

Estrategias genómicas y moleculares para el control de la babesiosis bovina

Genome and molecular strategies for bovine babesiosis control

Juan Joel Mosqueda Gualito^a, Alfonso Falcón Neri^b, Juan Alberto Ramos Aragón^b, Germinal Jorge Canto Alarcón^a, Minerva Camacho-Nuez^c

RESUMEN

El control de la babesiosis bovina en muchas partes del mundo está restringido al tratamiento quimioterapéutico y al control de la población de garrapatas con agentes acaricidas. No hay programas de control basados en estudios de inmunidad de hato, control integral de la garrapata y las enfermedades que transmite, ni vacunas contra la babesiosis disponibles comercialmente. Para poder desarrollar estas herramientas es necesario utilizar tecnologías que incluyan conocimientos de genómica, proteómica y bioinformática, apoyadas en la investigación de genes con potencial diagnóstico o vacunal. El estudio de la función de los genes, y de la conservación o variabilidad son indispensables para determinar su utilidad. Es necesario, primero identificar los genes con potencial a incluirse en el desarrollo de estas herramientas, y después, evaluar su variabilidad o conservación en distintas poblaciones de parásitos. En segundo término, es necesario seleccionar regiones específicas de estos genes, que cumplan la función deseada, ya sean regiones conservadas o diferentes entre cepas. Finalmente, es necesario utilizar el método adecuado de evaluación de estos candidatos para el desarrollo de métodos de control adecuados. A pesar de que hay ciertos avances en el estudio de genes de *B. bovis*, hay prácticamente nula información respecto a *B. bigemina*. Es necesario aprovechar las nuevas estrategias genómicas y de bioinformática para identificar nuevos genes con potencial diagnóstico y de vacunación. El desarrollo de la ganadería mexicana está supeditado al establecimiento e implementación de estas herramientas.

PALABRAS CLAVE: Babesiosis bovina, Diagnóstico, Bioinformática.

ABSTRACT

The control of bovine babesiosis around the world is restricted to chemotherapeutic treatment and tick population reduction by acaricide agents. There are no control strategies based on herd immunity studies, programs on integral control of ticks and tick-transmitted diseases, neither are commercially available safe vaccines against babesiosis. In order to develop these tools it is necessary the use of genomics, proteomics, and bioinformatics together with research on genes with a potential use as diagnostics or vaccines. Studies on the function of those genes and, the degree of conservation of variation are mandatory to determine their usefulness. First, it is necessary to identify genes with a potential use in the development of these tools and then, evaluate their variation or conservation between different parasite populations. Second, specific domains of those genes must be selected in order for them to be used as desired, whether they are on conserved or variable regions of those genes in different strains. Finally, the best evaluation method for those genes must be employed to develop adequate control methods. Although there is some research in the study of *Babesia bovis* genes, there is practically no information about *B. bigemina*. Therefore it is necessary to take advantage of the genomics and bioinformatics strategies to identify new genes as diagnostics and vaccine potential. The development of the Mexican livestock depends upon the implementation of these tools.

KEY WORDS: Bovine babesiosis, diagnostics, bioinformatics.

INTRODUCCIÓN

En México como en muchos otros países con regiones ganaderas de clima tropical y subtropical, existe una enfermedad de los bovinos que es transmitida por garrapatas. Esta enfermedad conocida como babesiosis bovina, es causada por protozoarios del género *Babesia* y se caracteriza por inducir procesos febriles en animales infectados, además de causar anemia de tipo hemolítico, hemoglobinemia, hemoglobinuria y en casos frecuentes, signos nerviosos y la muerte⁽¹⁾.

INTRODUCTION

In México, the same as in other countries having tropical and subtropical livestock production areas, a tick transmitted disease is extant. This disease is widely known as bovine babesiosis, due to protozoa of the genus *Babesia*, characterized by fever in infected animals, besides producing hemolytic anemia, hemoglobinemia, hemoglobinuria and in many cases, nervous signs and death⁽¹⁾. In México, babesiosis is due to two species, *Babesia bigemina* and *B. bovis*,

^a Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Avenida de las Ciencias S/N Col. Juriquilla, Santiago de Querétaro CP. 76230, Querétaro, México. Tel: 442 1991200, ext. 5386. joel.mosqueda@uaq.mx Correspondencia al primer autor.

^b CENID PAVET / INIFAP, Jiutepec, Morelos, México.

^c Universidad Autónoma de la Ciudad de México, México, D.F.

En México, la babesiosis bovina es causada por dos especies, *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*, las cuales son transmitidas por dos especies de garrapatas presentes en el país, *Boophilus microplus* y *Boophilus annulatus* (ahora pertenecientes al género *Rhipicephalus*)^(2,3). Se considera que el 75 % de la población bovina del país, estimada en 2004 en 31,760,962 cabezas, se encuentra en zonas infestadas de garrapatas, por lo tanto expuestas a la enfermedad⁽⁴⁾. Aunque el costo ocasionado por la presencia de la garrapata y las enfermedades que trasmite como la babesiosis y la anaplasmosis no ha sido estimado recientemente, en 1975 éstas fueron de alrededor de 186 millones de dólares, muchos de los cuales son atribuidos a las pérdidas en la producción de carne y leche⁽⁵⁾. La incidencia de la enfermedad clínica está determinada por diferentes factores, por ejemplo, se ha demostrado que cuando la tasa de inoculación de *Babesia* por garrapatas infectadas es adecuada, de tal manera que se asegure que todos los becerros sean infectados durante el período cuando están protegidos por la inmunidad pasiva e innata (los animales jóvenes de hasta 8-9 meses de edad poseen una resistencia natural, la cual les permite tener una reacción de menor severidad a la enfermedad), entonces la presentación de la babesiosis clínica es mínima y se alcanza una estabilidad enzoótica^(6,7). Por otro lado, si la tasa de inoculación es baja, de tal manera que no todos los animales de un rancho se infectan cuando son jóvenes, algunos animales permanecen susceptibles a la enfermedad, y cuando estos se infectan en edad adulta, pueden sufrir una severa reacción clínica e incluso morir. Dado que la tasa de inoculación no es estable en las áreas enzoóticas, sino que varía con los cambios en las condiciones climáticas, o en las condiciones de manejo de los animales (por ejemplo, intenso tratamiento acaricida), un fenómeno denominado inestabilidad enzoótica puede aparecer dentro de una zona endémica y provocar brotes severos de babesiosis bovina⁽⁷⁾. La detección temprana del estado inmunológico de los animales en estas áreas de riesgo sería entonces 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. Al mismo tiempo se

transmitted by ticks present in the country, *Boophilus microplus* and *B. annulatus* (reclassified in the genus *Rhipicephalus*)^(2,3). Almost 75 % of the bovine cattle stock, estimated at 31,760,962 head in 2004, lives in tick infested areas and therefore exposed to this disease⁽⁴⁾. Even though losses due to ticks and to diseases transmitted by this parasite, babesiosis and anaplasmosis have not been estimated recently, they added to almost 186 million US dollars in 1975, mainly in beef and milk lost output⁽⁵⁾. Incidence of this disease is due to different factors, for example, when the *Babesia* inoculation rate by ticks is adequate, as when every calf is infected while protected by passive and innate immunity (young animals up to 8-9 mo old have natural resistance which provides a less severe reaction to the disease), then clinic babesiosis presence is minimal and an enzootic stability is attained^(6,7). On the other hand, with low inoculation rates, so that not all animals in a farm are infected when young, some individuals remain susceptible to the disease and if they become infected as adults, can show a severe clinical reaction and even die. Given the fact that the inoculation rate is unstable in enzootic areas and it changes along with climate conditions or with cattle management practices (i.e. intensive tick dippings), a phenomenon known as enzootic instability can take place within tick endemic areas and cause severe babesiosis outbreaks⁽⁷⁾. Therefore early detection of the immunological status of animals in these areas becomes essential for babesiosis control. Detection of this risk conditions is possible only through highly developed diagnostic methods that allow an efficient assessment of enzootic stability necessary for concluding if vaccination is needed. At the same time, effective and safe vaccines, which induce protective immunological response in immunized bovines, should be available. Currently neither reliable, sensitive and automated diagnostic methods nor safe vaccines that could offer adequate protection are available in either México or other countries where this disease is endemic^(7,8). With the publication of the *Babesia bovis* genome⁽⁹⁾ and the practically complete sequencing of the *Babesia bigemina* genome by the Sanger Institute (<http://www.sanger.ac.uk>) it is now possible to study these pathogens at the genome level and has given valuable data on

requieren vacunas eficaces y seguras que induzcan respuestas inmunológicas protectoras en los bovinos inmunizados. A la fecha no existen métodos de diagnóstico sensibles, automatizados y confiables, ni vacunas seguras que confieran protección adecuada en México ni en la mayoría de los países donde esta enfermedad es endémica^(7,8). Con la publicación de la secuencia del genoma completo de *Babesia bovis*⁽⁹⁾, y la casi terminada secuenciación del genoma de *Babesia bigemina* por el Instituto Sanger (<http://www.sanger.ac.uk/>), es posible ahora el estudio a nivel genómico de estos patógenos, y ha proporcionado a la fecha información valiosa sobre las características esenciales de la composición de su genoma y la comparación de éste con el de otros protozoarios apicomplexa de importancia en salud humana y animal, como aquéllos de los géneros *Plasmodium* y *Theileria*. Esta información ha permitido la incorporación de diversos análisis con programas de bioinformática que hacen posible la identificación de genes nuevos, o que son homólogos en otras especies, además del estudio de las proteínas predichas, su análisis comparativo y las características físico-químicas, antigénicas y filogenéticas que permiten un primer examen del potencial de estos genes putativos como candidatos para su uso como agentes de diagnóstico o vacunal. Análisis detallados son también posibles con la generación de etiquetas de secuencias expresadas (EST) para *Babesia bovis*⁽¹⁰⁾, que permiten analizar aquellos genes que se expresan de forma específica en los distintos estadios del ciclo de vida del parásito. Finalmente, la realización de métodos de análisis del genoma completo de forma masiva como los microarreglos que en breve estarán ya disponibles para su uso⁽¹¹⁾. Las alternativas para desarrollar herramientas de control de la babesiosis bovina basadas en tecnología recombinante no han sido muy exitosas. La principal razón es, además de la variación de antígenos inmuno-dominantes, el amplio arsenal de proteínas que tienen estos protozoarios para invadir a sus células blanco. Por ejemplo, *Babesia* y *Plasmodium* spp., dos protozoarios Apicomplexa, utilizan un mecanismo de invasión que involucra antígenos de la cubierta superficial para adherirse a receptores en la membrana de los eritrocitos. Esto es seguido de la liberación de antígenos de organelos como las micronemas, que ayudan a la

essential traits of their genomes, which can be compared with those of other Apicomplexa parasites important to both human and animal health that belong to the genii *Plasmodium* and *Theileria*. This information has allowed setting up several analyses by means of bioinformatics programs that make possible identification of either new genes or homologous in other species, besides allowing research on predicted proteins and their comparative analysis and further studying of their physicochemical, antigenic and phylogenetic characteristics, which help to achieve a primary assessment of the potential of these putative genes as candidates as, likely, diagnostic or vaccine agents. Detailed analyses are possible too through EST generation for *B. bovis*⁽¹⁰⁾, which allow analysis of those genes that express themselves specifically at different stages of the life cycle of the parasite. Finally, massive development of analysis methods for the whole genome, as microarrays, that will be available soon⁽¹¹⁾.

Development of alternative tools for control of bovine babesiosis based on recombinant technology has not been very successful. Probably the main reason for this is the generous arsenal of proteins that these protozoans have at their disposal for invading target cells, in addition to immunodominant antigen variations. For example, *Babesia* spp. and *Plasmodium* spp, two Apicomplexa protozoans, use an invasion mechanism that involves surface antigens for bonding to receptors present in the erythrocyte membrane. Then it follows a release of antigens from organelles, such as micronemes, that guide parasites so their apical portions attach themselves to the membrane of erythrocytes. In the next step rhoptry and spherical body proteins are released which assist invagination and penetration of the red blood cells membrane^(12,13,14). Although some differences exist between species in the cell invasion process, the truth is that vaccines based in only one antigen have few probabilities of conferring protective immunity, regardless of whichever antigen is used^(15,16,17), but when two or more combined antigens are used, results are considerably improved, thus suggesting that exposition to different types of epitopes present in diverse antigens, either native or recombinant, is absolutely necessary^(18,19,20) for vaccine effectiveness. Existence of epitopes which induce

orientación del parásito para que la porción apical quede en contacto con la membrana del eritrocito. Acto seguido hay liberación de proteínas de las roptrías y de los cuerpos esféricos, que facilita la invaginación de la membrana del eritrocito y su penetración^(12,13,14). Aunque existen diferencias entre las distintas especies durante el proceso de invasión, lo cierto es que las vacunas basadas en un sólo antígeno tienen pocas posibilidades de conferir una protección adecuada, independientemente del tipo de antígeno usado^(15,16,17). Cuando dos o más antígenos se han usado en combinación, los resultados han mejorado notablemente, indicando que es necesaria una exposición a diferentes tipos de epítopes presentes en diversos antígenos, ya sea usando antígenos nativos o recombinantes^(18,19,20). De estos resultados podemos inferir que existen epítopes que inducen respuestas humorales y celulares protectoras. Algunos de estos epítopes ya han sido mapeados por su capacidad de estimular respuestas protectoras de tipo T_H1. Al mismo tiempo, los esfuerzos para generar antígenos recombinantes que induzcan respuestas humorales neutralizantes, se han visto opacados por la variabilidad de los epítopes expuestos, y por la presencia de epítopes inmunodominantes que inducen una gran cantidad de anticuerpos no protectores. Una estrategia para corregir estos problemas, es la selección de epítopes de las proteínas involucradas en los distintos pasos del proceso de invasión, con capacidad de inducir respuestas humorales y celulares protectoras. Esta estrategia puede hacerse en dos pasos; primero, seleccionar los epítopes conservados de proteínas que ya han sido probados por su capacidad de inducir respuestas celulares T_H, y segundo, la selección de epítopes de proteínas de superficie que sean conservados y que induzcan respuestas humorales. Una vez que se tenga este panel de epítopes, estos pueden evaluarse como antígenos conservados que induzcan respuestas inmunológicas protectoras (tipo T_H1) e induzcan anticuerpos que reconozcan epítopes conservados. Con estas dos características pueden generarse métodos de diagnóstico inmunológico o bien candidatos vacunales que ofrezcan nuevas alternativas para el control mejorado de la enfermedad. Aquí describiremos las estrategias que nosotros y otros grupos estamos realizando para desarrollar nuevos métodos para el

both humoral and cellular protective responses can be inferred from these results. Some of these epitopes have been mapped because of their capacity for stimulating T_H1 type protective responses. Simultaneously, efforts for generating recombinant antigens which induce neutralizing humoral responses, have been overshadowed by exposed epitope variation and by the presence of immunodominant epitopes that induce a great amount of non protective antibodies. Selection of epitopes from proteins involved in each step of the cell invasion process that are able to induce protective humoral and cellular responses becomes a strategy for solving these problems. This strategy can be performed in two steps. First of all, the selection of conserved epitopes in proteins already tested as capable of inducing a T_H cell response, and the secondly by selection of conserved epitopes of surface proteins that induce humoral responses. Once this epitope's panel is gathered, epitopes can be assayed as conserved antigens which induce both protective type T_H1 immune response and antibodies that recognize conserved epitopes. With these two traits, diagnostic immunological methods can be created or else vaccine candidates that offer new alternatives for improved control of babesiosis. In this paper we describe strategies followed by the present and other research teams for development of new babesiosis control methods, including diagnostic methods and antigens showing vaccine potential.

Search in the *Babesia* spp. genome of new genes of importance

This strategy has been used before for finding new genes in pathogens, that are homologous to genes previously characterized in other phylogenetically similar microorganisms⁽²¹⁾. Homologous functional genes, usually share a certain degree of identity at both the nucleotide and amino acid sequence level and this trait allows for positive results in a BLAST search in sequenced genomes. Genes that codify for proteins of importance in both invasion and escape processes to and from the host cell become potential targets for blockage with vaccine antibodies. Enzymes and other metabolic proteins can be used too as targets for new drugs. As a final point, proteins with conserved functions, and for that reason conserved sequences, can be used as targets for immunologic and molecular diagnostic

control de la enfermedad, incluyendo métodos de diagnóstico y antígenos con potencial vacunal.

Búsqueda de nuevos genes con importancia en genomas de *Babesia* spp

Esta estrategia se ha utilizado previamente para encontrar genes nuevos en especies de patógenos que sean homólogos a genes previamente caracterizados en otros microorganismos filogenéticamente similares⁽²¹⁾. Genes homólogos en función, usualmente comparten cierto grado de identidad a nivel de secuencia, tanto nucleotídica como de aminoácidos, y esta característica permite asumir que un elevado grado de identidad entre estos genes en especies distintas permitirá resultados positivos al realizar búsquedas BLAST en genomas secuenciados. Genes que codifican proteínas con importancia en los procesos de invasión y escape de las células hospederas, son blancos potenciales de bloqueo mediante anticuerpos vacunales. Enzimas y otras proteínas metabólicas pueden ser usadas como blancos de fármacos nuevos. Finalmente, proteínas con funciones conservadas, y por lo tanto, secuencias conservadas, pueden usarse como blancos de métodos de diagnóstico inmunológico y molecular. En *Babesia*, hay un número elevado de genes homólogos en otras especies de protozoarios aplicomplexos mejor estudiadas como *Plasmodium*, *Toxoplasma* o *Theileria*. Por su parte *Babesia bovis* ha sido históricamente más estudiada que *Babesia bigemina* y por lo tanto hay más genes identificados. La reciente secuenciación de ambos genomas hace posible la aplicación de esta estrategia.

Análisis e identificación de epítopes conservados de proteínas de superficie y de organelos apicales de cepas de distintas regiones de México y el mundo de *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*.

Se han utilizado genes que codifican antígenos de organelos y de la cubierta de superficie de *Babesia* spp, específicamente la proteína asociada a las roptrías 1a (RAP-1a), el antígeno de la superficie del merozoito 1 y 2 (MSA-1, MSA-2), la glicoproteína de superficie 45 (GP-45) y algunos citoplasmáticos como la proteína de choque térmico 20 (HSP-20). Estudios hechos por nosotros y otros han demostrado el potencial antigénico e inmunoprotector de estas proteínas^(22,23,24). Con las

methods. A high number of homologous genes in other more studied *Apicomplexa* parasites, as *Plasmodium* spp., *Toxoplasma* spp. and *Theileria* spp. are found in *Babesia* spp. on the other hand *Babesia bovis* has in the past been studied more than *Babesia bigemina* and therefore more genes have been identified in that species. The recent sequentiation of both their genomes makes possible the use of this strategy.

Analysis and identification of conserved epitopes of surface proteins and apical organelles of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* strains found in diverse regions of México and the rest of the world

Genes encoding for *Babesia* spp. surface and organelle antigens, specifically rhoptry associated protein 1a (RAP-1a), merozoite 1 and 2 surface antigen (MSA-1, MSA-2), surface glycoprotein 45 (GP-45) and some cytoplasmic antigens such as heat shock protein 20 (HSP-20), have been used. Studies carried out by our group and other authors have shown the antigenic and immunoprotective potential of these proteins^(22,23,24). For assessing the presence of conserved regions⁽²⁵⁾, multiple alignments of predicted proteins can be performed by means of specific software (Vector NTI Advance) with sequences obtained in alleles of those genes from México's isolates and from other countries of the world. Alignments of each protein allow identification of regions of proteins conserved in every isolate and that are exposed on the surface. This can be achieved through analysis of each peptide obtained through bioinformatics computer analysis, as antigenicity (Antigenic), hydrophilicity and presence of secondary structures (NNPREDICT), absence of transmembrane regions (TMHMM) and signal peptides (SignalP), as well as presence of B epitopes (BCEPred and ABCPred). Synthetic peptides for each antigen can be created with the obtained regions, which can be then used for generating specific antibodies against each peptide as has been done before for *B. bovis* proteins⁽²⁶⁾. These antibodies must then be evaluated through Western Blot (WB) and indirect Immunofluorescence (IFI). The main purpose is to verify that the selected peptides produce immunologic responses that induce specific antibodies capable of blocking a merozoite invasion. The final goal is having a peptide panel

secuencias obtenidas de los alelos de esos genes de aislados de México y otras partes del mundo, se pueden realizar alineamientos múltiples de las proteínas predichas con programas computacionales específicos (vector NTI Advance) para evaluar la presencia de regiones conservadas⁽²⁵⁾. Los alineamientos de cada proteína permiten identificar aquellas regiones de las proteínas que son conservadas en todos los aislados y que estén expuestas en la superficie, esto mediante el análisis de cada péptido obtenido por análisis computacionales bioinformáticos como la antigenicidad (Antigenic), además de la hidrofobicidad y la presencia de estructuras secundarias (NNPREDICT), la ausencia de regiones transmembranales (TMHMM) y de péptido señal (SignalP), al igual que la presencia de epítopes B (BCEPred y ABCPred). Con la regiones obtenidas, entonces es posible generar péptidos sintéticos por cada antígeno y usarse estos para generar anticuerpos específicos contra cada péptido, como se ha hecho anteriormente para proteínas de *B. bovis*⁽²⁶⁾. Estos anticuerpos, después deben ser evaluados mediante western blot (WB) e inmunofluorescencia indirecta (IFI). El objetivo principal es verificar que los péptidos seleccionados generan respuestas inmunológicas que forman anticuerpos que son específicos, y que tienen la capacidad de bloquear la invasión de merozoitos. La meta de este objetivo es contar con un panel de péptidos que cumplan con estos requisitos y que sean evaluados posteriormente como candidatos de diagnóstico o vacunales.

Genes de *Babesia* spp., con importancia vacunal y de diagnóstico encontrados mediante estrategias genómicas y de bioinformática

Desde la secuenciación de los genomas de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, se ha publicado la identificación de varios genes con potencial importancia como agentes vacunales y de diagnóstico. Entre los más sobresalientes están el antígeno de la membrana apical 1 de *Babesia bovis*, la proteína relacionada a trombospondina (TRAP), los cuales fueron identificados debido a la homología en su secuencia con los genes respectivos en *Plasmodium falciparum*^(21,27). Otros genes homólogos al antígeno principal de la superficie del esporozoito de *Theileria annulata* (SPAG-1), el antígeno más estudiado en esta

that meets these requirements and that can be later evaluated as either diagnostic or vaccine candidates.

***Babesia* spp. genes of vaccine and diagnostic significance found by means of bioinformatic and genomic strategies**

From the moment that both the *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* genomes were sequenced, identification of several genes showing significant potential as vaccine and diagnostic agents have been published. Among the most outstanding of these, the *B. bovis* apical membrane 1 antigen, the thrombospondin related anonymous protein (TRAP), which were identified because of their sequence homology with the respective *Plasmodium falciparum* genes^(21,27). Other genes showing homology with the main *Theileria annulata* sporozoite surface antigen (SPAG-1), the most studied gene in this species due to its capacity to become potential immunogen, were also identified in *B. bovis*⁽⁹⁾. The homologous gene to TRAP has also been identified in *Babesia bigemina* (Petrig, R., personal communication). Characterization of these genes at the predicted protein level and their conservation among strains of diverse geographical origins should allow them to be considered as possible candidates for either diagnostic or vaccine agents against this pathogen.

Analysis of conserved sequences for generation of synthetic peptides and their use in disease control

For a long time antigens that were identified for their capacity for inducing protective immunological responses in immunized bovines have been studied. Some of these antigens include those found in merozoite surfaces (MSA). However, these antigens have shown great variation, which in turn results in a non recognition by antibodies against strains with different MSA^(28,29) and that compromises their use as vaccine antigens. However, a more detailed bioinformatics analysis these genes sequences obtained from strains of different geographical origin should allow identification of conserved regions that have been already used for generation of specific synthetic peptides. These peptides can be used as vaccine agents, and when applied as immunogens into susceptible bovines can induce

especie por su capacidad como inmunógeno potencial, fueron identificados también en *B. bovis*⁽⁹⁾. Se ha identificado el gen homólogo en *Babesia bigemina* a TRAP (Petrig, R., comunicación personal). La caracterización de estos genes a nivel de proteína predicha y su conservación entre cepas de distintas zonas geográficas, permitirán su consideración como posibles candidatos, ya sea de diagnóstico o bien como integrantes de nuevas vacunas contra este patógeno.

Análisis de secuencias conservadas para la generación de péptidos sintéticos y su aplicación en el control de la enfermedad

Desde hace mucho se han estudiado antígenos que fueron identificados por su capacidad para inducir respuestas inmunológicas protectoras a bovinos inmunizados. Algunos de estos antígenos incluyen aquellos localizados en la membrana de la superficie del merozoito (MSA). Sin embargo, estos antígenos han mostrado una gran variabilidad antigénica, que se traduce en una ausencia de reconocimiento por anticuerpos contra cepas con MSA distintos^(28,29) y que compromete su uso como antígenos vacunales. Sin embargo, un análisis bioinformático más detallado de las secuencias de estos genes obtenidas de cepas de distintas zonas geográficas, pueden permitir identificar regiones conservadas que se han usado para generar péptidos sintéticos específicos. Estos péptidos pueden entonces usarse como agentes vacunales, y que al ser aplicados como inmunógenos en bovinos susceptibles, induzcan anticuerpos que neutralicen el proceso de invasión y por lo tanto eviten el establecimiento de la infección. Estudios recientes preliminares han mostrado resultados promisorios, y la aplicación de esta estrategia con otros antígenos está siendo evaluada actualmente⁽³⁰⁾.

De los genes nuevos a las proteínas predichas: aplicaciones y perspectivas

Una vez identificadas las secuencias que reúnen los requisitos de un marco abierto de lectura (ORF), un primer paso consiste en verificar si estos ORFs son genes verdídicamente. Una forma de verificación es evaluar la transcripción de estos ORF's: esto es sencillo y rápido al diseñar primers o iniciadores directamente de las secuencias obtenidas (exones), estos primers son utilizados

antibodies that can neutralize the invasion process and therefore prevent establishment of the disease. Recent preliminary studies have shown promising results and use of this strategy with other antigens is being currently assessed⁽³⁰⁾.

From new genes to predicted proteins: perspectives and applications

Once sequences which meet the open reading frame (ORF) requirements have been identified, a first step should be verifying if these ORFs are really genes. One way of verification is evaluating ORF transcription; this is relatively easy and quick, through primer design directly from obtained sequences (exons). These primers are used for proving presence of transcripts in mRNA samples, an indicator that the selected sequence is a transcribed gene showing potential. Besides, the predicted sequence of proteins codified by these genes can be obtained through informatics, and also, additional information such as to know if these are membrane proteins or if their epitopes are accessible to the host immune system. Through alignment of several of these sequences from different strains it is possible to evaluate the degree of gene conservation and of their proteins and to acquire knowledge of variable and conserved regions. At the nucleotide sequence level, variable regions can be used for developing markers that allow strain discrimination through molecular techniques, currently a very desirable condition for its epidemiologic magnitude. Conserved sequences at the amino acid level shall allow in the future the development of conserved peptides that can be used as diagnostic tools when introduced in immunodiagnostic tests, as ELISA. Peptides can also be part of vaccines that generate immunologic responses against those protein conserved regions that when immunized to bovines, provide protection against heterologous challenges. The final objective is to produce improved control tools against bovine babesiosis, which with help of genomic technology and bioinformatics, will facilitate the prevention and control of this disease in endemic areas of Mexico and the rest of the world.

CONCLUSIONS

Bovine babesiosis causes huge economic losses in the livestock industry in endemic regions

para comprobar la presencia de transcritos en muestras de ARN mensajero, indicador de que la secuencia seleccionada es un gen que se transcribe y con potencial. Asimismo puede obtenerse mediante informática la secuencia predicha de las proteínas codificadas por estos genes, e información adicional que permita saber si estas proteínas son de membrana y la presencia de epitopes accesibles al sistema inmunológico del hospedero. Con el alineamiento de varias de estas secuencias de cepas distintas, es posible evaluar el grado de conservación de los genes y sus proteínas, y conocer las regiones conservadas o variables. A nivel de secuencias nucleotídicas, las regiones variables pueden utilizarse para el desarrollo de marcadores que permitan discriminar cepas mediante técnicas moleculares, una técnica muy requerida en la actualidad por su importancia epidemiológica. Las secuencias conservadas a nivel de aminoácidos permitirán el desarrollo de péptidos conservados que pueden ser utilizados como herramientas de diagnóstico al ser incorporados en técnicas de diagnóstico inmunológicas como la ELISA. Los péptidos también pueden formar parte de vacunas que generen respuestas inmunológicas contra esas regiones conservadas de las proteínas, y al ser inmunizados a bovinos, protejan contra desafíos heterólogos. La meta es producir herramientas de control mejoradas contra la babesiosis bovina que, ayudadas por las tecnologías genómicas y de bioinformática, ayuden a prevenir y controlar esta enfermedad en regiones endémicas de México y el mundo.

CONCLUSIONES

La babesiosis bovina causa enormes pérdidas económicas a la ganadería en las regiones donde está presente.

LITERATURA CITADA

1. McCosker PJ, The global importance of babesiosis, in *Babesiosis*, Ristic M, Kreier JP editors. Academic Press: New York. 1981,
2. Osorno M. Babesiosis en México. *Vet Méx*;1978(11):203-218.
3. Hoffman A, Lopez-Campos G. Biodiversidad de los acaros en Mexico. First ed. Mexico, DF: CONABIO; 2000.
4. SIAP. Cattle population in Mexico 1999-2008. www.sagarpa.gob.mx, 2008.

worldwide. Current control methods are inadequate, as no effective vaccines are available and diagnostic methods are of low sensitivity. Genomics and bioinformatics are tools that allow analyzing already completely sequenced genomes and search for new genes showing both diagnostic and vaccine potential, which can be used for generating new diagnostic methods, both sensitive and automated, as well as effective vaccines that allow for improved control of babesiosis worldwide, not only in México.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was financed through projects INCO 003691 and PROMEP-PTC-108

End of English version

Los métodos actuales de control no son suficientes ya que no hay vacunas disponibles que sean eficaces, y los métodos de diagnóstico actuales son poco sensibles.

La genómica y la bioinformática son herramientas que permiten analizar genomas completos ya secuenciados, y buscar nuevos genes con potencial diagnóstico y vacunal, e incorporarlos para generar nuevos métodos de diagnóstico, sensibles y automatizados, y vacunas eficaces que ayuden a controlar la enfermedad en México y el mundo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es financiado por los proyectos: INCO 003691 y PROMEP-PTC-108 .

5. Beltran LG. National anti-Tick Campaign. In: *Ectoparasites Seminar*. CIAT. 1975.
6. Mahoney DF, Ross DR. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. *Aust Vet J* 1972;48(5):292-298.
7. Bock R. *et al.* Babesiosis of cattle. *Parasitology*;2004(129 Suppl):S247-69.
8. Mosqueda J. *et al.* Advances in the development of molecular tools for the control of bovine babesiosis in Mexico. *Parasitology* 2007;49(Suppl1):19-22.

ESTRATEGIAS GENÓMICAS Y MOLECULARES PARA EL CONTROL DE BABESIOSIS

9. Brayton KA. *et al.* Genome sequence of *Babesia bovis* and comparative analysis of apicomplexan hemoprotozoa. *PLoS Pathog* 2007;3(10):1401-1413.
10. de Vries E. *et al.* Expressed sequence tag (EST) analysis of the erythrocytic stages of *Babesia bovis*. *Vet Parasitol* 2006;138(1-2):61-74.
11. Lau AO, Tibbals DL, McElwain TF. *Babesia bovis*: the development of an expression oligonucleotide microarray. *Exp Parasitol* 2007;117(1):93-98.
12. Jack RM, Ward PA. The entry process of *Babesia* merozoites into red cells. *Am J Pathol* 1981;102(1):109-113.
13. Chitnis CE, Blackman MJ. Host cell invasion by malaria parasites. *Parasitol Today* 2000;16(10):411-415.
14. Cowman AF, Crabb BS. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell* 2006;124(4):755-766.
15. McElwain TF., *et al.* Molecular characterization and immunogenicity of neutralization-sensitive *Babesia bigemina* merozoite surface proteins. *Mol Biochem Parasitol* 1991;47(2):213-22.
16. Hines SA. *et al.* Immunization of cattle with recombinant *Babesia bovis* merozoite surface antigen-1. *Infect Immun* 1995;63(1):349-352.
17. Norimine J. *et al.* Stimulation of T-helper cell gamma interferon and immunoglobulin G responses specific for *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 (RAP-1) or a RAP-1 protein lacking the carboxy-terminal repeat region is insufficient to provide protective immunity against virulent *B. bovis* challenge. *Infect Immun* 2003;71(9):5021-5032.
18. Wright IG. *et al.* The development of a recombinant *Babesia* vaccine. *Vet Parasitol* 1992;44(1-2):3-13.
19. Schetters TP. *et al.* Not peripheral parasitaemia but the level of soluble parasite antigen in plasma correlates with vaccine efficacy against *Babesia canis*. *Parasite Immunol* 1996;18(1):1-6.
20. Alonso PL. *et al.* Duration of protection with RTS,S/AS02A malaria vaccine in prevention of *Plasmodium falciparum* disease in Mozambican children: single-blind extended follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet* 2005;366(9502): 2012-2018.
21. Gaffar FR. *et al.* A *Babesia bovis* merozoite protein with a domain architecture highly similar to the thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) present in *Plasmodium* sporozoites. *Mol Biochem Parasitol* 2004;136(1):25-34.
22. Mosqueda J. *et al.* *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 and rhoptry-associated protein 1 are expressed in sporozoites, and specific antibodies inhibit sporozoite attachment to erythrocytes. *Infect Immun* 2002;70(3):1599-1603.
23. Mosqueda J, McElwain TF, Palmer GH. *Babesia bovis* merozoite surface antigen 2 proteins are expressed on the merozoite and sporozoite surface, and specific antibodies inhibit attachment and invasion of erythrocytes. *Infect Immun* 2002;70(11):6448-6455.
24. Wilkowsky SE. *et al.* *Babesia bovis* merozoite surface protein-2c (MSA-2c) contains highly immunogenic, conserved B-cell epitopes that elicit neutralization-sensitive antibodies in cattle. *Mol Biochem Parasitol* 2003;127(2):133-141.
25. Genis AD. *et al.* Phylogenetic analysis of Mexican *Babesia bovis* isolates using msa and ssrRNA gene sequences. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1149:121-5.
26. Norimine J. *et al.* Conservation of *Babesia bovis* small heat shock protein (Hsp20) among strains and definition of T helper cell epitopes recognized by cattle with diverse major histocompatibility complex class II haplotypes. *Infect Immun* 2004;72(2):1096-106.
27. Gaffar FR. *et al.* Erythrocyte invasion by *Babesia bovis* merozoites is inhibited by polyclonal antisera directed against peptides derived from a homologue of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1. *Infect Immun* 2004;72(5): 2947-2955.
28. Hines SA. *et al.* Neutralization-sensitive merozoite surface antigens of *Babesia bovis* encoded by members of a polymorphic gene family. *Mol Biochem Parasitol* 1992;55(1-2):85-94.
29. Leroith T. *et al.* Sequence variation and immunologic cross-reactivity among *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 proteins from vaccine strains and vaccine breakthrough isolates. *Infect Immun* 2005;73(9):5388-5394.
30. Florin-Christensen M. *et al.* Search for *Babesia bovis* vaccine candidates. *Parassitologia*;2007;49(Suppl 1):9-12.