



Unidad Académica de Desarrollo Biotecnológico
Facultad de Medicina, Instituto de Higiene
Universidad de la República



Producción del antígeno recombinante Ct-RAP-1 de *Babesia bovis* como potencial plataforma diagnóstica de la babesiosis bovina en Uruguay

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE CIENCIAS
LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA
TESINA DE GRADO
2026**

Hernán Alvarez

Orientador: Andrea Rossi

Co-Orientador: Julio Guarnaschelli

Agradecimientos

En primer lugar, el agradecimiento pleno a mis padres por ser los pilares en mi vida y mi modelo a seguir como persona.

A Jime, por estar presente en toda mi carrera y apoyarme en todo momento; y a mis amigos, por estar presentes en el camino de formación.

Finalmente, agradecer a la Unidad por permitirme realizar la tesina, principalmente a mis orientadores, Andrea y Julio, por disponer su tiempo y conocimiento para formarme como profesional.

Resumen

Babesia bovis es un protozooario hemoparásito transmitido por la garrapata *Rhipicephalus microplus*, agente causal de la babesiosis bovina, una enfermedad de elevada letalidad que genera importantes pérdidas económicas en los sistemas ganaderos. En Uruguay, la expansión geográfica de la garrapata ha favorecido el incremento de la incidencia de la enfermedad, estimándose pérdidas cercanas a los 15 millones de dólares anuales. La vigilancia epidemiológica constituye una herramienta clave para su control; sin embargo, las metodologías diagnósticas disponibles presentan limitaciones. La microscopía posee baja sensibilidad en infecciones con escasa parasitemia, mientras que la inmunofluorescencia indirecta (IFI), considerada la técnica serológica de referencia, presenta baja capacidad de procesamiento, dependencia del operador y potencial reactividad cruzada con *B. bigemina*. En este contexto, el desarrollo de ensayos ELISA basados en antígenos recombinantes representa una alternativa promisorio para mejorar el diagnóstico de la enfermedad. El objetivo de esta tesina fue producir de forma recombinante el extremo C-terminal de la proteína asociada a la roptria 1 de *B. bovis* (rCt-RAP-1_Bbo) y evaluar preliminarmente su potencial aplicación como antígeno en un ELISA indirecto. RAP-1 participa en la invasión eritrocitaria y su región C-terminal se caracteriza por presentar secuencias conservadas, epítomos inmunodominantes y baja reactividad cruzada con otras especies de *Babesia*. Para ello, el gen sintético correspondiente fue clonado en el vector pET-15b, expresado en *Escherichia coli* BL21(DE3) y purificado mediante cromatografía de afinidad a níquel. La antigenicidad de la proteína recombinante se evaluó mediante Western blot utilizando sueros bovinos positivos para *B. bovis*, observándose el reconocimiento específico de una banda de aproximadamente 30 kDa. Asimismo, se analizó su desempeño en un ELISA indirecto desarrollado en el marco del proyecto de investigación en el que se inserta esta tesina, empleando una seroteca compuesta por animales con estatus sanitario previamente caracterizado. Los resultados obtenidos sugieren que rCt-RAP-1_Bbo tendría la capacidad para discriminar entre animales seropositivos y seronegativos para *B. bovis*, sin evidenciar reactividad cruzada frente a sueros positivos para *B. bigemina* ni *Anaplasma marginale*. En conclusión, se logró producir y purificar exitosamente el antígeno recombinante rCt-RAP-1_Bbo y demostrar su capacidad para ser reconocido específicamente por anticuerpos dirigidos contra *B. bovis*. Estos resultados respaldan su potencial aplicación como antígeno sensibilizante en ensayos ELISA para el diagnóstico serológico de la babesiosis bovina. Como perspectivas, se propone ampliar la evaluación utilizando un mayor número de muestras para determinar la sensibilidad y especificidad diagnóstica del ensayo y avanzar hacia la validación de una herramienta serológica adaptada a las necesidades sanitarias de Uruguay.

Abreviaturas

Ag: Antígeno

Ag_{Son}: Antígeno Sonicado

BSA: Albúmina Sérica Bovina

ELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

IFI: Prueba de inmunofluorescencia indirecta

IPTG: isopropyl β -D-thiogalactoside

kDa: kilodalton

LB: Medio Luria-Bertani

LB Amp: Medio Luria-Bertani con Ampicilina

mA: miliampere

nt: Nucleótidos

DO: Densidad óptica

PBS: Buffer fosfato salino

PBST: solución al 0,05% de Tween®20 en Buffer fosfato salino

1% BSA PBST: solución al 1% (p/v) de BSA en PBST

rpm: Revoluciones por minuto

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

Índice

1. Introducción	1
1.1. Tristeza Parasitaria Bovina	1
1.2. <i>Babesia bovis</i>	1
1.3. Herramientas diagnósticas para <i>B. bovis</i>	3
1.3.1. Microscopía de frotis sanguíneo.....	3
1.3.2. Técnicas Moleculares: PCR y Variantes.....	3
1.3.3. Técnicas Serológicas.....	4
1.3.4. Antígenos utilizados para el diagnóstico serológico de <i>B. bovis</i>	5
1.4. Situación en Uruguay.....	8
1.5. Hipótesis.....	9
2. Objetivos.....	11
3. Materiales y métodos.....	12
3.1. Síntesis y clonado del gen Ct-RAP-1_Bbo.....	12
3.2. Transformación de pET-15b-Ct-RAP-1_Bbo en BL21 <i>E. coli</i>	12
3.3. Selección de Colonias	12
3.4. Congelado de las cepas.	13
3.5. Miniprep.....	13
3.6. Digestión enzimática.....	13
3.7. Electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa	13
3.8. Introducción de la expresión de rCt-RAP-1_Bbo.....	13
3.9. Purificación de rCt-RAP-1_Bbo.....	14
3.10. Electroforesis de proteínas por SDS-PAGE.....	15
3.11. Diálisis.....	15
3.12. Cuantificación por método BCA.....	15

3.13. Seroteca.....	16
3.14. Western Blot.....	16
3.15. ELISA.....	17
3.16. Análisis Estadístico.....	17
4. Resultados	18
5. Discusión y conclusiones.....	26
6. Perspectivas.....	30
7. Bibliografía	32

1. Introducción

La prevención y el control de enfermedades transmisibles en animales constituyen un componente central del trabajo de los servicios veterinarios. Con el apoyo de los avances científicos, estos servicios deben diseñar e implementar estrategias ajustadas a la realidad del país y en línea con las orientaciones internacionales. La mejora de las herramientas diagnósticas es un aspecto crucial, porque permite detectar las enfermedades de manera más precisa y oportuna, reduciendo su diseminación y su efecto sobre la producción, la salud pública y el comercio (WOAH, 2021).

En este contexto, el desarrollo y la optimización de métodos diagnósticos adquieren especial relevancia para las enfermedades transmitidas por garrapatas, entre las cuales se destaca la Tristeza Parasitaria Bovina (TPB) por su impacto en la producción ganadera.

1.1. Tristeza Parasitaria Bovina

La Tristeza Parasitaria Bovina es un complejo sindrómico, febril y anemizante, causado por los protozoarios *B. bovis* y *B. bigemina* (causantes de la babesiosis), y por la rickettsia *Anaplasma marginale*, causante de la anaplasmosis (Puentes et al., 2026; Aubry and Geale, 2011).

Este complejo impacta significativamente en la producción ganadera al generar importantes costos asociados a tratamientos, manejo sanitario y asistencia veterinaria, así como pérdidas productivas derivadas de la disminución en la ganancia de peso, reducción en la producción de leche, menor eficiencia reproductiva, abortos y mortalidad (Strydom et al., 2023). En conjunto, estos efectos constituyen la principal fuente de pérdidas económicas asociadas a las enfermedades transmitidas por garrapatas en Uruguay (Miraballes et al., 2019; Cuore y Solari., 2022).

1.2. *Babesia bovis*

La babesiosis bovina, además de ser causada por *B. bovis* y *B. bigemina*, también puede ser producida por otras especies como *B. divergens* y *B. major*, siendo una enfermedad de distribución mundial que representa una seria amenaza para la producción ganadera (Hakimi et al., 2022). Estas especies, pertenecientes al filo Apicomplexa, presentan diferencias en su biología, morfología y comportamiento infeccioso, pero comparten un ciclo de vida intracelular estricto en eritrocitos de vertebrados y una dependencia absoluta de garrapatas como vectores biológicos (Laha et al., 2015). El principal vector de la babesiosis bovina en América del Sur es la garrapata *Rhipicephalus microplus*, aunque otras especies de *Rhipicephalus*, como también *Ixodes ricinus* y *Haemaphysalis* pueden actuar como vectores en otras zonas del mundo (Chauvin et al., 2009).

El diagrama ilustra el ciclo de vida del *Babesia oocyst*, dividido en dos partes: A) y B).

A) Desarrollo en la garrapata: Una garrapata (Garrapata) ingiere gametocitos al alimentarse de sangre de un huésped vertebrado. Los gametocitos se desarrollan en trofozoitos y luego en merozoitos. Los merozoitos migran a las glándulas salivales, donde se convierten en esporozoitos. Los esporozoitos pueden sobrevivir fuera de la garrapata o infectar a un nuevo huésped vertebrado al picar.

B) Desarrollo en el huésped vertebrado: Un huésped vertebrado (representado por una vaca) ingiere gametocitos al ser picado por una garrapata. Los gametocitos se desarrollan en trofozoitos y luego en merozoitos. Los merozoitos migran a las glándulas salivales, donde se convierten en esporozoitos. Los esporozoitos pueden sobrevivir fuera de la garrapata o infectar a un nuevo huésped vertebrado al picar.

El ciclo se completa cuando el nuevo huésped ingiere gametocitos durante la siguiente alimentación de sangre.

Las manifestaciones clínicas de la babesiosis bovina dependen de la especie involucrada y muestran diferencias marcadas entre *B. bovis* y *B. bigemina*. En las infecciones por *B. bovis*, el cuadro clínico se caracteriza por fiebre alta, anorexia, ataxia, shock circulatorio y, de forma distintiva, signos neurológicos asociados al secuestro de eritrocitos infectados en los capilares cerebrales, un fenómeno ausente en *B. bigemina* (Gallego et al., 2019). La anemia y la

hemoglobinuria suelen manifestarse en etapas más avanzadas (Santos et al., 2023). A nivel hematológico, *B. bovis* presenta parasitemias bajas (generalmente <1% en sangre circulante incluso en fases agudas). En contraste, las infecciones por *B. bigemina* cursan con parasitemias considerablemente más altas, lo que se asocia a un cuadro dominado por fiebre, hemoglobinuria y anemia, pero sin la aparición de signos neurológicos (WOAH, 2021).

Un aspecto epidemiológico fundamental de la babesiosis es la resistencia edad-dependiente observada en terneros jóvenes, donde animales menores de 9 meses de edad raramente desarrollan signos clínicos severos tras la infección, presentando parasitemias bajas (Santos et al., 2023). Esta resistencia innata que limita la invasión y replicación parasitaria puede atribuirse a múltiples factores incluyendo la protección pasiva de anticuerpos maternos, características del sistema inmune neonatal (Bastos et al., 2022). Sin embargo, esta ventana de resistencia natural se cierra progresivamente con la edad, y bovinos adultos, mayores de 9 meses, sin exposición previa se vuelven altamente susceptibles a desarrollar babesiosis aguda con elevada mortalidad. Los animales adultos que se recuperan de la infección aguda, ya sea con o sin tratamiento, pueden permanecer crónicamente infectados como portadores asintomáticos durante períodos prolongados (meses a años), manteniendo parasitemias bajas indetectables por microscopía, pero identificables mediante técnicas moleculares sensibles. Este estado de portador crónico confiere inmunidad protectora sólida contra reinfecciones, pero simultáneamente convierte al animal en reservorio epidemiológico capaz de servir como fuente de infección para garrapatas no infectadas, perpetuando la transmisión en el ambiente (Jerzak et al., 2023).

1.3. Herramientas diagnósticas para *B. bovis*

El diagnóstico de *B. bovis* se realiza mediante dos estrategias complementarias. Por un lado, los métodos de diagnóstico directo o confirmatorio permiten detectar la presencia del patógeno en el animal infectado, siendo especialmente útiles para confirmar infecciones activas. Por otro lado, las herramientas serológicas permiten identificar la respuesta inmune humoral generada frente a este hemoparásito, constituyendo una alternativa valiosa para estudios epidemiológicos, vigilancia sanitaria y evaluación de la exposición previa al agente.

1.3.1. Microscopía de frotis sanguíneos

Entre los métodos directos, el frotis sanguíneo sigue siendo un método accesible, rápido y de bajo costo, particularmente útil en contextos clínicos y en áreas con recursos limitados, y constituye el punto de partida en el diagnóstico de la babesiosis bovina. Sin embargo, su precisión para diferenciar entre *B. bovis* y *B. bigemina*, basándose únicamente en características morfológicas, depende en gran medida de la experiencia del observador (Dasanayaka et al., 2026). Sumado a esto, la naturaleza laboriosa al requerir examinar múltiples campos microscópicos dada la baja concentración del parásito en infecciones crónicas o subclínicas sumado a la subjetividad inherente del observador, hacen de esta técnica, poco sensible y no ideal para monitoreo de rodeos (Garcia et al., 2022).

1.3.2. Técnicas Moleculares: PCR y Variantes

Las técnicas moleculares, en particular la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), constituyen métodos directos de diagnóstico, y han demostrado una elevada sensibilidad y especificidad para la detección de *B. bovis*, superando las limitaciones de los métodos basados en hibridación convencional (Figueroa et al., 1992). Diferentes variantes de PCR han sido desarrolladas para mejorar la capacidad diagnóstica, incluyendo PCR multiplex a tiempo final que permite la detección simultánea de *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale* (Figueroa et al., 1993), o PCR en tiempo real (qPCR), capaz de detectar niveles muy bajos de parasitemia (Kim et al., 2007). En contexto, si bien la PCR y sus variantes forman parte del diagnóstico molecular actual de la babesiosis, su implementación rutinaria se ve limitada por el costo y personal capacitado.

Recientemente, se han desarrollado métodos moleculares directos isotérmicos que eliminan la necesidad de termocicladores, lo que ha facilitado su aplicación en pruebas diagnósticas en el punto de atención (“*point-of-care*”). Entre ellos, la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) y la amplificación por polimerasa mediada por recombinasa (RPA) han demostrado alta sensibilidad, rapidez y facilidad de implementación en condiciones de campo (Dasanayaka et al., 2026).

Por otro lado, las tecnologías basadas en CRISPR ofrecen gran precisión y potencial para el desarrollo de pruebas portátiles de alta sensibilidad, representando una de las direcciones más recientes en la evolución del diagnóstico molecular de la babesiosis bovina (Dasanayaka et al., 2026).

1.3.3. Técnicas Serológicas

Las técnicas serológicas constituyen métodos indirectos basados en la detección de anticuerpos específicos frente a hemoparásitos. Estos ensayos detectan inmunoglobulinas (principalmente IgG e IgM) producidas por el hospedador en respuesta a la infección, lo que permite determinar el estatus inmunológico y la prevalencia de la enfermedad en rodeos (García et al., 2022). Actualmente en Uruguay, la decisión de vacunar un rodeo depende del estado de seroconversión de los animales (ej. umbral del 70 % de seropositivos). Determinar el estatus inmunitario es vital para prevenir brotes clínicos severos que afectan principalmente a bovinos mayores de un año. En zonas endémicas, el objetivo sanitario es promover que la totalidad del rodeo adquiera inmunidad contra *B. bovis* y *B. bigemina* antes del año. Cuando la circulación de hemoparásitos es elevada, terneros de menores a un año adquieren inmunidad por exposición natural. Por el contrario, cuando la seroprevalencia es inferior a la esperada, el sistema se asocia a un mayor riesgo de brotes clínicos, lo que hace necesaria la implementación de programas de vacunación (Dasanayaka et al., 2026).

Dentro de los ensayos serológicos, la inmunofluorescencia indirecta (IFI), empleada para la detección de anticuerpos contra *B. bovis* y *B. bigemina*, se considera el método “*gold standard*” para el serodiagnóstico de la babesiosis bovina y ha sido ampliamente utilizada como prueba comparativa para validar otras técnicas serológicas y moleculares (Lira-Amaya et al., 2021);

Esta técnica presenta limitaciones operativas, como la necesidad de personal entrenado y una baja capacidad de procesamiento masivo (Dasanayaka et al., 2026), además de potencial reactividad cruzada, especialmente con *B. bigemina* (WOAH, 2021).

Los ensayos basados en ELISA para la detección de anticuerpos constituyen una de las herramientas más utilizadas para el diagnóstico y la vigilancia epidemiológica de la babesiosis bovina. Entre ellos se incluyen: ELISA indirecto; ELISA sándwich doble antígeno que emplea antígeno/s tanto para la captura como para la detección; y ELISA competitivo basados en anticuerpos monoclonales. Estos ensayos pueden emplear tanto extractos parasitarios crudos como antígenos recombinantes, y en comparación con IFI, poseen una mayor capacidad de procesamiento y reproducibilidad (Terkawi et al., 2011). En general, se postula que el uso de extractos parasitarios crudos podría favorecer la sensibilidad diagnóstica debido a la presencia de múltiples epítomos antigénicos; sin embargo, la especificidad puede verse comprometida por la presencia de proteínas derivadas del hospedador y de epítomos compartidos. En contraste, el empleo de antígenos recombinantes podría contribuir a una mayor estandarización de los ensayos y a mejorar la especificidad, al utilizar proteínas o regiones antigénicas definidas que reducen la probabilidad de reactividad cruzada (Dasanayaka et al., 2026).

Las pruebas inmunocromatográficas de flujo lateral (ICT) han emergido como herramientas del tipo *point-of-care* para la detección rápida (10–15 minutos) de anticuerpos contra *B. bovis* y *B. bigemina* sin necesidad de equipamiento especializado. Estas pruebas representan una alternativa portátil y de fácil implementación, particularmente útil para su aplicación en condiciones de campo (Guswanto et al., 2017). No obstante, su sensibilidad puede ser inferior a la de técnicas como ELISA, debido al menor tiempo de interacción antígeno-anticuerpo durante el ensayo. Asimismo, se ha reportado que la variabilidad antigénica entre cepas puede afectar su desempeño diagnóstico, especialmente cuando se emplean antígenos derivados de aislamientos no representativos de la región en estudio (Dasanayaka et al., 2026).

1.3.4. Antígenos utilizados para el diagnóstico serológico de *B. bovis*

Los primeros enfoques serológicos para el diagnóstico de *B. bovis* utilizaron extractos crudos de merozoitos obtenidos a partir de eritrocitos infectados mediante lisado celular (Machado et al., 1997). Estos antígenos fueron y siguen siendo empleados en ELISAs de tipo indirecto para la detección de anticuerpos en animales infectados naturalmente y en estudios epidemiológicos (Trindade et al., 2010; Jaramillo Ortiz et al., 2018; Matos et al., 2020).

El desarrollo de tecnologías recombinantes ha permitido la identificación y producción de múltiples proteínas específicas de *B. bovis* como candidatos antigénicos para su aplicación en el diagnóstico en distintos formatos de ELISA (Tabla 1). En comparación con los antígenos crudos, los antígenos recombinantes permiten una mayor estandarización y reproducibilidad de los ensayos serológicos, además de reducir reacciones inespecíficas asociadas a la presencia de componentes celulares del hospedador en los extractos antigénicos (Jaramillo Ortiz et al., 2018).

Uno de los antígenos más ampliamente utilizados para el serodiagnóstico de *B. bovis* es una proteína asociada a las roptrias, organelos involucrados en la invasión eritrocitaria, llamada RAP-1, que está altamente conservada entre cepas de *B. bovis* de diversas regiones geográficas (Hidalgo et al., 2022; Rojas et al., 2024). Los primeros ensayos ELISA indirectos utilizando la proteína completa demostraron una elevada sensibilidad diagnóstica; sin embargo, la especificidad se vio limitada debido a reacciones cruzadas con *B. bigemina* (Boonchit et al., 2002). Estudios posteriores atribuyeron la respuesta cruzada con *B. bigemina* a la región amino-terminal (N-ter) de la proteína y evaluaron versiones recombinantes que contenían exclusivamente la región carboxi-terminal (C-ter) de RAP-1 (Boonchit et al., 2004). Los autores reportaron que un ELISA indirecto basado en dicha región alcanzó valores de sensibilidad y especificidad del 100%, representando una mejora significativa respecto a los ensayos desarrollados con la proteína completa (Boonchit et al., 2004). Asimismo, fue reportado que anticuerpos dirigidos contra la región C-terminal reconocen antígenos expresados durante el estadio intraeritrocitario del parásito (Hidalgo et al., 2022; Rojas et al., 2024).

Tabla 1: Antígenos candidatos para el desarrollo de ELISAs contra *B. bovis*

Tipo de antígeno	Tipo de ELISA/características	Referencia
Extracto de merozoitos de <i>B. Bovis</i>	Indirecto/Extracto de merozoitos de <i>B. Bovis</i>	Machado et al., 1997; Trindade et al., 2010; Matos et al., 2020
SBP-4 (Proteína del cuerpo esférico 4)	Indirecto/Proteína recombinante expresada en <i>E. coli</i>	Chung et al., 2017; Terkawi et al., 2011
SBP-1 (Proteína del cuerpo esférico 1)	Indirecto/Proteína recombinante expresada en <i>E. coli</i>	Terkawi et al., 2011
SBP-1 + SBP-4	Indirecto/Cóctel de proteínas recombinantes expresadas en <i>E. coli</i>	El-Sayed et al., 2019
MSA-2c (Proteína de superficie del merozoito)	Indirecto/Proteína recombinante expresada en <i>E. coli</i>	Bono et al., 2008; Terkawi et al., 2011
	Competencia/Desarrollo de anticuerpo monoclonal	Domínguez et al., 2004
	Double Antigen Sandwich/ Sensibilizada con MSA-2c recombinante; detectada mediante MSA-2c marcado	Primo et al., 2026
RAP-1 (Proteína asociada a la roptria 1)	Indirecto/Proteína recombinante expresada en <i>E. coli</i>	Boonchit et al., 2004; Terkawi et al., 2011; Yang et al., 2015
	Competencia/Desarrollo de anticuerpo monoclonal	Goff et al., 2006
MSA-2c, RAP-1 y HSP20 (Heat Shock Protein 20)	Indirecto/Multiantígeno recombinante quimérico	Jaramillo Ortiz et al., 2018

La región C-terminal de RAP-1 ha sido evaluada en diferentes formatos serológicos. Goff y colaboradores (2006) describieron un ELISA competitivo basado en este antígeno, el cual presentó una sensibilidad del 91,1%, especificidad del 100% y alta reproducibilidad (Goff et al., 2006). No obstante, el desempeño de los ELISAs indirectos basados en el extremo C-terminal de RAP-1 ha mostrado variaciones entre estudios, con reportes que muestran una sensibilidad del 64,2%, una especificidad del 72,3% y una concordancia del 66% entre el ELISA e IFI (Terkawi et al., 2011).

Otro de los antígenos recombinantes que surge de la bibliografía como candidato promisorio para el diagnóstico de *B. bovis* es la proteína del cuerpo esférico 4 (SBP-4), una proteína secretada durante el estadio intraeritrocitario y localizada en los cuerpos esféricos del parásito, asociados a la invasión de los eritrocitos infectados. Diversos estudios han demostrado que ELISAs indirectos basados en este antígeno presentan alta sensibilidad y especificidad, así como una elevada concordancia con la prueba de referencia (IFI) en muestras provenientes de distintas regiones geográficas (Terkawi et al., 2011; Chung et al., 2017). En este contexto, existe el uso de un cóctel recombinante compuesto por SBP-1 y SBP-4 utilizado como antígeno sensibilizante, donde se demuestra una mayor reactividad frente a sueros positivos a *B. bovis* y una menor reactividad cruzada con *B. bigemina* en comparación a cada antígeno individual (El-Sayed et al., 2019).

La proteína MSA-2c pertenece a la familia de antígenos de superficie expresados en los merozoítos de *B. bovis*, y está involucrada en la interacción y adhesión inicial del parásito a los eritrocitos del hospedador. Ha sido utilizada en ELISAs tipo indirectos (Bono et al., 2008), sándwich (Primo et al., 2026) y competitivos utilizando anticuerpos monoclonales para la detección del antígeno (Domínguez et al., 2004), demostrando una elevada sensibilidad y concordancia con IFI en animales infectados naturalmente (Domínguez et al., 2004; Bono et al., 2008). No obstante, el uso de MSA-2c como antígeno diagnóstico ha sido cuestionado en determinados contextos; Bono y colaboradores (2008) reportaron reactividad cruzada frente a sueros de animales inoculados con *B. bigemina* (Bono et al., 2008).

Por otra parte, se han propuesto estrategias orientadas a mejorar el desempeño diagnóstico mediante la combinación de múltiples determinantes antigénicos. En este contexto, se desarrolló un antígeno quimérico recombinante que integra fragmentos de MSA-2c, RAP-1 y HSP20 (*Heat Shock Protein 20*) en una única molécula, los cuales mostraron una sensibilidad del 96% y una especificidad del 94% en ELISAs indirectos, aunque con reactividad cruzada atribuible a epítomos compartidos con *B. bigemina* (Jaramillo Ortiz et al., 2018).

En conjunto, estos antecedentes respaldan el uso de la región C-terminal de RAP-1 y de SPB-4 como los candidatos antigénicos más adecuados para el desarrollo de ensayos serológicos específicos en la detección de anticuerpos contra *B. bovis*. Nuestra estrategia experimental estuvo orientada a producir el antígeno recombinante Ct-RAP-1 de *B. bovis*.

1.4. Situación en Uruguay

i) Epidemiología

Uruguay presenta condiciones epidemiológicas favorables para la ocurrencia de brotes de babesiosis debido al clima, la alta densidad de ganado bovino, el predominio de sistemas productivos extensivos y la presencia estable de *R. microplus* en amplias zonas del país, lo que facilita la persistencia y transmisión del agente. En nuestro país, se ha reportado que la expansión geográfica de la garrapata ha incrementado la incidencia de la babesiosis bovina (Miraballes et al., 2019). A nivel nacional se observan dos áreas bien delimitadas, una denominada “Zona Control” que comprende los departamentos al norte del río Negro y al sureste del país (Cerro Largo, Treinta y tres, Rocha, Lavalleja y Maldonado) (Fig.2) y se caracteriza por una alta prevalencia del vector, siendo considerada la región endémica. Por otro lado, la “Zona Libre”, que abarca el centro-sur y suroeste del territorio nacional, se considera libre de garrapata sin embargo se han reportado casos esporádicos (Fig.2). En este contexto, la dinámica poblacional de *R. microplus* a lo largo del año juega un rol clave en el riesgo de transmisión de babesiosis. Esta garrapata presenta varias generaciones en el año, siendo la tercera generación, la cual se desarrolla hacia el otoño en Uruguay, la de mayor impacto epidemiológico. El aumento marcado en la carga de garrapatas sobre los animales incrementa la probabilidad de transmisión de *Babesia spp.*, coincidiendo así la tercera generación de la garrapata con el pico anual de casos de babesiosis bovina (Solari et al., 2013).

ii) Diagnóstico

En Uruguay, las técnicas estándar de diagnóstico de animales infectados son la microscopía de frotis sanguíneos y órganos para la observación directa del parásito y conteo para determinar la carga parasitaria. Por otra parte, en los últimos años se implementó el uso de la PCR multiplex a tiempo final para el diagnóstico de los tres agentes de la TPB (Parodi et al., 2022), sin embargo, su uso no ha sido masivo a nivel de laboratorios de diagnóstico.

Asimismo, el país no dispone de herramientas serológicas de alta sensibilidad y especificidad validadas localmente para la detección de *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale*, lo que restringe el monitoreo poblacional y la evaluación de intervenciones sanitarias. El método serológico de referencia para la vigilancia y el diagnóstico de la babesiosis bovina realizada en nuestro país es IFI, que solo es realizada en DILAVE. Estas metodologías presentan limitaciones en términos de sensibilidad, reproducibilidad, escalabilidad y descentralización operativa, particularmente en infecciones crónicas con baja parasitemia y en estudios de vigilancia epidemiológica. En este contexto, el desarrollo de un sistema diagnóstico serológico como el ELISA, que ofrece alta sensibilidad y especificidad analítica, resulta clave para abordar los distintos escenarios clínico-epidemiológicos de estas enfermedades en nuestro país.

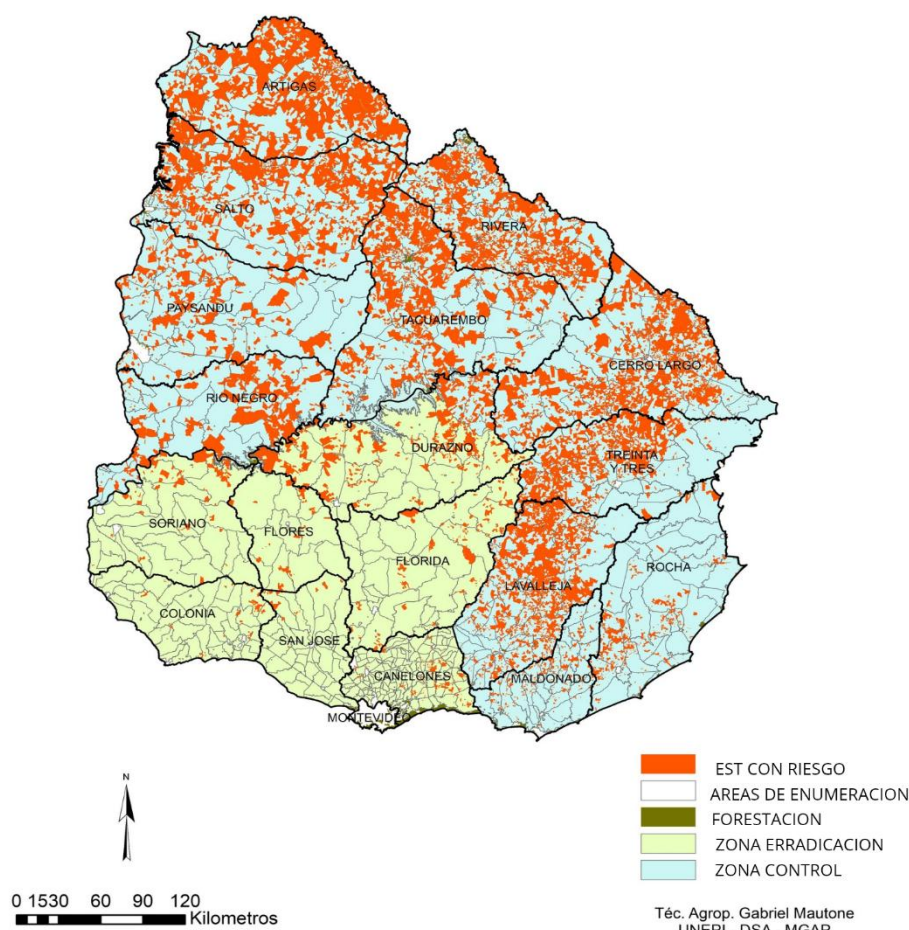


Figura 2: Situación de la garrapata según variables de riesgo registrado al 26 de Julio de 2025 (Luengo Larrosa, L. (2025)).

1.5. Hipótesis

Se plantea como hipótesis que la producción del antígeno recombinante Ct-RAP-1 de *B. bovis*, basado en una secuencia representativa de aislamientos regionales, permitirá obtener un antígeno apto para su aplicación en un ELISA indirecto específico destinado al diagnóstico serológico de *B. bovis*.

Para contrastar esta hipótesis, nuestra estrategia experimental estuvo orientada a producir el antígeno recombinante Ct-RAP-1 de *B. bovis* mediante expresión en *E. coli* y posterior purificación, analizándose preliminarmente su antigenicidad y reactividad cruzada frente a otros hemoparásitos en un ELISA indirecto desarrollado en el laboratorio (*in house*).

Este trabajo se enmarcó en una línea de investigación de la Unidad Académica de Desarrollo Biotecnológico orientada al desarrollo de herramientas serológicas para la detección de los hemoparásitos causantes de la tristeza parasitaria bovina (TPB), llevada a cabo por la Dra. Andrea Rossi en colaboración con PSA-INIA.

2. Objetivos

Objetivo general

Producir de forma recombinante el extremo C-terminal del gen RAP-1 de *B. bovis* (Ct-RAP-1_Bbo), con el fin de evaluar su potencial aplicación en el diagnóstico serológico de *B. bovis* en Uruguay.

Objetivos específicos:

1. Optimizar las condiciones de cultivo e inducción del sistema de expresión recombinante *E. coli* BL21 transformado con el vector pET-15b-Ct-RAP-1_Bbo.
2. Producir a escala de laboratorio y purificar la proteína recombinante rCt-RAP-1_Bbo mediante cromatografía de afinidad.
3. Evaluar preliminarmente la antigenicidad de la proteína recombinante rCt-RAP-1_Bbo mediante ensayos serológicos utilizando sueros bovinos positivos y negativos para *B. bovis*.

3. Materiales y métodos

3.1. Síntesis y clonado del gen Ct-RAP-1_Bbo

Previo al inicio de esta tesis, la secuencia nucleotídica de la región C-terminal del gen RAP-1 de *B. bovis* de la cepa R1 de Argentina (R1A) fue obtenida de la base de datos de NCBI. El fragmento de ADN correspondiente al Ct-RAP-1_Bbo se envió a sintetizar químicamente, previa optimización de codones para su expresión en *E. coli*, y subclonar en el vector de expresión pET-15b a la empresa GenScript. El plásmido pET-15b contiene un sistema de expresión controlado por el promotor T7, cuya transcripción es inducida con isopropil- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) debido a la presencia del operador lacO. Se utilizó como marcador de selección el gen de resistencia a ampicilina, lo que permitió seleccionar las bacterias que hubiesen incorporado el plásmido tras la transformación. Ct-RAP-1_Bbo se insertó en fase, conservando el marco de lectura, y quedó flanqueado por los sitios de restricción *NdeI* y *XhoI*. Para purificación se utilizó una secuencia de seis histidinas (His-Tag) en el extremo N-terminal mediante cromatografía de afinidad a metales.

3.2. Transformación de pET-15b-Ct-RAP-1_Bbo en BL21 *E. coli*

Para la expresión se seleccionó la cepa *E. coli* BL21(DE3) debido a dos ventajas clave. En primer lugar, contiene en su cromosoma el gen de la ARN polimerasa T7, lo que permite la transcripción del gen clonado bajo el promotor T7. En segundo lugar, presenta una baja actividad proteolítica, cualidad que favorece la estabilidad de la proteína recombinante. La transformación química se realizó utilizando células competentes de *E. coli* BL21(DE3), preparadas mediante el método de cloruro de calcio y gentilmente provistas por el Dr. Julio Guarnaschelli. Dos alícuotas de células competentes se descongelaron en hielo durante 15 min; a una de ellas se le agregó 3 μ L del plásmido recombinante pET-15b-Ct-RAP-1_Bbo, mientras que la otra se mantuvo como control negativo de transformación. Las mezclas se homogeneizaron suavemente y se incubaron en hielo durante 20 min, seguidas de un shock térmico a 42 °C durante 60 s y una incubación inmediata en hielo por 2 min. Posteriormente, se agregaron 900 μ L de medio Luria-Bertani Broth, Miller (BD Difco™) estéril sin antibiótico a cada tubo y se incubaron a 37 °C con agitación durante 1 h. Para la selección de transformantes, se sembraron 100 μ L de cada suspensión en placas de LB agar (Sigma-Aldrich) con 100 μ g/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich) (LBA c/Amp). Para aumentar la probabilidad de recuperar transformantes en caso de baja eficiencia, el volumen restante se centrifugó, los pellets se resuspendieron en un volumen reducido de LB, concentrando la muestra 10 X, y se sembraron en placas de LBA c/Amp. En todos los casos, la siembra se realizó por extensión en superficie utilizando una espátula estéril. Las placas se incubaron por 16 h a 37 °C, considerándose la aparición de colonias como indicativo de una transformación exitosa.

3.3. Selección de Colonias

A partir de las placas de transformación en LBA c/Amp, se seleccionaron tres colonias individuales, las cuales fueron inoculadas en 10 mL de medio LB suplementado con 100 μ g/mL de ampicilina (LB c/Amp) y cultivada por 16 h a 37 °C bajo agitación constante a 200 rpm. A

partir de cada cultivo, se prepararon stocks bacterianos (punto 3.4) y, en paralelo, se realizó la confirmación de la presencia del plásmido recombinante (punto 3.5).

3.4. Congelado de las cepas

A partir del cultivo obtenido, se prepararon stocks bacterianos mediante la adición de glicerol estéril hasta alcanzar una concentración final del 16 % (v/v). Las alícuotas obtenidas se almacenaron a -80°C para su conservación.

3.5. Miniprep

La confirmación de los transformantes se realizó mediante extracción plasmídica (miniprep) seguida de digestión con enzimas de restricción. Para la miniprep, se utilizó el mismo cultivo bacteriano obtenido bajo las condiciones descritas en el punto 3.3. Finalizado el cultivo, se centrifugó a 8000 rpm por 12 min a 4°C y se purificó el ADN plasmídico utilizando el kit comercial *QIAprep® Spin Miniprep Kit* (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.6. Digestión enzimática

Para confirmar la presencia y el tamaño del inserto del plásmido recombinante pET-15b_Ct-RAP-1_Bbo, se realizaron digestiones enzimáticas utilizando las enzimas de restricción NdeI y XhoI, cuyos sitios de reconocimiento se localizan flanqueando la secuencia de Ct-RAP-1. Para esto, 2 μL de ADN plasmídico se digirió: con 1 μL de NdeI (Thermo Scientific, ER0585) en Buffer O, o con 1 μL de XhoI (Thermo Scientific, ER0691) en el Buffer R. La doble digestión se realizó con 1 μL de NdeI y 2 μL de XhoI en Buffer O. Todas las reacciones se realizaron con un volumen final de 10 μL durante 3 horas a 37°C en baño de agua.

3.7. Electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa

Para visualizar ADN plasmídico y los productos de digestión se realizó electroforesis en gel de agarosa (Thermo Scientific) al 1% preparado en buffer TBE 1X [89 mM Tris Base, 89 mM ácido bórico (todos de Sigma-Aldrich), 2 mM EDTA (PanReac AppliChem)]. Las muestras se prepararon mezclándolas con buffer de carga 6X [30% glicerol, 0.25% xilen cianol, 10 mM Tris-HCl pH 7.5 (Sigma-Aldrich), 0.25% bromofenol azul (Merck) y 1 mM EDTA (AppliChem)]. Se utilizó el marcador de peso molecular de ADN Thermo Scientific™ GeneRuler 1 kb DNA Ladder. La electroforesis se realizó en buffer TBE 1X a 100 V en el sistema HORIZON® 58 de Life Technologies. La visualización del gel se realizó al finalizar la corrida electroforética con GelGreen® (Biotium); posteriormente, el gel se analizó mediante exposición a luz UV en el sistema G:BOX Syngene, y las imágenes se capturaron con el software GeneSnap (Syngene).

3.8. Inducción de la expresión de rCt-RAP-1_Bbo

Para la inducción de la expresión de rCt-RAP-1_Bbo, se preparó un cultivo semilla de 16 h a 37°C con agitación a 200 rpm partiendo de una colonia obtenida del plaqueo del stock bacteriano congelado. Finalizado el cultivo, se prepararon cultivos de 50, 100 y 200 mL de LB

c/Amp a partir del cultivo semilla en una dilución 1:50, y se incubaron a 37 °C con agitación a 200 rpm. Se tomaron alícuotas del cultivo a cada hora para la medición de la densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀), utilizando un espectrofotómetro Ultrospec 10 (Amersham Biosciences) con el fin de corroborar el crecimiento bacteriano. Cuando los cultivos alcanzaron una OD₆₀₀ de 0,8–0,9 (aproximadamente a las 2 h de cultivo), se indujeron con IPTG (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 1 mM. El crecimiento bacteriano pre y post inducción en los cultivos con y sin inducción fue analizado cada una hora mediante la determinación de la OD₆₀₀.

3.9. Purificación de rCt-RAP-1_Bbo

Finalizados los cultivos, se realizó una centrifugación a 4500 rpm durante 20 min a 4 °C. El pellet bacteriano se resuspendió y concentró 20 veces en al 2% (v/v) Tritón X-100 (Union Carbide Corporation) PBS pH=7,4. La suspensión bacteriana se sonicó en frío a 50 mA en el sonicador UltraSonic 4710 Series (Cole-Palmer), realizando 10 ciclos de 15 segundos con intervalos de 60 segundos de enfriamiento entre ciclos, y luego se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se recolectó como fracción soluble (FSol), mientras que el pellet se resuspendió en PBS hasta el volumen inicial (fracción insoluble, FInsol).

La purificación se realizó mediante cromatografía de afinidad, empleando la columna *High Affinity Ni-Charged Resin* (GenScript) con un volumen de resina de 2,5 mL. El protocolo de purificación utilizado se detalla en la Tabla 2.

Tabla 2. Protocolo de purificación de rCt-RAP-1_Bbo.

Buffers	Composición	Volúmenes totales/lavado (Vol resina: 2.5 mL)
LE Buffer pH=8	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl	4
Wash Buffer 1 pH=5,8	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 10 mM Imidazol 2% (v/v) Triton X100 100%	10
Wash Buffer 2 pH=5,8	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 30 mM Imidazol 2% (v/v) Triton X100 100%	10
Elution Buffer pH= 8	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 250 mM Imidazol	5

Todos los reactivos para preparar los buffers fueron de marca Sigma-Aldrich, con excepción de Triton X100 100% (Union Carbide Corporation). Los buffers fueron filtrados a través de Filtros de jeringa Minisart® CA 0,45µm para eliminar residuos. Los pasos de purificación (flow-through, wash buffers, resinas pre y post lavados, y todos los eluidos obtenidos) fueron recolectados y analizados mediante cuantificación de proteínas a 280 nm utilizando Nanodrop,

y por electroforesis de proteínas SDS-PAGE. Todas las fracciones de elución obtenidas durante el proceso fueron conservadas a -20 °C hasta su utilización posterior.

3.10. Electroforesis de proteínas por SDS-PAGE

El perfil proteico de las fracciones soluble e insoluble, y de las diferentes etapas de la purificación se determinó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), siguiendo la metodología descrita por Laemmli (1970) y protocolos estándar utilizados rutinariamente en el laboratorio. Brevemente, las muestras proteicas se prepararon mezclando cada fracción con buffer de muestra 5X [0.125 M Tris-HCl, 4% SDS, 20% glicerol (todos de Sigma-Aldrich), 0.02% azul de bromofenol (Merck) pH 6.8 y 5% β -mercaptoetanol (Thermo Scientific)], y posteriormente se calentaron a 100 °C durante 5 minutos. Se sembraron 0,15 unidades de densidad óptica por carril para fracciones solubles e insolubles, y 0,25 unidades para fracciones provenientes de eluidos, wash buffers y resinas, calculadas como el producto de la absorbancia a 600 nm y el volumen de cultivo procesado. Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida al 12% (gel de resolución) utilizando un sistema discontinuo, con un espesor de 1,5 mm. La electroforesis se llevó a cabo en buffer Tris-glicina-SDS (pH 8.3) a 120 V constantes, en el equipo MiniProtein Tetra System (BioRad). Finalizada la corrida, los geles se tiñeron con Azul de Coomassie (Sigma-Aldrich) durante 1 h y se destiñeron con una solución de 30% metanol y 10% ácido acético hasta la visualización de las bandas proteicas. Se utilizó como marcador de peso molecular el PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10–180 kDa).

3.11. Diálisis

Las fracciones de elución seleccionadas de rCt-RAP-1_Bbo fueron combinadas en un pool y dializadas utilizando una membrana con un punto de corte molecular (MWCO) de 12 kDa (Sigma-Aldrich). La membrana fue cargada con 10 mL del pool de eluido y dializadas contra PBS 1X, empleando una relación volumen muestra:buffer de 1:300 (v/v). La diálisis se llevó a cabo a 4 °C bajo agitación constante. Transcurridas 24 h, el buffer fue reemplazado por PBS 1X nuevo, manteniendo el volumen y condiciones de incubación, y se continuó la diálisis durante un período adicional equivalente. Finalizado el proceso, las muestras dializadas fueron recuperadas y almacenadas a -20 °C hasta su utilización.

3.12. Cuantificación por método BCA

La concentración proteica se determinó mediante el ensayo del ácido bicinonínico (BCA) (Sigma-Aldrich). Para cuantificar se realizó una curva a partir de un estándar comercial de 1000 μ g/mL de Albúmina de Suero Bovino (BSA) (Sigma-Aldrich) con 7 concentraciones de 800 a 25 μ g/mL en PBS. Las muestras problemas fueron diluidas en PBS 1 (1:1, 1:5 y 1:10) (v/v). La curva estándar y las muestras fueron sembradas con 10 μ L por pocillo en una placa de 96 pocillos Cellstar® Greiner Bio One™ (Cat # 655180). Todas las diluciones fueron sembradas por duplicado (estándar y muestras). Se agregó 250 μ L/pocillo de una solución 50:1 (v/v) de los reactivos BCA y sulfato de cobre, se incubó la placa a 37°C por 30 minutos; y posteriormente se realizó la medición de absorbancia a 562 nm (DO_{562nm}) con el lector de placas

BMG Labtech SPECTROstar Nano. La determinación de la concentración proteica se realizó interpolando los datos de DO_{562nm} en la curva estándar de BSA.

3.13. Seroteca

Se trabajó con una seroteca compuesta por 50 muestras de sueros de bovinos de status sanitario caracterizado provenientes de rodeos del país. La seroteca fue cedida por el Dr. Pablo Parodi de la Plataforma de Investigación en Salud Animal del INIA Tacuarembó, en el marco de una colaboración con la Unidad Académica de Desarrollo Biotecnológico (UADB). Los sueros fueron provenientes de animales con estatus sanitario previamente caracterizado mediante microscopía de frotis sanguíneos y PCR multiplex. El conjunto incluyó diez sueros positivos para *B. bovis*, diez sueros con infección por *B. bovis/B. bigemina*, diez sueros positivos para *B. bigemina* y diez sueros positivos para *A. marginale*, así como diez sueros sin evidencia de infección previa que fueron utilizados como controles negativos.

3.14. Western Blot

Para evaluar el reconocimiento inmunológico de rCt-RAP-1_{Bbo} mediante Western Blot, se sembraron 15 µg de proteína purificada por carril en un gel de SDS-PAGE al 12% junto con un marcador de peso molecular preteñido (Ítem 3.10). Finalizada la corrida electroforética, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF mediante transferencia seca utilizando el sistema Invitrogen iBlot™ 2 Dry Blotting System y stacks de transferencia preensamblados, aplicando un programa escalonado (20 V durante 1 min, 23 V durante 4 min y 25 V durante 2 min). La eficiencia de la transferencia se verificó mediante tinción con Rojo de Ponceau. Posteriormente, la membrana se cortó en tiras y se decoloró mediante lavados con agua destilada. A continuación, se bloqueó con 5% leche descremada (LD) en 0,05% Tween-20 PBS (PBST) durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Las tiras se lavaron cinco veces con 20 mL de PBST durante 5 min cada una, con agitación. Posteriormente, se utiliza una tira para determinar la presencia de la proteína recombinante mediante incubación con un anticuerpo α-His-Tag conjugado a HRP (GenScript, A00612) a una concentración final de 0,5 µg/mL durante 16 h a 4 °C con agitación. Las tiras restantes se incubaron con sueros bovinos (5 positivos y 2 negativos para *B. bovis*) diluidos 1:100 en 0,5% LD PBST, pre-adsorbidos con sonificado de *E.coli* BL21 (150 µg/mL concentración final). La incubación se realizó durante toda la noche a 4 °C con agitación. Luego de cinco lavados bajo las mismas condiciones, las membranas se incubaron durante 1 h a 37 °C con anti-IgG bovina conjugado a HRP (Sigma, A5295), diluido 1:1000 en 0,5% LD PBST. Posteriormente, se realizaron cinco lavados bajo las condiciones previamente descritas y finalmente, se realizó la detección mediante quimioluminiscencia utilizando el sistema Amersham™ ECL Detection Reagents, siguiendo las instrucciones del fabricante. La detección de quimioluminiscencia se realizó en condiciones de oscuridad mediante el sistema G:BOX (Syngene).

3.15. ELISA

Para el inmunoensayo se utilizaron placas de 96 pocillos Cellstar® Greiner Bio One™ (Cat. # 655180), las cuales fueron sensibilizadas con 50 µL/pocillo del antígeno rCtRAP-1_Bbo (10 µg/mL) en PBS e incubadas por 16 h a 4°C. Las placas se lavaron tres veces de 3 min cada una con PBST, el bloqueo fue realizado con 100 µL/pocillo de 1% BSA en PBST durante 1 h a 37 °C. Luego de tres lavados, se sembraron 50 µL/pocillo de los sueros problemas diluidos 1/100 y 1/400 en 1% BSA en PBST, pre-adsorbidos (30 min a temperatura ambiente con 150 µg/mL de sonificado de *E.coli* BL21), y se incubaron 1 h a 37 °C. Luego de tres lavados con PBST, se agregó 50 µL/pocillo de anti-bovine IgG HRPO conjugated (SIGMA, A5295) diluido 1:3000 en 1% BSA en PBST. Las placas se incubaron 1 h a 37 °C en y posteriormente fueron lavadas tres veces con PBST. Se reveló con 50 µL/pocillo del sustrato cromogénico OPD SigmaFast® y se incubó en oscuridad por 10 min a 37°C, la reacción fue frenada con 15 µL/pocillo de H₂SO₄ 3M. La absorbancia fue leída a 492 nm en el lector de placas BMG Labtech SPECTROstar Nano.

3.16. Análisis Estadístico

Para comparar los niveles de IgG de los grupos positivos y negativos para *B. bovis* se empleó test de Mann-Whitney de dos vías. El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA), y el p valor $p < 0,05$ se representó en el gráfico con un asterisco.

4. Resultados

A) Obtención y verificación del sistema de expresión recombinante *E. coli* BL21 pET-15b-Ct-RAP-1_Bbo.

Previo al inicio de este trabajo, se seleccionó la secuencia nucleotídica del gen Ct-RAP-1_Bbo, correspondiente a la cepa R1 de Argentina (R1A) como referencia representativa de la región. La secuencia fue obtenida de la base de datos de NCBI y confirmada mediante un análisis bioinformático de BLAST y alineamientos múltiples frente a las cepas de referencia internacional como T2Bo (Goff et al., 1998), Mo7 (Hines et al., 1989) y regionales de Brasil y Argentina, asegurando así el uso de una secuencia conservada.

Recibido el constructo, se transformó la cepa *E. coli* BL21 con el plásmido pET-15b-Ct-RAP-1_Bbo. Las células fueron recuperadas en medio no selectivo y sembradas en placas de agar LB con antibiótico para seleccionar bacterias transformadas. En el control negativo (células no transformadas) no se observó crecimiento bacteriano en el medio selectivo, confirmando la eficacia de la presión antibiótica y la ausencia de contaminación. En contraste, en la placa sembrada con el cultivo sin concentrar crecieron más de 100 colonias, mientras que en la placa correspondiente al cultivo concentrado el número de colonias fue demasiado elevado para su cuantificación. En conjunto, estos resultados nos confirmaron que la transformación fue exitosa.

La presencia del plásmido y del fragmento Ct-RAP-1_Bbo se verificó mediante análisis de restricción. Para ello, se realizó la extracción de ADN plasmídico a partir de cultivos bacterianos de colonias transformadas, seguida de la digestión con las enzimas de restricción NdeI y XhoI, que flanquean la región de inserción del gen Ct-RAP-1_Bbo. Se llevaron a cabo dos digestiones simples, cada una con cada enzima para linealizar el plásmido y determinar el tamaño, y una doble digestión con ambas enzimas para liberar el inserto y determinar su tamaño. Los productos de digestión fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa, observándose un patrón de bandas consistente con los tamaños esperados para el vector y el inserto (Fig. 3). En las digestiones simples, se observó una banda única que migró según el tamaño esperado para el plásmido linealizado (6521 pb), mientras que en la doble digestión fueron observadas dos bandas definidas: una correspondiente al vector pET-15b (5708 pb) y otra banda de masa molecular coincidente con el tamaño teórico del inserto Ct-RAP-1_Bbo (813 pb) (Fig. 3).

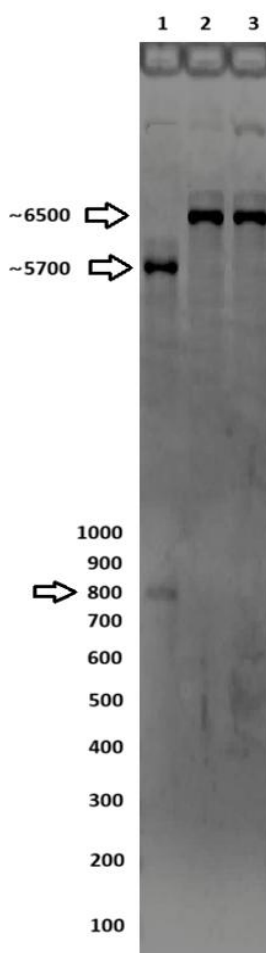


Figura 3. Análisis por restricción enzimática del plásmido recombinante pET-15b-Ct-RAP-1_Bbo mediante electroforesis en gel de agarosa. Carril 1: Doble digestión con enzimas NdeI y XhoI. Carril 2: Simple digestión con enzima NdeI. Carril 3: Simple digestión con enzima XhoI.

B) Análisis de la cinética de crecimiento del sistema de expresión *E. coli* BL21 y optimización del tiempo de inducción.

Tras confirmar la obtención de los transformantes de *E. coli* BL21, se evaluó la cinética de crecimiento del sistema de expresión *E.coli*. Para ello, se realizaron cultivos a escala de 50 mL en medio LB Amp, partiendo de inóculos obtenidos de cultivos semilla de 16 h.

Se trabajó con dos cultivos paralelos e independientes: uno de ellos fue inducido con 1 mM de IPTG, mientras que el otro se mantuvo como control no inducido (-IPTG). La cinética de crecimiento se analizó mediante la medición de la OD_{600nm} (Tabla 3), y mostró que presentaron una fase de crecimiento exponencial alcanzando valores de OD_{600nm} cercanos a 0,8-0,9 a las 2 h de incubación (Fig. 4), punto en el cual se indujo con IPTG. Los cultivos alcanzaron una OD_{600nm} de 2,7 (+IPTG) y 2, 8 (-IPTG) tras 7 h de incubación, evidenciando el ingreso a la fase estacionaria, momento en el cual fueron finalizados (Fig. 4).

Tabla 3. Cinética de crecimiento (OD_{600nm}) de *E. coli* BL21 pET-15b-Ct-RAP-1_Bbo bajo condiciones de inducción (+IPTG) y no inducción (-IPTG).

Tiempo (hs)	OD_{600nm} Final (+IPTG)	OD_{600nm} Final (-IPTG)
1	0,2	0,2
2	0,9	0,8
3	1,5	1,6
4	2,2	2,4
5	2,5	2,6
6	2,7	2,8
7	2,7	2,8

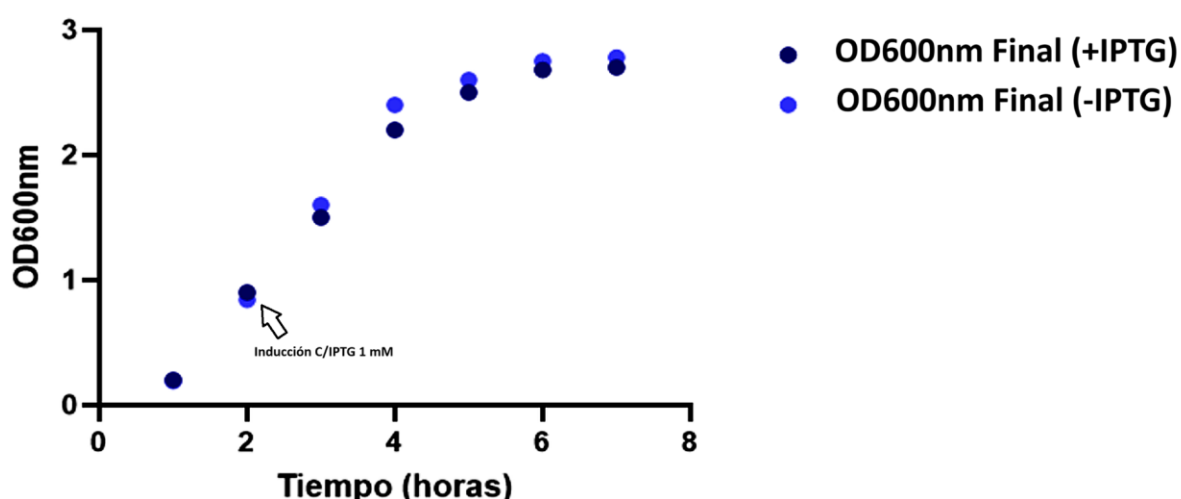


Figura 4. Curva de crecimiento (OD_{600nm}) de *E. coli* BL21 pET-15b-Ct-RAP-1_Bbo bajo condiciones de inducción (+IPTG) y no inducción (-IPTG).

C) Expresión y evaluación de solubilidad de rCt-RAP-1_Bbo

Optimizadas las condiciones de cultivo e inducción con IPTG, se evaluó la capacidad del sistema de expresión para producir el fragmento recombinante. Para ello, se realizaron cultivos de 50 mL en medio LB Amp los cuales fueron inducidos con 1 mM de IPTG (+IPTG), de acuerdo con el protocolo descrito previamente. En forma paralela, se cultivó la misma cepa transformada, pero sin inducir (-IPTG). Finalizados los cultivos, las células fueron cosechadas y sometidas a un proceso de ruptura celular por sonicación, obteniéndose las fracciones soluble (FSol) e insoluble (FInsol) para ambas condiciones. Con el fin de determinar la especificidad de la inducción y el perfil de solubilidad de la proteína rCt-RAP-1_Bbo, las fracciones FSol y FInsol de ambas condiciones (+IPTG y -IPTG) se analizaron mediante

electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Fig. 5). El análisis comparativo permitió observar que rCt-RAP-1_Bbo (peso molecular 30.99 kDa) se expresó en respuesta a la inducción con IPTG y en forma soluble (Fig. 5, carril 2). En las fracciones de los cultivos sin inducir no se observaron bandas del peso molecular de nuestro fragmento (Fig. 5, carril 4 y 5).

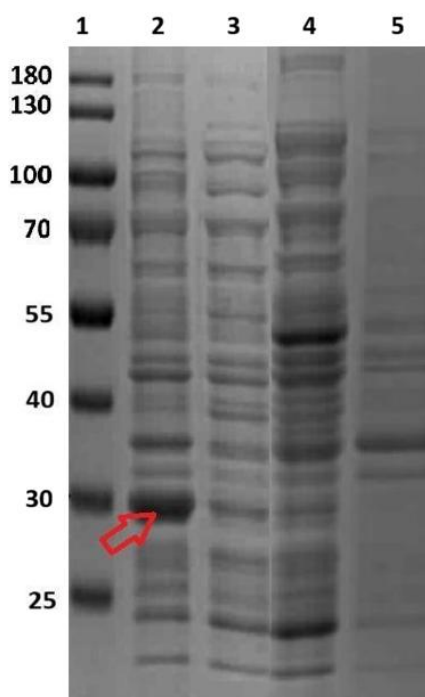


Figura 5. Análisis por SDS-PAGE de las fracciones solubles e insolubles de rCt-RAP-1_Bbo. Carril 1: Marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10 to 180 kDa), Carril 2: Fracción soluble (+IPTG), Carril 3: Fracción insoluble (+IPTG), Carril 4: Fracción soluble (-IPTG), Carril 5: Fracción insoluble (-IPTG). Flecha Roja: banda representativa a rCt-RAP-1_Bbo.

C) Purificación por afinidad de rCt-RAP-1_Bbo y optimización de las condiciones de elución

El fragmento rCt-RAP-1_Bbo se purificó mediante cromatografía de afinidad utilizando la resina GenScript High Affinity Ni-Charged Resin, aplicando inicialmente el protocolo estándar del fabricante. Como resultado, se obtuvo un eluido que contenía la proteína de interés junto con múltiples proteínas contaminantes (Fig. 6), evidenciando una retención inespecífica de proteínas por parte de la resina.

A fin de superar esta limitación, se optimizaron las condiciones de purificación mediante la modificación del pH y el incremento de la astringencia en las etapas de lavado. El protocolo optimizado (detallado en ítem 3.9 de Materiales y Métodos) incorporó un segundo buffer de lavado (Wash Buffer 2; con 30 mM de imidazol) en un gradiente escalonado respecto al Wash Buffer 1 (10 mM de imidazol), ambos con Tritón X-100 y pH 5,8. Este ajuste redujo significativamente la adsorción inespecífica de proteínas contaminantes a la resina, manteniendo intacta la unión de la proteína diana (Fig. 7, carriles 4 y 6). En las fracciones de

elución se observó una banda única y definida con un peso molecular aparente concordante con el valor teórico de rCt-RAP-1_Bbo (30.99 kDa), logrando la remoción casi total de las proteínas endógenas (Fig. 7, carriles 7-9). Este incremento en la astringencia de los lavados permitió recuperar la proteína recombinante con un mayor grado de pureza para su posterior aplicación en inmunoensayos

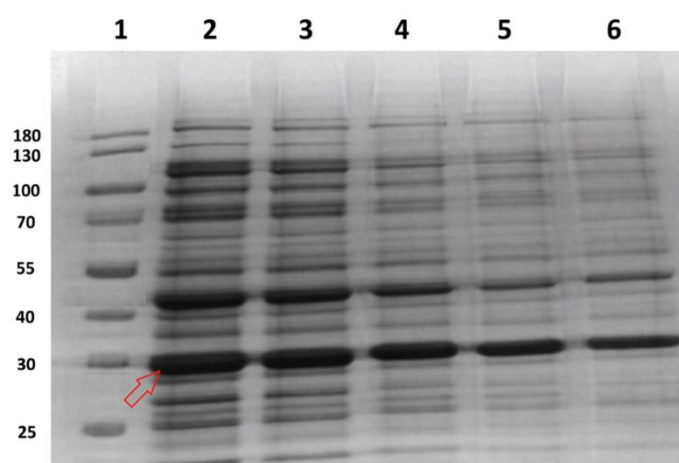


Figura 6. Análisis por SDS-PAGE 12% de purificación de la proteína recombinante Ct-RAP-1_Bbo utilizando el protocolo estándar del fabricante. Carril 1: Marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10 to 180 kDa), Carril 2, 3, 4, 5 y 6: Eluidos 1 al 5 respectivamente. Flecha Roja: banda representativa a rCt-RAP-1_Bbo.

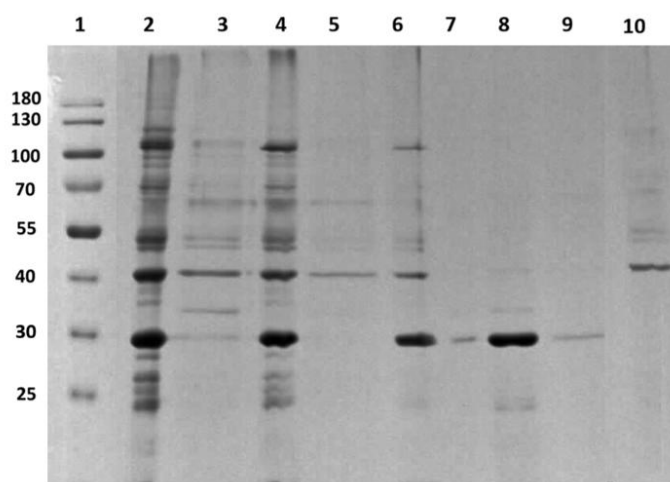


Figura 7. Análisis por SDS-PAGE 12% de purificación de la proteína recombinante rCt-RAP-1_Bbo utilizando el protocolo optimizado. Carril 1: Marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10 to 180 kDa), Carril 2: Resina post Flow Through, Carril 3: Wash Buffer 1 Carril 4: Resina post Wash buffer 1, Carril 5: Wash Buffer 2 Carril 6: Resina post Wash buffer 2, Carril 7, 8, 9 y 10: Eluidos 1, 3 y 5 respectivamente, Carril 10: Resina post Eluido.

Una vez optimizado el protocolo de purificación, se realizaron cultivos de 150 mL para producir la proteína recombinante. Los cultivos fueron inducidos con 1mM de IPTG, a partir de la fracción soluble se obtuvieron las fracciones de elución de mayor concentración (E1 a E7), las cuales fueron combinadas en un único pool y posteriormente dializadas, obteniéndose un volumen final de 10 mL de proteína purificada. La concentración del lote (pool) de rCt-RAP-1_Bbo purificada, determinada mediante el método de BCA, fue de 284 µg/mL.

D) Evaluación preliminar de la antigenicidad de rCt-RAP-1_Bbo mediante Western blot.

Para este ensayo, se utilizaron sueros positivos para *B. bovis* (#3, #4, #7, #8 y #10) y los sueros negativos (#17 y #19) para todos los hemoparásitos obtenidos de la seroteca. Los sueros utilizados para este ensayo fueron seleccionados mediante Dot-Blot previo a esta tesina. El análisis por Western blot demostró la capacidad de rCt-RAP-1_Bbo para ser reconocida por anticuerpos específicos en sueros de animales infectados por *B. bovis* (Fig. 8). Los sueros positivos exhibieron una banda de reconocimiento específica a ~31 kDa, coincidente con el control positivo α -His-Tag, lo que confirma la antigenicidad de la proteína recombinante. El suero control negativo (#19) no mostró señal de inmunorreactividad, mientras que suero #17 mostró un reconocimiento con alta intensidad de rCt-RAP-1_Bbo, sugiriendo que, si bien este suero fue clasificado inicialmente como negativo, posiblemente su clasificación no sea correcta o el bovino tuvo una exposición previa al patógeno.

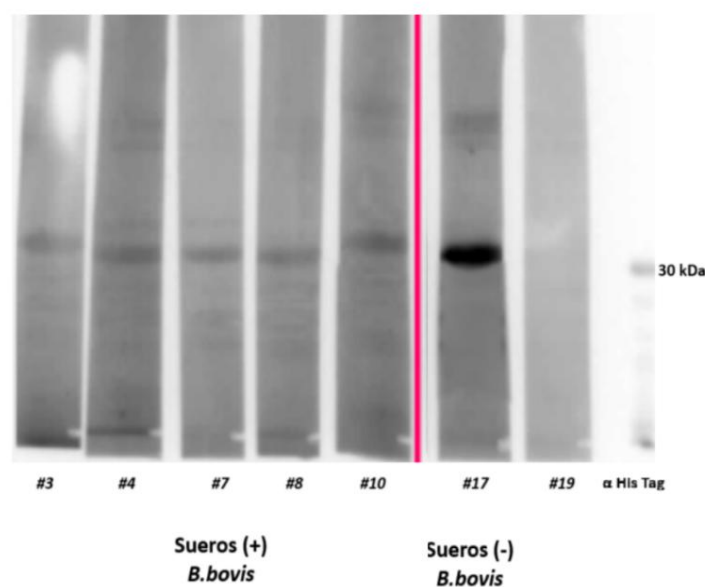


Figura 8: Análisis por Western blot de la especificidad serológica de rCt-RAP-1_Bbo. Detección de la proteína recombinante (~31 kDa) empleando un panel de sueros bovinos positivos (#3, #4, #7, #8, #10) y negativos (#17, #19) a *B. bovis*. Carril α -HisTag: control positivo de expresión revelado con anticuerpo anti-histidina.

E) Evaluación preliminar de la capacidad de detección serológica de rCt-RAP-1_Bbo mediante ELISA indirecto

Para evaluar la capacidad del antígeno rCt-RAP-1_Bbo de discriminar entre animales seropositivos y seronegativos para *B. bovis* se realizó un ELISA indirecto desarrollado en el laboratorio (*in house*) en el contexto del proyecto donde se enmarca de esta tesina. Para esto, analizamos los sueros positivos (n=10) y negativos (n=10) para *B. bovis*. A partir de los valores de OD_{492nm} de los 10 sueros negativos para los tres patógenos (*B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale*), calculamos un valor de corte que nos permita en forma preliminar definir sueros positivos de negativos, este fue calculado como el promedio OD_{492nm} más 2 desvíos estándar. Como resultado, pudimos observar que los sueros positivos para *B. bovis* (n=10) exhibieron niveles de IgG por encima del valor de corte y significativamente mayores a los sueros control negativos (Fig. 9). Dentro de este grupo, se observó que nueve de los sueros negativos se agruparon de por debajo del umbral de positividad; con excepción del suero #17 que mostró niveles elevados de IgG, incluso mayores a los arrojados por los sueros positivos (Fig. 9).

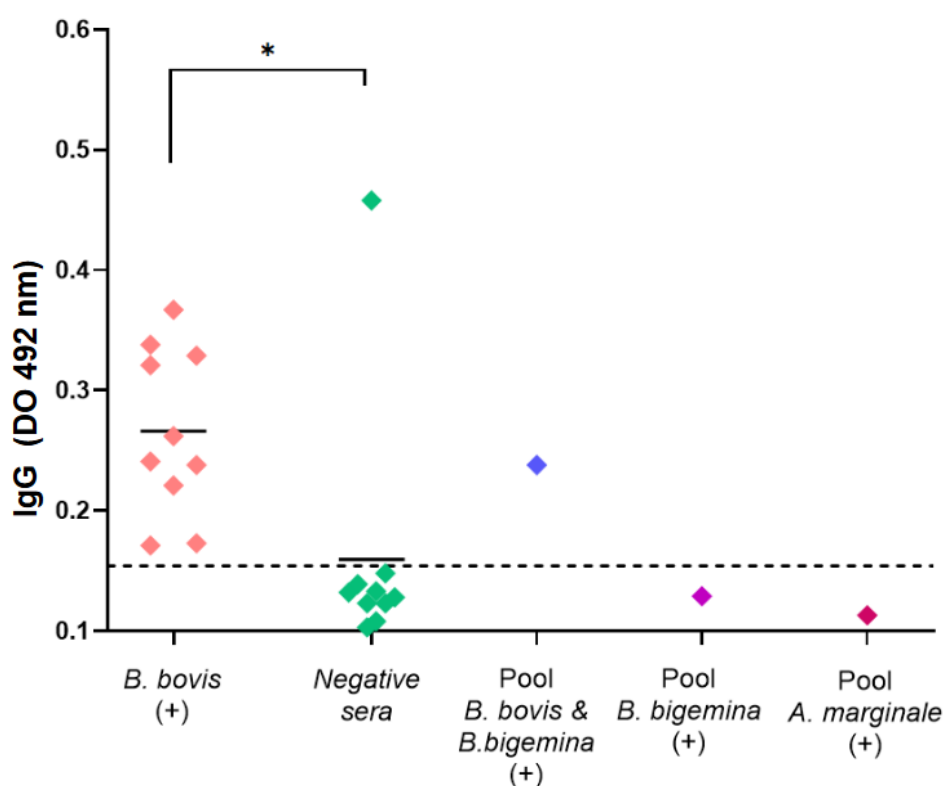


Figura 9: Niveles de IgG específica frente al antígeno recombinante Ct-RAP-1_Bbo mediante ELISA indirecto (OD_{492nm}). De izquierda a derecha: sueros positivos a *B. bovis*, sueros negativos para los tres patógenos, pool mixto *B. bovis*/*B. bigemina*, sueros positivos a *B. bigemina* y sueros positivos a *A. marginale*. Test Mann Whitney *p < 0,05.

Para el análisis preliminar de la especificidad cruzada se realizaron pooles positivos para *B. bovis*/*B. bigemina*, *B. bigemina* y *A. marginale* a partir de 10 sueros cada uno. Los resultados evidenciaron que el pool mixto *B. bovis*/*B. bigemina* presentó una reactividad positiva (Fig. 10). En contraposición, tanto el pool positivo para *B. bigemina* como el de *A. marginale* mostraron valores de absorbancia basales inferiores al valor de corte, descartando reacciones cruzadas con estos hemoparásitos (Fig. 9). En suma, los resultados mostraron en forma preliminar que el ELISA recombinante basado en rCt-RAP-1_Bbo posee una capacidad de discriminación entre animales seropositivos y seronegativos.

5. Discusión y Conclusiones

Diversos estudios han señalado que el desempeño diagnóstico de antígenos basados en el extremo C-terminal de RAP-1 puede variar según la población y el origen geográfico de las muestras evaluadas (Boonchit et al., 2004; Terkawi et al., 2011). El extremo C-terminal ha sido ampliamente empleado en serodiagnóstico y estudios epidemiológicos con alta confiabilidad (Terkawi et al., 2011); sin embargo, se ha reportado que su desempeño puede variar según el origen geográfico de las muestras, mostrando mejores resultados en sueros asiáticos en comparación con aquellos provenientes de regiones como África o Sudamérica (Boonchit et al., 2004; Terkawi et al., 2011). Igualmente, cabe destacar que el presente trabajo se desarrolló a partir de la secuencia nucleotídica de la región C-terminal del gen RAP-1 de *B. bovis* de la cepa R1 de Argentina (R1A); y previo al diseño experimental, se realizó un relevamiento bioinformático comparativo utilizando secuencias de cepas circulantes en la región, con el objetivo de contemplar la variabilidad geográfica previamente reportada en la bibliografía. De este modo, las posibles limitaciones asociadas a diferencias regionales en la secuencia del extremo C-terminal de RAP-1 fueron consideradas desde las etapas iniciales del desarrollo del antígeno recombinante.

La producción del antígeno recombinante rCt-RAP-1_Bbo en el sistema de expresión basado en *E. coli* BL21 constituyó un primer paso fundamental para el desarrollo de un inmunoensayo específico para la detección de anticuerpos contra *B. bovis*. La confirmación del clon recombinante mediante digestiones enzimáticas y análisis en gel de agarosa aseguró la presencia íntegra del inserto de 813 pb (Fig. 3), validando el constructo diseñado para las etapas posteriores.

La ausencia de diferencias apreciables en la cinética de crecimiento entre los cultivos inducidos y no inducidos (Fig. 4), reflejada en los valores de OD_{600nm} similares, sugiere que la inducción con IPTG no produjo alteraciones detectables en el crecimiento bacteriano, lo que indicaría que la expresión de la proteína recombinante no generó efectos tóxicos significativos sobre el hospedador bajo las condiciones evaluadas. Sin embargo, la intensidad relativa de la banda observada indicaría que la proteína recombinante no constituyó una de las fracciones proteicas predominantes del extracto celular, sugiriendo una capacidad moderada de acumulación intracelular. Esta limitación podría estar asociada a factores inherentes a la expresión heteróloga de proteínas derivadas de apicomplejos en sistemas procariotas, tales como la eficiencia de traducción, el plegamiento proteico o la estabilidad intracelular de la proteína recombinante, factores ampliamente descritos como determinantes del rendimiento de expresión (Rosano et al., 2014). No obstante, dado que el objetivo de esta etapa fue obtener proteína recombinante para su caracterización y evaluación posterior, los resultados obtenidos demostraron la factibilidad del sistema de expresión seleccionado.

Por otra parte, el sistema pET/T7 utilizado en cepas BL21 es conocido por inducir niveles extremadamente altos de expresión, lo cual puede favorecer acumulación de proteínas insolubles, formación de cuerpos de inclusión y estrés metabólico celular. Rosano y Ceccarelli

(2014) describen que sistemas de expresión altamente fuertes en *E. coli* frecuentemente producen proteínas mal plegadas o insolubles debido a la saturación de la maquinaria celular de traducción y plegamiento (Rosano et al., 2014). Sin embargo, en nuestro caso no se observaron valores elevados de crecimiento bacteriano, lo que sugiere que el problema probablemente no se relacione con una sobreproducción masiva de biomasa o con una expresión extremadamente alta típica del sistema pET. Esto podría indicar que existen características intrínsecas de la proteína recombinante o de la secuencia sintetizada que generarían estrés celular o toxicidad durante la expresión, incluso sin alcanzar densidades ópticas elevadas. En este sentido, Dumon-Seignovert y colaboradores (2004) demostraron que ciertas proteínas recombinantes expresadas en BL21 pueden generar toxicidad celular significativa, afectando la estabilidad plasmídica, el crecimiento bacteriano y la viabilidad celular. Por lo tanto, en el contexto de un eventual escalado de la producción del antígeno para el desarrollo de un ELISA de aplicación comercial, sería conveniente optimizar en primer lugar las condiciones de expresión en el sistema utilizado. En este sentido, podrían evaluarse diferentes concentraciones de IPTG, temperaturas de inducción más bajas y tiempos de expresión más prolongados, estrategias que han demostrado mejorar el rendimiento de proteínas recombinantes (Larentis et al., 2014; Rosano et al., 2014). Si bien se realizaron ensayos preliminares utilizando menores concentraciones de IPTG y temperaturas de inducción reducidas, no se observaron incrementos apreciables en la producción de la proteína recombinante. Asimismo, podría considerarse la utilización de una nueva preparación de células competentes BL21, a fin de descartar posibles limitaciones asociadas a la cepa empleada. En caso de que estas estrategias no permitan mejorar el rendimiento de expresión, podrían evaluarse alternativas como la modificación de la secuencia recombinante o el empleo de cepas especializadas para la expresión de proteínas de difícil producción, como C41(DE3) o C43(DE3) (Dumon-Seignovert et al., 2004).

En relación con la evaluación de la solubilidad, rCt-RAP-1_Bbo fue detectada tanto en la fracción soluble como en la insoluble (Fig. 5). No obstante, tras la optimización del protocolo de sonicación se comprobó que la proteína recombinante se recupera mayoritariamente en la fracción soluble, indicando que su presencia en la fracción insoluble se encontraba asociada a una ruptura celular incompleta y no a una tendencia predominante a formar agregados. La obtención de rCt-RAP-1_Bbo en forma soluble representa una ventaja para su producción, ya que simplifica las etapas posteriores de purificación al evitar procedimientos adicionales de solubilización y renaturalización (Wingfield et al., 2015). En conjunto, estos resultados respaldan la idoneidad del sistema de expresión empleado para la producción de rCt-RAP-1_Bbo con fines diagnósticos.

Respecto a la purificación de rCt-RAP-1_Bbo, la aplicación inicial del protocolo recomendado por el fabricante de la resina no permitió obtener la proteína con el grado de pureza esperado, observándose la copurificación de proteínas inespecíficas en las fracciones obtenidas (Fig. 6). Ante esta situación, se optimizaron las condiciones de purificación mediante la incorporación de un gradiente de imidazol, la reducción del pH de los buffers de lavado y la adición de Tritón X-100. La disminución del pH constituye una estrategia utilizada para incrementar la selectividad de la cromatografía de afinidad, ya que reduce la interacción de proteínas unidas

inespecíficamente con la resina, mientras que la proteína portadora del His-tag mantiene una afinidad suficiente por el níquel inmovilizado (Bornhorst et al., 2000). Asimismo, la incorporación de imidazol en los buffers de lavado y elución constituye una estrategia ampliamente utilizada para incrementar la selectividad de la cromatografía IMAC, reduciendo la unión inespecífica de proteínas contaminantes (Bornhorst et al., 2000; Block et al., 2009). La implementación conjunta de estas modificaciones permitió obtener fracciones de rCt-RAP-1_Bbo con un mayor grado de pureza respecto al protocolo inicialmente utilizado (Fig. 7).

Los resultados obtenidos a partir del Western Blot (Fig. 8) y de ELISA (Fig. 9) nos sugieren que el antígeno rCt-RAP-1_Bbo conserva determinantes antigénicos capaces de ser reconocidos por anticuerpos presentes en animales expuestos a *B. bovis*. Asimismo, el bajo nivel de reactividad observado en la mayoría de los sueros clasificados como negativos para *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale* nos sugiere una potencial aplicación diagnóstica del antígeno rCt-RAP-1_Bbo. No obstante, uno de estos sueros negativos (suero negativo #17) mostró tener altos niveles de anticuerpos reflejando una posible discrepancia con su clasificación como suero negativo. Este resultado podría atribuirse a diferentes factores o causas: a) que este bovino tuviera una infección subclínica no detectada por las técnicas de clasificación utilizadas para generar esta seroteca como lo es la microscopía y la PCR a tiempo final; b) que el bovino haya tenido una exposición previa a *B. bovis* y los métodos de clasificación no incluyeron el diagnóstico serológico. Esta discrepancia en la clasificación puede deberse a que las técnicas parasitológicas y moleculares detectan la presencia del parásito o de su material genético (Dasanayaka et al., 2026), mientras que los ensayos serológicos evalúan la respuesta inmune humoral, la cual puede persistir durante períodos prolongados después de la infección (García et al., 2022).

Por otra parte, la ausencia de reactividad detectable en los pools de sueros positivos para *B. bigemina* y *A. marginale* constituye una observación preliminar compatible con una posible especificidad del antígeno para la detección de anticuerpos contra *B. bovis*. Este resultado se respalda en los niveles de anticuerpos detectados en el pool de sueros positivos para *B. bovis* y *B. bigemina*. Sin embargo, es importante destacar que esta evaluación preliminar se llevó a cabo utilizando un número reducido de muestras y, en el caso de los grupos positivos para *B. bigemina* y *A. marginale*, mediante pools de sueros, lo que impide estimar la variabilidad individual y limita las conclusiones acerca de la especificidad diagnóstica del ensayo. En conjunto, estos resultados sugieren una baja reactividad cruzada de rCt-RAP-1_Bbo frente a anticuerpos dirigidos contra otros hemoparásitos, en concordancia con estudios previos que describen una adecuada especificidad diagnóstica de antígenos recombinantes basados en el extremo C-terminal de RAP-1 (Boonchit et al., 2004). No obstante, será necesario evaluar un mayor número de muestras individuales para confirmar estos hallazgos.

A pesar de estas limitaciones, los hallazgos alcanzados en esta tesina representan una primera aproximación, realizada en nuestro país, al estudio de la región C-terminal de RAP-1 como antígeno recombinante para aplicaciones serológicas. En este sentido, los resultados obtenidos respaldan la continuidad de su evaluación en estudios posteriores que incluyan un mayor número de muestras individuales, una caracterización más amplia de posibles reactividades

cruzadas y la determinación de parámetros diagnósticos como sensibilidad, especificidad y valores predictivos. Estas etapas serán fundamentales para establecer el verdadero potencial de rCt-RAP-1_Bbo como componente de herramientas serológicas destinadas al diagnóstico y la vigilancia epidemiológica de la babesiosis bovina causada por *B. bovis*.

6. Perspectivas

El presente trabajo estableció las primeras bases para la implementación de un inmunoensayo basado en la proteína recombinante Ct-RAP-1_Bbo como herramienta diagnóstica para la babesiosis bovina en Uruguay. Los resultados obtenidos nos sugieren que el antígeno rCt-RAP-1_Bbo conservó los determinantes antigénicos capaces de ser reconocidos por anticuerpos provenientes de animales expuestos a *B. bovis* brindándole la capacidad de discriminar entre animales seropositivos y seronegativos para este hemoparásito. Sin embargo, serán necesarios estudios de validación diagnóstica analítica con un mayor número de muestras que permitan confirmar su desempeño.

Como perspectivas futuras, un paso fundamental será validar el ELISA con un conjunto más amplio y epidemiológicamente diverso de muestras. Esta etapa permitirá evaluar el desempeño del ensayo en condiciones que reflejen con mayor fidelidad la heterogeneidad del rodeo bovino del país. En este sentido, se prevé trabajar con sueros positivos y negativos para *B. bovis*, confirmados mediante IFAT y PCR, provenientes de distintos contextos:

- Animales de ensayos de vacunación (monovalentes y polivalentes frente a *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale*) y controles no vacunados.

La inclusión de sueros vacunales permitirá evaluar el comportamiento del ELISA ante respuestas inmunes inducidas y no naturales. En particular, se podrá determinar si el antígeno rCt-RAP-1_Bbo es capaz de discriminar entre animales con infección natural y animales inmunizados, así como monitorear la duración de la respuesta humoral generada por las formulaciones utilizadas en la Hemovacuna. Esto podría aportar información valiosa para optimizar estrategias de inmunización y esquemas de revacunación.

- Animales de regiones endémicas o con brotes recientes de babesiosis.

El uso de sueros provenientes de zonas con alta circulación de *B. bovis* permitirá evaluar la sensibilidad del ELISA en situaciones de infección activa o exposición reciente; lo cual constituye un escenario realista y exigente para probar la robustez del ensayo.

- Ganado procedente de regiones libres de garrapata.

Las muestras de animales provenientes de zonas sin presencia de *R. microplus*, como el suroeste del país, servirán como un panel adicional de referencia negativa, ya que estos bovinos no han estado expuestos al parásito ni a sus vectores. La evaluación en este tipo de poblaciones permitirá confirmar la especificidad del diagnóstico y descartar la existencia de ruido de fondo.

La implementación de este ELISA en Uruguay fortalecería notablemente la capacidad diagnóstica nacional, permitiendo la detección rápida, objetiva y reproducible de animales infectados. Además, su naturaleza escalable lo convierte en una herramienta adecuada para estudios epidemiológicos a gran escala.

Finalmente, el avance hacia herramientas diagnósticas basadas en antígenos recombinantes adquiere especial relevancia en un contexto donde la biotecnología aplicada al control de enfermedades vectoriales está evolucionando de manera acelerada. El desarrollo de nuevas tecnologías, incluyendo vacunas basadas en ingeniería de proteínas dirigidas al vector, como *R. microplus*, está modificando el enfoque tradicional del control sanitario. En este escenario de innovación, disponer de métodos diagnósticos confiables, sensibles y adaptados a las necesidades productivas del país será fundamental para apoyar estrategias de vigilancia y manejo integrado de la babesiosis bovina.

7. Bibliografía

- Aubry, P., & Geale, D. W. (2011). A review of bovine anaplasmosis. *Transboundary and emerging diseases*, 58(1), 1–30.
- Bastos, R. G., Laughery, J. M., Ozubek, S., Alzan, H. F., Taus, N. S., Ueti, M. W., & Suarez, C. E. (2022). Identification of novel immune correlates of protection against acute bovine babesiosis by superinfecting cattle with *in vitro* culture attenuated and virulent *Babesia bovis* strains. *Frontiers in immunology*, 13, 1045608.
- Block, H., Maertens, B., Spriestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R., Labahn, J., & Schäfer, F. (2009). Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. *Methods in enzymology*, 463, 439–473.
- Bono M.F., Mangold A.J., Baravalle M.E., Valentini B.S., Thompson C.S., Wilkowsky S.E., Echaide I.E., Farber M.D. & Torioni de Echaide S.M. (2008). Efficiency of a recombinant MSA-2c-based ELISA to establish the persistence of antibodies in cattle vaccinated with *Babesia bovis*. *Vet. Parasitol.*, 157, 203–210.
- Bornhorst, J. A., & Falke, J. J. (2000). *Purification of proteins using polyhistidine affinity tags*. *Methods in Enzymology*, 326, 245–254.
- Boonchit, S., Xuan, X., Yokoyama, N., Goff, W. L., Wagner, G., & Igarashi, I. (2002). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant rhoptry-associated protein 1 antigen against *Babesia bovis* for the detection of specific antibodies in cattle. *Journal of clinical microbiology*, 40(10), 3771–3775.
- Boonchit, S., Xuan, X., Yokoyama, N., Goff, W. L., Waghela, S. D., Wagner, G., & Igarashi, I. (2004). Improved enzyme-linked immunosorbent assay using C-terminal truncated recombinant antigens of *Babesia bovis* rhoptry-associated protein-1 for detection of specific antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(4), 1601–1604.
- Chauvin A, Moreau E, Bonnet S, Plantard O, Malandrin L (2009). *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Vet Res.* 2009 Mar-Apr;40(2):37.
- Chung, C. J., Suarez, C. E., Bandaranayaka-Mudiyanse, C. L., Bandaranayaka-Mudiyanse, C. B., Rzepka, J., Heiniger, T. J., Chung, G., Lee, S. S., Adams, E., Yun, G., & Waldron, S. J. (2017). A novel modified-indirect ELISA based on spherical body protein 4 for detecting antibody during acute and long-term infections with diverse *Babesia bovis* strains. *Parasites & vectors*, 10(1), 77.
- Cuore, U y Solari, MA (2022). Manual práctico para el control de la garrapata común de ganado bovino y enfermedades asociadas (MGAP-DILAVE). Cámara de Especialidades Veterinarias.
- Da Trindade, H. I., Silva, G. R., Teixeira, M. C., Sousa, M. G., Machado, R. Z., Freitas, F. L., & Almeida, K.deS. (2010). Detection of antibodies against *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in calves from the region of Araguaína, State of Tocantins, Brazil. *Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*, 19(3), 169–173.
- Dasanayaka, B. P., Pathirana, S. L., Jayawardana, A., Handunnetti, S. M., Fernando, N., Galhena, B. P., Weerasena, S. J., Nitsche, A., Iddamaldeniya, S. S., & Dietzsch, A. K. (2026). A roadmap in detecting frequently reported bovine babesiosis: From blood smear to CRISPR. *Veterinary parasitology*, 342, 110662.
- Dominguez, M., Zabal, O., Wilkowsky, S., Echaide, I., Torioni de Echaide, S., Asenzo, G., Rodríguez, A., Zamorano, P., Farber, M., Suarez, C., & Florin-Christensen, M. (2004). Use of a monoclonal antibody against

Babesia bovis merozoite surface antigen-2c for the development of a competitive ELISA test. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1026, 165–170.

Dumon-Seignovert, L., Cariot, G., & Vuillard, L. (2004). The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). *Protein expression and purification*, 37(1), 203–206.

El-Sayed S, Rizk MA, Terkawi M, Igarashi I (2019). Cocktail *Babesia bovis* antigens for global detection of *Babesia bovis* infection in cattle. *Exp Parasitol*. 206:107758.

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

Figuerola, J.V., Chieves, L.P., Johnson, G.S., Buening, G.M., 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.

Gallego-Lopez, G. M., Cooke, B. M., & Suarez, C. E. (2019). Interplay between Attenuation- and Virulence-Factors of *Babesia bovis* and Their Contribution to the Establishment of Persistent Infections in Cattle. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 8(3), 97.

Garcia, K., Weakley, M., Do, T., & Mir, S. (2022). Current and Future Molecular Diagnostics of Tick-Borne Diseases in Cattle. *Veterinary sciences*, 9(5), 241.

Goff, W. L., Johnson, W. C., & Cluff, C. W. (1998). *Babesia bovis* immunity. In vitro and in vivo evidence for IL-10 regulation of IFN-gamma and iNOS. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 849, 161–180.

Goff, W. L., Molloy, J. B., Johnson, W. C., Suarez, C. E., Pino, I., Rhalem, A., Sahibi, H., Ceci, L., Carelli, G., Adams, D. S., McGuire, T. C., Knowles, D. P., & McElwain, T. F. (2006). Validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Babesia bovis*. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 13(11), 1212–1216.

Guswanto, A., Allamanda, P., Mariamah, E. S., Munkjargal, T., Tuvshintulga, B., Takemae, H., Sivakumar, T., AbouLaila, M., Terkawi, M. A., Ichikawa-Seki, M., Nishikawa, Y., Yokoyama, N., & Igarashi, I. (2017). Evaluation of immunochromatographic test (ICT) strips for the serological detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection in cattle from Western Java, Indonesia. *Veterinary parasitology*, 239, 76–79.

Hakimi H, Yamagishi J, Kawazu S-i, Asada M (2022) Advances in understanding red blood cell modifications by *Babesia*. *PLoS Pathog* 18(9): e1010770.

He, L., Bastos, R. G., Sun, Y., Hua, G., Guan, G., Zhao, J., & Suarez, C. E. (2021). Babesiosis as a potential threat for bovine production in China. *Parasites & vectors*, 14(1), 460

Hidalgo-Ruiz, Susana Mejia-López (2022). *Babesia bovis* AMA-1, MSA-2c and RAP-1 contain conserved B and T-cell epitopes, which generate neutralizing antibodies and a long-lasting Th1 immune response in vaccinated cattle, *Vaccine*, Volume 40, Issue 8,2022, 1108-1115

Hines, S. A., McElwain, T. F., Buening, G. M., & Palmer, G. H. (1989). Molecular characterization of *Babesia bovis* merozoite surface proteins bearing epitopes immunodominant in protected cattle. *Molecular and biochemical parasitology*, 37(1), 1–9.

- Jaramillo Ortiz, J. M., Montenegro, V. N., de la Fournière, S. A. M., Sarmiento, N. F., Farber, M. D., & Wilkowsky, S. E. (2018). Development of an Indirect ELISA Based on a Recombinant Chimeric Protein for the Detection of Antibodies against Bovine Babesiosis. *Veterinary sciences*, 5(1), 13.
- Jerzak, M., Gandurski, A., Tokaj, M., Stachera, W., Szuba, M., & Dybicz, M. (2023). Advances in *Babesia* Vaccine Development: An Overview. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 12(2), 300.
- Kim C.M., Blanco L.B.C., Alhassan A., Iseki H., Yokoyama N., Xuan X. & Igarashi I.(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.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Laha R, Das M, Sen A (2015). Morphology, epidemiology, and phylogeny of *Babesia*: An overview. *Trop Parasitol.* Jul-Dec;5(2):94-100.
- Larentis, A. L., Nicolau, J. F., Esteves, G.dosS., Vareschini, D. T., de Almeida, F. V., dos Reis, M. G., Galler, R., & Medeiros, M. A. (2014). Evaluation of pre-induction temperature, cell growth at induction and IPTG concentration on the expression of a leptospiral protein in *E. coli* using shaking flasks and microbioreactor. *BMC research notes*, 7, 671.
- Lira-Amaya, J. J., Martínez-García, G., Santamaria-Espinosa, R. M., Castañeda-Arriola, R. O., Ojeda-Carrasco, J. J., Ávila-Ramírez, G., & Figueroa-Millán, J. V. (2021). Comparative Study of Indirect Fluorescent Antibody, ELISA, and Immunochromatography Tests for Serological Diagnosis of Bovine Babesiosis Caused by *Babesia bovis*.
- Luengo Larrosa, L. (2025). Plan Nacional de lucha contra la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Anuario OPYP 2025.
- Machado, R. Z., Montassier, H. J., Pinto, A. A., Lemos, E. G., Machado, M. R., Valadão, I. F., Barci, L. G., & Malheiros, E. B. (1997). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. *Veterinary parasitology*, 71(1), 17–26.
- Matos, C. A., Silva, J. B. D., Gonçalves, L. R., Mendes, N. S., Alvarez, D. O., André, M. R., & Machado, R. Z. (2020). Genetic diversity of *Babesia bovis* studied longitudinally under natural transmission conditions in calves in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*, 29(4), 021220.
- Miraballes, C., Araújo, V., Riet-Correa, F. (2019). *Rhipicephalus microplus*, babesiosis and anaplasmosis in Uruguay: current situation and control or elimination programs on farms. *Exp. Appl. Acarol.* 78(4), 579-593.
- Parodi, P., Armúa-Fernández, M. T., Corbellini, L. G., Rivero, R., Miraballes, C., Riet-Correa, F., & Venzal, J. M. (2022). Description of bovine babesiosis and anaplasmosis outbreaks in northern Uruguay between 2016 and 2018. *Veterinary parasitology, regional studies and reports*, 29, 100700.
- Primo, M. E., Valentini, B. S., Panizza, M. M., Morel, N., & Thompson, C. S. (2026). Double antigen sandwich ELISA for detection of antibodies against *Babesia bovis*. *Veterinary parasitology*, 342, 110657.
- Puentes, J. D., Machado, R. Z., de Souza Perinotto, W. M., Vilela, V. L. R., & Riet-Correa, F. (2026). Tick fever risk and factors influencing the transmission of *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle properties from Atlantic Forest biome. *Tropical animal health and production*, 58(2), 73.

- Rojas MJ, Bastos RG, Navas J, Laughery JM, Lacy PA and Suarez CE (2024) A conserved motif in the immune-subdominant RAP-1 related antigen of *Babesia bovis* contains a B-cell epitope recognized by antibodies from protected cattle. *Front. Immunol.* 15:1380660.
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology*, 5, 172.
- Santos, J. H. M., Siddle, H. V., Raza, A., Stanisic, D. I., Good, M. F., & Tabor, A. E. (2023). Exploring the landscape of *Babesia bovis* vaccines: progress, challenges, and opportunities. *Parasites & vectors*, 16(1), 274.
- Solari, M.A., Dutra, F., Quintana, S., (2013). Epidemiología y prevención de los hemoparásitos (*Babesia* sp. y *Anaplasma marginale*) en el Uruguay. In: Fiel C, Nari A (eds) Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes. Montevideo, Hemisferio Sur, 689–714
- Strydom, T., Lavan, R. P., Torres, S., & Heaney, K. (2023). The Economic Impact of Parasitism from Nematodes, Trematodes and Ticks on Beef Cattle Production. *Animals : an open access journal from MDPI*, 13(10), 1599.
- Suarez, C. E., Laughery, J. M., Schneider, D. A., Sondgeroth, K. S., & McElwain, T. F. (2012). Acute and persistent infection by a transfected Mo7 strain of *Babesia bovis*. *Molecular and biochemical parasitology*, 185(1), 52–57.
- Terkawi, M. A., Huyen, N. X., Wibowo, P. E., Seuseu, F. J., Aboulaila, M., Ueno, A., Goo, Y. K., Yokoyama, N., Xuan, X., & Igarashi, I. (2011). Spherical body protein 4 is a new serological antigen for global detection of *Babesia bovis* infection in cattle. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 18(2), 337–342.
- Wingfield P. T. (2015). Overview of the purification of recombinant proteins. *Current protocols in protein science*, 80, 6.1.1–6.1.35.
- WOAH (World Organisation for Animal Health) Terrestrial Manual (2021). Obligaciones de los Servicios Veterinarios (Chapter 1.1); Bovine Babesiosis (Chapter 3.4.2).
- Yang, C., Liu, J., Li, A., Li, Y., Liu, A., Xie, J., Liu, G., Yin, H., Guan, G., & Luo, J. (2015). Evaluating the *Babesia bovis* infection of cattle in China with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Acta parasitologica*, 60(4), 721–726