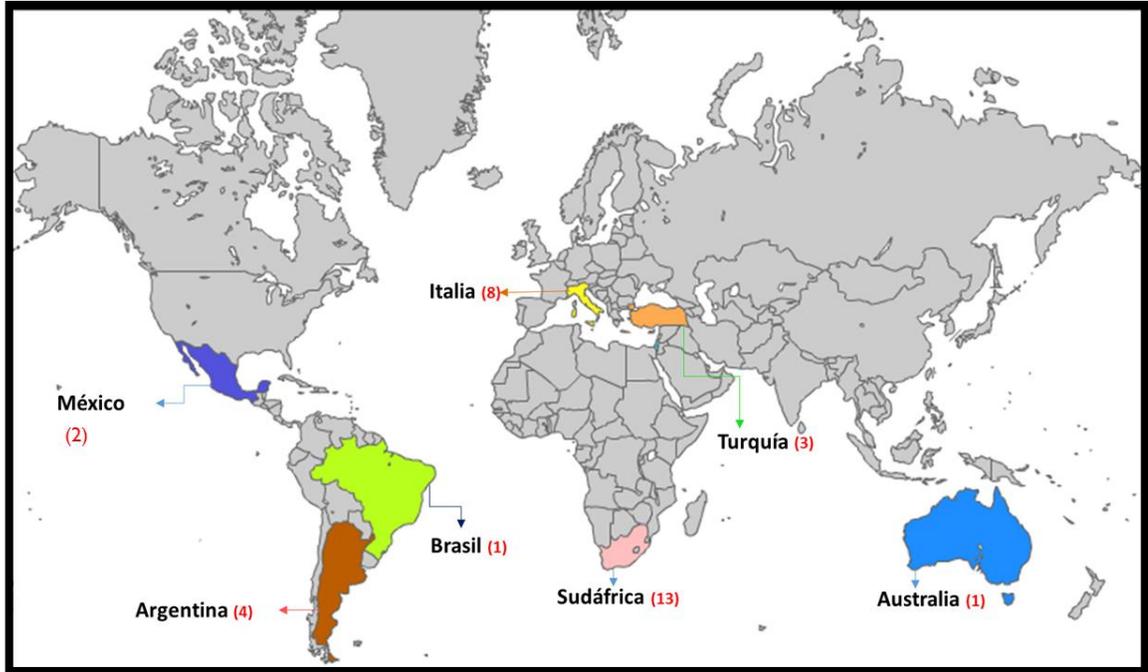


Figura 12. Distribución mundial de las cepas de *B. bigemina* utilizadas para el diseño de los iniciadores.

La secuencia consenso seleccionada para el diseño de cebadores fue la que presentaba un porcentaje de similitud más alto y que estaba secuenciada en todas las cepas. Esta región tiene un tamaño de 262 pb y solo presenta diferencia en 4pb. Comprende del nucleótido 500 al 761.

A continuación, en la figura 13, se muestra la secuencia, los nucleótidos de colores indican que son bases que se diferencian entre cepas, esta secuencia pertenece a la cepa Chiapas, la cual fue usada de referencia para la estandarización de la técnica. La primera base, adenina (**A**), es diferente en *solo* dos cepas, la cepa SP3 de Argentina y la cepa australiana, las cuales poseen una guanina (G) en su lugar. La segunda base (**A**) solo cambia en una cepa de corrientes (Argentina) y al igual que la anterior, en su lugar presenta una G. La tercera base, timina (**T**), es especialmente diferente únicamente en la cepa Chiapas, las otras 17 cepas conservan en su lugar la base C (Citosina). Finalmente, la cuarta base (**G**), *solo* difiere en la cepa australiana que en su lugar tiene una T.

```
GAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTCGCCAGTATCAG
CCGCCGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCCGTTACTAACTGCGCCGAATACGCC
AGCAACATCGTGCCCGTTCCGACCAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGTCTATGATGGA
AAGGAGGAGATGTGTTACATCCTGTACTCGCCGATGCAGTACAACCAGGGAAACCAGGTACTGT
GACGAGGACGG
```

Figura 13. Secuencia consenso utilizada en el diseño de iniciadores donde se aprecia con colores rojo, verde, azul y morado las mutaciones puntuales en algunas de las cepas.

Al alinear estas secuencias con otras conocidas, se puede evidenciar variaciones en docenas a cientos de pares de bases que eventualmente puede generar un efecto funcional sobre la biología del organismo. Estas tecnologías, aplicadas de diferentes formas o en diferentes tiempos, pueden ser la causa de los cambios en los genes secuenciados, pues las nuevas tecnologías y los algoritmos han cambiado significativamente el campo de manera imprevisible (Dolled-Filhart *et al.*, 2013).

Por otro lado, también debe tenerse en cuenta que es posible que haya cierto grado de polimorfismo en la secuencia del gen, pues en el 2015, (Moitra *et al.* (2015) estudiaron seis aislados de pacientes humanos infectados con *B. microti* y demostraron que existe un grado de polimorfismo entre estos, sin embargo, no encontraron efectos significativos sobre la secuencia de aminoácidos. Por el contrario, en *Plasmodium falciparum*, un organismo relacionado con *B. bigemina* se ha identificado un polimorfismo característico de ciertas regiones del gen y lo atribuyen a mecanismos ocasionados por la selección natural (Escalante *et al.*, 2001). Pese a esto, no existen estudios en babesiosis bovina que determinen este aspecto donde incluyan diferentes cepas de los parásitos. Lo que sí está bien reportado es que el gen y la proteína están muy conservadas tanto en *B. bigemina* como en *B. bovis* (Salama *et al.*, 2013; Torina *et al.*, 2016).

En la figura 14 se muestra el alineamiento de la región consenso. La secuencia tiene entre el 99%-100% de similitud entre las cepas y va del nucleótido 500 al 761 en la secuencia completa del gen *ama-1*.

Para el diseño de cebadores se requirió del uso de dos programas informáticos y de varios diseños que se discuten a continuación:

Sobre la secuencia consenso seleccionada y producto de las experiencias previas en el laboratorio, se realizó un primer diseño de cebadores de forma manual que logran cumplir con los requerimientos de cebadores para LAMP. El programa utilizado para verificar cada parámetro inicialmente fue Oligoanalyzer (Integrated DNA Technologies). De este diseño, y después de haber evaluado diferentes aspectos correspondientes a la estandarización que se resumen y enlistan en la figura 11 (Ver en Metodología), no se obtuvo ningún producto amplificado. Por este motivo, se diseñó nuevamente otro juego de cebadores y se probaron con diferentes parámetros de los cuales tampoco se obtuvo resultado alguno. En total se diseñaron 3 juegos de cebadores de forma manual, con Oligoanalyzer y 2 juegos con el programa PrimerExplorer, el cual selecciona automáticamente los cebadores que cumplen en su mayoría, las características requeridas. Las particularidades y la comparación de cada diseño, excepto los usados para la totalidad de los experimentos o los que funcionaron de forma óptima se presentan en el cuadro 8. Una vez verificados todos los requerimientos, se aseguró que cada secuencia seleccionada como cebador cumpliera con el 100% de identidad con todas las cepas de *B. bigemina*. Es importante recalcar que ninguna de las secuencias presenta identidad, según los programas bioinformáticos, a secuencias de *B. bovis* u otros organismos relacionados. Posterior al diseño, se enviaron a sintetizar y se realizó, como se menciona en la metodología, una prueba de PCR para evaluar la correcta hibridación de cebadores internos y externos.

Chiapas GAGCTTCGGCAGGTGCTTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTGCGCAGTAT CAGCCGCGACCTCGTAAGTGGGGTTACAAGGAAACGCCGTACTAAGTGGCCGAATACGCCAGCAAC
 Australian GAGCTTCGGCAGGTGCTTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTGCGCAGTAT CAGCCGCGACCTCGTAAGTGGGGTTACAAGGAAACGCCGTACTAAGTGGCCGAATACGCCAGCAAC
 SF3 GAGCTTCGGCAGGTGCTTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTGCGCAGTAT CAGCCGCGACCTCGTAAGTGGGGTTACAAGGAAACGCCGTACTAAGTGGCCGAATACGCCAGCAAC
 IT2 GAGCTTCGGCAGGTGCTTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTGCGCAGTAT CAGCCGCGACCTCGTAAGTGGGGTTACAAGGAAACGCCGTACTAAGTGGCCGAATACGCCAGCAAC
 IV1 GAGCTTCGGCAGGTGCTTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTGCGCAGTAT CAGCCGCGACCTCGTAAGTGGGGTTACAAGGAAACGCCGTACTAAGTGGCCGAATACGCCAGCAAC
 ITA8CT GAGCTTCGGCAGGTGCTTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTGCGCAGTAT CAGCCGCGACCTCGTAAGTGGGGTTACAAGGAAACGCCGTACTAAGTGGCCGAATACGCCAGCAAC
 ITA7FA GAGCTTCGGCAGGTGCTTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTGCGCAGTAT CAGCCGCGACCTCGTAAGTGGGGTTACAAGGAAACGCCGTACTAAGTGGCCGAATACGCCAGCAAC
 ITA6FA GAGCTTCGGCAGGTGCTTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTGCGCAGTAT CAGCCGCGACCTCGTAAGTGGGGTTACAAGGAAACGCCGTACTAAGTGGCCGAATACGCCAGCAAC
 ITA5RG GAGCTTCGGCAGGTGCTTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTGCGCAGTAT CAGCCGCGACCTCGTAAGTGGGGTTACAAGGAAACGCCGTACTAAGTGGCCGAATACGCCAGCAAC
 ITA4PG GAGCTTCGGCAGGTGCTTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTGCGCAGTAT CAGCCGCGACCTCGTAAGTGGGGTTACAAGGAAACGCCGTACTAAGTGGCCGAATACGCCAGCAAC
 Turkey GAGCTTCGGCAGGTGCTTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTGCGCAGTAT CAGCCGCGACCTCGTAAGTGGGGTTACAAGGAAACGCCGTACTAAGTGGCCGAATACGCCAGCAAC
 Rio GAGCTTCGGCAGGTGCTTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTGCGCAGTAT CAGCCGCGACCTCGTAAGTGGGGTTACAAGGAAACGCCGTACTAAGTGGCCGAATACGCCAGCAAC
 Mexico GAGCTTCGGCAGGTGCTTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTGCGCAGTAT CAGCCGCGACCTCGTAAGTGGGGTTACAAGGAAACGCCGTACTAAGTGGCCGAATACGCCAGCAAC
 MIA GAGCTTCGGCAGGTGCTTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTGCGCAGTAT CAGCCGCGACCTCGTAAGTGGGGTTACAAGGAAACGCCGTACTAAGTGGCCGAATACGCCAGCAAC
 M1P GAGCTTCGGCAGGTGCTTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTGCGCAGTAT CAGCCGCGACCTCGTAAGTGGGGTTACAAGGAAACGCCGTACTAAGTGGCCGAATACGCCAGCAAC
 ITA3 GAGCTTCGGCAGGTGCTTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTGCGCAGTAT CAGCCGCGACCTCGTAAGTGGGGTTACAAGGAAACGCCGTACTAAGTGGCCGAATACGCCAGCAAC
 ITA2 GAGCTTCGGCAGGTGCTTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTGCGCAGTAT CAGCCGCGACCTCGTAAGTGGGGTTACAAGGAAACGCCGTACTAAGTGGCCGAATACGCCAGCAAC
 ITA1 GAGCTTCGGCAGGTGCTTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTGCGCAGTAT CAGCCGCGACCTCGTAAGTGGGGTTACAAGGAAACGCCGTACTAAGTGGCCGAATACGCCAGCAAC
 Bb1NW-C4 GAGCTTCGGCAGGTGCTTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTGCGCAGTAT CAGCCGCGACCTCGTAAGTGGGGTTACAAGGAAACGCCGTACTAAGTGGCCGAATACGCCAGCAAC
 GF-C19 GAGCTTCGGCAGGTGCTTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTGCGCAGTAT CAGCCGCGACCTCGTAAGTGGGGTTACAAGGAAACGCCGTACTAAGTGGCCGAATACGCCAGCAAC
 Bb1GF-C7 GAGCTTCGGCAGGTGCTTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTGCGCAGTAT CAGCCGCGACCTCGTAAGTGGGGTTACAAGGAAACGCCGTACTAAGTGGCCGAATACGCCAGCAAC
 GF-C1 GAGCTTCGGCAGGTGCTTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTGCGCAGTAT CAGCCGCGACCTCGTAAGTGGGGTTACAAGGAAACGCCGTACTAAGTGGCCGAATACGCCAGCAAC
 FS-189 GAGCTTCGGCAGGTGCTTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTGCGCAGTAT CAGCCGCGACCTCGTAAGTGGGGTTACAAGGAAACGCCGTACTAAGTGGCCGAATACGCCAGCAAC
 FS-146 GAGCTTCGGCAGGTGCTTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTGCGCAGTAT CAGCCGCGACCTCGTAAGTGGGGTTACAAGGAAACGCCGTACTAAGTGGCCGAATACGCCAGCAAC
 WC-10284 GAGCTTCGGCAGGTGCTTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTGCGCAGTAT CAGCCGCGACCTCGTAAGTGGGGTTACAAGGAAACGCCGTACTAAGTGGCCGAATACGCCAGCAAC
 WC-851 GAGCTTCGGCAGGTGCTTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTGCGCAGTAT CAGCCGCGACCTCGTAAGTGGGGTTACAAGGAAACGCCGTACTAAGTGGCCGAATACGCCAGCAAC
 MF-C12 GAGCTTCGGCAGGTGCTTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTGCGCAGTAT CAGCCGCGACCTCGTAAGTGGGGTTACAAGGAAACGCCGTACTAAGTGGCCGAATACGCCAGCAAC
 MF-C11 GAGCTTCGGCAGGTGCTTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTGCGCAGTAT CAGCCGCGACCTCGTAAGTGGGGTTACAAGGAAACGCCGTACTAAGTGGCCGAATACGCCAGCAAC
 MF-C1 GAGCTTCGGCAGGTGCTTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTGCGCAGTAT CAGCCGCGACCTCGTAAGTGGGGTTACAAGGAAACGCCGTACTAAGTGGCCGAATACGCCAGCAAC
 DIVA GAGCTTCGGCAGGTGCTTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTGCGCAGTAT CAGCCGCGACCTCGTAAGTGGGGTTACAAGGAAACGCCGTACTAAGTGGCCGAATACGCCAGCAAC
 KZN-C24 GAGCTTCGGCAGGTGCTTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTGCGCAGTAT CAGCCGCGACCTCGTAAGTGGGGTTACAAGGAAACGCCGTACTAAGTGGCCGAATACGCCAGCAAC
 Corrientes GAGCTTCGGCAGGTGCTTTACAAACGCAGGCAACATCCACGGTAATTTGTGCGCAGTAT CAGCCGCGACCTCGTAAGTGGGGTTACAAGGAAACGCCGTACTAAGTGGCCGAATACGCCAGCAAC
 * * * * *
 Chiapas ATCGTGCCTGGTTCGACAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGCT ATGATGGAAGGAGGAGATGTGTACATCCTGTACTGCGCGATGCAAGTACAACCAAGGAAACCAAGTACTGTGACGAGGACCG
 Australian ATCGTGCCTGGTTCGACAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGCT ATGATGGAAGGAGGAGATGTGTACATCCTGTACTGCGCGATGCAAGTACAACCAAGGAAACCAAGTACTGTGACGAGGACCG
 SF3 ATCGTGCCTGGTTCGACAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGCT ATGATGGAAGGAGGAGATGTGTACATCCTGTACTGCGCGATGCAAGTACAACCAAGGAAACCAAGTACTGTGACGAGGACCG
 IT2 ATCGTGCCTGGTTCGACAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGCT ATGATGGAAGGAGGAGATGTGTACATCCTGTACTGCGCGATGCAAGTACAACCAAGGAAACCAAGTACTGTGACGAGGACCG
 IV1 ATCGTGCCTGGTTCGACAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGCT ATGATGGAAGGAGGAGATGTGTACATCCTGTACTGCGCGATGCAAGTACAACCAAGGAAACCAAGTACTGTGACGAGGACCG
 ITA8CT ATCGTGCCTGGTTCGACAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGCT ATGATGGAAGGAGGAGATGTGTACATCCTGTACTGCGCGATGCAAGTACAACCAAGGAAACCAAGTACTGTGACGAGGACCG
 ITA7FA ATCGTGCCTGGTTCGACAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGCT ATGATGGAAGGAGGAGATGTGTACATCCTGTACTGCGCGATGCAAGTACAACCAAGGAAACCAAGTACTGTGACGAGGACCG
 ITA6FA ATCGTGCCTGGTTCGACAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGCT ATGATGGAAGGAGGAGATGTGTACATCCTGTACTGCGCGATGCAAGTACAACCAAGGAAACCAAGTACTGTGACGAGGACCG
 ITA5RG ATCGTGCCTGGTTCGACAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGCT ATGATGGAAGGAGGAGATGTGTACATCCTGTACTGCGCGATGCAAGTACAACCAAGGAAACCAAGTACTGTGACGAGGACCG
 ITA4PG ATCGTGCCTGGTTCGACAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGCT ATGATGGAAGGAGGAGATGTGTACATCCTGTACTGCGCGATGCAAGTACAACCAAGGAAACCAAGTACTGTGACGAGGACCG
 Turkey ATCGTGCCTGGTTCGACAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGCT ATGATGGAAGGAGGAGATGTGTACATCCTGTACTGCGCGATGCAAGTACAACCAAGGAAACCAAGTACTGTGACGAGGACCG
 Rio ATCGTGCCTGGTTCGACAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGCT ATGATGGAAGGAGGAGATGTGTACATCCTGTACTGCGCGATGCAAGTACAACCAAGGAAACCAAGTACTGTGACGAGGACCG
 Mexico ATCGTGCCTGGTTCGACAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGCT ATGATGGAAGGAGGAGATGTGTACATCCTGTACTGCGCGATGCAAGTACAACCAAGGAAACCAAGTACTGTGACGAGGACCG
 MIA ATCGTGCCTGGTTCGACAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGCT ATGATGGAAGGAGGAGATGTGTACATCCTGTACTGCGCGATGCAAGTACAACCAAGGAAACCAAGTACTGTGACGAGGACCG
 M1P ATCGTGCCTGGTTCGACAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGCT ATGATGGAAGGAGGAGATGTGTACATCCTGTACTGCGCGATGCAAGTACAACCAAGGAAACCAAGTACTGTGACGAGGACCG
 ITA3 ATCGTGCCTGGTTCGACAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGCT ATGATGGAAGGAGGAGATGTGTACATCCTGTACTGCGCGATGCAAGTACAACCAAGGAAACCAAGTACTGTGACGAGGACCG
 ITA2 ATCGTGCCTGGTTCGACAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGCT ATGATGGAAGGAGGAGATGTGTACATCCTGTACTGCGCGATGCAAGTACAACCAAGGAAACCAAGTACTGTGACGAGGACCG
 ITA1 ATCGTGCCTGGTTCGACAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGCT ATGATGGAAGGAGGAGATGTGTACATCCTGTACTGCGCGATGCAAGTACAACCAAGGAAACCAAGTACTGTGACGAGGACCG
 Bb1NW-C4 ATCGTGCCTGGTTCGACAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGCT ATGATGGAAGGAGGAGATGTGTACATCCTGTACTGCGCGATGCAAGTACAACCAAGGAAACCAAGTACTGTGACGAGGACCG
 GF-C19 ATCGTGCCTGGTTCGACAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGCT ATGATGGAAGGAGGAGATGTGTACATCCTGTACTGCGCGATGCAAGTACAACCAAGGAAACCAAGTACTGTGACGAGGACCG
 Bb1GF-C7 ATCGTGCCTGGTTCGACAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGCT ATGATGGAAGGAGGAGATGTGTACATCCTGTACTGCGCGATGCAAGTACAACCAAGGAAACCAAGTACTGTGACGAGGACCG
 GF-C1 ATCGTGCCTGGTTCGACAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGCT ATGATGGAAGGAGGAGATGTGTACATCCTGTACTGCGCGATGCAAGTACAACCAAGGAAACCAAGTACTGTGACGAGGACCG
 FS-189 ATCGTGCCTGGTTCGACAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGCT ATGATGGAAGGAGGAGATGTGTACATCCTGTACTGCGCGATGCAAGTACAACCAAGGAAACCAAGTACTGTGACGAGGACCG
 FS-146 ATCGTGCCTGGTTCGACAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGCT ATGATGGAAGGAGGAGATGTGTACATCCTGTACTGCGCGATGCAAGTACAACCAAGGAAACCAAGTACTGTGACGAGGACCG
 WC-10284 ATCGTGCCTGGTTCGACAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGCT ATGATGGAAGGAGGAGATGTGTACATCCTGTACTGCGCGATGCAAGTACAACCAAGGAAACCAAGTACTGTGACGAGGACCG
 WC-851 ATCGTGCCTGGTTCGACAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGCT ATGATGGAAGGAGGAGATGTGTACATCCTGTACTGCGCGATGCAAGTACAACCAAGGAAACCAAGTACTGTGACGAGGACCG
 MF-C12 ATCGTGCCTGGTTCGACAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGCT ATGATGGAAGGAGGAGATGTGTACATCCTGTACTGCGCGATGCAAGTACAACCAAGGAAACCAAGTACTGTGACGAGGACCG
 MF-C11 ATCGTGCCTGGTTCGACAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGCT ATGATGGAAGGAGGAGATGTGTACATCCTGTACTGCGCGATGCAAGTACAACCAAGGAAACCAAGTACTGTGACGAGGACCG
 MF-C1 ATCGTGCCTGGTTCGACAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGCT ATGATGGAAGGAGGAGATGTGTACATCCTGTACTGCGCGATGCAAGTACAACCAAGGAAACCAAGTACTGTGACGAGGACCG
 DIVA ATCGTGCCTGGTTCGACAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGCT ATGATGGAAGGAGGAGATGTGTACATCCTGTACTGCGCGATGCAAGTACAACCAAGGAAACCAAGTACTGTGACGAGGACCG
 KZN-C24 ATCGTGCCTGGTTCGACAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGCT ATGATGGAAGGAGGAGATGTGTACATCCTGTACTGCGCGATGCAAGTACAACCAAGGAAACCAAGTACTGTGACGAGGACCG
 Corrientes ATCGTGCCTGGTTCGACAGAGGACCAAGTACAGGTACCCCTTCGCT ATGATGGAAGGAGGAGATGTGTACATCCTGTACTGCGCGATGCAAGTACAACCAAGGAAACCAAGTACTGTGACGAGGACCG
 * * * * *

Figura 14. Alineamiento múltiple de la secuencia consenso. Asteriscos (*): no existe diferencia en el alineamiento. Espacios en blanco: variación de la secuencia en alguna de las cepas. Letras de colores: nucleótidos que varían en una o dos cepas

Como lo mencionan Tomita *et al.* (2008), un apropiado diseño de cebadores es un aspecto clave en la amplificación génica mediante LAMP. Pese a que los cebadores pueden ser elaborados manualmente, es recomendado el uso del software creado para el diseño de cebadores exclusivos para la técnica debido a que el programa tiene en cuenta las características específicas de los cebadores como el tamaño del amplicón, la cantidad de adeninas y timinas en los extremos de los cebadores internos, temperatura de fusión diferente entre los cebadores, distancia entre cada uno, entre otros.

Los cebadores seleccionados después del análisis *in silico* y mostrados en el cuadro 9, fueron enviados a sintetizar en diferentes tiempos a la unidad de síntesis del IBT de la UNAM (juego 1 abril de 2016 y juego 4 septiembre de 2016). Exceptuando el juego 4, todos los cebadores fueron sometidos a diversas pruebas para lograr una amplificación (figura 11), sin embargo, no se obtuvo amplificación evidente por electroforesis o cambio de coloración. En la figura 15 se observa una imagen típica y compartida en todas las pruebas realizadas sin éxito. El control positivo demuestra el barrido esperado, los carriles 2 al 7 pertenecen a la evaluación de las diferentes temperaturas. Como se puede apreciar, hay una señal fuerte en la parte inferior de la imagen que pertenece a los p cebadores, los cuales no están siendo usados o posiblemente están hibridando entre sí; en la parte de arriba se aprecia de color blanco lo que parece ser una banda y que se atribuye al DNA blanco. Ese mismo patrón fue observado múltiples veces en cada prueba realizada de la cual no se obtuvo amplificación.

En acuerdo con la afirmación de Tomita (2008), deben sintetizarse los cebadores buscando un funcionamiento óptimo, ya que una base puede hacer la diferencia en el rendimiento de los mismos. El poco éxito obtenido inicialmente con los primeros juegos de cebadores puede deberse en sí a un diseño que, aunque fuese apropiado, no cumplía con los requerimientos para llevar a cabo la amplificación.

Cuadro 9. Secuencias y características de cuatro juegos de cebadores diseñados inicialmente.

	Característica	Primer	Juego 1	Juego 2*	Juego 3 Σ	Juego 4 Σ	
Primers externos	Secuencia	F3/B3	TCTGGCGTTCCCCGAGACT/ GCATCGGCGAGTACAGGAT GTAAC	CAACATCGTGCCCGGTT/ GTAGTACAGGTGCGCATC G	GAGCTTCGGCAGGTGCTCTTAC/ CGTCCTCGTCACAGTACCTGGT TC	GAGCTTCGGCAGGTGCTCTTAC/ CCT GGTTCCTGGTTGTAAGTGCATC	
	Tamaño		19/28	18/19	22/24	22/25	
	GC (%)^		63.2/50	61.1/57.9	59.1/58.3	59.1/56	
	Tm (°C)~		61/59.6	56.9/55.7	60.1/60.8	60.1/61.4	
	Horquillas (Δ G)		-1.2/-2.51	-0.43/0.74	-2.12/-1.07	-2.12/-0.44	
	Homodimeros (Δ G)		3.91/6.35	-9.75/-13.8	-6.34/-4.41	-6.34/-7.05	
Primers internos	Secuencia	FIP (F2/F1c)	GCTTCGGCAGGTGCTCTTA CATCGGCGGCTGATACTGG CGACA	GACCAAGTACAGGTACCC CT/TGCATCGGCGAGTACA GGATG T	CACGGTAATTTGTCGCCAGTAT CA GC/GCTGGCGTATTTCGGCGCAG	CACGGTAATTTGTCGCCAGTAT CAGC/GCTGGCGTATTTCGGCGC AGTTAGTAAC	
		BIP (B1c/B2)	CCGTAAGTGGGGTTACAAG GGAAACGCC/TTGGTCCTCT GGTCGGAACC	GTGACGAGGACGGATCAG CG/GCCTCGCTTTTGTACG GTT	GGTCCGACCAGAGGACCAAGT ACAGGTAC/CCTGGTTGTAAGTGC ATCGGCGA	TTCCGACCAGAGGACCAAGTAC AGGTAC/GTACAGGATGTAACAC ATCTCCTCCTTTCC	
	Tamaño	FIP (F2/F1c)	21/22	20/22	26/27	26/27	
		BIP (B1c/B2)	28/20	20/19	30/22	28/30	
	GC (%)^	FIP (F2/F1c)	57.1/63.6	55/54.5	50/55.6	50/55.6	
		BIP (B1c/B2)	57.1/60	65/52.6	56.7/59.1	53.6/46.7	
	Tm (°C)~	FIP (F2/F1c)	59.9/65.2	55.8/60.7	59.8/63.2	59.8/63.2	
		BIP (B1c/B2)	64.4/59.1	60.2/55.9	61.7/60.8	62.5/59.7	
	Horquillas (Δ G)	FIP (F2/F1c)	-1.1/-3.08	-0.73/-1.36	-0.01/-3.47	-0.01/-3.47	
		BIP (B1c/B2)	-2.17/-0.96	-1.41/-0.06	-2.07/-0.43	-0.73/-2.51	
	Homodimeros (Δ G)	FIP (F2/F1c)	-5.09/-5.19	-9.78/-7.05	-5.36/-9.89	-5.36/-9.89	
		BIP (B1c/B2)	-4.95/-4.64	-4.62/-3.65	-4.62/-7.05	-4.64/-6.35	
	* Primers diseñados con PrimerExplorer pero los valores corresponden a los arrojados por Oligoanalyzer						
	Σ A este juego se le diseñó primers Loop						
Σ A este juego se le diseñó un primer Loop Forward							
^ Valor de referencia: 40-60%							
~ Valor de referencia: 59-61°C para F2, F3, B2 y B3; 62-66°C para F1c y B1c							

A concentraciones iniciales (ver en metodología) el juego de cebadores 4 generó una amplificación a 61°C. En el carril 3 de la Figura 16, se observa el barrido característico de la técnica y que corresponde a la evaluación de la reacción a 61°C, mientras que en el carril 9 corresponde al control positivo de *B. bovis*. No se obtuvo amplificación a otras temperaturas.

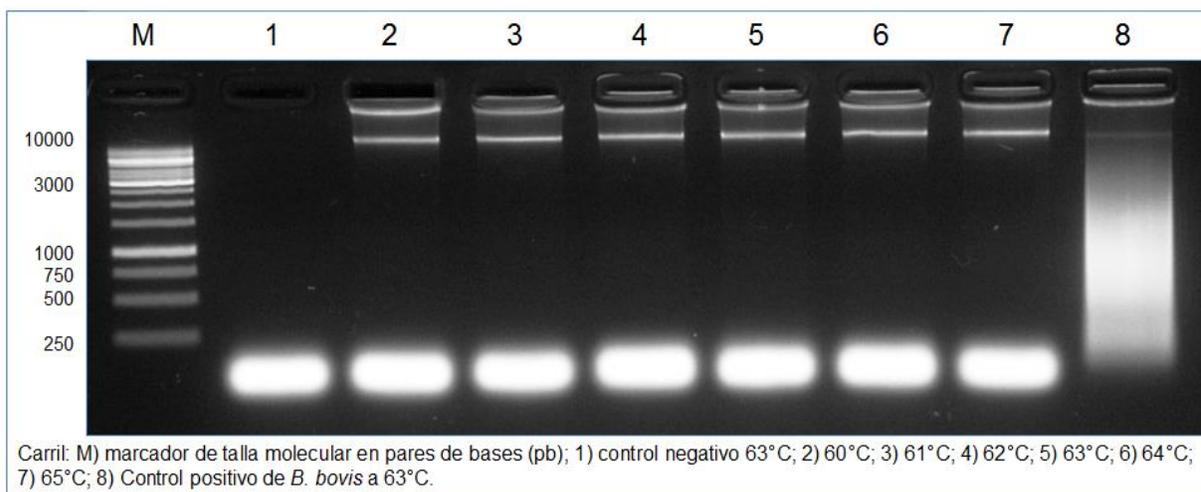


Figura 15. Imagen característica de las pruebas realizadas con diferentes juegos de cebadores y bajo diversas condiciones de amplificación.

A pesar de que, como se observa en el cuadro 8, para este juego se diseñó un cebador Loop forward, las pruebas iniciales se realizaron sin este con el objetivo de que, posterior a la estandarización, se evaluara el efecto sobre la reacción y la técnica funcionara con el mínimo de costos posible.

Cuando se estableció la temperatura adecuada para la reacción, se procedió a realizar los ensayos de sensibilidad y especificidad. No obstante, por errores técnicos, los controles negativos comenzaron a dar resultados positivos lo cual dificultó y retrasó el experimento. Se hicieron los siguientes ajustes: el cambio de reactivos, cambio de stock de cebadores, inclusión de cebador Loop para aumentar la especificidad, entre otros. Sin embargo, las pruebas continuaron arrojando resultados de contaminación. Por tal motivo, se tomó la decisión de sintetizar un nuevo stock de cebadores que serían usados para continuar los ensayos en el

Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas del Instituto de Tecnología Agropecuaria INTA (Castelar, Buenos Aires, Argentina).

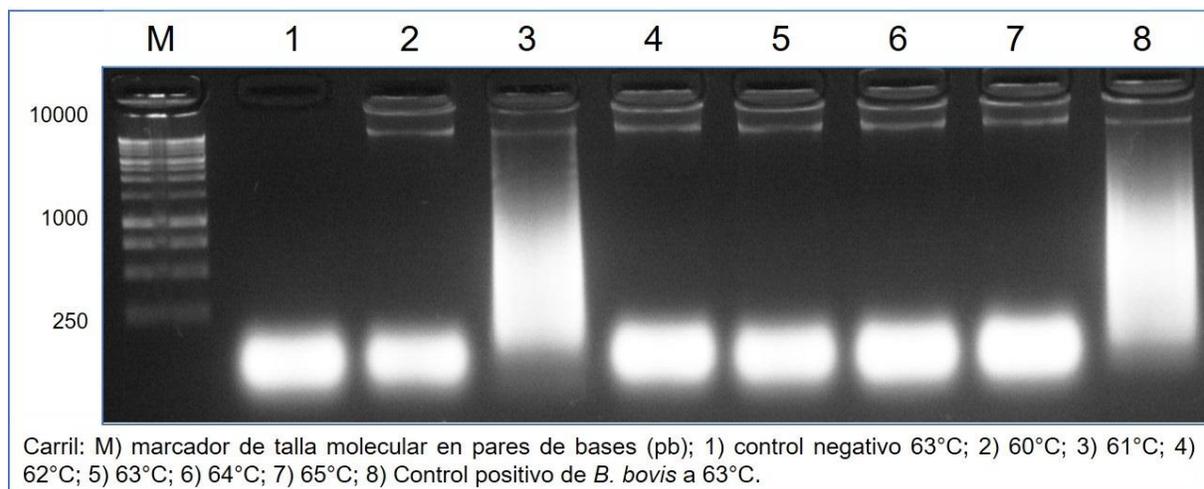


Figura 16. Reacción de LAMP con el juego de cebadores 4 para el diagnóstico de *B. bigemina*.

Estos cebadores, mostraron inicialmente un resultado óptimo, pero cuando se realizaba el mix de cebadores (ver en metodología), dejaban de funcionar e impedían la amplificación. Pensando en esto y con la colaboración del laboratorio de Brucella, Campylobacter y Microbiota del Instituto de Biotecnología en Buenos Aires, se diseñó un quinto juego de cebadores con el programa PrimerExplorer. La síntesis presentó diferencias con los otros juegos sintetizados, en el cuadro 10 se enlistan algunas. Además de utilizar el programa, la presentación de los cebadores cambió, pues los primeros juegos venían resuspendidos y el juego número 5 (el utilizado en toda la investigación) fueron liofilizados, además, los cebadores internos del último juego fueron purificados para eliminar impurezas o bases sobrantes.

En acuerdo con lo mencionado por algunos autores (Tanner y Evans, 2014), la técnica de LAMP es propensa a presentar amplificaciones inespecíficas debido a la cantidad y número de cebadores, así que debe prestarse especial atención en evitar efectos en los cebadores como la formación de dímeros, lo que pudo haber sido el caso del juego de cebadores 4 diseñados. Es por esto que, como lo mencionan los

autores, el uso de programas como PrimerExplorer es recomendable, ya que se evitan automáticamente las secuencias problema.

El riesgo de resultados contaminados con la técnica ya está bien documentado. (Tomita *et al.*, 2008; Tanner y Evans, 2014) afirman que, debido a la extrema sensibilidad de LAMP y al alto nivel de amplificación, existe riesgo de contaminación con los productos amplificados, especialmente cuando el tubo es operado manualmente abriéndolo y cerrándolo para análisis post-reacción. Para evitar este suceso, la preparación de reactivos y muestras deben ser realizadas en un lugar limpio y diferente y con distinto material que se usará para la manipulación del tubo una vez terminada la reacción. Lamentablemente, estos aspectos no fueron tenidos en cuenta inicialmente, pues en el mismo lugar se preparaban las muestras y se realizaba la electroforesis, esto implicó la apertura y cierre de los tubos y ocasionó los resultados contaminados observados en la investigación.

Cuadro 10. Diferencias en la síntesis de los cebadores.

Factor	Juegos 1-4	Juego 5
Síntesis	Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México	T4 Oligo
Presentación	Resuspendidos en agua milli-Q estéril	Liofilizados
Escala se síntesis	100nM	100nM
Purificación	No	Si DST y para FIP y BIP HPLC
Concentración	Difiere entre cebadores	100µM una vez resuspendidos.
DST: Desalado y purificado por filtración en gel HPLC: Cromatografía de líquidos de alta resolución		

Según Tanner y Evans (2014) y Tomita *et al.* (2008), aunque la purificación de cebadores no es un requerimiento estricto, si es un paso recomendado para aumentar la especificidad y reproducibilidad de la prueba. La recomendación indica

que la purificación debe realizarse por HPLC o purificación en gel de principalmente los cebadores internos.

Debido a los óptimos resultados de este último diseño sintetizado, estos fueron utilizados para la totalidad de los experimentos.

Las características de los cebadores se muestran en el cuadro 11. Para este juego se utilizaron los cebadores Loop y se utilizó como stock de trabajo una solución que contiene todos los cebadores a una concentración de 100 μ m (ver en metodología).

Cuadro 11. Características específicas de los cebadores.

Cebador	F3	F2	F1c	B1c	B2	B3	FLP	BLP
Tamaño (# de bases)	20	19	20	22	20	20	21	17
GC (%)	50	53	65	55	55	55	52	65
Tm (°C)	59.4	60.2	65.3	64.1	60.4	60	61.3	60.4
Hairpin (Δ G) 5'/3'	-4.46/ -5.19	-5.09/ -6.25	-6.35/ -6.63	-4.95/ -7.42	-4.13/ -6.19	-5.58/ -5.53	-7.03/ -4.91	-5.41/ -7.53
GC: Contenido de guaninas y citosinas en porcentaje TM: Temperatura de fusión Hairpin: Formación de horquillas								

Las secuencias iniciadoras amplifican un fragmento de 204 pares de bases. La figura 17 esquematiza la distancia en número de bases entre los fragmentos. En letras color rojo se indica el tamaño del fragmento en pares de bases. Los rangos numéricos en letras color negro corresponden a los requerimientos establecidos.

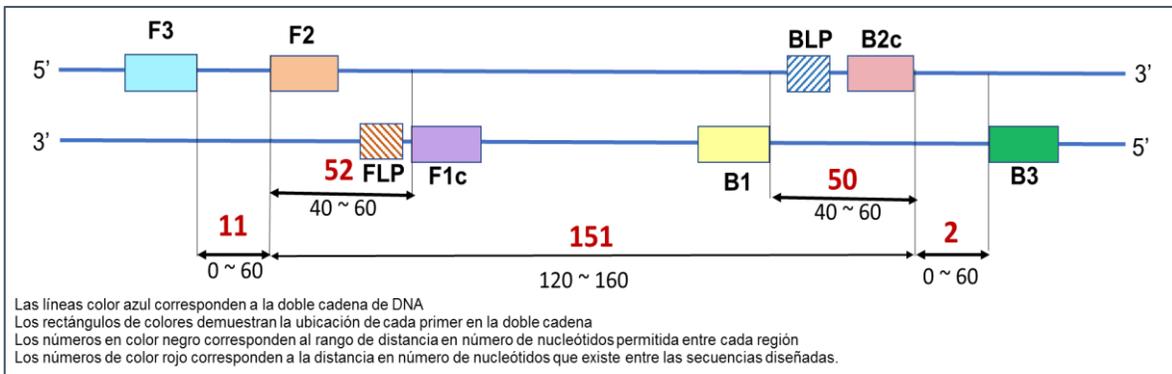


Figura 17. Ubicación de los cebadores en la doble cadena de DNA y distancia en número de bases entre cada una

Como fue mencionado en la revisión bibliográfica, los cebadores loop son usados para acelerar la reacción, además, como lo menciona (Dhama *et al.*, 2014) estos cebadores facilitan la reacción y agrega grandes cantidades de DNA en corto tiempo.

Con la amplificación positiva de este diseño, se inició la siguiente fase en la metodología del proyecto.

5.2 Estandarización y optimización de la reacción de LAMP

Como se menciona en la metodología, los cebadores sintetizados fueron probados inicialmente mediante la técnica de PCR punto final con el fin de comprobar la hibridación de los mismos. Los juegos de cebadores probados, que no funcionaron con LAMP, siempre fueron evaluados mediante la técnica de PCR y, curiosamente, a pesar de que no se generaba la reacción en la técnica de LAMP, si se generaba una amplificación de tamaño esperado con la PCR (imágenes no se muestran). Con el juego de cebadores utilizados al final de la investigación no se realizó la técnica de PCR debido a que se observó una amplificación positiva desde el primer intento con LAMP. El motivo exacto por el cual no funcionaron los juegos de cebadores iniciales se desconoce, sin embargo, como se discute en el apartado anterior, existen factores involucrados principalmente con el diseño que interfieren en el adecuado funcionamiento de la prueba.

Cuadro 12. Concentraciones necesarias para la amplificación.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
Cebador F3	100 μ M	0,2 μ M
Cebador B3	100 μ M	0,2 μ M
Cebador FIP	100 μ M	1,6 μ M
Cebador BIP	100 μ M	1,6 μ M
Cebador FLP	100 μ M	0,8 μ M
Cebador BLP	100 μ M	0,8 μ M
dNTPs	10mM	1,4 mM
Betaína	4 M	0,8 M
Buffer	10x	1x
MgSO₄	100mM	6 mM
Bst polimerasa	8000 U/ μ l	8 U/ μ l
HNB	3mM	120 μ M
DNA	-	-
Agua	-	csp 25 μ l
Los corchetes indican que los reactivos señalados fueron mezclados en una solución de trabajo Csp: Cantidad suficiente para		

Las condiciones iniciales probadas en la mayoría de los experimentos fueron modificadas de acuerdo a reportes en la literatura y a las recomendaciones del

laboratorio de Brucella, Campylobacter y Microbiota del Instituto de Biotecnología del INTA. Las concentraciones finales a las cuales la técnica fue estandarizada y desarrollada se presentan en el cuadro 13.

En la figura 18 se muestra la primera prueba de LAMP efectuada a 63°C a las condiciones especificadas en el cuadro 12 y la visualización del producto por colorimetría y por electroforesis en gel de agarosa. De color morado se observa una reacción negativa a la amplificación y de color azul una amplificación positiva.

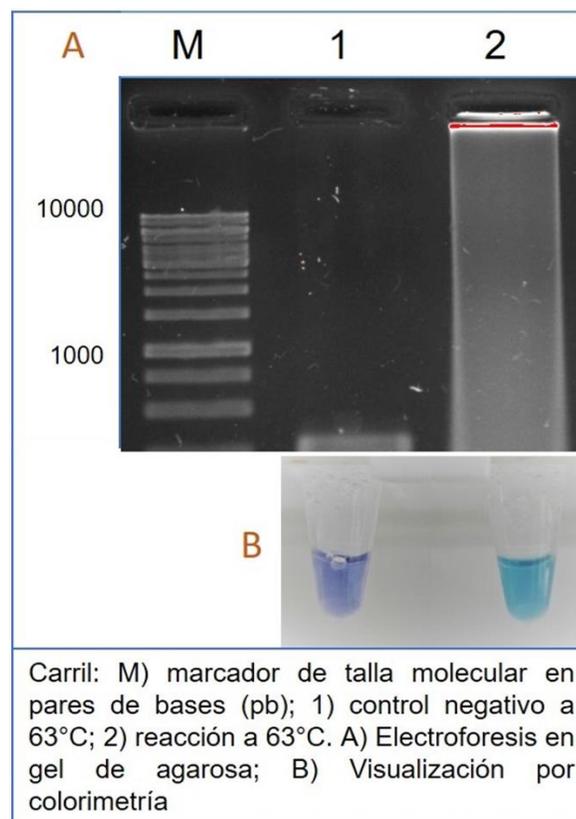


Figura 18. Reacción de LAMP para evaluar los iniciadores en DNA de *Babesia bigemina*.

Las concentraciones finales del cuadro descrito anteriormente, también fueron utilizadas en los experimentos de Trangoni *et al.* (2015) y son muy similares a las recomendadas por el fabricante de la enzima y por el artículo de Tanner y Evans (2014) de la revista *Current Protocols*. No obstante, este factor varía mucho entre las publicaciones, pues cada equipo de investigación lo estandarizan de acuerdo a sus resultados propios. Contrariamente, en la investigación de Liu *et al.* (2012)

utilizaron las mismas concentraciones de reactivos, pero concentraciones elevadas de cebadores (40 μM de internos y 5 μM de externos) que aumentarían innecesariamente el costo de la prueba.

Estudios recientes, dirigidos a simplificar aún más la técnica, han encaminado sus esfuerzos a eliminar reactivos o pasos de la técnica. Ma *et al.* en el 2017, demostraron que el uso de Betaína disminuye en un 1% la eficiencia de reacción y que su uso no es necesario para la prueba de LAMP. Sin embargo, este hecho ha sido muy poco reportado.

Un factor diferencial de la presente investigación fue la eliminación del paso de desnaturalización, paso reportado por Notomi *et al.* en el año 2000. Para efectos de desnaturalización del templado de DNA, antes de comenzar la prueba de LAMP el tubo de reacción es llevado a cabo a una temperatura de 95°C durante 5 minutos. Pese a esta recomendación, y aunque no se comparó este factor, la reacción no necesitó de este paso para llevarse a cabo.

La reacción es finalizada, para inactivar la enzima a 80°C por 5 minutos. Acorde con lo reportado por Biswas y Sakai, (2014), el tiempo de este paso es posible efectuarlo por 2 a 10 minutos.

Dentro de los factores estandarizados, es importante determinar, como se mencionó anteriormente, la temperatura de reacción de la prueba. En la figura 19 se muestra la evaluación de las temperaturas (60-65°C). Los resultados obtenidos indicaron que la amplificación se lleva a cabo en todas las temperaturas evaluadas. Esto es una ventaja competitiva al ofrecer flexibilidad en este factor ya que permite la variación térmica entre los equipos usados para la prueba. Es importante indicar que no se observaron cambios a nivel colorimétrico; todas las temperaturas producen un cambio de coloración de violeta a azul cielo sin diferencias aparentes entre cada una. Este dato es correlacionado con la imagen de la electroforesis, pues no hay mayor evidencia de diferencias entre las temperaturas. Para la realización de las pruebas siguientes del experimento, se seleccionó 63°C como temperatura ideal al ser un punto medio entre el rango de temperaturas que se pueden utilizar.

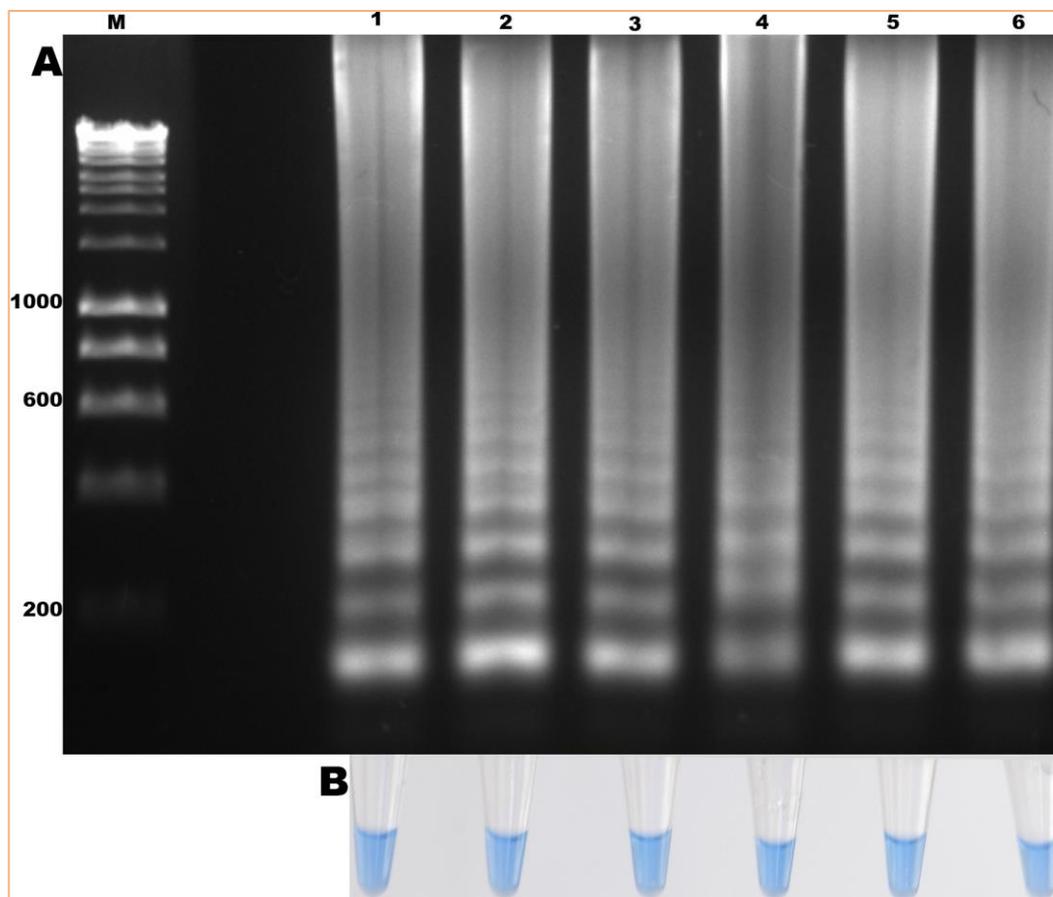


Figura 19. Evaluación de la temperatura de amplificación. Panel A. Electroforesis y panel B. Prueba colorimétrica con azul de hidroxinaftol. Carriles: M) Marcador de talla molecular en pb; 1) 60°C; 2) 61°C; 3) 62°C; 4) 63°C; 5) 64°C y, 6) 65°C. A la izquierda se muestran las tallas moleculares en pb.

También se evaluó el tiempo mínimo necesario para la amplificación del DNA mediante la técnica de LAMP. En una reacción a 63°C, el tiempo mínimo necesario para observar tanto un cambio de coloración como el barrido característico en la electroforesis fue de 30 minutos. En la figura 20, en el panel A, se puede observar cómo a los 15 minutos de reacción todavía se encuentran los cebadores sin utilizar y el DNA sin amplificar (líneas en la parte superior e inferior del carril). Sin embargo, ya es evidente un barrido a los 30 minutos después de haber iniciado la reacción. En cuanto a los cambios colorimétricos, en el panel B, a los 15 minutos aún no es evidente ningún cambio y, a partir de los 30 minutos ya hay un viraje de color de violeta a azul. Se puede apreciar como, a medida que aumenta el tiempo de reacción, el color azul se va haciendo más claro.

Como lo mencionan Notomi *et al.* (2015), pequeñas cantidades de DNA son amplificadas en cortos periodos y el uso de cebadores Loop, aumenta la eficiencia de amplificación. En otras investigaciones, como la de Yang *et al.* (2016), también han evaluado factores como la temperatura y el tiempo de incubación. En cuanto al tiempo de incubación evaluaron de 30 a 60 minutos y reportaron que el tiempo ideal fue de 60 minutos a 64°C, lo que concuerda con la presente investigación. Otras, investigaciones también han evaluado estos factores. Por ejemplo, XiaoBo *et al.* (2016) desarrollaron la técnica de LAMP para el diagnóstico de *Anaplasma marginale* y evaluaron 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos de reacción y concluyeron, acorde a la presente investigación, que 60 minutos es el tiempo adecuado de incubación. Aunque, a diferencia de la presente prueba, los investigadores ya obtenían un barrido desde los 10 minutos de reacción. Después de estandarizar el tiempo y la temperatura de incubación, la técnica de LAMP para diagnosticar *B. bigemina* funcionó con las siguientes características:

Volumen de reacción: 25 µl

Programa: 63°C por 60 minutos y 5 minutos de inactivación de la enzima a 80°C.

5.3 Evaluación de la especificidad y sensibilidad de la prueba de LAMP

Las pruebas de especificidad arrojaron el resultado que se esperaba desde el análisis bioinformático. Cuando se realiza la prueba con DNA de organismos relacionados o con cualquier otro que pudiera estar presente en la reacción, no se obtiene ninguna amplificación inespecífica.

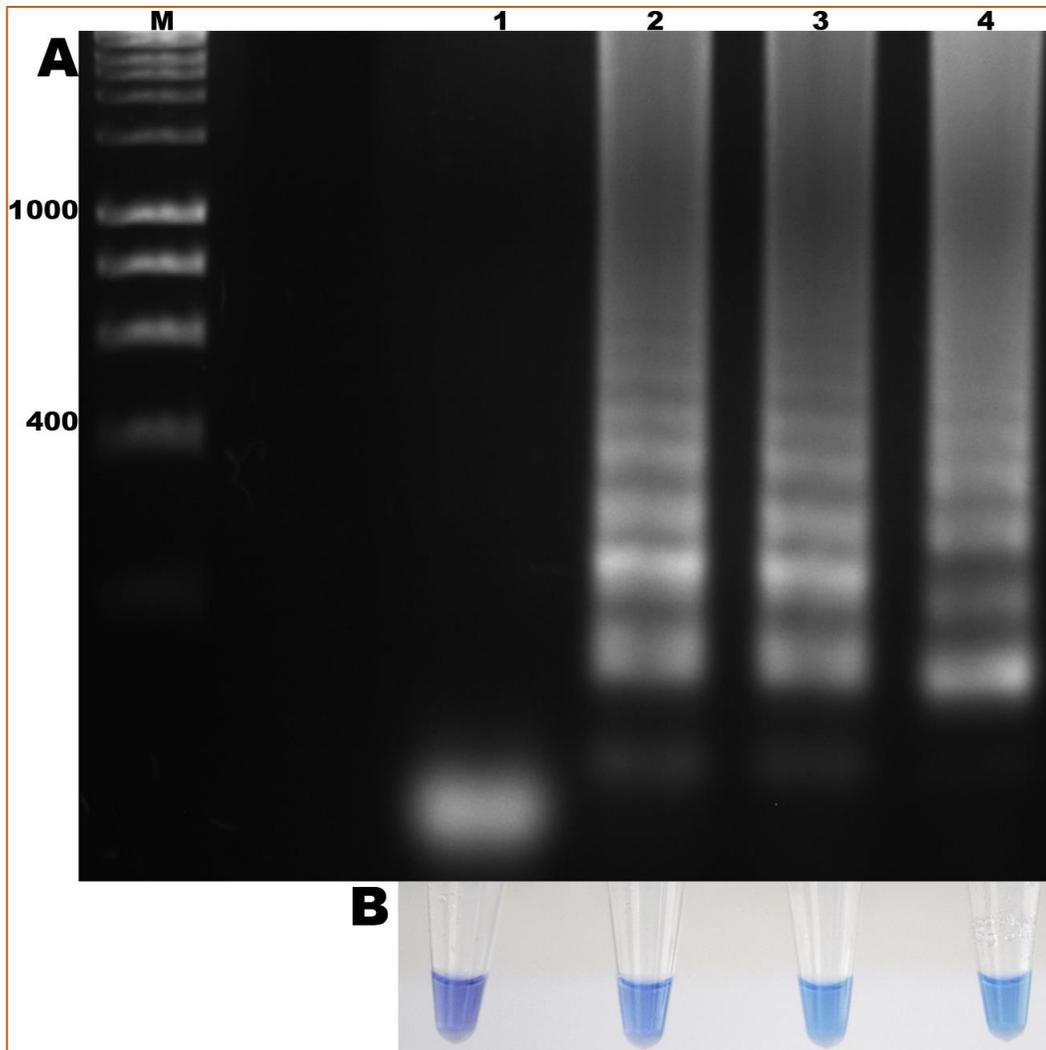


Figura 20. Determinación del tiempo de incubación. Panel A. Electroforesis y panel B. Prueba colorimétrica con azul de hidroxinaftol. Carril: M) Marcador de talla molecular en pb; 1) 15 minutos de reacción; 2) 30 minutos de reacción, 3) 45 minutos de reacción y, 4) 60 minutos de reacción. Del lado izquierdo se observa el marcado de talla molecular.

En la Figura 21 se puede observar en la imagen A la electroforesis en gel de agarosa y en la imagen B el resultado de la visualización por colorimetría. El carril 1 pertenece a la prueba que contiene DNA de *B. bigemina*, los carriles 2 al 10 contienen DNA de otros organismos y el carril 11 es una prueba libre de DNA o prueba control. Se observa la coloración azul característica de una reacción positiva solamente en la muestra que contiene DNA de *B. bigemina*.

En las pruebas de diagnóstico molecular que utilizan el gen *ama-1* como gen blanco de diagnóstico, también han evaluado y dirigido la prueba a que presente como ventaja, alta especificidad diagnóstica. Desde el reporte hecho por Torina *et al.* (2010), varios investigadores han seleccionado este gen para el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico. Sivakumar *et al.* (2012a) desarrollaron la técnica de PCR anidado basada en el gen *ama-1* y compararon los resultados con la técnica de nPCR *Spel-Aval* previamente desarrollada (Figueroa *et al.*, 1993) ya que este último además de *B. bigemina*, amplifica DNA de *B. ovata*. La especificidad de la prueba fue evaluada con DNA de *B. bovis*, *T. orientalis*, *B. ovata*, *T. brucei gambiense* y muestras de sangre de bovinos de Mongolia. Los resultados fueron positivos, la prueba fue específica para la detección de *B. bigemina* constituyéndola como una herramienta de diagnóstico útil. Es así como este estudio molecular dio paso a la investigación de la presencia de la enfermedad en países como Egipto, Myanmar, Sri Lanka, Filipinas y Vietnam (Sivakumar *et al.*, 2012b; Sivakumar *et al.*, 2013; Ybañez *et al.*, 2013; Elsify *et al.*, 2015; Bawm *et al.*, 2016).

Existen tres reportes previos de pruebas de LAMP capaces de detectar *B. bigemina*. El primero, del 2007, consta de una prueba múltiple que detecta de manera simultánea *B. bovis* y *B. bigemina*. Para el diseño de los cebadores se utilizó el gen *rap-1* de *B. bigemina* y se utilizó, en una misma reacción, dos sets de 4 cebadores. Esta prueba fue construida para distinguir entre las dos especies posterior a un análisis de restricción enzimática (Iseki *et al.*, 2007). Pese a que el reporte demuestra tener especificidad y fue estandarizada con DNA de una cepa argentina, la prueba se torna más costosa al tener que hacer uso de mayor cantidad de cebadores, enzima de restricción y diseño de cebadores internos más largos para insertar el sitio de restricción, además, la visualización del producto, al mismo tiempo de que constituye un mayor trabajo y tiempo de la realización de la electroforesis en gel de agarosa, implica conocimiento del patrón de bandas para cada organismo y por consiguiente, los resultados pueden dejarse a subjetividad de quien los interpreta.

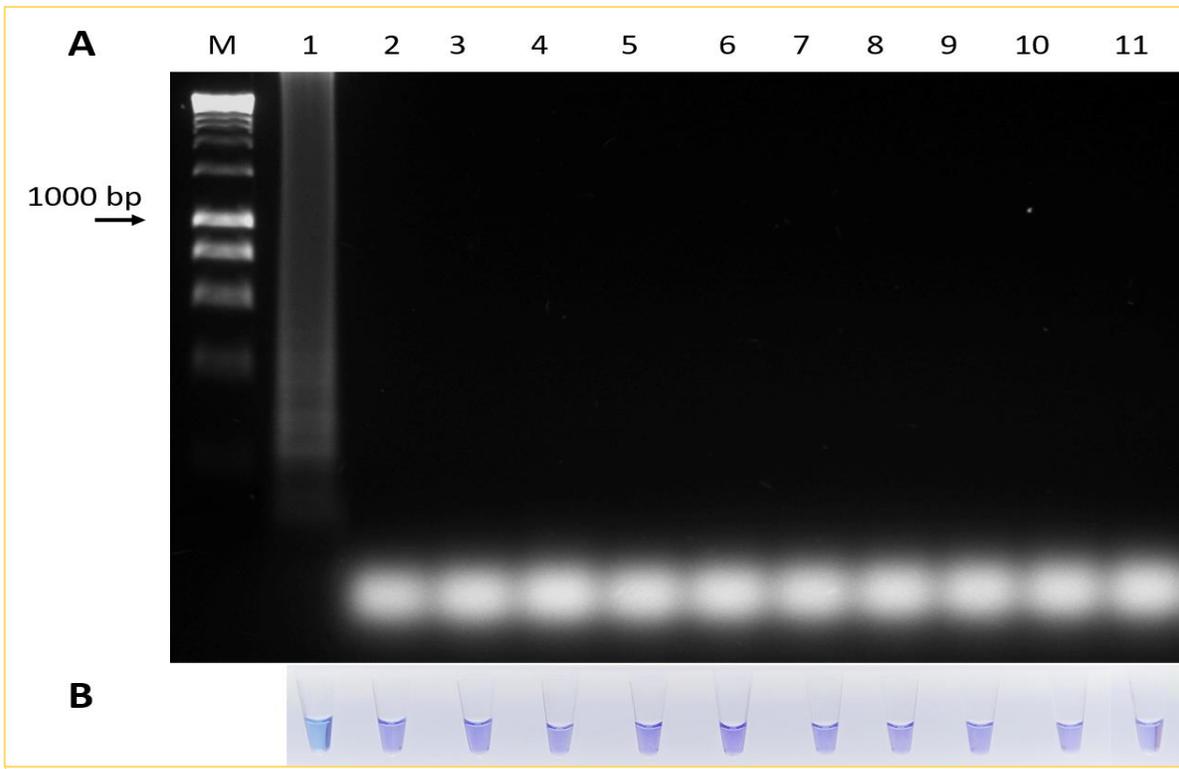


Figura 21. Prueba de especificidad de la técnica de LAMP con DNA de distintos organismos. Panel A. Electroforesis y panel B. Prueba colorimétrica con azul de hidroxinaftol. Carril: M) Marcador de talla molecular en pb; 1) *B. bigemina*; 2) *B. bovis*; 3) *Anaplasma marginale*; 4) *A. phagocytophilum*; 5) *A. centrale*; 6) *Trypanosoma theileri*; 7) bovino; 8) humano; 9) *Rhipicephalus microplus*; 10) *Neospora caninum* y, 11) Control negativo. A la izquierda se observa el marcador de talla molecular.

El segundo, Liu *et al.* en el 2012, desarrollaron la técnica para la detección de cepas de China. Los cebadores fueron diseñados sobre secuencias especie-específicas del espacio transcrito interno y el producto es evaluado mediante electroforesis en gel de agarosa. La prueba de especificidad no demuestra reacción cruzada con organismos como *B. ovata*, *B. major*, *Theileria annulata*, *T. sinensis*, *T. sergenti*, *A. marginale*, o DNA genómico de bovino. Pese a esta ventaja, la técnica no fue desarrollada y probada con cepas de otras partes del mundo, por lo cual, su aplicación se limita al país de desarrollo. El último reporte a la fecha fue realizado por Yang *et al.* (2016). En la investigación, con el objetivo de simplificar y mejorar la técnica, desarrollaron la técnica de LAMP convencional con cebadores diseñados sobre secuencias del gen *Citocromo b* que detectan tanto a *B. bovis* como a *B.*

bigemina y, posteriormente, el producto amplificado era usado en una prueba llamada tiras de flujo lateral que estaban marcadas con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) con el fin de evadir la electroforesis y confirmar el agente etiológico. Esta técnica demostró ser específica y rápida, pero requiere de inversión de dinero para la elaboración de las tiras inmunocromatográficas.

Para realizar el experimento de sensibilidad, se evaluaron diluciones a partir de DNA extraído de sangre que contenía el 2% de parasitemia. El límite de detección de la prueba de LAMP fue de 1×10^{-8} , es decir, es capaz de detectar el 0.00000001% de parasitemia. En la figura 22 se puede observar, en el panel B, como curiosamente la coloración va cambiando a medida que aumenta la dilución de DNA; es evidente el azul claro del carril 2 al carril 9, sin embargo, en los carriles 10 y 11 la coloración se vuelve un poco más azul oscura, sin llegar a ser morada o violeta. También en la última dilución (carril 12), ya se observa una coloración coincidente de amplificación negativa. En el panel A se puede confirmar el mismo resultado mediante la electroforesis. Nótese que las dos formas de visualizar el resultado poseen la capacidad de evidenciar el producto amplificado a la misma dilución, por tanto, se puede afirmar que ambas técnicas poseen la misma sensibilidad para la revelación de la amplificación.

A la hora de comparar la sensibilidad con la técnica de nPCR, como se puede evidenciar en la figura 23, el límite de detección de la misma coincidió con la técnica de LAMP, se observa amplificación hasta la dilución de 1×10^{-8} . No obstante, la realización de esta técnica, como se explicará más adelante, requiere de aproximadamente 7 horas y su practicidad es cuestionable, ya que es una técnica de 2 pasos que implican la apertura del tubo de reacción e incrementa los riesgos de contaminación.

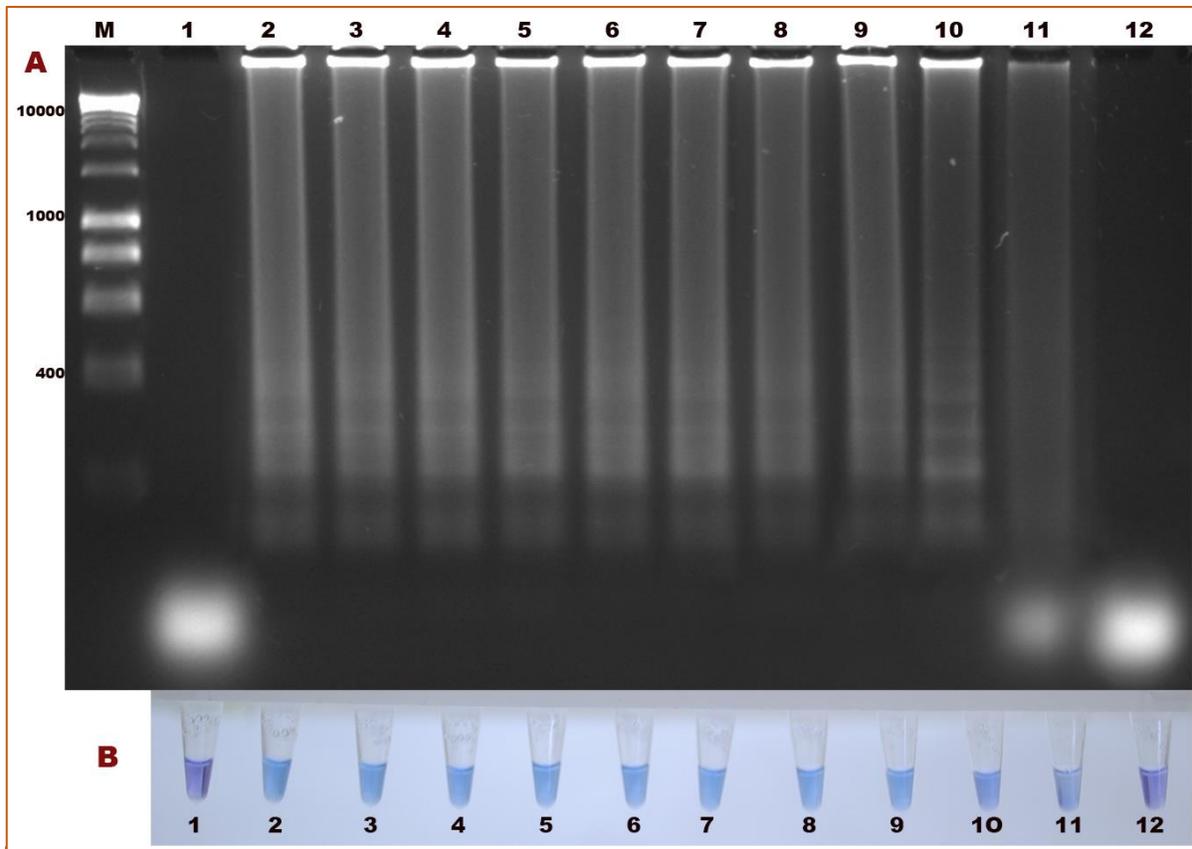


Figura 22. Evaluación de la sensibilidad diagnóstica de la técnica de LAMP. Panel A. Electroforesis y panel B. Prueba colorimétrica con azul de hidroxinaftol. Carril: M) Marcador de talla molecular en pb; 1) Control negativo; 2) 2% de parasitemia; 3) 1% de parasitemia; 4) 1×10^{-1} ; 5) 1×10^{-2} ; 6) 1×10^{-3} ; 7) 1×10^{-4} ; 8) 1×10^{-5} ; 9) 1×10^{-6} ; 10) 1×10^{-7} ; 11) 1×10^{-8} ; 12) 1×10^{-9} .

Existen varios métodos para evaluar la sensibilidad, algunos muy diferentes al realizado en el presente proyecto. Por ejemplo, otros investigadores determinan el límite de detección, a través de diluciones seriadas con concentraciones determinadas con exactitud (Masoji *et al.*, 2017). Así pues, por ejemplo, una concentración de DNA de 50 ng/ μ l es diluída 1/10 hasta llegar a una concentración que contiene 0.5 pg/tubo, posterior a esto se realiza la prueba con las diluciones y se determina la cantidad mínima de DNA necesaria para la amplificación. Este método es el método ideal para la determinación de la sensibilidad; no obstante, en la presente investigación no fue realizada así debido a que no existía la manera cuantitativa de determinar la cantidad específica de DNA del parásito y no se contempló en la metodología al inicio de la investigación.

En el trabajo de Iseki (2007), se evaluó la sensibilidad de LAMP realizando

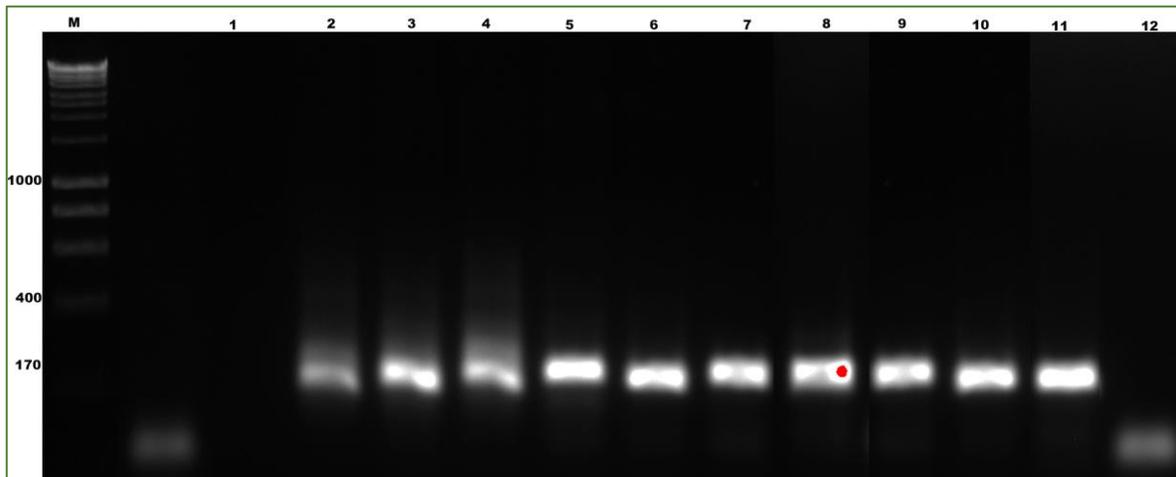


Figura 23. Prueba de sensibilidad de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa anidada. Carril: M) Marcador de talla molecular en pb; 1) Control negativo; 2) 2% de parasitemia; 3) 1% de parasitemia; 4) 1×10^{-1} ; 5) 1×10^{-2} ; 6) 1×10^{-3} ; 7) 1×10^{-4} ; 8) 1×10^{-5} ; 9) 1×10^{-6} ; 10) 1×10^{-7} ; 11) 1×10^{-8} ; 12) 1×10^{-9} .

diluciones seriadas de eritrocitos infectados con eritrocitos sin infectar para alcanzar una concentración de parásitos de 5×10^7 (1%) a 5×10^{10} (0,0000001%) de eritrocitos infectados en 200 μ l de eritrocitos totales. Ellos compararon la prueba con la técnica de PCR anidado y reportaron que el límite de detección de la nPCR fue de 0.00001% (5×10^2 eritrocitos infectados) y de LAMP fue de 0.000001% (5×10^1 eritrocitos infectados), 10 veces más sensible que la nPCR, lo que difiere en poca magnitud con la presente investigación. En la investigación de Liu *et al.* (2012), por su parte, realizaron el análisis de sensibilidad con cantidades conocidas de DNA, el LAMP que desarrollaron fue capaz de detectar 0.1pg/ μ l de DNA, 100 veces más sensible cuando lo compararon con la PCR tiempo final. Desgraciadamente, no es posible realizar una comparación en estos términos. Finalmente, en la investigación de Yang *et al.* (2016), evaluaron la sensibilidad a través de diluciones seriadas de DNA cuya concentración fue determinada por espectrofotometría. Con esta metodología LAMP fue capaz de detectar 0.85 fg de DNA, 100 veces más sensible que el PCR punto final (85 fg). Esta investigación tampoco es posible confrontarla con la presente, menos cuando la metodología de cuantificación no asegura que el DNA pertenece en su totalidad al DNA del parásito.

Por mencionar y comparar, trabajos como el de Wen *et al.* (2016) para diagnosticar *A. marginale* reportaron que la técnica de LAMP fue 100 veces más sensible que la PCR punto final, resultados similares fueron reportados por Xie *et al.*, (2013) para diagnosticar *Theileria equi*.

Por otro lado, el trabajo hecho por Alhassan *et al.* (2007), quienes desarrollaron la técnica de LAMP para diagnosticar piroplasmosis en equinos, arrojó que la sensibilidad es la misma con el método de LAMP y de PCR.

5.4 Validación de la prueba de LAMP con DNA de cepas de *B. bigemina* de distintas zonas geográficas.

Con el fin de comprobar en gran medida que la técnica es capaz de detectar cualquier cepa de *B. bigemina* del mundo, los experimentos incluyeron cepas de diferentes regiones de México como Chiapas, Colima, Jalisco, Nayarit y Querétaro, y de dos países de América del Sur; Argentina (tres cepas) y Colombia (1 aislado de campo). Como puede observarse en la figura 24, la técnica tiene la capacidad de amplificación del DNA de todas las cepas, y de acuerdo a los cambios colorimétricos y a la electroforesis, la amplificación es óptima y los resultados son muy evidentes.

Es importante mencionar que de Argentina se evaluaron 3 cepas y la cepa de Colombia pertenece a un animal infectado naturalmente. En los reportes de la técnica de LAMP anteriores, no evaluaron la detección de diferentes cepas por lo cual el presente trabajo se constituye como la primera prueba de LAMP que demuestra detectar *B. bigemina* de diferentes países. Esto quiere decir que la prueba puede ser aplicada con confianza en muchas partes del mundo

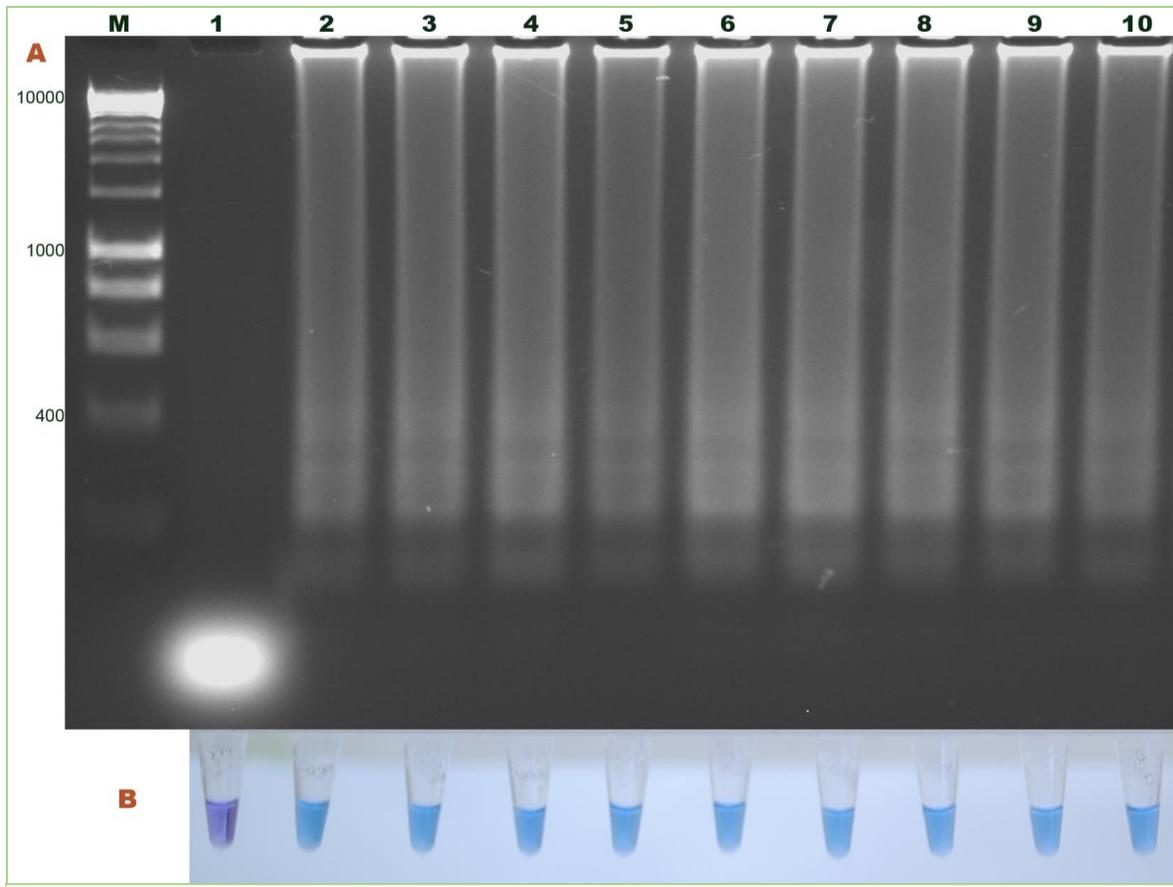


Figura 24. Detección de cepas de *B. bigemina* mediante la técnica de LAMP. Carril: M) Marcador de talla molecular en pb; 1) Control negativo. México: 2) Chiapas; 3) Colima; 4) Jalisco; 5) Nayarit; 6) Querétaro. Argentina: 7) S1a; 8) S2p; 9) S3p; 10) Colombia.

Ybañez *et al.* (2013) realizaron un estudio epidemiológico en Filipinas y demostraron que las secuencias de aislados de 9 áreas del país eran idénticas entre sí y que, del mismo modo, las identidades fueron altas en cepas de países como Brasil, Estados Unidos, Argentina, Turquía, Italia y Sri Lanka; sin embargo, los autores concluyen que con secuencias tan cortas no es posible afirmar que son totalmente conservadas. Por otro lado, Sivakumar *et al.* (2013) evaluaron las secuencias del gen de diferentes países y algunas provincias de Vietnam y reportaron que las secuencias vietnamitas pertenecían a un único y diferente clado del árbol filogenético, sin embargo, las secuencias continúan siendo conservadas entre sí (98.6-99.1%) y son diagnosticadas con los mismos cebadores reportados en el 2012. Elsify *et al.* (2015), por su parte, condujeron un estudio epidemiológico

en bovinos y búfalos de cuatro provincias en Egipto utilizando los cebadores reportados también en el 2012. En este trabajo, ellos analizaron el grado de conservación entre 15 aislados de diferentes áreas geográficas del país el cual osciló entre el 95.3 y 100%.

En general, los pocos reportes de estudios realizados con el gen *ama-1* lo caracterizan por ser un gen conservado entre aislados y cepas y divergente de otras especies relacionadas, lo cual lo hace un excelente candidato para el desarrollo de técnicas que utilicen secuencias de este gen como blanco diagnóstico.

5.5 Estimación del costo de la prueba por animal

Para evaluar el costo de cada prueba en términos de reactivos para diagnosticar *B. bigemina* mediante LAMP, se estimó el valor de cada reactivo con precios actualizados en 2017. En el cuadro 13 se discrimina el costo total de reactivos, el volumen de presentación, el volumen usado para cada reacción de 25 μ l y el costo en pesos mexicanos (MXN) de cada uno por reacción teniendo en cuenta la concentración final requerida para cada una. La mayoría de los valores pueden fluctuar de acuerdo al comportamiento del dólar y otros factores, es por esto que el cuadro presenta una estimación a la fecha. Es importante resaltar que en las estimaciones, falta incluir el costo de materiales (tubos de PCR, puntas estériles, guantes, pipetas, etc.) y del equipo o baño de maría.

Como se puede observar en la tabla, es una técnica muy económica. Incluso, el costo total de cada prueba se puede disminuir a la mitad al disminuir el volumen de la reacción a la mitad. Los experimentos realizados en esta investigación demostraron que la técnica es útil incluso a una reacción de 10 μ l (datos no mostrados); por lo que, para términos de un diagnóstico económico, el costo de una prueba podría reducirse a 18 pesos mexicanos. Es importante mencionar que, el único equipo que se tendría que comprar es un baño de maría (el cual incluso se puede acondicionar).

Cuadro 13. Estimación del costo de reactivos por prueba. Estimación hecha en pesos mexicanos en Junio del 2017.

Reactivo	Costo total en MXN	Volumen en μ l del stock	Volumen en μ l por reacción	Costo en MXN por reacción
Cebador F3	\$227.36	561.1	0.05	\$0.02
Cebador B3	\$227.36	618.7	0.05	\$0.02
Cebador FIP	\$1,081.35	153.6	0.4	\$2.82
Cebador BIP	\$1,115.40	229.5	0.4	\$1.94
Cebador FLP	\$238.72	561.8	0.2	\$0.08
Cebador BLP	\$193.25	782.1	0.2	\$0.05
dNTP Mix	\$3,523.47	500	3.5	\$24.66
Betaina	\$947.72	10000	5	\$0.04
Buffer	\$775.23	1500	2.5	\$1.29
MgSO4	\$775.23	1500	1.5	\$0.78
HNB	\$8,775.40	10000	1	\$0.00065
Bst Pol	\$775.23	200	1	\$3.88
Agua	\$3.00	5000	7	\$0.00420
TOTAL				\$35.59
Cada reacción es de 25 μ l				
HNB: Azul de Hidroxinaftol				
Bst Pol: Enzima Bst polimerasa				

Si se comparan los costos con una PCR anidada para diagnosticar el mismo organismo, teniendo en cuenta los costos de: cebadores, PCR Master Mix, agua libre de nucleasas, agarosa, RedGel® y marcador de talla molecular, el precio de estos reactivos es de 24 pesos mexicanos. Sin embargo, falta incluir el precio del buffer TAE para la electroforesis. Es importante tener presente dos aspectos: primero, el material necesario para una nPCR es mayor, pues es una reacción de dos pasos por lo que se requiere el doble de tubos para PCR, el doble de puntas estériles, charolas y paletas para pesar agarosa, recipientes para diluir agarosa, recipientes para preparar TAE, más guantes, entre otros; segundo, los equipos necesarios como el termociclador, la cámara de electroforesis, la fuente de poder, una báscula de precisión, un horno de microondas, un fotodocumentador y un computador tienen un precio mucho más elevado que un simple baño de maría.

Evidentemente, el costo de una nPCR vista desde todos los términos ya mencionados, es mucho mayor al de un LAMP.

Por otro lado, la comparación a nivel económico no se limita meramente al costo de reactivos, materiales y equipos. Existen otros factores en los que también se ahorra dinero mediante una prueba de LAMP. Estos factores, por ejemplo, podrían ser el tiempo de prueba, menor posibilidad de falsos positivos y falsos negativos, las instalaciones necesarias y otros factores que se discuten en la siguiente sección.

5.6 Ventajas de LAMP

A continuación, se mencionan y discuten las ventajas de LAMP y se compara, al mismo tiempo, con otra técnica molecular como la PCR y sus variantes.

La técnica de LAMP ha sido considerada como una clase de tecnología de detección novedosa y está siendo ampliamente usada demostrando ventajas competitivas. Primero comparado con los métodos tradicionales de diagnóstico, la especificidad de LAMP es extremadamente alta. Los cuatro cebadores son específicamente diseñados para reconocer 6 regiones diferentes en el DNA blanco. Si alguno de los cebadores no hibrida correctamente, la reacción no ocurre y el hecho de que sea necesario que los 6 cebadores hibriden elimina, en teoría, la amplificación inespecífica. Segundo, se ha demostrado que LAMP es de 10 a 1000 veces más sensible que una PCR; es capaz de detectar 10 copias o incluso menos de templado de DNA. Es decir, la prueba puede ser usada para la detección de una enfermedad en estadios tempranos de la infección, en animales sin signos clínicos aparentes o en animales portadores (Li *et al.*, 2017).

LAMP posee alta eficiencia de amplificación, pues toma menos tiempo que cualquier otra técnica molecular de rutina como la PCR. Esta ventaja es atribuida a que no es necesario escoger un complejo de condiciones variables de temperaturas; al amplificar el DNA 10^9 - 10^{10} veces en 15 a 60 minutos, se ahorra una hora o más de reacción comparada con una PCR tiempo final.

La técnica es más estable que una PCR o PCR en tiempo real. Es segura en un rango de temperatura y pH y a un amplio rango de tiempo de elongación. Esta estabilidad es útil en caso de muestras no procesadas o procesadas de forma incompleta donde algunos componentes tratan de impedir la reacción. Trazas de sangre entera, medio de cultivo, N-acetil cisteína, NaCl, anticoagulante o componentes anticomplemento pueden inhibir la enzima Taq polimerasa y por lo tanto la PCR no detecta el DNA blanco. Sin embargo, LAMP puede tolerar estos componentes (Kaneko *et al.*, 2007). La cadena de frío es una necesidad mientras se prepara el mix para una PCR; esto no es un mandato en el caso de LAMP. Los

inhibidores de la Taq polimerasa en muestras como orina y heces no tienen efecto sobre la LAMP (Dhama *et al.*, 2014).

Una de las ventajas más atractivas de LAMP es su bajo costo y fácil operación. Por ejemplo, se puede tomar tejido directamente del animal enfermo y realizar la técnica sin cultivar la bacteria separadamente o realizar extracción de DNA (Nagamine *et al.*, 2001). Al mismo tiempo, debido a su habilidad para amplificar ácidos nucleicos a condiciones isotérmicas permite el uso de equipos de reacción costo-efectivos como un simple baño de maría y evade la inversión en equipos costosos como el termociclador.

La técnica también permite en cierto modo la portabilidad, pues al no requerir equipos especializados, esta puede ser implementada “fuera del laboratorio” o en laboratorios de baja complejidad o instituciones de diagnóstico (Boehme *et al.*, 2007).

Finalmente, la cualidad más importante de LAMP es que posibilita interpretar los resultados de manera visual mediante diferentes métodos como la colorimetría. Como se menciona en el texto, la superioridad del colorante HNB se da debido a que además de ser económico, no es necesario abrir el tubo de reacción finalizado el tiempo de incubación (Goto *et al.*, 2009). Además, como lo mencionan Wastling *et al.* (2010), quienes compararon diversos métodos de detección visual, el HNB es el mejor método de detección visual debido a su facilidad de aplicación, costo y sensibilidad.

La técnica de PCR anidada (nPCR), catalogada como la prueba molecular de oro para el diagnóstico de *B. bigemina*, ha sido ampliamente usada como se ha mencionado en el presente texto. Al ser la técnica molecular recomendada por la OIE, es pertinente realizar una comparación con la prueba de LAMP que se desarrolló para demostrar las ventajas competitivas que tiene esta última sobre la técnica convencional. En el cuadro 14 se puede observar la comparación de varios factores.

Cuadro 14. Comparación de la técnica de LAMP con la técnica de PCR anidada. Adaptada de: Han, (2013) y Biswas y Sakai (2014).

	PCR anidada	LAMP
Especificidad	Regular	Alta
Sensibilidad	Alta	Alta
Cuantificación	No	Si
Purificación de DNA/RNA	Si	No necesariamente
Procesamiento	Dos veces	Una vez
Tiempo requerido para los resultados	7 horas	1.5 horas
Método de detección	Electroforesis en gel de agarosa	Visual
Riesgo de contaminación	+++	++
Equipo requerido	Termociclador, cámara de electroforesis, fuente de poder, computador fotodocumentador, balanza, horno de microondas	Baño de maría
Portabilidad	No	Si
Costo	Alto	Bajo
Detección de más de un patógeno en la misma reacción	No	Si

La especificidad de LAMP para amplificar DNA de *B. bigemina* desarrollada en este trabajo fue alta, se comparó bioinformáticamente y se demostró que no amplifica DNA de otros organismos relacionados. Sivakumar *et al.* (2012a), reportaron que la técnica de PCR anidada desarrollada por Figueroa (1993) y cuyos cebadores son recomendados para diagnóstico por la OIE, también amplifican *Babesia ovata*; por tal motivo en el cuadro se describe la especificidad de esta técnica como regular. La sensibilidad de ambas pruebas es alta, como se discute en la sección 5.3, las dos técnicas en el presente estudio demostraron tener el mismo límite de detección. La opción de cuantificación del producto amplificado es posible realizarla en LAMP, como lo expusieron Tanner *et al.* (2012) quienes

desarrollaron una técnica cuantitativa y múltiple que detecta más de 3 patógenos al tiempo, sin necesidad de procedimientos posteriores a la reacción.

El tiempo requerido para obtener un resultado está relacionado con los pasos para el procesamiento. Sin contar con el tiempo de extracción de DNA, el tiempo requerido para cada paso de la PCR anidada, según el protocolo reportado por Figueroa (1993) es de 2 horas con 30 minutos, eso quiere decir que tan solo en el tiempo en el termociclador son 5 horas de reacción. A esto debe adicionársele 30 a 40 minutos de procesamiento pre-reacción (descongelación de reactivos, limpieza y desinfección de zona de trabajo, preparación de material y rotulado de tubos, estimación de cantidades, entre otros) y una hora de procesamiento pos-reacción donde se implica el enfriamiento de la muestra y toda la metodología necesaria para la electroforesis (carga, corrida y revelado). En total, para realizar esta técnica se necesitan de 6 ½ a 7 horas. Afortunadamente, para una prueba de LAMP se requiere únicamente 30 minutos de procesamiento pre-reacción y 1 hora con 5 minutos en el equipo, lo que en total es 1 hora con 35 minutos para obtener resultados.

Debido a la sensibilidad de las dos técnicas, ambas poseen un riesgo alto de contaminación, sin embargo, el hecho de que la PCR anidada sea de dos pasos e implique la apertura del tubo de reacción incrementa exponencialmente este riesgo.

Finalmente, la técnica de LAMP para el diagnóstico de *B. bigemina* descrita aquí, cumple con los requisitos que debe cumplir un test de diagnóstico ideal de acuerdo a los criterios de la Organización Mundial de la Salud: 1) sensibilidad; 2) especificidad; 3) bajo costo; 4) simplicidad; 5) rapidez; 6) adoptable a cualquier tipo de variación climática y 7) fácil disponibilidad de instrumentos y equipos (Njiru, 2012).

CONCLUSIONES

- ✓ Se desarrollo y estandarizó la técnica de Amplificación Isotermica basada en Horquillas (LAMP) para el diagnóstico de *Babesia bigemina*.
- ✓ Se diseñaron cebadores específicos que amplifican secuencias conservadas entre diferentes cepas de *B. bigemina* mediante LAMP.
- ✓ Logró optimizarse las condiciones de amplificación del DNA de *B. bigemina* mediante la técnica de LAMP y su visualización.
- ✓ Se determinó la sensibilidad y especificidad de LAMP.
- ✓ Se evaluó la prueba de LAMP en muestras de DNA de *B. bigemina* de diferentes zonas geográficas del mundo.

LITERATURA CITADA

- Ahmed, J. 2002. The role of cytokines in immunity and immunopathogenesis of pirolasmoses. *Parasitol. Res.* 88:S48–S50.
- Alhassan, A., O. M. M. Thekiso, N. Yokoyama, N. Inoue, M. Y. Motloang, P. A. Mbat, H. Yin, Y. Katayama, T. Anzai, C. Sugimoto, and I. Igarashi. 2007. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for diagnosis of equine piroplasmosis. *Vet. Parasitol.* 143:155–160.
- Angus, B. M. 1996. The History of the Cattle Tick *Boophilus microplus* in Australia and Achievements in its Control. *Int. J. Parasitol.* 12:1341–1355.
- Araújo, F. R., C. R. Madruga, C. R. Leal, M. A. Schenk, R. H. Kessler, A. P. Marques, and D. C. Lemaire. 1998. Comparison between enzyme-linked immunosorbent assay, indirect fluorescent antibody and rapid agglutination tests in detecting antibodies against *Babesia bovis*. *Vet. Parasitol.* 74:101–108.
- Babes, V. 1888. Sur l'hémoglobulinurie bactérienne du boeuf. *CR Acad Sci.* 107:692–694.
- Babes, V. 1892. L'étiologie d'une enzootic des moutons dénommée "Carceag" en Roumanie. *CR Acad Sci Paris.* 115:359–361.
- Babesia bigemina* - Wellcome Trust Sanger Institute. 2016. Available from: <http://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/protozoa/babesia-bigemina.html>
- Barré, N., and G. Uilenberg. 2010. Spread of parasites transported with their hosts: case study of two species of cattle tick. *Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot.* 29:149–160, 135–147.
- Bawm, S., L. L. Htun, N. N. Maw, T. Ngwe, Y. Tosa, T. Kon, C. Kaneko, R. Nakao, T. Sakurai, H. Kato, and K. Katakura. 2016. Molecular survey of *Babesia* infections in cattle from different areas of Myanmar. *Ticks Tick-Borne Dis.* 7:204–207.
- Baxevanis, A. D. 2001. Information Retrieval from Biological Databases. In: *Bioinformatics: A practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*. Segunda. John Wiley & Sons, Inc. p. 155–186.
- Benavides, E. 1985. Consideraciones con relación a la epizootiología de anaplasmosis y babesiosis en los bovinos. *Rev. ICA.* 20:69–75.
- Benavides, E. 2002. Epidemiología y control de los hematozoarios y parásitos tisulares que afectan al ganado. *Carta Fedegan.* 112–134.

Benavides, E., N. Polanco, O. Vizcaino, and Ó. Betancur. 2012. Criterios y protocolos para el diagnóstico de hemoparásitos en bovinos. *Rev. Cienc. Anim.* 0:31–49.

Benavides, E., J. Romero, and L. Villamil. 2016. Las garrapatas del ganado bovino y los agentes de enfermedad que transmiten en escenarios epidemiológicos de cambio climático. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), Costa Rica.

Bishop, J. P., and L. G. Adams. 1973. Combination thin and thick blood films for the detection of *Babesia* parasitemia. *Am. J. Vet. Res.* 34:1213–1214.

Biswas, G., and M. Sakai. 2014. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for detection and identification of aquaculture pathogens: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98:2881–2895.

Blackman, M. J., and L. H. Bannister. 2001. Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. *Mol. Biochem. Parasitol.* 117:11–25.

BLAST. 2016. National Center for Biotechnology Information NCBI. Available from: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Bock, R., L. Jackson, A. De Vos, and W. Jorgensen. 2004a. Babesiosis of cattle. *Parasitology.* 129:S247–S269.

Bock, R., L. Jackson, A. De Vos, and W. Jorgensen. 2004b. Babesiosis of cattle. *Parasitology.* 129:S247–S269.

Boehme, C. C., P. Nabeta, G. Henostroza, R. Raqib, Z. Rahim, M. Gerhardt, E. Sanga, M. Hoelscher, T. Notomi, T. Hase, and M. D. Perkins. 2007. Operational Feasibility of Using Loop-Mediated Isothermal Amplification for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Microscopy Centers of Developing Countries. *J. Clin. Microbiol.* 45:1936–1940.

Böse, R., W. K. Jorgensen, R. J. Dalgliesh, K. T. Friedhoff, and A. J. de Vos. 1995. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Vet. Parasitol.* 57:61–74.

Brayton, K. A., A. O. T. Lau, D. R. Herndon, L. Hannick, L. S. Kappmeyer, S. J. Berens, S. L. Bidwell, W. C. Brown, J. Crabtree, D. Fadrosch, T. Feldblum, H. A. Forberger, B. J. Haas, J. M. Howell, H. Khouri, H. Koo, D. J. Mann, J. Norimine, I. T. Paulsen, D. Radune, Q. Ren, R. K. Smith Jr., C. E. Suarez, O. White, J. R. Wortman, D. P. Knowles Jr., T. F. McElwain, and V. M. Nene. 2007. Genome Sequence of *Babesia bovis* and Comparative Analysis of Apicomplexan Hemoprotozoa. *PLoS Pathog.* 3:e148.

Brown, W. C., and G. H. Palmer. 1999. Designing blood-stage vaccines against *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Parasitol. Today Pers. Ed.* 15:275–281.

Buening, G. M., A. Barbet, P. Myler, S. Mahan, V. Nene, and T. C. McGuire. 1990. Characterization of a repetitive DNA probe for *Babesia bigemina*. *Vet. Parasitol.* 36:11–20.

Buling, A., A. Criado-Fornelio, G. Asenzo, D. Benitez, J. C. Barba-Carretero, and M. Florin-Christensen. 2007. A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Vet. Parasitol.* 147:16–25.

Cacciò, S., C. Cammà, M. Onuma, and C. Severini. 2000. The beta-tubulin gene of *Babesia* and *Theileria* parasites is an informative marker for species discrimination. *Int. J. Parasitol.* 30:1181–1185.

Callow, L. L. 1979. Some aspects of the epidemiology and control of bovine babesiosis in Australia. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 50:353–356.

Carson, C. A., H. M. Brandt, J. B. Jensen, C. W. Bailey, and G. K. Allen. 1994. Use of random amplified polymorphic DNA analysis to compare *Babesia bovis* and *B. bigemina* isolates. *Parasitol. Res.* 80:312–315.

Castellano, A. 1994. Advances in the diagnosis of anaplasmosis and babesiosis infections. In: *Use of Applicable Biotechnological Methods for Diagnosing Haemoparasites: Proceedings of the Expert Consultation, Mérida, Mexico, 4-6 October 1993.* Food & Agriculture Org.

Centro Nacional para la Información Biotecnológica. NCBI. 2016. GenBank. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

Centro Nacional para la Información Biotecnológica. NCBI. 2017. Taxonomy browser. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=5866>

Chauvin, A., E. Moreau, S. Bonnet, O. Plantard, and L. Malandrin. 2009. *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Vet. Res.* 40:37.

Chou, P.-H., Y.-C. Lin, P.-H. Teng, C.-L. Chen, and P.-Y. Lee. 2011. Real-time target-specific detection of loop-mediated isothermal amplification for white spot syndrome virus using fluorescence energy transfer-based probes. *J. Virol. Methods.* 173:67–74.

Clark, J. S. 1951. Texas fever in Oklahoma. *Chron. Okla.* 29:429–443.

Clustal Omega. 2016. Instituto Europeo de Bioinformática. Available from: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

Criado-Fornelio, A. 2007. A review of nucleic-acid-based diagnostic tests for Babesia and Theileria, with emphasis on bovine piroplasms. *Parassitologia*. 49 Suppl 1:39–44.

Criado-Fornelio, A., A. Buling, G. Asenzo, D. Benitez, M. Florin-Christensen, A. Gonzalez-Oliva, G. Henriques, M. Silva, A. Alongi, A. Agnone, A. Torina, and C. R. Madruga. 2009. Development of fluorogenic probe-based PCR assays for the detection and quantification of bovine piroplasmids. *Vet. Parasitol.* 162:200–206.

Criado-Fornelio, A., A. Martinez-Marcos, A. Buling-Saraña, and J. C. Barba-Carretero. 2003. Molecular studies on Babesia, Theileria and Hepatozoon in southern Europe. Part I. Epizootiological aspects. *Vet. Parasitol.* 113:189–201.

Demessie, Y., and S. Derso. 2015. Tick Borne Hemoparasitic Diseases of Ruminants: A Review. *Adv. Biol. Res.* 9:210–224.

Dhama, K., K. Karthik, S. Chakraborty, R. Tiwari, S. Kapoor, A. Kumar, and P. Thomas. 2014. Loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP): a new diagnostic tool lights the world of diagnosis of animal and human pathogens: a review. *Pak. J. Biol. Sci. PJBS.* 17:151–166.

Dolled-Filhart, M. P., M. Lee, C. Ou-Yang, R. R. Haraksingh, and J. C.-H. Lin. 2013. Computational and bioinformatics frameworks for next-generation whole exome and genome sequencing. *ScientificWorldJournal.* 2013:730210.

Eiken Chemical Co., Ltd. A guide to LAMP primer designing.

El-Ashker, M., H. Hotzel, M. Gwida, M. El-Beskawy, C. Silaghi, and H. Tomaso. 2015. Molecular biological identification of Babesia, Theileria, and Anaplasma species in cattle in Egypt using PCR assays, gene sequence analysis and a novel DNA microarray. *Vet. Parasitol.* 207:329–334.

Elsify, A., T. Sivakumar, M. Nayel, A. Salama, A. Elkhtam, M. Rizk, O. Mosaab, K. Sultan, S. Elsayed, I. Igarashi, and N. Yokoyama. 2015. An epidemiological survey of bovine Babesia and Theileria parasites in cattle, buffaloes, and sheep in Egypt. *Parasitol. Int.* 64:79–85.

Escalante, A. A., H. M. Grebert, S. C. Chaiyaroj, M. Magris, S. Biswas, B. L. Nahlen, and A. A. Lal. 2001. Polymorphism in the gene encoding the apical membrane antigen-1 (AMA-1) of Plasmodium falciparum. X. Asembo Bay Cohort Project. *Mol. Biochem. Parasitol.* 113:279–287.

Estrada-Peña, A., A. Bouattour, J.-L. Camicas, A. Guglielmone, I. Horak, F. Jongejan, A. Latif, R. Pegram, and A. R. Walker. 2006. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus Boophilus (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. *Exp. Appl. Acarol.* 38:219–235.

Figueroa, J. V., L. P. Chieves, G. S. Johnson, and G. M. Buening. 1992. Detection of *Babesia bigemina*-infected carriers by polymerase chain reaction amplification. *J. Clin. Microbiol.* 30:2576–2582.

Figueroa, J. V., L. P. Chieves, G. S. Johnson, 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. *Vet. Parasitol.* 50:69–81.

Florin-Christensen, M., C. E. Suarez, A. E. Rodriguez, D. A. Flores, and L. Schnittger. 2014. Vaccines against bovine babesiosis: where we are now and possible roads ahead. *Parasitology.* 1–30.

Goff, W. L., W. C. Johnson, J. B. Molloy, W. K. Jorgensen, S. J. Waldron, J. V. Figueroa, O. Matthee, D. S. Adams, T. C. McGuire, I. Pino, J. Mosqueda, G. H. Palmer, C. E. Suarez, D. P. Knowles, and T. F. McElwain. 2008. Validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Babesia bigemina* antibodies in cattle. *Clin. Vaccine Immunol. CVI.* 15:1316–1321.

Goodger, B. V., and D. F. Mahoney. 1974. Evaluation of the passive haemagglutination test for the diagnosis of *Babesia argentina* infection in cattle. *Aust. Vet. J.* 50:246–249.

Goto, M., E. Honda, A. Ogura, A. Nomoto, and K.-I. Hanaki. 2009. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *BioTechniques.* 46:167–172.

Graham, O. H., and J. L. Hourrigan. 1977. Eradication programs for the arthropod parasites of livestock. *J. Med. Entomol.* 13:629–658.

Grisi, L., R. C. Leite, J. R. de S. Martins, A. T. M. de Barros, R. Andreotti, P. H. D. Cançado, A. A. P. de León, J. B. Pereira, and H. S. Villela. 2014. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet. Braz. J. Vet. Parasitol. Orgao Of. Col. Bras. Parasitol. Vet.* 23:150–156.

Gubbels, J. M., A. P. de Vos, M. van der Weide, J. Viseras, L. M. Schouls, E. de Vries, and F. Jongejan. 1999. Simultaneous Detection of Bovine *Theileria* and *Babesia* Species by Reverse Line Blot Hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 37:1782–1789.

Guglielmone, A. A. 1995. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Vet. Parasitol.* 57:109–119.

Han, E.-T. 2013. Loop-mediated isothermal amplification test for the molecular diagnosis of malaria. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 13:205–218.

Hodgson, J. L. 1992. Biology and Transmission of *Babesia bigemina* in *Boophilus microplus*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 653:42–51.

Homer, M. J., I. Aguilar-Delfin, S. R. Telford, P. J. Krause, and D. H. Persing. 2000. Babesiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 13:451–469.

Iseki, H., A. Alhassan, N. Ohta, O. M. M. Thekiso, N. Yokoyama, N. Inoue, A. Nambota, J. Yasuda, and I. Igarashi. 2007. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine *Babesia* parasites. *J. Microbiol. Methods.* 71:281–287.

Jaroenram, W., W. Kiatpathomchai, and T. W. Flegel. 2009. Rapid and sensitive detection of white spot syndrome virus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *Mol. Cell. Probes.* 23:65–70.

Johnston, L. a. Y., G. Leatch, and P. N. Jones. 1978. The Duration of Latent Infection and Functional Immunity in Droughtmaster and Hereford Cattle Following Natural Infection with *Babesia Argentina* and *Babesia Bigemina*. *Aust. Vet. J.* 54:14–18.

Jonsson, N. N., R. E. Bock, and W. K. Jorgensen. 2008. Productivity and health effects of anaplasmosis and babesiosis on *Bos indicus* cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia. *Vet. Parasitol.* 155:1–9.

Kaneko, H., T. Kawana, E. Fukushima, and T. Suzutani. 2007. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 70:499–501.

Kiatpathomchai, W., W. Jaroenram, N. Arunrut, S. Jitrapakdee, and T. W. Flegel. 2008. Shrimp Taura syndrome virus detection by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *J. Virol. Methods.* 153:214–217.

Kim, C.-M., L. B. C. Blanco, A. Alhassan, H. Iseki, N. Yokoyama, X. Xuan, and I. Igarashi. 2008. Development of a rapid immunochromatographic test for simultaneous serodiagnosis of bovine babesioses caused by *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78:117–121.

Kivaria, F. M. 2006. Estimated direct economic costs associated with tick-borne diseases on cattle in Tanzania. *Trop. Anim. Health Prod.* 38:291–299.

Levine, N. D. 1971. Taxonomy of the Piroplasms. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 90:2–33.

Lew, A., and W. Jorgensen. 2005. Molecular approaches to detect and study the organisms causing bovine tick borne diseases: babesiosis and anaplasmosis. *Afr. J. Biotechnol.* 4:292–302.

Li, Y., P. Fan, S. Zhou, and L. Zhang. 2017. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A novel rapid detection platform for pathogens. *Microb. Pathog.* 107:54–61.

Liu, A., G. Guan, P. Du, H. Gou, Z. Liu, J. Liu, M. Ma, J. Yang, Y. Li, Q. Niu, Q. Ren, Q. Bai, H. Yin, and J. Luo. 2012. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method based on two species-specific primer sets for the rapid identification of Chinese *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Parasitol. Int.* 61:658–663.

Lohmeyer, K. H., J. M. Pound, M. A. May, D. M. Kammlah, and R. B. Davey. 2011. Distribution of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* (Acari: Ixodidae) infestations detected in the United States along the Texas/Mexico border. *J. Med. Entomol.* 48:770–774.

Ma, C., Y. Wang, P. Zhang, and C. Shi. 2017. Accelerated isothermal nucleic acid amplification in betaine-free reaction. *Anal. Biochem.*

Mackenstedt, U., M. Gauer, P. Fuchs, F. Zapf, E. Schein, and H. Mehlhorn. 1995. DNA measurements reveal differences in the life cycles of *Babesia bigemina* and *B. canis*, two typical members of the genus *Babesia*. *Parasitol. Res.* 81:595–604.

Mahoney, D. F. 1962. Bovine babesiosis: diagnosis of infection by a complement fixation test. *Aust. Vet. J.* 38.

Mahoney, D. F. 1969. Bovine babesiosis: a study of factors concerned in transmission. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 63:1–14.

Mahoney, D. F. 1977. The diagnosis of babesiosis in Australia. In: *Workshop on Hemoparasites (Anaplasmosis and Babesiosis)*. Centro Internacional de Agricultura Tropical. CIAT. Colombia. p. 49–65.

Manjunathachar, H. V., B. C. Saravanan, M. Kesavan, K. Karthik, P. Rathod, M. Gopi, P. Tamilmahan, and B. L. Balaraju. 2014. Economic importance of ticks and their effective control strategies. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 4:S770–S779.

Manual terrestre: OIE - World Organisation for Animal Health. 2014. Available from: <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-terrestre/>

Martins, T. M., O. C. Pedro, R. A. Caldeira, V. E. do Rosário, L. Neves, and A. Domingos. 2008. Detection of bovine babesiosis in Mozambique by a novel seminested hot-start PCR method. *Vet. Parasitol.* 153:225–230.

Masoji, V. ., R. . Zende, R. . Suryawanshi, V. . Vaidya, R. . Waghamare, D. . Kshirsagar, and A. . Shirke. 2017. Rapid Detection of *Salmonella* spp. in Animal Origin Foods by In-House Developed Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 6:2523–2532.

Mehlhorn, H., and E. Shein. 1984. The piroplasms: life cycle and sexual stages. *Adv. Parasitol.* 23:37–103.

Mewes, H. W., R. Doelz, and D. G. George. 1994. Sequence databases: an indispensable source for biotechnological research. *J. Biotechnol.* 35:239–256.

Mihalca, A. D., V. Cozma, E. Şuteu, A. Marinculic, and p Boireau. 2010. The quest for piroplasms: from Babeş and Smith to molecules. *Sci Parasitol.* 11:14–19.

Minjauw, B., and A. McLeod. 2003. Tick-borne diseases and poverty. The impact of ticks and tickborne diseases on the livelihood of small-scale and marginal livestock owners in India and eastern and southern Africa. Available from: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=GB2012100456>

Mitchell, G. H., A. W. Thomas, G. Margos, A. R. Dluzewski, and L. H. Bannister. 2004. Apical Membrane Antigen 1, a Major Malaria Vaccine Candidate, Mediates the Close Attachment of Invasive Merozoites to Host Red Blood Cells. *Infect. Immun.* 72:154–158.

Moitra, P., H. Zheng, V. Anantharaman, R. Banerjee, K. Takeda, Y. Kozakai, T. Lepore, P. J. Krause, L. Aravind, and S. Kumar. 2015. Expression, Purification, and Biological Characterization of Babesia microti Apical Membrane Antigen 1. *Infect. Immun.* 83:3890–3901.

Mori, Y., M. Kitao, N. Tomita, and T. Notomi. 2004. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 59:145–157..

Mori, Y., K. Nagamine, N. Tomita, and T. Notomi. 2001. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289:150–154.

Mori, Y., and T. Notomi. 2009. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J. Infect. Chemother. Springer Sci. Bus. Media BV.* 15:62–69.

Morzaria, S., J. Katende, A. Kairo, V. Nene, and A. Musoke. 1992. New methods for the diagnosis of Babesia bigemina infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 87 Suppl 3:201–205.

Mosqueda, J. J., A. Falcon, J. A. Ramos, G. Canto, and M. Camacho-Nuez. 2012. Estrategias genómicas y moleculares para el control de la babesiosis bovina. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 3:51–59.

Mosqueda, J., A. Olvera-Ramirez, G. Aguilar-Tipacamú, and G. J. Canto. 2012. Current advances in detection and treatment of babesiosis. *Curr. Med. Chem.* 19:1504.

Murrell, A., and S. C. Barker. 2003. Synonymy of Boophilus Curtice, 1891 with Rhipicephalus Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Syst. Parasitol.* 56:169–172.

Nagamine, K., T. Hase, and T. Notomi. 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol. Cell. Probes.* 16:223–229.

Nagamine, K., K. Watanabe, K. Ohtsuka, T. Hase, and T. Notomi. 2001. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a nondenatured template. *Clin. Chem.* 47:1742–1743.

Nagatani, N., K. Yamanaka, M. Saito, R. Koketsu, T. Sasaki, K. Ikuta, T. Miyahara, and E. Tamiya. 2011. Semi-real time electrochemical monitoring for influenza virus RNA by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification using a USB powered portable potentiostat. *The Analyst.* 136:5143–5150.

Navarrete, I., F. . Serrano, and D. Reina. 1999. Babesiosis. In: *Parasitología Veterinaria*. Vol. 1. McGraw-Hill Interamericana de España, S.A.U., España.

Njiru, Z. K. 2012. Loop-Mediated Isothermal Amplification Technology: Towards Point of Care Diagnostics. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6.

Notomi, T., Y. Mori, N. Tomita, and H. Kanda. 2015. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *J. Microbiol. Seoul Korea.* 53:1–5.

Notomi, T., H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, and T. Hase. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28:E63.

Organización Mundial de Sanidad Animal. OIE. 2015. Sistema Mundial de Información zoonosológica. WAHIS-Wild Interface. Available from: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahidwild.php/Index/indexcontent/newlang/es

Palmer, G. H. 1991. Development of diagnostic reagents for anaplasmosis and babesiosis. In: *Recent Developments in the control of Anaplasmosis, Babesiosis and Cowdriosis: Proceedings of a Workshop Held at ILRAD*. The International Laboratory for Research on Animal Diseases. T.T. Dolan, Kenya.

Penzhorn, B. 2013. Bovine babesiosis. *Afr. Vet. Inf. Portal*. Available from: <http://www.afrivip.org/education/livestock/high-impact/vector-borne-diseases/bovine-babesiosis/2013>

Perry, B. D. 1996. Epidemiological indicators and their application to the control of tick-borne diseases. In: *Manual on Tick and Tick-borne Disease Control*. FAO, Roma.

Playford, M. 2005. Review of Research Needs for cattle Tick Control, Phases I and II. In: *Meat & Livestock Australia Limited*. Australia.

PrimerExplorer. 2016. Eiken Chemical Co., Ltd. Available from: <https://primerexplorer.jp/e/index.html>

Qurollo, B. A., N. R. Archer, M. E. Schreeg, H. S. Marr, A. J. Birkenheuer, K. N. Haney, B. S. Thomas, and E. B. Breitschwerdt. 2017. Improved molecular detection

of Babesia infections in animals using a novel quantitative real-time PCR diagnostic assay targeting mitochondrial DNA. *Parasit. Vectors.* 10:128.

Ray, B. K., C. W. Bailey, J. B. Jensen, and C. A. Carson. 1992. Chromosomes of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 52:123–126.

Salama, A. A., M. A. Terkawi, S. Kawai, M. Aboulaila, M. Nayel, A. Mousa, A. Zaghawa, N. Yokoyama, and I. Igarashi. 2013. Specific antibody to a conserved region of *Babesia* apical membrane antigen-1 inhibited the invasion of *B. bovis* into the erythrocyte. *Exp. Parasitol.* 135:623–628..

Schnittger, L., A. E. Rodriguez, M. Florin-Christensen, and D. A. Morrison. 2012. *Babesia*: A world emerging. *Infect. Genet. Evol.* 12:1788–1809.

Sivakumar, T., K. Altangerel, B. Battsetseg, B. Battur, M. Aboulaila, T. Munkhjargal, T. Yoshinari, N. Yokoyama, and I. Igarashi. 2012a. Genetic detection of *Babesia bigemina* from Mongolian cattle using apical membrane antigen-1 gene-based PCR assay. *Vet. Parasitol.* 187:17–22.

Sivakumar, T., H. Kothalawala, S. A. E. Abeyratne, S. C. Vimalakumar, A. S. Meewewa, D. T. Hadirampela, T. Puvirajan, S. Sukumar, K. Kuleswarakumar, A. D. N. Chandrasiri, I. Igarashi, and N. Yokoyama. 2012b. A PCR-based survey of selected *Babesia* and *Theileria* parasites in cattle in Sri Lanka. *Vet. Parasitol.* 190:263–267.

Sivakumar, T., D. T. B. Lan, P. T. Long, T. Yoshinari, M. Tattiyapong, A. Guswanto, K. Okubo, I. Igarashi, N. Inoue, X. Xuan, and N. Yokoyama. 2013. PCR Detection and Genetic Diversity of Bovine Hemoprotozoan Parasites in Vietnam. *J. Vet. Med. Sci.* 75:1455–1462.

Smith, T., 1859-1934, F. L. Kilborne, and 1858-1936. 1893. Investigations into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever. Available from: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300655646>

Starcovici, C. 1893. Bemerkungen über den durch Babès entdeckten Blutparasiten und die durch denselben hervorgebrachten Krankheiten, die seuchenhafte Hämoglobinurie des Rindes (Babès), das Texasfieber (Th. Smith) und der Carceag der Schafe (Babès. *Zbl Bakt Abt.* 14:1–8.

Suarez, C. E., and S. Noh. 2011. Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. *Vet. Parasitol.* 180:109–125.

Süss, J., C. Klaus, F.-W. Gerstengarbe, and P. C. Werner. 2008. What makes ticks tick? Climate change, ticks, and tick-borne diseases. *J. Travel Med.* 15:39–45.

Tanner, N. A., and T. C. Evans. 2014. Loop-mediated isothermal amplification for detection of nucleic acids. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 105:Unit 15.14.

Tanner, N. A., Y. Zhang, and T. C. Evans. 2012. Simultaneous multiple target detection in real-time loop-mediated isothermal amplification. *BioTechniques*. 53:81–89.

Terkawi, M. A., O. M. M. Thekiso, C. Katsande, A. A. Latif, B. J. Mans, O. Mathee, N. Mkize, N. Mabogoane, F. Marais, N. Yokoyama, X. Xuan, and I. Igarashi. 2011. Serological survey of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle in South Africa. *Vet. Parasitol.* 182:337–342.

The Center for Food Security and Public Health. 2008. Bovine Babesiosis.

Tomita, N., Y. Mori, H. Kanda, and T. Notomi. 2008. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat. Protoc.* 3:877–882.

Tonukari, N. J. 2010. *Theileria parva* apical membrane antigen-1 (AMA-1) shares conserved sequences with apicomplexan homologs. *Int. J. Biotechnol. Mol. Biol. Res.* 1:36–41.

Torina, A., A. Agnone, G. Sireci, J. J. Mosqueda, V. Blanda, I. Albanese, M. La Farina, A. Cerrone, F. Cusumano, and S. Caracappa. 2010. Characterization of the apical membrane antigen-1 in Italian strains of *Babesia bigemina*. *Transbound. Emerg. Dis.* 57:52–56.

Torina, A., A. Cordaro, V. Blanda, R. D'Agostino, S. Scimeca, M. E. Scariano, G. Sireci, and R. Lelli. 2016. A promising new ELISA diagnostic test for cattle babesiosis based on *Babesia bigemina* Apical Membrane Antigen-1. *Vet. Ital.* 52:63–69.

Trangoni, M. D., A. K. Gioffré, M. E. Cerón Cucchi, K. C. Caimi, P. Ruybal, M. J. Zumárraga, and S. L. Cravero. 2015. LAMP technology: Rapid identification of *Brucella* and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Braz. J. Microbiol. Publ. Braz. Soc. Microbiol.* 46:619–626.

Uilenberg, G. 1995. International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. *Vet. Parasitol.* 57:19–41.

Uilenberg, G. 2006. *Babesia*—A historical overview. *Vet. Parasitol.* 138:3–10.

Valdez Espinosa, U. M. 2015. Identificación de epítomos conservados en aislados de *Babesia bigemina* [Tesis de Maestría]. Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Wang, C.-H., K.-Y. Lien, J.-J. Wu, and G.-B. Lee. 2011. A magnetic bead-based assay for the rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by using a microfluidic system with integrated loop-mediated isothermal amplification. *Lab. Chip.* 11:1521–1531.

Wastling, S. L., K. Picozzi, A. S. L. Kakembo, and S. C. Welburn. 2010. LAMP for human African trypanosomiasis: a comparative study of detection formats. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4:e865.

World Organisation for Animal Health. 2013. Bovine Babesiosis.

World Organisation for Animal Health. 2014. Bovine Babesiosis. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Paris.

Wright, I. G., B. V. Goodger, G. D. Buffington, I. A. Clark, F. Parrodi, and D. J. Waltisbuhl. 1989. Immunopathophysiology of babesial infections. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83 Suppl:11–13.

XiaoBo, W., J. HuiTing, Z. YangLong, L. XiuYan, L. Jiao, and N. HongBo. 2016. Rapid and sensitive diagnosis of cattle anaplasmosis by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Pak. Vet. J.* 36:174–178.

Xie, J., G. Liu, Z. Tian, and J. Luo. 2013. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *Theileria equi*. *Acta Trop.* 127:245–250.

Yang, Y., Q. Li, S. Wang, X. Chen, and A. Du. 2016. Rapid and sensitive detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *Vet. Parasitol.* 219:71–76.

Ybañez, A. P., T. Sivakumar, R. H. D. Ybañez, M. R. B. Vincoy, J. A. Tingson, Z. O. Perez, S. R. Gabotero, L. P. Buchorno, N. Inoue, K. Matsumoto, H. Inokuma, and N. Yokoyama. 2013. Molecular survey of bovine vector-borne pathogens in Cebu, Philippines. *Vet. Parasitol.* 196:13–20.

Young, A. S., and S. P. Morzaria. 1986. Biology of *Babesia*. *Parasitol. Today.* 2:211–219.

Yu, L., M. A. Terkawi, M. J. Cruz-Flores, F. G. Claveria, G. O. Aboge, J. Yamagishi, Y.-K. Goo, S. Cao, T. Masatani, Y. Nishikawa, and X. Xuan. 2013. Epidemiological Survey of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* Infections of Cattle in Philippines. *J. Vet. Med. Sci.* 75:995–998.

ANEXOS

SP3	ATGCAGTGCATATTGAATAGGATTACGCTACTGGCTACGCCAGTTATTTTCTTTCTATGG
Mexico	ATGCAGTGCATATTGAATAGGATTACGCTACTGGCTACGCCAGTTATTTTCTTTCTATGG
M1A	ATGCAGTGCATATTGAATAGGATTACGCTACTGGCTACGCCAGTTATTTTCTTTCTATGG
M1P	ATGCAGTGCATATTGAATAGGATTACGCTACTGGCTACGCCAGTTATTTTCTTTCTATGG
Australian	ATGCAGTGCATATTGAATAGGATTACGCTACTGGCTACGCCAGTTATTTTCTTTCTTTGG
MP-C12	-----
MP-C11	-----
MP-C1	-----
ITA2	ATGCAGTGCATATTGAATAGGATTACGCTACTGGCTACGCCAGTTATTTTCTTTCTATGG
KZN-C24	-----
Rio	ATGCAGTGCATATTGAATAGGATTACGCTACTGGCTACGCCAGTTATTTTCTTTCTATGG
DIVA	-----
ITA3	ATGCAGTGCATATTGAATAGGATTACGCTACTGGCTACGCCAGTTATTTTCTTTCTATGG
IV1	ATGCAGTGCATATTGAATAGGATTACGCTACTGGCTACGCCAGTTATTTTCTTTCTATGG
IT2	ATGCAGTGCATATTGAATAGGATTACGCTACTGGCTACGCCAGTTATTTTCTTTCTATGG
Turkey	ATGCAGTGCATATTGAATAGGATTACGCTACTGGCTACGCCAGTTATTTTCTTTCTATGG
ITA5RG	ATGCAGTGCATATTGAATAGGATTACGCTACTGGCTACGCCAGTTATTTTCTTTCTATGG
Corrientes	ATGCAGTGCATATTGAATAGGATTACGCTACTGGCTACGCCAGTTATTTTCTTTCTATGG
ITA7PA	ATGCAGTGCATATTGAATAGGATTACGCTACTGGCTACGCCAGTTATTTTCTTTCTATGG
Chiapas	ATGCAGTGCATATTGAATAGGATTACGCTACTGGCTACGCCAGTTATTTTCTTTCTATGG
ITA4PG	ATGCAGTGCATATTGAATAGGATTACGCTACTGGCTACGCCAGTTATTTTCTTTCTATGG
ITA6PA	ATGCAGTGCATATTGAATAGGATTACGCTACTGGCTACGCCAGTTATTTTCTTTCTATGG
ITA8CT	ATGCAGTGCATATTGAATAGGATTACGCTACTGGCTACGCCAGTTATTTTCTTTCTATGG
ITA1	ATGCAGTGCATATTGAATAGGATTACGCTACTGGCTACGCCAGTTATTTTCTTTCTATGG
GP-C19	-----
WC-10284	-----
BbiNW-C4	-----
FS-146	-----
BbiGP-C7	-----
GP-C1	-----
FS-189	-----
WC-851	-----

SP3	CTATCCACGGAGATTTTCGCCTGCAGGATGCGCCTTCGTGACCTTCCAGAACGAGCCCCT
Mexico	CTATCCATGGAGATTTTCGCCTGCAGGATGCGCCTTCGTGACCTTCCAGAACGAGCCCCT
M1A	CTATCCACGGAGATTTTCGCCTGCAGGATGCGCCTTCGTGACCTTCCAGAACGAGCCCCT
M1P	CTATCCACGGAGATTTTCGCCTGCAGGATGCGCCTTCGTGACCTTCCAGAACGAGCCCCT
Australian	CTATCCACGGAGATTTTCGCCTGCAGGATGCGCCTTCGTGACCTTCCAGAACGAGCCCACG
MP-C12	-----
MP-C11	-----
MP-C1	-----
ITA2	CTATCCACGGAGATTTTCGCCTGCAGGATGCGCCTTCGTGACCTTCCAGAACGAGCCCCT
KZN-C24	-----
Rio	CTATCCACGGAGATTTTCGCCTGCAGGATGCGCCTTCGTGACCTTCCAGAACGAGCCCCT
DIVA	-----
ITA3	CTATCCACGGAGATTTTCGCCTGCAGGATGCGCCTTCGTGACCTTCCAGAACGAGCCCCT
IV1	CTATCCACGGAGATTTTCGCCTGCAGGATGCGCCTTCGTGACCTTCCAGAACGAGCCCCT
IT2	CTATCCACGGAGATTTTCGCCTGCAGGATGCGCCTTCGTGACCTTCCAGAACGAGCCCCT
Turkey	CTATCCACGGAGATTTTCGCCTGCAGGATGCGCCTTCGTGACCTTCCAGAACGAGCCCCT
ITA5RG	CTATCCACGGAGATTTTCGCCTGCAGGATGCGCCTTCGTGACCTTCCAGGACGAGCCCCT
Corrientes	CTATCCACGGAGATTTTCGCCTGCAGGATGCGCCTTCGTGACCTTCCAGAACGAGCCCCT
ITA7PA	CTATCCACGGAGATTTTCGCCTGCAGGATGCGCCTTCGTGACCTTCCAGAACGAGCCCCT
Chiapas	CTATCCACGGAGATTTTCGCCTGCAGGATGCGCCTTCGTGACCTTCCAGAACGAGCCCCT
ITA4PG	CTATCCACGGAGATTTTCGCCTGCAGGATGCGCCTTCGTGACCTTCCAGAACGAGCCCCT
ITA6PA	CTATCCACGGAGATTTTCGCCTGCAGGATGCGCCTTCGTGACCTTCCAGAACGAGCCCCT
ITA8CT	CTATCCACGGAGATTTTCGCCTGCAGGATGCGCCTTCGTGACCTTCCAGAACGAGCCCCT
ITA1	CTATCCACGGAGATTTTCGCCTACAGGATGCGCCTTCGTGACCTTCCAGAACGAGCCCCT
GP-C19	-----
WC-10284	-----

BbiNW-C4 -----
 FS-146 -----
 BbiGP-C7 -----
 GP-C1 -----
 FS-189 -----
 WC-851 -----

SP3 TCCACGAGAGGCACCAGGAGGTCTTCCCGTAGCAGCAGGAACCAACAGGCGACTTCTAGT
 Mexico TCCGCGAGAGGCACCAGGAGGTCTTCCCGTAGCAGCAGGCATCAACAGGCGACTTCTAGT
 M1A TCCACGAGAGGCACCAGGAGGTCTTCCCGTAGCAGCAGGCACCAACAGGCGACTTCTAGT
 M1P TCCACGAGAGGCACCAGGAGGTCTTCCCGTAGCAGCAGGCACCAACAGGCGACTTCTAGT
 Australian TCCACGAGAGGCACCAGGAGGTCTTCCCGTTCGTGCGCCAATCAACAGGCGACTTCGAGT
 MP-C12 -----
 MP-C11 -----
 MP-C1 -----
 ITA2 TCCACGAGAGGCACCAGGAGGTCTTCCCGTTCGTGCGCCAATCAACAGGCGACTTCTAGT
 KZN-C24 -----
 Rio TCCGCGAGAGGCACCAGGAGGTCTTCCCGTTCGTGCGCCAATCAACAGGCGACTTCTAGT
 DIVA -----
 ITA3 TCCACGAGAGGCACCAGGAGGTCTTCCCGTTCGTGCGCCAATCAACAGGCGACTTCGAGT
 IV1 TCCACGAGAGGCACCAGGAGGTCTTCCCGTTCGTGCGCCAATCAACAGGCGACTTCGAGT
 IT2 TCCACGAGAGGCACCAGGAGGTCTTCCCGTTCGTGCGCCAATCAACAGGCGACTTCGAGT
 Turkey TCCACGAGAGGCACCAGGAGGTCTTCCCGTTCGTGCGCCAATCAACAGGCGACTTCGAGT
 ITA5RG TCCACGAGAGGCACCAGGAGGTCTTCCCGTTCGTGCGCCAATCAACAGGCGACTTCTAGT
 Corrientes TCCACGAGAGGCACCAGGAGGTCTTCCCGTTCGTGCGCCAATCAACAGGCGACTTCTAGT
 ITA7PA TCCACGAGAGGCACCAGGAGGTCTTCCCGTTCGTGCGCCAATCAACAGGCGACTTCTAGT
 Chiapas TCCACGAGAGGCACCAGGAGGTCTTCCCGTTCGTGCGCCAATCAACAGGCGACTTCTAGT
 ITA4PG TCCACGAGAGGCACCAGGAGGTCTTCCCGTTCGTGCGCCAATCAACAGGCGACTTCTAGT
 ITA6PA TCCACGAGAGGCACCAGGAGGTCTTCCCGTTCGTGCGGACATCAACAGGCGACTTCTAGT
 ITA8CT TCCACGAGAGGCACCAGGAGGTCTTCCCGTTCGTGCGCCAATCAACAGGCGACTTCTAGT
 ITA1 TCCACGAGAGGCACCAGGAGGTCTTCCCGTTCGTGCGCCAATCAACAGGCGACTTCTAGT
 GP-C19 -----
 WC-10284 -----
 BbiNW-C4 -----
 FS-146 -----
 BbiGP-C7 -----
 GP-C1 -----
 FS-189 -----
 WC-851 -----

SP3 ACTTCGCAAGCTGGAGCTGGCGAGGCTACAGAGCGCACGGGGGGCAGAGCCGCGGGCTCC
 Mexico ACTTCGCAAGCTGGAGCTGGCGAGGCTACAGAGCGCACGGGGGGCAGAACTGCGGGCTCC
 M1A ACTTCGCAAGCTGGAGCTGGCGAGGCTACAGAGCGCACGGGGGGCAGAACTGCGGGCTCC
 M1P ACTTCGCAAGCTGGAGCTGGCGAGGCTACAGAGCGCACGGGGGGCAGAACTGCGGGCTCC
 Australian ACTTCGCAAGCTGGAGCTGGTGAAGGCTACAGAGCGCACGGGGGGCAGAGCTGCGGGCTCC
 MP-C12 -----
 MP-C11 -----
 MP-C1 -----
 ITA2 ACTTCGCAAGCTGGAGCTGGCGAGGCTACAGAGCGCACGGGGGGCAGAACTGCGGGCTCC
 KZN-C24 -----
 Rio ACTTCGCAAGCTGGAGCTGGCGAGGCTACAGAGCGCACGGGGGGCAGAACTGCGGGCTCC
 DIVA -----
 ITA3 ACCTCGCAAGCTGGAGCTGGGGAGGCTACAGAGCGCACGGGGGGCAGAACTGCGGGCTCC
 IV1 ACCTCGCAAGCTGGAGCTGGCGAGGCTACAGAGCGCACGGGGGGCAGAACTGCGGGCTCC
 IT2 ACCTCGCAAGCTGGAGCTGGGGAGGCTACAGAGCGCACGGGGGGCAGAACTGCGGGCTCC
 Turkey ACTTCGCAAGCTGGAGCTGGCGAGGCTACAGAGCGCACGGGGGGCAGAACTGCGGGCTCC
 ITA5RG ACTTCGCAAGCTGGAGCTGGCGAGGCTACAGAGCGCACGGGGGGCAGAACTGCGGGCTCC
 Corrientes ACTTCGCAAGCTGGAGCTGGCGAGGCTACAGAGCGCACGGGGGGCAGAACTGCGGGCTCC
 ITA7PA ACTTCGCAAGCTGGAGCTGGCGAGGCTACAGAGCGCACGGGGGGCAGAACTGCGGGCTCC
 Chiapas ACTTCGCAAGCTGGAGCTGGCGAGGCTACAGAGCGCACGGGGGGCAGAACTGCGGGCTCC
 ITA4PG ACTTCGCAAGCTGGAGCTGGCGAGGCTACAGAGCGCACGGGGGGCAGAACTGCGGGCTCC

ITA6PA ACTTCGCAAGCTGGAGCTGGCGAGGCTACAGAGCGCACGGGGGGCAGAACTGCGGGCTCC
 ITA8CT ACTTCGCAAGCTGGAGCTGGCGAGGCTACAGAGCGCACGGGGGGCAGAACTGCGGGCTCC
 ITA1 ACTTCGGAAGCTGGAGCTGGCGAGGCTACAGAGCGCGGGGGGGCAGAACTGCGGGCTCC
 GP-C19 -----
 WC-10284 -----
 BbinW-C4 -----
 FS-146 -----
 BbiGP-C7 -----
 GP-C1 -----
 FS-189 -----
 WC-851 -----

SP3 AAGCTTATCCCGCAAACGCCGTGGACCAGGTACATGATCAAGTACGACATCGCTCGCTGC
 Mexico AAGCTTATCCCGCAAACGCCGTGGACCAGGTACATGATCAAGTACGACATCGCTCGCTGC
 M1A AAGCTTATCCCGCAAACGCCGTGGACCAGGTACATGATCAAGTACGACATCGCTCGCTGC
 M1P AAGCTTATCCCGCAAACGCCGTGGACCAGGTACATGATCAAGTACGACATCGCTCGCTGC
 Australian AAGCTTATCCCGCAAACGCCATGGACCAGGTACATGATCAAGTACGACATCGCTCGCTGC
 MP-C12 -----
 MP-C11 -----
 MP-C1 -----
 ITA2 AAGCTTATCCCGCAAACGCCATGGACCAGGTACATGATCAAGTACGACATCGCTCGCTGC
 KZN-C24 -----
 Rio AAGCTTATCCCGCAAACGCCGTGGACCAGGTACATGATCAAGTACGACATCGCTCGCTGC
 DIVA -----
 ITA3 AAGCTTATCCCGCAAACGCCATGGACCAGGTACATGATCAAGTACGACATCGCTCGCTGC
 IV1 AAGCTTATCCCGCAAACGCCATGGACCAGGTACATGATCAAGTACGACATCGCTCGCTGC
 IT2 AAGCTTATCCCGCAAACGCCGTGGACCAGGTACATGATCAAGTACGACATCGCTCGCTGC
 Turkey AAGCTTATCCCGCAAACGCCGTGGACCAGGTACATGATCAAGTACGACATCGCTCGCTGC
 ITA5RG AAGCTTATCCCGCAAACGCCATGGACCAGGTACATGATCAAGTACGACATCGCTCGCTGC
 Corrientes AAGCTTATCCCGCAAACGCCGTGGACCAGGTACATGATCAAGTACGACATCGCTCGCTGC
 ITA7PA AAGCTTATCCCGCAAACGCCATGGACCAGGTACATGATCAAGTACGACATCGCTCGCTGC
 Chiapas AAGCTTATCCCGCAAACGCCATGGACCAGGTACATGATCAAGTACGACATCGCTCGCTGC
 ITA4PG AAGCTTATCCCGCAAACGCCGTGGACCAGGTACATGATCAAGTACGACATCGCTCGCTGC
 ITA6PA AAGCTTATCCCGCAAACGCCATGGACCAGGTACATGATCAAGTACGACATCGCTCGCTGC
 ITA8CT AAGCTTATCCCGCAAACGCCATGGACCAGGTACATGATCAAGTACGACATCGCTCGCTGC
 ITA1 AAGCTTATCCCGCAAACGCCATGGACCAGGTACATGATCAAGTACGACATCGCTCGCTGC
 GP-C19 -----
 WC-10284 -----
 BbinW-C4 -----
 FS-146 -----
 BbiGP-C7 -----
 GP-C1 -----
 FS-189 -----
 WC-851 -----

SP3 CACGGATCCGGTATTTTCGTCGACATCGGAGGATACGAGGCTGTTGGAACAAGTATTAT
 Mexico CACGGATCCGGTATTTTCGTCGACATCGGAGGATACGAGGCTGTTGGAACAAGTATTAT
 M1A CACGGATCCGGTATTTTCGTCGACATCGGAGGATACGAGGCTGTTGGAACAAGTATTAT
 M1P CACGGATCCGGTATTTTCGTCGACATCGGAGGATACGAGGCTGTTGGAAGCAAGTATTAT
 Australian CACGGATCCGGTATTTTCGTCGACATCGGAGGATACGAGGCTGTTGGAACAAGTATTAT
 MP-C12 -----
 MP-C11 -----
 MP-C1 -----
 ITA2 CACGGATCCGGTATTTTCGTCGACATCGGAGGATACGAGGCTGTTGGAATAAGTATTAT
 KZN-C24 -----
 Rio CACGGATCCGGTATTTTCGTCGACATCGGAGGATACGAGGCTGTTGGAATAAGTATTAT
 DIVA -----
 ITA3 CACGGATCCGGTATTTTCGTCGACATCGGAGGATACGAGGCTGTTGGAACAAGTATTAT
 IV1 CACGGATCCGGTATTTTCGTCGACATCGGAGGATACGAGGCTGTTGGAACAAGTATTAT
 IT2 CACGGATCCGGTATTTTCGTCGACATCGGAGGATACGAGGCTGTTGGAACAAGTATTAT
 Turkey CACGGATCCGGTATTTTCGTCGACATCGGAGGATACGAGGCTGTTGGAACAAGTATTAT

ITA5RG CACGGATCCGGTATTTTCGTCGACATCGGAGGATACGAGGCTGTTGGAAACAAGTATTAT
 Corrientes CACGGATCCGGTATTTTCGTCGACATCGGAGGATACGAGGCTGTTGGAAATAAGTATTAT
 ITA7PA CACGGATCCGGTATTTTCGTCGACATCGGAGGATACGAGGCTGTTGGAAATAAGTATTAT
 Chiapas CACGGATCCGGTATTTTCGTCGACATCGGAGGATACGAGGCTGTTGGAAATAAGTATTAT
 ITA4PG CACGGATCCGGTATTTTCGTCGACATCGGAGGATACGAGGCTGTTGGAAACAAGTATTAT
 ITA6PA CACGGATCCGGTATTTTCGTCGACATCGGAGGATACGAGGCTGTTGGAAATAAGTATTAT
 ITA8CT CACGGATCCGGTATTTTCGTCGACATCGGAGGATACGAGGCTGTTGGAAATAAGTATTAT
 ITA1 CACGGGTCGGTATTTTCGTCGACATCGGAGGATACGAGGCTGTTGGAAATAAGTATTAT
 GP-C19 -----
 WC-10284 -----
 BbinW-C4 -----
 FS-146 -----
 BbiGP-C7 -----
 GP-C1 -----
 FS-189 -----
 WC-851 -----

SP3 CGTATGCCCACAGGAAAATGCCCGTTATGGGTAAGGTCATCAACCTCGCGAGCGGTGCC
 Mexico CGTATGCCCACAGGAAAATGCCCGTTATGGGTAAGGTCATCAGCCTCGCGAGCGGTGCC
 M1A CGTATGCCCACAGGAAAATGCCCGTTATGGGTAAGGTCATCAGCCTCGCGAGCGGTGCC
 M1P CGTATGCCCACAGGAAAATGCCCGTTATGGGTAAGGTCATCAGCCTCGCGAGCGGTGCC
 Australian CGTATGCCCACAGGAAAATGCCCGTTATGGGTAAGGTCATCAACCTTGCAGCGGTGCC
 MP-C12 -----
 MP-C11 -----
 MP-C1 -----
 ITA2 CGTATGCCCACAGGAAAATGCCCGTTATGGGTAAGGTCATCAGCCTCGCGAGCGGTGCC
 KZN-C24 -----
 Rio CGTATGCCCACAGGAAAATGCCCGTTATGGGTAAGGTCATCAGCCTCGCGAGCGGTGCC
 DIVA -----
 ITA3 CGTATGCCCACAGGAAAATGCCCGTTATGGGTAAGGTCATCAGCCTTGCAGCGGTGCC
 IV1 CGTATGCCCACAGGAAAATGCCCGTTATGGGTAAGGTCATCAGCCTTGCAGCGGTGCC
 IT2 CGTATGCCCACAGGAAAATGCCCGTTATGGGTAAGGTCATCAGCCTTGCAGCGGTGCC
 Turkey CGTATGCCCACAGGAAAATGCCCGTTATGGGTAAGGTCATCAGCCTTGCAGCGGTGCC
 ITA5RG CGTATGCCCACAGGAAAATGCCCGTTATGGGTAAGGTCATCAGCCTTGCAGCGGTGCC
 Corrientes CGTATGCCCACAGGAAAATGCCCGTTATGGGTAAGGTCATCAGCCTCGCGAGCGGTGCC
 ITA7PA CGTATGCCCACAGGAAAATGCCCGTTATGGGTAAGGTCATCAGCCTTGCAGCGGTGCC
 Chiapas CGTATGCCCACAGGAAAATGCCCGTTATGGGTAAGGTCATCAGCCTTGCAGCGGTGCC
 ITA4PG CGTATGCCCACAGGAAAATGCCCGTTATGGGTAAGGTCATCAGCCTTGCAGCGGTGCC
 ITA6PA CGTATGCCCACAGGAAAATGCCCGTTATGGGTAAGGTCATCAGCCTTGCAGCGGTGCC
 ITA8CT CGTATGCCCACAGGAAAATGCCCGATATGGGTAAGGTCATCAGCCTTGCAGCGGTGCC
 ITA1 CGTATGCCCACAGGAAAATGCCCGTTATGGGTAAGGTCATCAGCCTTGCAGCGGTGCC
 GP-C19 -----
 WC-10284 -----
 BbinW-C4 -----
 FS-146 -----
 BbiGP-C7 -----
 GP-C1 -----
 FS-189 -----
 WC-851 -----

SP3 GACTTCCTCGAACCGATTTCTGCCGACAACCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCCGAG
 Mexico GACTTCCTCGAACCGATTTCTGCCGACAACCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCCGAG
 M1A GACTTCCTCGAACCGATTTCTGCCGACAACCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCCGAG
 M1P GACTTCCTCGAACCGATTTCTGCCGACAACCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCCGAG
 Australian GACTTCCTCGAACCGATTTCTGCCGACAACCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCCGAG
 MP-C12 -----GAACCGATTTCTGCCGACAACCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCCGAG
 MP-C11 -----GAACCGATTTCTGCCGACAACCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCCGAG
 MP-C1 -----
 ITA2 GACTTCCTCGAACCGATTTCTGCCGACAACCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCCGAG
 KZN-C24 -----GAACCGATTTCTGCCGACAACCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCCGAG
 Rio GACTTCCTCGAACCGATTTCTGCCGACAACCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCCGAG

DIVA -----
 ITA3 GACTTCCTCGAACCGATTTCTGCCGACAACCCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCCGAG
 IV1 GACTTCCTCGAACCGATTTCTGCCGACAACCCCTCGCTACAGAGGTCTGGCGTTCCCCGAG
 IT2 GACTTCCTCGAACCGATTTCTGCCGACAACCCCTCGCTACAGAGGTCTGGCGTTCCCCGAG
 Turkey GACTTCCTCGAACCGATTTCTGCCGACAACCCCTCGCTACAGAGGTCTGGCGTTCCCCGAG
 ITA5RG GACTTCCTCGAACCGATTTCTGCCGACAACCCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCCGAG
 Corrientes GACTTCCTCGAACCGATTTCTGCCGACAACCCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCCGAG
 ITA7PA GACTTCCTCGAACCGATTTCTGCCGACAACCCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCCGAG
 Chiapas GACTTCCTCGAACCGATTTCTGCCGACAACCCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCCGAG
 ITA4PG GACTTCCTCGAACCGATTTCTGCCGACAACCCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCCGAG
 ITA6PA GACTTCCTCGAACCGATTTCTGCCGACAACCCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCCGAG
 ITA8CT GACTTCCTCGAACCGATTTCTGCCGACAACCCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCCGAG
 ITA1 GACTTCCTCGAACCGATTTCTGCCGACAACCCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCCGAG
 GP-C19 -----GAACCGATTTCTGCCGACAACCCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCCGAG
 WC-10284 -----GAACCGATTTCTGCCGACAACCCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCCGAG
 BbiNW-C4 -----GAACCGATTTCTGCCGACAACCCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCCGAG
 FS-146 -----GAACCGATTTCTGCCGACAACCCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCCGAG
 BbiGP-C7 -----GAACCGATTTCTGCCGACAACCCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCCGAG
 GP-C1 -----GAACCGATTTCTGCCGACAACCCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCCGAG
 FS-189 -----
 WC-851 -----GAACCGATTTCTGCCGACAACCCCTCGCTACAGGGGTCTGGCGTTCCCCGAG

SP3 ACTGTGATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAGCATCCAC
 Mexico ACTGTGATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCAC
 M1A ACTGTGATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCAC
 M1P ACTGTGATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCAC
 Australian ACTGTGATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAGCATCCAC
 MP-C12 ACTGTGATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCAC
 MP-C11 ACTGTGATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCAC
 MP-C1 -----GAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCAC
 ITA2 ACTGTGATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCAC
 KZN-C24 ACTGTGATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCAC
 Rio ACTGTGATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCAC
 DIVA -----GAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCAC
 ITA3 ACTGTGATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCAC
 IV1 ACTGTGATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCAC
 IT2 ACTGTGATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCAC
 Turkey ACTGTGATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCAC
 ITA5RG ACCGTGATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCAC
 Corrientes ACTGTGATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCAC
 ITA7PA ACTGTGATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCAC
 Chiapas ACTGTGATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCAC
 ITA4PG ACTGTGATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCAC
 ITA6PA ACTGTGATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCAC
 ITA8CT ACTGTGATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCAC
 ITA1 ACTGTGATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCAC
 GP-C19 ACTGTGATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCAC
 WC-10284 ACTGTGATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCAC
 BbiNW-C4 ACTGTGATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCAC
 FS-146 ACTGTGATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCAC
 BbiGP-C7 ACTGTGATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCAC
 GP-C1 ACTGTGATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCAC
 FS-189 -----GAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCAC
 WC-851 ACTGTGATCAAGCACACTGGAGCTTCGGCAGGTGCTCTTACAAACGCAGGCAACATCCAC

SP3 GGTAATTTGTGCGCAGTATCAGCCGCCACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCC
 Mexico GGTAATTTGTGCGCAGTATCAGCCGCCACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCC
 M1A GGTAATTTGTGCGCAGTATCAGCCGCCACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCC
 M1P GGTAATTTGTGCGCAGTATCAGCCGCCACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCC
 Australian GGTAATTTGTGCGCAGTATCAGCCGCCACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCC
 MP-C12 GGTAATTTGTGCGCAGTATCAGCCGCCACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCC

MP-C11 GGTAATTTGTGCGCCAGTATCAGCCGCCGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCC
MP-C1 GGTAATTTGTGCGCCAGTATCAGCCGCCGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCC
ITA2 GGTAATTTGTGCGCCAGTATCAGCCGCCGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCC
KZN-C24 GGTAATTTGTGCGCCAGTATCAGCCGCCGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCC
Rio GGTAATTTGTGCGCCAGTATCAGCCGCCGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCC
DIVA GGTAATTTGTGCGCCAGTATCAGCCGCCGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCC
ITA3 GGTAATTTGTGCGCCAGTATCAGCCGCCGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCC
IV1 GGTAATTTGTGCGCCAGTATCAGCCGCCGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCC
IT2 GGTAATTTGTGCGCCAGTATCAGCCGCCGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCC
Turkey GGTAATTTGTGCGCCAGTATCAGCCGCCGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCC
ITA5RG GGTAATTTGTGCGCCAGTATCAGCCGCCGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCC
Corrientes GGTAATTTGTGCGCCAGTATCAGCCGCCGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCC
ITA7PA GGTAATTTGTGCGCCAGTATCAGCCGCCGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCC
Chiapas GGTAATTTGTGCGCCAGTATCAGCCGCCGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCC
ITA4PG GGTAATTTGTGCGCCAGTATCAGCCGCCGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCC
ITA6PA GGTAATTTGTGCGCCAGTATCAGCCGCCGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCC
ITA8CT GGTAATTTGTGCGCCAGTATCAGCCGCCGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCC
ITA1 GGTAATTTGTGCGCCAGTATCAGCCGCCGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCC
GP-C19 GGTAATTTGTGCGCCAGTATCAGCCGCCGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCC
WC-10284 GGTAATTTGTGCGCCAGTATCAGCCGCCGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCC
BbiNW-C4 GGTAATTTGTGCGCCAGTATCAGCCGCCGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCC
FS-146 GGTAATTTGTGCGCCAGTATCAGCCGCCGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCC
BbiGP-C7 GGTAATTTGTGCGCCAGTATCAGCCGCCGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCC
GP-C1 GGTAATTTGTGCGCCAGTATCAGCCGCCGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCC
FS-189 GGTAATTTGTGCGCCAGTATCAGCCGCCGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCC
WC-851 GGTAATTTGTGCGCCAGTATCAGCCGCCGACCTCCGTAAGTGGGGTTACAAGGGAAACGCC

SP3 GTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGACCAGAGGACCAAG
Mexico GTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGACCAGAGGACCAAG
M1A GTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGACCAGAGGACCAAG
M1P GTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGACCAGAGGACCAAG
Australian GTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGACCAGAGGACCAAG
MP-C12 GTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGACCAGAGGACCAAG
MP-C11 GTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGACCAGAGGACCAAG
MP-C1 GTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGACCAGAGGACCAAG
ITA2 GTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGACCAGAGGACCAAG
KZN-C24 GTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGACCAGAGGACCAAG
Rio GTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGACCAGAGGACCAAG
DIVA GTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGACCAGAGGACCAAG
ITA3 GTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGACCAGAGGACCAAG
IV1 GTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGACCAGAGGACCAAG
IT2 GTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGACCAGAGGACCAAG
Turkey GTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGACCAGAGGACCAAG
ITA5RG GTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGACCAGAGGACCAAG
Corrientes GTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGACCAGAGGACCAAG
ITA7PA GTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGACCAGAGGACCAAG
Chiapas GTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGACCAGAGGACCAAG
ITA4PG GTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGACCAGAGGACCAAG
ITA6PA GTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGACCAGAGGACCAAG
ITA8CT GTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGACCAGAGGACCAAG
ITA1 GTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGACCAGAGGACCAAG
GP-C19 GTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGACCAGAGGACCAAG
WC-10284 GTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGACCAGAGGACCAAG
BbiNW-C4 GTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGACCAGAGGACCAAG
FS-146 GTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGACCAGAGGACCAAG
BbiGP-C7 GTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGACCAGAGGACCAAG
GP-C1 GTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGACCAGAGGACCAAG
FS-189 GTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGACCAGAGGACCAAG
WC-851 GTTACTAACTGCGCCGAATACGCCAGCAACATCGTGCCCGGTTCCGACCAGAGGACCAAG
*** *****

SP3 TACAGGTACCCCTTCGTCTACGATGGAAGGAGGAGATGTGTTACATCCTGTACTCGCCG

FS-189 ATGCAGTACAACCAGGGAACCAGGTACTGTGACGAGGACGGATCAGCGAAGGAAGGGCCT
 WC-851 ATGCAGTACAACCAGGGAACCAGGTACTGTGACGAGGACGGATCAGCGAAGGAAGGGCCT
 ***** ** ***** **

SP3 AGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTACAAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGC
 Mexico AGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTACAAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGC
 M1A AGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTACAAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGC
 M1P AGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTACAAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGC
 Australian AGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTACAAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGC
 MP-C12 AGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTACAAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGC
 MP-C11 AGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTACAAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGC
 MP-C1 AGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTACAAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGC
 ITA2 AGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTACAAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGC
 KZN-C24 AGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTACAAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGC
 Rio AGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTACAAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGC
 DIVA AGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTACAAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGC
 ITA3 AGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTACAAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGC
 IV1 AGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTACAAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGC
 IT2 AGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTACAAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGC
 Turkey AGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTACAAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGC
 ITA5RG AGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTACAAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGC
 Corrientes AGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTACAAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGC
 ITA7PA AGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTACAAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGC
 Chiapas AGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTACAAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGC
 ITA4PG AGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTACAAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGC
 ITA6PA AGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTACAAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGC
 ITA8CT AGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTACAAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGC
 ITA1 AGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTACAAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGC
 GP-C19 AGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTACAAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGC
 WC-10284 AGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTACAAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGC
 BbinW-C4 AGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTACAAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGC
 FS-146 AGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTACAAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGC
 BbiGP-C7 AGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTACAAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGC
 GP-C1 AGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTACAAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGC
 FS-189 AGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTACAAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGC
 WC-851 AGCTCGTTGCTCTGTATGAAACCGTACAAAAGCGAGGCCGATGCGCACCTGTACTACGGC

SP3 AGCGCCAGGATTGACCCGAAGTGGGATCAGAAGTGCCTATGAAGCCCATTAAAGGACGCC
 Mexico AGCGCCAGGATTGACCCGAAGTGGGATCAGAAGTGCCTATGAAGCCCATTAAAGGACGCC
 M1A AGCGCCAGGATTGACCCGAAGTGGGATCAGAAGTGCCTATGAAGCCCATTAAAGGACGCC
 M1P AGCGCCAGGATTGACCCGAAGTGGGATCAGAAGTGCCTATGAAGCCCATTAAAGGACGCC
 Australian TCAGCGCGCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAAGTGCCTATGAAGCCCATAAAGGACGCC
 MP-C12 TCGGCGCGCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAAGTGCCTATGAAGCCCATTAAAGGACGCC
 MP-C11 TCGGCGCGCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAAGTGCCTATGAAGCCCATTAAAGGACGCC
 MP-C1 TCGGCGCGCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAAGTGCCTATGAAGCCCATTAAAGGACGCC
 ITA2 TCAGCGCGCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAAGTGCCTATGAAGCCCATAAAGGACGCC
 KZN-C24 TCAGCGCGCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAAGTGCCTATGAAGCCCATAAAGGACGCC
 Rio TCGGCGCGCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAAGTGCCTATGAAGCCCATAAAGGACGCC
 DIVA TCGGCGCGCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAAGTGCCTATGAAGCCCATAAAGGACGCC
 ITA3 TCAGCGCGCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAAGTGCCTATGAAGCCCATTAAAGGACGCC
 IV1 TCAGCGCGCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAAGTGCCTATGAAGCCCATTAAAGGACGCC
 IT2 TCAGCGCGCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAAGTGCCTATGAAGCCCATTAAAGGACGCC
 Turkey TCAGCGCGCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAAGTGCCTATGAAGCCCATTAAAGGACGCC
 ITA5RG TCAGCGCGCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAAGTGCCTATGAAGCCCATTAAAGGACGCC
 Corrientes TCGGCGCGCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAAGTGCCTATGAAGCCCATTAAAGGACGCC
 ITA7PA TCAGCGCGCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAAGTGCCTATGAAGCCCATTAAAGGACGCC
 Chiapas TCAGCGCGCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAAGTGCCTATGAAGCCCATTAAAGGACGCC
 ITA4PG TCGGCGCGCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAAGTGCCTATGAAGCCCATTAAAGGACGCC
 ITA6PA TCGGCGCGCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAAGTGCCTATGAAGCCCATTAAAGGACGCC
 ITA8CT TCGGCGCGCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAAGTGCCTATGAAGCCCATTAAAGGACGCC
 ITA1 TCGGCGCGCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAAGTGCCTATGAAGCCCATTAAAGGACGCC
 GP-C19 TCGGCGCGCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAAGTGCCTATGAAGCCCATTAAAGGACGCC

WC-10284 TCGGCGCGCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAAGTGCCTATGAAGCCCATTAAAGGACGCC
 BbiNW-C4 TCGGCGCGCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAAGTGCCTATGAAGCCCATTAAAGGACGCC
 FS-146 TCAGCGCGCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAAGTGCCTATGAAACCCATTAAAGGACGCC
 BbiGP-C7 TCAGCGCGCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAAGTGCCTATGAAGCCCATTAAAGGACGCC
 GP-C1 TCAGCGCGCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAAGTGCCTATGAAGCCCATTAAAGGACGCC
 FS-189 TCAGCGCGCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAAGTGCCTATGAAGCCCATTAAAGGACGCC
 WC-851 TCAGCGCGCATTGACCCGAAGTGGGATCAGAAGTGCCTATGAAGCCCATTAAAGGACGCC

** * ***** ** ***** ***** *****

SP3 ATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCCCTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTAT
 Mexico ATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCCCTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTAT
 M1A ATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCCCTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTAT
 M1P ATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCCCTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTAT
 Australian ATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTAT
 MP-C12 ATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTAT
 MP-C11 ATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTAT
 MP-C1 ATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTAT
 ITA2 ATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTAT
 KZN-C24 ATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTAT
 Rio ATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCCCTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTAT
 DIVA ATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTAT
 ITA3 ATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTAT
 IV1 ATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTAT
 IT2 ATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTAT
 Turkey ATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTAT
 ITA5RG ATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTAT
 Corrientes ATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTAT
 ITA7PA ATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTAT
 Chiapas ATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTAT
 ITA4PG ATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTAT
 ITA6PA ATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTAT
 ITA8CT ATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTAT
 ITA1 ATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTAT
 GP-C19 ATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTAT
 WC-10284 ATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTAT
 BbiNW-C4 ATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTAT
 FS-146 ATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTAT
 BbiGP-C7 ATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTAT
 GP-C1 ATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTAT
 FS-189 ATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTAT
 WC-851 ATTTTCGGTACGTGGGTTTCCGGCGCCTGTGTTGCACTCGAATCTGCTTTTGAGGAGTAT

SP3 GTCGACAGCGCTGAGGAATGTGCTGCGATCCTGTTGAAAATTCAGCTGCGGATGTTGAC
 Mexico GTCGACAGCGCTGAGGAATGTGCTGCGATCCTGTTGAAAATTCAGCTGCGGATGTTGAC
 M1A GTCGACAGCGCTGAGGAATGTGCTGCGATCCTGTTGAAAATTCAGCTGCGGATGTTGAC
 M1P GTCGACAGCGCTGAGGAATGTGCTGCGATCCTGTTGAAAATTCAGCTGCGGATGTTGAC
 Australian GTCGACAGCGCTGAGGAATGTGCTGCGATCCTGTTGAAAATTCAGCTGCGGATGTTGAC
 MP-C12 GTCGACAGCGCTGAGGAATGTGCTGCGATCCTGTTGAAAATTCAGCTGCGGATGTTGAC
 MP-C11 GTCGACAGCGCTGAGGAATGTGCTGCGATCCTGTTGAAAATTCAGCTGCGGATGTTGAC
 MP-C1 GTCGACAGCGCTGAGGAATGTGCTGCGATCCTGTTGAAAATTCAGCTGCGGATGTTGAC
 ITA2 GTCGACAGCGCTGAGGAGTGTGCTGCGATCCTGTTGAAAATTCAGCTGCGGATGTTGAC
 KZN-C24 GTCGACAGCGCTGAGGAATGTGCTGCGATCCTGTTGAAAATTCAGCTGCGGATGTTGAC
 Rio GTCGACAGCGCTGAGGAATGTGCTGCGATCCTGTTGAAAATTCAGCTGCGGATGTTGAC
 DIVA GTCGACAGCGCTGAGGAATGTGCTGCGATCCTGTTGAAAATTCAGCTGCGGATGTTGAC
 ITA3 GTCGACAGCGCTGAGGAGTGTGCTGCGATCCTGTTGAAAATTCAGCTGCGGATGTTGAC
 IV1 GTCGACAGCGCTGAGGAGTGTGCTGCGATCCTGTTGAAAATTCAGCTGCGGATGTTGAC
 IT2 GTCGACAGCGCTGAGGAGTGTGCTGCGATCCTGTTGAAAATTCAGCTGCGGATGTTGAC
 Turkey GTCGACAGCGCTGAGGAGTGTGCTGCGATCCTGTTGAAAATTCAGCTGCGGATGTTGAC
 ITA5RG GTCGACAGCGCTGAGGAGTGTGCTGCGATCCTGTTGAAAATTCAGCTGCGGATGTTGAC
 Corrientes GTCGACAGCGCTGAGGAGTGTGCTGCGATCCTGTTGAAAATTCAGCTGCGGATGTTGAC
 ITA7PA GTCGACAGCGCTGAGGAGTGTGCTGCGATCCTGTTGAAAATTCAGCTGCGGATGTTGAC
 Chiapas GTCGACAGCGCTGAGGAGTGTGCTGCGATCCTGTTGAAAATTCAGCTGCGGATGTTGAC

ITA4PG GTCGACAGCGCTGAGGAGTGTGCTGCGATCCTGTTTCGAAACATTCAGCTGCGGATGTTGAC
 ITA6PA GTCGACAGCGCTGAGGAGTGTGCTGCGATCCTGTTTCGAAACATTCAGCTGCGGATGTTGAC
 ITA8CT GTCGACAGCGCTGAGGAGTGTGCTGCGATCCTGTTTCGAAACATTCAGCTGCGGATGTTGAC
 ITA1 GTCGACAGCGCTGAGGAGTGTGCTGCGATCCTGTTTCGAAAATTCAGCTGCGGATGTTGAC
 GP-C19 GTCGACAGCGCTGAGGAGTGTGCTGCGATCCTGTTTCGAAAATTCAGCTGCGGATGTTGAC
 WC-10284 GTCGACAGCGCTGAGGAGTGTGCTGCGATCCTGTTTCGAAAATTCAGCTGCGGATGTTGAC
 BbinW-C4 GTCGACAGCGCTGAGGAGTGTGCTGCGATCCTGTTTCGAAAATTCAGCTGCGGATGTTGAC
 FS-146 GTCGACAGCGCTGAGGAGTGTGCTGCGATCCTGTTTCGAAAATTCAGCTGCGGATGTTGAC
 BbiGP-C7 GTCGACAGCGCTGAGGAGTGTGCTGCGATCCTGTTTCGAAAATTCAGCTGCGGATGTTGAC
 GP-C1 GTCGACAGCGCTGAGGAGTGTGCTGCGATCCTGTTTCGAAAATTCAGCTGCGGATGTTGAC
 FS-189 GTCGACAGCGCTGAGGAGTGTGCTGCGATCCTGTTTCGAAAATTCAGCTGCGGATGTTGAC
 WC-851 GTCGACAGCGCTGAGGAGTGTGCTGCGATCCTGTTTCGAAAATTCAGCTGCGGATGTTGAC
 *** ***** ** ***** ***** ***** *****

SP3 ATTGACATCGACTCGGAGAGGTACAATGAAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAAC
 Mexico ATTGACATCGACTCGGAGAGGTACAATGAAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAAC
 M1a ATTGACATCGACTCGGAGAGGTACAATGAAATCAGGGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAAC
 M1P ATTGACATCGACTCGGAGAGGTACAATGAAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAAC
 Australian ATTGACATCGACTCGGAGAGGTACAATGAAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAAC
 MP-C12 ATTGACATCGACTCGGAGAGGTACAATGAAATCAGCGAGCTCTATAATGGTCTCAAGAAC
 MP-C11 ATTGACATCGACTCGGAGAGGTACAATGAAATCAGCGAGCTCTATAATGGTCTCAAGAAC
 MP-C1 ATTGACATCGACTCGGAGAGGTACAATGAAATCAGCGAGCTCTATAATGGTCTCAAGAAC
 ITA2 ATTGACATCGACTCGGAGAGGTACAATGAAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAAC
 KZN-C24 ATTGACATCGACTCGGAGAGGTACAATGAAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAAC
 Rio ATTGACATCGACTCGGAGAGGTACAATGAAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAAC
 DIVA ATTGACATCGACTCGGAGAGGTACAATGAAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAAC
 ITA3 ATTGACATCGAGTCGGAGAGATACAATGAAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAAC
 IV1 ATTGACATCGAGTCGGAGAGATACAATGAAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAAC
 IT2 ATTGACATCGAGTCGGAGAGATACAATGAAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAAC
 Turkey ATTGACATCGAGTCGGAGAGATACAATGAAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAAC
 ITA5RG ATTGACATCGAGTCGGAGAGGTACAATGAAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAAC
 Corrientes ATTGACATCGACTCGGAGAGGTACAATGAAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAAC
 ITA7PA ATTGACATCGAGTCGGAGAGGTACAATGAAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAAC
 Chiapas ATTGACATCGAGTCGGAGAGGTACAATGAAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAAC
 ITA4PG ATTGACATCGAGTCGGAGAGGTACAATGAAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAAC
 ITA6PA ATTGACATCGAGTCGGAGAGGTACAATGAAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAAC
 ITA8CT ATTGACATCGAGTCGGAGAGGTACAATGAAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAAC
 ITA1 ATTGACATCGACTCGGAGAGGTACAATGAAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAAC
 GP-C19 ATTGACATCGACTCGGAGAGGTACAATGAAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAAC
 WC-10284 ATTGACATCGACTCGGAGAGGTACAATGAAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAAC
 BbinW-C4 ATTGACATCGACTCGGAGAGGTACAATGAAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAAC
 FS-146 ATTGACATCGACTCGGAGAGGTACAATGAAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAAC
 BbiGP-C7 ATTGACATCGACTCGGAGAGGTACAATGAAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAAC
 GP-C1 ATTGACATCGACTCGGAGAGGTACAATGAAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAAC
 FS-189 ATTGACATCGACTCGGAGAGGTACAATGAAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAAC
 WC-851 ATTGACATCGACTCGGAGAGGTACAATGAAATCAGCGAGCTCTACAATGGTCTCAAGAAC
 ***** ***** ***** ***** ***** *****

SP3 CTTACCTTCAGCAGATCGCGTTCTCGTGTTTGCCCTATGGCGAAGTCAGCCGCTTCC
 Mexico CTTACCTTCAGCAGATCGCGTTCTCGTGTTTGCCCTATGGCGAAGTCAGCCGCTTCC
 M1A CTTACCTTCAGCAGATCGCGTTCTCGTGTTTGCCCTATGGCGAAGTCAGCCGCTTCC
 M1P CTTACCTTCAGCAGATCGCGTTCTCGTGTTTGCCCTATGGCGAAGTCAGCCGCTTCC
 Australian CTTACCTTCAGCAGATCGCATCTCGTGTTTGCCCTATGGCGAAGTCAGCCGCTTCC
 MP-C12 CTTACCTTCAGCAGATCGCGTTCTCGTGTTTGCCCTATGGCGAAGTCAGCCGCTTCC
 MP-C11 CTTACCTTCAGCAGATCGCGTTCTCGTGTTTGCCCTATGGCGAAGTCAGCCGCTTCC
 MP-C1 CTTACCTTCAGCAGATCGCGTTCTCGTGTTTGCCCTATGGCGAAGTCAGCCGCTTCC
 ITA2 CTTACCTTCAGCAGATCGCGTTCTCGTGTTTGCCCTATGGCGAAGTCAGCCGCTTCC
 KZN-C24 CTTACCTTCAGCAGATCGCGTTCTCGTGTTTGCCCTATGGCGAAGTCAGCCGCTTCC
 Rio CTTACCTTCAGCAGATCGCGTTCTCGTGTTTGCCCTATGGCGAAGTCAGCCGCTTCC
 DIVA CTTACCTTCAGCAGATCGCGTTCTCGTGTTTGCCCTATGGCGAAGTCAGCCGCTTCC
 ITA3 CTTAAGCTTCAGCAGATCGCGTTCTCGTGTTTGCCCTATGGCGAAGTCAGCCGCTTCC
 IV1 CTTAAGCTTCAGCAGATCGCGTTCTCGTGTTTGCCCTATGGCGAAGTCAGCCGCTTCC
 IT2 CTTAAGCTTCAGCAGATCGCGTTCTCGTGTTTGCCCTATGGCGAAGTCAGCCGCTTCC

Rio	TGCCGTATCCTGAACGCAACTCCTACCTGCCTCATCATCAACGCCGGCAGTCTGGCCATG
DIVA	-----
ITA3	TGCCGTATCCTGAACGCAACGCCTACCTGCCTCATCATCAACGCCGGCAGTCTGGCCATG
IV1	TGCCGTATCCTGAACGCAACTCCTACCTGCCTCATCATCAACGCCGGCAGCCTGGCCATG
IT2	TGCCGTATCCTGAACGCAACTCCTACCTGCCTCATCATCAACGCCGGCAGCCTGGCCATG
Turkey	TGCCGTATCCTGAACGCAACTCCTACCTGCCTCATCATCAACGCCGGCAGCCTGGCCATG
ITA5RG	TGCCGTATCCTGAACGCAACGCCTACCTGCCTCATCATCAACGCCGGCAGCCTGGCCATG
Corrientes	TGCCGTATCCTGAACGCAACGCCTACCTGCCTCATCATCAACGCCGGCAGCCTGGCCATG
ITA7PA	TGCCGTATCCTGAACGCAACTCCTACCTGCCTCATCATCAACGCCGGCAGCCTGGCCATG
Chiapas	TGCCGTATCCTGAACGCAACTCCTACCTGCCTCATCATCAACGCCGGCAGCCTGGCCATG
ITA4PG	TGCCGTATCCTGAACGCAACGCCTACCTGCCTCATCATCAACGCCGGCAGCCTGGCCATG
ITA6PA	TGCCGTATCCTGAACGCAACTCCTACCTGCCTCATCATCAACGCCGGCAGCCTGGCCATG
ITA8CT	TGCCGTATCCTGAACGCAACTCCTACCTGCCTCATCATCAACGCCGGCAGCCTGGCCATG
ITA1	TGCCGTATCCTGAACGCAACTCCTACCTGCCTCATCATCAACGCCGGCAGCCTGGCCATG
GP-C19	-----
WC-10284	-----
BbiNW-C4	-----
FS-146	-----
BbiGP-C7	-----
GP-C1	-----
FS-189	-----
WC-851	-----

SP3	ACCGCCCTCGGTTCCCGGTTGGAGTCGGACGCCATTAACTACCCATGCCACATCGACACC
Mexico	ACCGCCCTCGGTTCCCGGTTGGAGTCGGACGCCATTAACTACCCATGCCACATCGACACC
M1A	ACCGCCCTCGGTTCCCGGTTGGAGTCGGACGCCATTAACTACCCATGCCACATCGACACC
M1P	ACCGCCCTCGGTTCCCGGTTGGAGTCGGACGCCATTAACTACCCATGCCACATCGACACC
Australian	ACCGCCCTCGGTTCCCGGTTGGAGTCGGACGCCATTAACTACCCATGCCACATCGACACC
MP-C12	-----
MP-C11	-----
MP-C1	-----
ITA2	ACCGCCCTCGGTTCCCGGTTGGAGTCTGACGCCATTAACTACCCATGCCACATCGACACC
KZN-C24	-----
Rio	ACCGCCCTCGGTTCCCGGTTGGAGTCGGACGCCATTAACTACCCATGCCACATCGACACC
DIVA	-----
ITA3	ACCGCCCTCGGTTCCCGGTTGGAGTCGGACGCCATTAACTACCCATGCCACATCGACACC
IV1	ACCGCCCTCGGTTCCCGGTTGGAGTCTGACGCCATTAACTACCCATGCCACATCGACACC
IT2	ACCGCCCTCGGTTCCCGGTTGGAGTCTGACGCCATTAACTACCCATGCCACATCGACACC
Turkey	ACCGCCCTCGGTTCCCGGTTGGAGTCTGACGCCATTAACTACCCATGCCACATCGACACC
ITA5RG	ACCGCCCTCGGTTCCCGGTTGGAGTCTGACGCCATTAACTACCCATGCCACATCGACACC
Corrientes	ACCGCCCTCGGTTCCCGGTTGGAGTCGGACGCCATTAACTACCCATGCCACATCGACACC
ITA7PA	ACCGCCCTCGGTTCCCGGTTGGAGTCTGACGCCATTAACTACCCATGCCACATCGACACC
Chiapas	ACCGCCCTCGGTTCCCGGTTGGAGTCTGACGCCATTAACTACCCATGCCACATCGACACC
ITA4PG	ACCGCCCTCGGTTCCCGGTTGGAGTCGGACGCCATTAACTACCCATGCCACATCGACACC
ITA6PA	ACCGCCCTCGGTTCCCGGTTGGAGTCTGACGCCATTAACTACCCATGCCACATCGACACC
ITA8CT	ACCGCCCTCGGTTCCCGGTTGGAGTCTGACGCCATTAACTACCCATGCCACATCGACACC
ITA1	ACCGCCCTCGGTTCCCGGTTGGAGTCTGACGCCATTAACTACCCATGCCACATCGACACC
GP-C19	-----
WC-10284	-----
BbiNW-C4	-----
FS-146	-----
BbiGP-C7	-----
GP-C1	-----
FS-189	-----
WC-851	-----

SP3	CTTGTTACGTCGAGCCGCGCAAGAGGGACTCTAGGGAAGATGGCGACAGGAACTCCGGT
Mexico	CTTGTTACGTCGAGCCGCGCAAGAGGGACTCTAGGGAAGATGGCGACAGGAACTCCGGT
M1A	CTTGTTACGTCGAGCCGCGCAAGAGGGACTCTAGGGAAGATGGCGACAGGAACTCCGGT
M1P	CTTGTTACGTCGAGCCGCGCAAGAGGGACTCTAGGGAAGATGGCGACAGGAACTCCGGT
Australian	CTTGTTACGTCGAGCCGCGCAAGAGGGACTCTAGGGAAGATGGCGACAGGAACTCCGGT

MP-C12 -----
 MP-C11 -----
 MP-C1 -----
 ITA2 CTTGGTTACGTCGAGCCGCGCAAGAGGGACTCTAGGGAAGATGGCGACAGGAACTCCGGT
 KZN-C24 -----
 Rio CTTGGTTACGTCGAGCCGCGCAAGAGGGACTCTAGGGAAGATGGCGACAGGAACTCCGGT
 DIVA -----
 ITA3 CTTGGTTACGTCGAGCCGCGCAAGAGGGACTCTAGGGAAGATGGTGACAGGAACTCCGGT
 IV1 CTTGGTTACGTCGAGCCGCGCAAGAGGGACTCTAGGGAAGATGGCGACAGGAACTCCGGT
 IT2 CTTGGTTACGTCGAGCCGCGCAAGAGGGACTCTAGGGAAGATGGCGACAGGAACTCCGGT
 Turkey CTTGGTTACGTCGAGCCGCGCAAGAGGGACTCTAGGGAAGATGGCGACAGGAACTCCGGT
 ITA5RG CTTGGTTACGTCGAGCCGCGCAAGAGGGACTCTAGGGAAGATGGCGACAGGAACTCCGGT
 Corrientes CTTGGTTACGTCGAGCCGCGCAAGAGGGACTCTAGGGAAGATGGCGACAGGAACTCCGGT
 ITA7PA CTTGGTTACGTCGAGCCGCGCAAGAGGGACTCTAGGGAAGATGGCGACAGGAACTCCGGT
 Chiapas CTTGGTTACGTCGAGCCGCGCAAGAGGGACTCTAGGGAAGATGGCGACAGGAACTCCGGT
 ITA4PG CTTGGTTACGTCGAGCCGCGCAAGAGGGACTCTAGGGAAGATGGTGAGAGGAACTCCGGT
 ITA6PA CTTGGTTACGTCGAGCCGCGCAAGAGGGACTCTAGGGAAGATGGTGACAGGAACTCCGGT
 ITA8CT CTTGGTTACGTCGAGCCGCGCAAGAGGGACTCTAGGGAAGATGGCGACAGGAACTCCGGT
 ITA1 CTTGGTTACGTCGAGCCGCGCAAGAGGAACTCTAGGGAAGATGGCGACAGGAACTCCGGT
 GP-C19 -----
 WC-10284 -----
 BbiNW-C4 -----
 FS-146 -----
 BbiGP-C7 -----
 GP-C1 -----
 FS-189 -----
 WC-851 -----

SP3 ATCACCACCGCTCTCAACATGCAGACTTTGAAGTGCACGAAATACGTCCACTCGAAGTAT
 Mexico ATCACCACCGCTCTCAACATGAAAACCTTTGAAGTGCACGAAATACGTCCACTCGAAGTAT
 M1A ATCACCACCGCTCTCAACATGAAAACCTTTGAAGTGCACGAAATACGTCCACTCGAAGTAT
 M1P ATCACCACCGCTCTCAACATGAAAACCTTTGAAGTGCACGAAATACGTCCACTCGAAGTAT
 Australian ATCACCACCGCTCTCAACATGAAAACCTTTGAAGTGCACGAAATACGTCCACTCGAAGTAT
 MP-C12 -----
 MP-C11 -----
 MP-C1 -----
 ITA2 ATCACCACCGCTCTCAACATGAAAACCTTTGAAGTGCACGAAATACGTCCACTCGAAGTAT
 KZN-C24 -----
 Rio ATCACCACCGCTCTCAACATGAAAACCTTTGAAGTGCACGAAATACGTCCACTCGAAGTAT
 DIVA -----
 ITA3 ATCACCACCGCTCTCAACATGAAAACCTTTGAAGTGCACGAAATACGTCCACTCGAAGTAT
 IV1 ATCACCACCGCTCTCAACATGAAAACCTTTGAAGTGCACGAAATACGTCCACTCGAAGTAT
 IT2 ATCACCACCGCTCTCAACATGAAAACCTTTGAAGTGCACGAAATACGTCCACTCGAAGTAT
 Turkey ATCACCACCGCTCTCAACATGAAAACCTTTGAAGTGCACGAAATACGTCCACTCGAAGTAT
 ITA5RG ATCACCACCGCTCTCAACATGAAAACCTTTGAAGTGCACGAAATACGTCCACTCGAAGTAT
 Corrientes ATCACCACCGCTCTCAACATGAAAACCTTTGAAGTGCACGAAATACGTCCACTCGAAGTAT
 ITA7PA ATCACCACCGCTCTCAACATGAAAACCTTTGAAGTGCACGAAATACGTCCACTCGAAGTAT
 Chiapas ATCACCACCGCTCTCAACATGAAAACCTTTGAAGTGCACGAAATACGTCCACTCGAAGTAT
 ITA4PG ATCACCACCGCTCTCAACATGAAAACCTTTGAAGTGCACGAAATACGTCCACTCGAAGTAT
 ITA6PA ATCACCACCGCTCTCAACATGAAAACCTTTGAAGTGCACGAAATACGTCCACTCGAAGTAT
 ITA8CT ATCACCACCGCTCTCAACATGAAAACCTTTGAAGTGCACGAAATACGTCCACTCGAAGTAT
 ITA1 ATCACCACCGCTCTCAACATGAAAACCTTTGAAGTGCACGAAATACGTCCACTCGAAGTAT
 GP-C19 -----
 WC-10284 -----
 BbiNW-C4 -----
 FS-146 -----
 BbiGP-C7 -----
 GP-C1 -----
 FS-189 -----
 WC-851 -----

SP3	TCTGAAAGCTGTGGCACGTACTACTACTGCTCCGAAGAGAAATCCGGCTACCTCAGCAGG
Mexico	TCTGAAAGCTGTGGCACGTACTACTACTGCTCCGAAGAGAAATCCGGCTACCTCAGCAGG
M1A	TCTGAAAGCTGTGGCACGTACTACTACTGCTCCGAAGAGAAATCCGGCTACCTCAGCAGG
M1P	TCTGAAAGCTGTGGCACGTACTACTACTGCTCCGAAGAGAAATCCGGCTACCTCAGCAGG
Australian	TCTGAAAGCTGTGGCACGTACTACTACTGCTCCGAGGAGAAATCCGGCTACCTCAGCAGG
MP-C12	-----
MP-C11	-----
MP-C1	-----
ITA2	TCTGAAAGCTGTGGCACGTACTACTACTGCTCCGAAGAGAAATCCGGCTACCTCAGCAGG
KZN-C24	-----
Rio	TCTGAAAGCTGTGGCACGTACTACTACTGCTCCGAAGAGAAATCCGGCTACCTCAGCAGG
DIVA	-----
ITA3	TCTGAGAGCTGTGGCACGTACTACTACTGCTCCGAAGAGAAATCCGGCTACCTCAGCAGG
IV1	TCTGAAAGCTGTGGCACGTACTACTACTGCTCCGAAGAGAAATCCGGCTACCTCAGCAGG
IT2	TCTGAAAGCTGTGGCACGTACTACTACTGCTCCGAAGAGAAATCCGGCTACCTCAGCAGG
Turkey	TCTGAAAGCTGTGGCACGTACTACTACTGCTCCGAAGAGAAATCCGGCTACCTCAGCAGG
ITA5RG	TCTGAAAGCTGTGGCACGTACTACTACTGCTCCGAAGAGAAATCCGGCTACCTCAGCAGG
Corrientes	TCTGAAAGCTGTGGCACGTACTACTACTGCTCCGAAGAGAAATCCGGCTACCTCAGCAGG
ITA7PA	TCTGAGAGCTGTGGCACGTACTACTACTGCTCCGAGGAGAAATCCGGCTACCTCAGCAGG
Chiapas	TCTGAAAGCTGTGGCACGTACTACTACTGCTCCGAAGAGAAATCCGGCTACCTCAGCAGG
ITA4PG	TCTGAAAGCTGTGGCACGTACTACTACTGCTCCGAAGAGAAATCCGGCTACCTCAGCAGG
ITA6PA	TCTGAGAGCTGTGGCACGTACTACTACTGCTCCGAAGAGAAATCCGGCTACCTCAGCAGG
ITA8CT	TCTGAAAGCTGTGGCACGTACTACTACTGCTCCGAAGAGAAATCCGGCTACCTCAGCAGG
ITA1	TCTGAAAGCTGTGGCACGTACTACTACTGCTCCGAAGAGAAATCCGGCTACCTCAGCAGG
GP-C19	-----
WC-10284	-----
BbiNW-C4	-----
FS-146	-----
BbiGP-C7	-----
GP-C1	-----
FS-189	-----
WC-851	-----

SP3	CTGTACCAGTTCATGTGCTCGCACAACGTGAAGAAGGCTGCGGTTATTTCCACGGCGCTC
Mexico	CTGTACCAGTTCATGTGCTCGCACAACGTGAAGAAGGCTGCGGTTATTTCCACGGCGCTC
M1A	CTGTACCAGTTCATGTGCTCGCACAACGTGAAGAAGGCTGCGGTTATTTCCACGGCGCTC
M1P	CTGTACCAGTTCATGTGCTCGCACAACGTGAAGAAGGCTGCGGTTATTTCCACGGCGCTC
Australian	CTGTACCAGTTCATGTGCTCGCACAACGTGAAGAAGGCTGCGGTTATTTCCACGGCGCTC
MP-C12	-----
MP-C11	-----
MP-C1	-----
ITA2	CTCTACCAGTTCATGTGCTCGCACAACGTGAAGAAGGCTGCGGTTATTTCCACGGCGCTC
KZN-C24	-----
Rio	CTGTACCAGTTCATGTGCTCGCACAACGTGAAGAAGGCTGCGGTTATTTCCACGGCGCTC
DIVA	-----
ITA3	CTCTACCAGTTCATGTGCTCGCACAACGTGAAGAAGGCTGCGGTTATTTCCACGGCGCTC
IV1	CTCTACCAGTTCATGTGCTCGCACAACGTGAAGAAGGCTGCGGTTATTTCCACGGCGCTC
IT2	CTCTACCAGTTCATGTGCTCGCACAACGTGAAGAAGGCTGCGGTTATTTCCACGGCGCTC
Turkey	CTCTACCAGTTCATGTGCTCGCACAACGTGAAGAAGGCTGCGGTTATTTCCACGGCGCTC
ITA5RG	CTCTACCAGTTCATGTGCTCGCACAACGTGAAGAAGGCTGCGGTTATTTCCACGGCGCTC
Corrientes	CTGTACCAGTTCATGTGCTCGCACAACGTGAAGAAGGCTGCGGTTATTTCCACGGCGCTC
ITA7PA	CTCTACCAGTTCATGTGCTCGCACAACGTGAAGAAGGCTGCGGTTATTTCCACGGCGCTC
Chiapas	CTGTACCAGTTCATGTGCTCGCACAACGTGAAGAAGGCTGCGGTTATTTCCACGGCGCTC
ITA4PG	CTCTACCAGTTCATGTGCTCGCACAACGTGAAGAAGGCTGCGGTTATTTCCACGGCGCTC
ITA6PA	CTCTACCAGTTCATGTGCTCGCACAACGTGAAGAAGGCTGCGGTTATTTCCACGGCGCTC
ITA8CT	CTGTACCAGTTCATGTGCTCGCACAACGTGAAGAAGGCTGCGGTTATTTCCACGGCGCTC
ITA1	CTGTACCAGTTCATGTGCTCGCACAACGTGAAGAAGGCTGCGGTTATTTCCACGGCGCTC
GP-C19	-----
WC-10284	-----
BbiNW-C4	-----
FS-146	-----
BbiGP-C7	-----

GP-C1 -----
FS-189 -----
WC-851 -----

SP3 GTGTTGCTGTGCTTGGCCATCTACTGGATTTACCAGAGGCTCTGGAGCACGAAGAAGGGT
Mexico GTGTTGCTGTGCTTGGCCATCTACTGGATTTACCAGAGGCTCTGGAGCACGAAGAAGGGT
M1A GTGTTGCTGTGCTTGGCCATCTACTGGATTTACCAGAGGCTCTGGAGCACGAAGAAGGGT
M1P GTGTTGCTGTGCTTGGCCATCTACTGGATTTACCAGAGGCTCTGGAGCACGAAGAAGGGT
Australian GTGTTGCTTGGCTTGGCCATCTACTGGATTTACCAGAGGCTCTGGAGCACGAAGAAGGGT
MP-C12 -----
MP-C11 -----
MP-C1 -----
ITA2 GTGTTGCTGTGCTTGGCCATCTACTGGATTTACCAGAGGCTCTGGAGCACGAAGAAGGGT
KZN-C24 -----
Rio GTGTTGCTTGGCTTGGCCATCTACTGGATTTACCAGAGGCTCTGGAGCACGAAGAAGGGT
DIVA -----
ITA3 GTGTTGCTGTGCTTGGCCATCTACTGGATTTACCAGAGGCTCTGGAGCACGAAGAAGGGT
IV1 GTGTTGCTGTGCTTGGCCATCTACTGGATTTACCAGAGGCTCTGGAGCACGAAGAAGGGT
IT2 GTGTTGCTGTGCTTGGCCATCTACTGGATTTACCAGAGGCTCTGGAGCACGAAGAAGGGT
Turkey GTGTTGCTGTGCTTGGCCATCTACTGGATTTACCAGAGGCTCTGGAGCACGAAGAAGGGT
ITA5RG GTGTTGCTTGGCTTGGCCATCTACTGGATTTACCAGAGGCTCTGGAGCACGAAGAAGGGT
Corrientes GTGTTGCTTGGCTTGGCCATCTACTGGATTTACCAGAGGCTCTGGAGCACGAAGAAGGGT
ITA7PA GTGTTGCTGTGCTTGGCCATCTACTGGATTTACCAGAGGCTCTGGAGCACGAAGAAGGGT
Chiapas GTGTTGCTGTGCTTGGCCATCTACTGGATTTACCAGAGGCTCTGGAGCACGAAGAAGGGT
ITA4PG GTGTTGCTTGGCTTGGCCATCTACTGGATTTACCAGAGGCTCTGGAGCACGAAGAAGGGT
ITA6PA GTGTTGCTTGGCTTGGCCATCTACTGGATTTACCAGAGGCTCTGGAGCACGAAGAAGGGT
ITA8CT GTGTTGCTTGGCTTGGCCATCTACTGGATTTACCAGAGGCTCTGGAGCACGAAGAAGGGT
ITA1 GTGTTGCTTGGCTTGGCCATCTACTGGATTTACCAGAGGCTCTGGAGCACGAAGAAGGGT
GP-C19 -----
WC-10284 -----
BbiNW-C4 -----
FS-146 -----
BbiGP-C7 -----
GP-C1 -----
FS-189 -----
WC-851 -----

SP3 CGTCAGCACGATGATTACGACCGCCTTATGAGCAAGTACGAGTATGACGATGTATCGCAT
Mexico CGTCAGCACGATGATTACGACCGCCTTATGAGCAAGTACGAGTATGACGATGTATCGCAT
M1A CGTCAGCACGATGATTACGACCGCCTTATGAGCAAGTACGAGTATGACGATGTATCGCAT
M1P CGTCAGCACGATGATTACGACCGCCTTATGAGCAAGTACGAGTATGACGATGTATCGCAT
Australian CGTCAGCACGATGATTACGACCGCCTTATGAGCAAGTACGAGTATGACGATGTATCGCAT
MP-C12 -----
MP-C11 -----
MP-C1 -----
ITA2 CGTCAGCACGATGATTACGACCGCCTTATGAGCAAGTACGAGTATGACGATGTATCGCAT
KZN-C24 -----
Rio CGTCAGCACGATGATTACGACCGCCTTATGAGCAAGTACGAGTATGACGATGTATCGCAT
DIVA -----
ITA3 CGTCAGCACGATGATTACGACCGCCTTATGAGCAAGTACGAGTATGACGATGTATCGCAT
IV1 CGTCAGCACGATGATTACGACCGCCTTATGAGCAAGTACGAGTATGACGATGTATCGCAT
IT2 CGTCAGCACGATGATTACGACCGCCTTATGAGCAAGTACGAGTATGACGATGTATCGCAT
Turkey CGTCAGCACGATGATTACGACCGCCTTATGAGCAAGTACGAGTATGACGATGTATCGCAT
ITA5RG CGTCAGCACGATGATTACGACCGCCTTATGAGCAAGTACGAGTATGACGATGTATCGCAT
Corrientes CGTCAGCACGATGATTACGACCGCCTTATGAGCAAGTACGAGTATGACGATGTATCGCAT
ITA7PA CGTCAGCACGATGATTACGACCGCCTTATGAGCAAGTACGAGTATGACGATGTATCGCAT
Chiapas CGTCAGCACGATGATTACGACCGCCTTATGAGCAAGTACGAGTATGACGATGTATCGCAT
ITA4PG CGTCAGCACGATGATTACGACCGCCTTATGAGCAAGTACGAGTATGACGATGTATCGCAT
ITA6PA CGTCAGCACGATGATTACGACCGCCTTATGAGCAAGTACGAGTATGACGATGTATCGCAT
ITA8CT CGTCAGCACGATGATTACGACCGCCTTATGAGCAAGTACGAGTATGACGATGTATCGCAT
ITA1 CGTCAGCACGATGATTACGACCGCCTTATGAGCAAGTACGAGTATGACGATGTATCGCAT

GP-C19 -----
 WC-10284 -----
 BbinW-C4 -----
 FS-146 -----
 BbiGP-C7 -----
 GP-C1 -----
 FS-189 -----
 WC-851 -----

SP3 GACAATATCGAGCCGGAGCACCAACTGAGAACAGACGCGTACATCTGGGGAGAGGCTGCC
 Mexico GACAATATCGAGCCGGAGCACCAACTGAGAACAGACGCGTACATCTGGGGAGAGGCTGCC
 M1A GACAATATCGAGCCGGAGCACCAACTGAGAACAGACGCGTACATCTGGGGAGAGGCTGCC
 M1P GACAATATCGAGCCGGAGCACCAACTGAGAACAGACGCGTACATCTGGGGAGAGGCTGCC
 Australian GACAATATCGAGCCGGAGCACCAACTGAGAACAGACGCGTACATCTGGGGAGAGGCTGCC
 MP-C12 -----
 MP-C11 -----
 MP-C1 -----
 ITA2 GACAATATCGAGCCGGAGCACCAACTGAGAACAGACGCGTACATCTGGGGAGAGGCTGCC
 KZN-C24 -----
 Rio GACAATATCGAGCCGGAGCACCAACTGAGAACAGACGCGTACATCTGGGGAGAGGCTGCC
 DIVA -----
 ITA3 GACAATATCGAGCCGGAGCACCAACTGAGAACAGACGCGTACATCTGGGGAGAGGCTGCC
 IV1 GACAATATCGAGCCGGAGCACCAACTGAGAACAGACGCGTACATCTGGGGAGAGGCTGCC
 IT2 GACAATATCGAGCCGGAGCACCAACTGAGAACAGACGCGTACATCTGGGGAGAGGCTGCC
 Turkey GACAATATCGAGCCGGAGCACCAACTGAGAACAGACGCGTACATCTGGGGAGAGGCTGCC
 ITA5RG GACAATATCGAGCCAGAGCACCAACTGAGAACAGACGCGTACATCTGGGGAGAGGCTGCC
 Corrientes GACAATATCGAGCCAGAGCACCAACTGAGAACAGACGCGTACATCTGGGGAGAGGCTGCC
 ITA7PA GACAATATCGAGCCAGAGCACCAACTGAGAACAGACGCGTACATCTGGGGAGAGGCTGCC
 Chiapas GACAATATCGAGCCAGAGCACCAACTGAGAACAGACGCGTACATCTGGGGAGA-----
 ITA4PG GACAATATCGAGCCGGAGCACCAACTGAGAACAGACGCGTACATCTGGGGAGAGGCTGCC
 ITA6PA GACAATATCGAGCCGGAGCACCAACTGAGAACAGACGCGTACATCTGGGGAGAGGCTGCC
 ITA8CT GACAATATCGAGCCAGAGCACCAACTGAGAACAGACGCGTACATCTGGGGAGAGGCTGCC
 ITA1 GACAATATCGAGCCGGAGCACCAACTGAGAACAGACGCGTACATCTGGGGAGAGGCTGCC
 GP-C19 -----
 WC-10284 -----
 BbinW-C4 -----
 FS-146 -----
 BbiGP-C7 -----
 GP-C1 -----
 FS-189 -----
 WC-851 -----

SP3 GCCAGACCCAGTGACATAACGCCAGTACACCTGACTAAGCTCAAC---
 Mexico GCCAGACCCAGTGACATAACGCCAGTACACCTGACTAAGCTCAAC---
 M1A GCCAGACCCAGTGACATAACGCCAGTACACCTGACTAAGCTCAAC---
 M1P GCCAGACCCAGTGACATAACGCCAGTACACCTGACTAAGCTCAAC---
 Australian GCCAGACCCAGTGACATAACGCCAGTACACCTGACTAAGCTCAACTGA
 MP-C12 -----
 MP-C11 -----
 MP-C1 -----
 ITA2 GCCAGACCCAGTGACATAACGCCAGTACACATGGCTAAGCTCAACTGA
 KZN-C24 -----
 Rio GCCAGACCCAGTGACATAACGCCAGTACACCTGACTAAGCTCAACTGA
 DIVA -----
 ITA3 GCCAGACCCAGTGACATAACGCCAGTACACCTGACTAAGCTCAACTGA
 IV1 GCCAGACCCAGTGACATAACGCCAGTACACCTGACTAAGCTCAACTGA
 IT2 GCCAGACCCAGTGACATAACGCCAGTACACCTGACTAAGCTCAACTGA
 Turkey GCCAGACCCAGTGACATAACGCCAGTACACCTGACTAAGCTCAACTGA
 ITA5RG GCCAGACCCAGTGACATAACGCCAGTACACCTGACTAAGCTCAACTGA
 Corrientes GCCAGACCCAGTGACATAACGCCAGTACACCTGACTAAGCTCAACTGA
 ITA7PA GCCAGACCCAGTGACATAACGCCAGTACACCTGACTAAGCTCAACTGA

Chiapas	-----
ITA4PG	GCCAGACCCAGTGACATAACGCCAGTACACCTGACTAAGCTCAACTGA
ITA6PA	GCCAGACCCAGTGACATAACGCCAGTACACCTGACTAAGCTCAACTGA
ITA8CT	GCCAGACCCAGTGACATAACGTCAGTACACCTGACTAAGCTCAACTGA
ITA1	GCCAGACCCAGTGACATAACGCCAGTACACATGGCTAAGCTCAACTGA
GP-C19	-----
WC-10284	-----
BbiNW-C4	-----
FS-146	-----
BbiGP-C7	-----
GP-C1	-----
FS-189	-----
WC-851	-----