



Facultad de Veterinaria  
**Universidad Zaragoza**



# Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

---

## ÍNDICE

1 – Resumen.....	2
1.2 – Abstract.....	3
2 – Justificación y objetivos.....	4
3 – Revisión bibliográfica.....	5
3.1 – Generalidades.....	5
1 – Etiología.....	5
2 – Epidemiología y distribución.....	5
3 – Morfología.....	6
4 – Ciclo biológico.....	9
5 – Factores de riesgo.....	11
6 – Patogenia, cuadro clínico y lesiones.....	12
7 – Inmunidad.....	14
2 – Diagnóstico.....	15
1 – Diagnóstico clínico – epidemiológico.....	15
2 – Diagnóstico diferencial.....	15
3 – Diagnóstico laboratorial.....	16
3 – Tratamiento.....	17
4 – Profilaxis.....	17
4 – Metodología.....	18
1 – Contexto del estudio.....	18
2 – Descripción del área.....	18
3 – Diseño del estudio.....	18
4 – Realización de técnicas.....	19
5 – Resultados.....	24
6 – Discusión.....	26
7 – Conclusiones.....	28
7.1 – Conclusiones.....	28
8 – Valoración personal.....	29
9 – Bibliografía.....	30

## 1 – RESUMEN

**Título:** “LA BESNOITIOSIS BOVINA: COMPARACIÓN DEL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO (IFI) FRENTE A LA RT-PCR EN HISOPOS CONJUNTIVALES”

**Resumen:**

La besnoitiosis bovina es una enfermedad de etiología parasitaria con cierta importancia económica en el sector bovino, caracterizada por un deterioro progresivo de los animales. Uno de los problemas principales a la hora de controlar la besnoitiosis en una explotación es su diagnóstico, pues las fases iniciales de la infección cursan con signos clínicos inespecíficos y cuando la respuesta inmune específica del animal se activa, el parásito se enquistaba en sus órganos diana y es más difícil de detectar.

Las pruebas de elección para detectar la enfermedad hoy en día son serológicas (como IFI o ELISA), pero estas pruebas requieren tomar muestras de sangre y realizar un manejo de los animales más invasivo.

Teniendo en cuenta que la conjuntiva ocular es uno de los órganos diana de *Besnoitia besnoiti* y que los parásitos se encuentran en ella formando quistes fácilmente accesibles, en este trabajo se propone intentar sustituir una de las pruebas de elección actuales (la IFI) por otra cuya toma de muestras resulta menos lesiva, como la RT-PCR de hisopado de conjuntiva ocular.

En el estudio se concluye que el hisopado de conjuntiva no parece ser capaz de detectar animales positivos con tanta sensibilidad diagnóstica como la IFI, y se sugieren cambios que podrían realizarse en el desarrollo de la prueba para mejorar los resultados en futuras investigaciones.

## 1.1 – ABSTRACT

**Title:** “BOVINE BESNOITIOSIS COMPARISON OF SEROLOGIC DIAGNOSIS (IFAT) AND RT-PCR OF CONJUNCTIVAL SWABS”

**Abstract:**

Bovine besnoitiosis is a parasitic disease of some economic significance in the bovine sector characterized by a progressive decline of the animals. One of the main problems when it comes to the control of besnoitiosis on a farm is its diagnosis, given that in the initial phases of the infection the signs of the disease are scarce and unspecific and that, when the humoral immune response of the animal is activated, the parasite encloses itself in cysts in its different target organs and it is harder to detect.

The tests of choice to detect this disease nowadays are mainly serologic (like indirect immunofluorescence – IFAT – or ELISA), but these tests require taking blood samples and a more invasive handling of the animals.

Taking into account that the ocular conjunctive is a target organ for *Besnoitia Besnoiti* and that parasites can be found there in the form of easily-accessible cysts, this study attempts to substitute one of the current tests of choice (IFAT) for another test, the sampling for which is less detrimental to the animals, like RT-PCR of ocular conjunctive swabs.

The conclusion reached in this study is that conjunctival swabs do not seem to be able to detect positive animals with as much diagnostic sensitivity as IFAT, and some changes are suggested that could be applied to the protocol in an attempt to getting better results in future investigations.

## 2 – JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La besnoitiosis bovina es una enfermedad parasitaria causada por *Besnoitia besnoiti*, un protozoo del *phylum Apicomplexa* que afecta principalmente al ganado bovino, aunque también se ha encontrado en otros rumiantes como corzos y ciervos. Pese a ser una enfermedad más propia de África y Asia, en los últimos años ha vuelto a cobrar importancia al experimentar un aumento en su prevalencia y en su expansión geográfica, llegándose a considerar como enfermedad emergente en Europa.

En el ámbito económico, la besnoitiosis se trata de una enfermedad con cierta relevancia en el sector bovino debido a las pérdidas económicas que pueden causar a los productores tanto su tratamiento y la instauración de medidas de lucha contra la enfermedad, como los controles serológicos o los tratamientos con insecticidas, el descenso en la productividad del rebaño, la aparición de problemas reproductivos en sementales y, en general, el progresivo deterioro y depreciación que experimentan los animales enfermos.

Hoy en día todavía son muchas las incertidumbres que rodean a este parásito. Se desconoce su hospedador definitivo y su mecanismo exacto de transmisión, así como muchos aspectos de su epidemiología y posibles medidas de control. Su tratamiento también es poco eficaz, y además de que la mayoría de los animales afectados son asintomáticos, los signos clínicos visibles se presentan en estadios tardíos de la enfermedad, cuando ya se han podido infectar otros animales del rebaño.

Por ello se debe considerar un diagnóstico temprano y eficaz como la mejor manera de impedir la transmisión de la enfermedad de forma generalizada en un rebaño. Lo que se propone en este trabajo es comparar una técnica de referencia como es el diagnóstico serológico por inmunofluorescencia indirecta con el diagnóstico molecular por PCR a partir de muestras de conjuntiva ocular, que es una técnica menos invasiva, para ver si hay diferencias significativas entre ellas y se podría sustituir la PCR por la inmunofluorescencia con resultados aceptables.

### 3 – REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 1. GENERALIDADES

##### 1. Etiología:

La besnoitiosis es una enfermedad parasitaria causada por *Besnoitia besnoiti*, que fue aislado por primera vez en Francia por Besnoit y Robin en 1912 (Besnoit & Robin, 1912). Se trata de un protozoo esporozoario intracelular obligado del *phylum Apicomplexa*. Los protozoos de este género afectan a un gran rango de especies domésticas y salvajes, incluyendo el vacuno, caprino, reno y caribú entre otras. Este parásito está relacionado con otros géneros de parásitos más conocidos como *Neospora*, *Hammondia* y *Toxoplasma* (Dubey *et al.*, 2002).

Aunque se desconoce con certeza su ciclo al completo, se acepta por homología con otros parásitos del mismo género (como *B. wallacei* o *B. darlingi*) que presenta un ciclo de reproducción coccidiano de tipo heteroxeno obligado; con una fase de reproducción sexual en el hospedador definitivo (HD), aún desconocido, y una fase de reproducción asexual en el hospedador intermediario (HI), que en el caso de *B. besnoiti* es el ganado bovino.

Hasta el momento no se ha conseguido identificar al HD, y aunque se asume que éste debería ser un carnívoro, y en concreto un felino salvaje, tras haber analizado más de 20 especies de estos animales nadie ha logrado involucrar a ninguno de forma concluyente. En consecuencia, esto puede hacernos pensar que la transmisión de la enfermedad mediante un ciclo coccidiano heteroxeno tradicional es poco común, siendo la transmisión horizontal directa o indirecta entre bóvidos la principal vía de diseminación de la besnoitiosis en la actualidad.

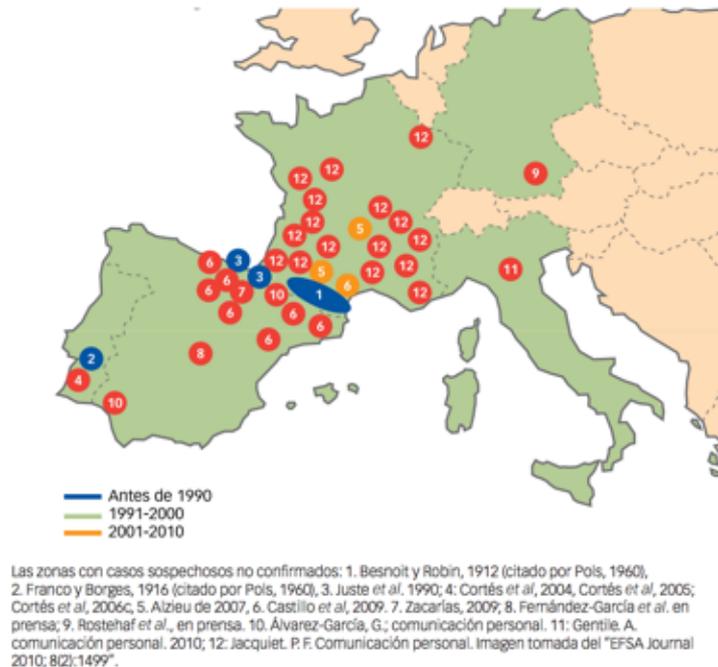
##### 2. Epidemiología y distribución:

La besnoitiosis bovina se encuentra ampliamente distribuida en Europa, África subsahariana, Asia y América del sur. La afección fue descrita por primera vez en Francia (Cadéac, 1884), y en los años siguientes se encontraron nuevos casos en ganado bovino en los pirineos franceses (Besnoit y Robin, 1912), en Portugal (en ganado importado de Angola) (Franco & Borges, 1916), y en Rusia (Peteshev *et al.*, 1974). Recientemente, se han encontrado anticuerpos frente a *B. besnoiti* en animales de Egipto (Ashmawy y Abu-Akkada, 2014) o incluso en Brasil (Uzêda *et al.*, 2014).

La enfermedad retomó importancia en Europa en los años 90, cuando después de años sin gran incidencia volvieron a surgir casos. En España, apareció inicialmente como una

enfermedad propia de las áreas del pirineo y la cordillera cantábrica (Juste *et al.*, 1990; Castillo, 2009).

La gran expansión de la enfermedad en Francia, Portugal, incluso Suiza y Hungría, provocó Çque, en el año 2010, la EFSA la reconociera como enfermedad emergente en Europa (EFSA, 2010) (Fig.1).



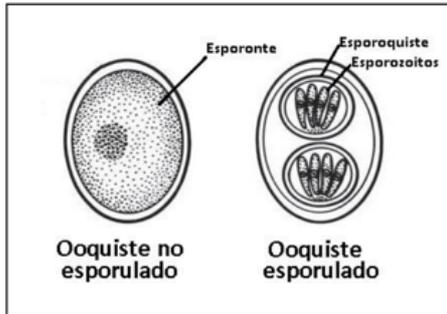
**Figura 1:** Distribución geográfica de la besnoitiosis bovina en el oeste de Europa. En verde, países donde la enfermedad había sido reportada hasta el año 2011. (Abuelo *et al.*, 2011).

### 3. Morfología:

*Besnoitia besnoiti* es un coccidio formador de quistes tisulares morfológicamente parecido a *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum*. Teóricamente, tiene un ciclo coccidiano intestinal (esquizogonia y esporogonia) en el HD, y otro extra extraintestinal (tisular) con reproducción asexual en un HI. Se sospecha que el parásito presenta cuatro estadios o formas diferentes:

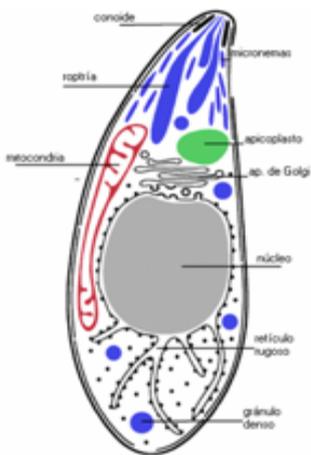
**1 – Ooquistes:** Se desconoce la morfología de los ooquistes de *B. besnoiti*, ya que se encontrarían en el HD, que aún no ha sido identificado. Por lo tanto, se toman como referencia ooquistes de otras especies de parásitos del mismo género cuyo HD es el gato (Fig.2). Estos tienen forma subsférica con dimensiones que generalmente se encuentran en un rango de 10 a 13 x 10 a 13  $\mu\text{m}$ , rodeados por una pared de dos capas de 0'5  $\mu\text{m}$  de grosor. Se eliminan en torno a los 10-15 días post-infección. Una vez esporulados en el exterior, los ooquistes

contienen dos esporoquistes que a su vez albergan cuatro esporozoítos en su interior cada uno (Dubey y Yabsley, 2010).



**Figura 2:** Dibujo esquemático de un oociste sin esporular y esporulado de *T. gondii* (Dennis A. Navarro Mamani, 2014).

**2 – Taquizoítos:** Se localizan de manera libre en la sangre y en el interior de células endoteliales, monocitos y neutrófilos del HI. Presentan un tamaño de unos 6 a 7'5  $\mu\text{m}$  y tienen una forma alargada o de plátano (Fig.3). Durante el estadio de taquizoíto el parásito se multiplica de forma asexual formando vacuolas parasitóforas y prolifera rápidamente por todo el organismo. En los fibroblastos, los taquizoítos cambian de morfología, desciende su tasa de multiplicación y se forma un quiste (Göbel *et al.*, 1985).



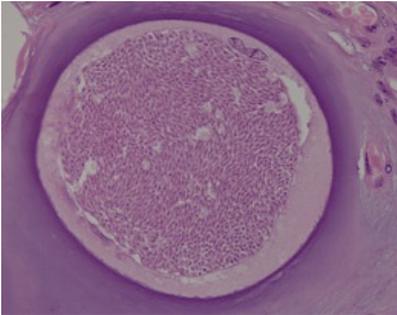
**Figura 3:** Modelo de taquizoíto del género *Apicomplexa* (Martínez Fernández, A.R (2002).

**3 – Quistes tisulares:** Las células diana de los quistes tisulares de *B. besnoiti* son los fibroblastos del HI, por lo que su localización puede ser muy diversa. Los quistes se desarrollan sobre todo en la dermis (en el cuello y la parte distal de las extremidades), en la conjuntiva ocular, en la mucosa del tracto respiratorio superior, en la mucosa del tracto reproductivo femenino y en los testículos, glándulas y conductos del aparato reproductor masculino.

Los quistes tienen forma esférica, son de color blanco brillante y se ven a simple vista. Tienen un diámetro que puede alcanzar hasta 409'9  $\mu\text{m}$ .

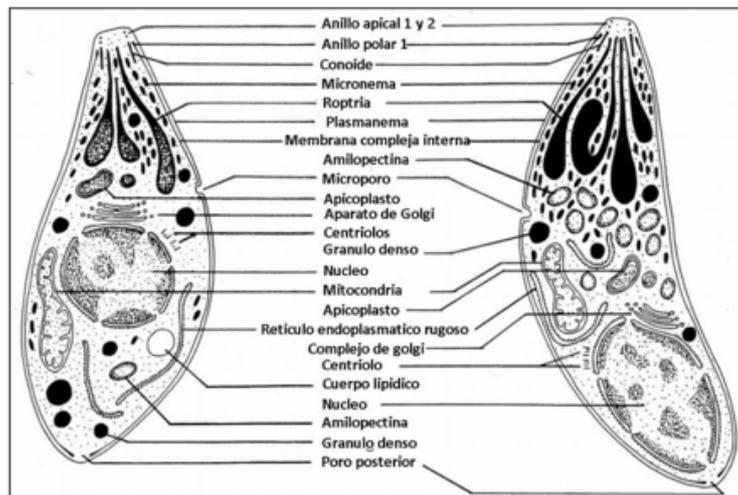
Cada quiste se forma dentro de una célula hospedadora, lo cual implica que presentan tres envueltas diferenciadas: una capa externa o pared formada por láminas de tejido conectivo, una intermedia formada por el citoplasma, núcleo y orgánulos de la célula hospedadora y una tercera capa formada por las vacuolas del parásito y que contiene los bradizoítos en su interior (Fig.4).

Los quistes se encuentran normalmente rodeados por un infiltrado inflamatorio granulomatoso no purulento que contiene mayoritariamente linfocitos T y monocitos o macrófagos activados (Dubey *et al.*, 2010; Frey *et al.*, 2013).



**Figura 4:** Quistes tisulares localizados en el tejido cutáneo de una vaca. Tinción H-E. (Esteban Gil, 2015).

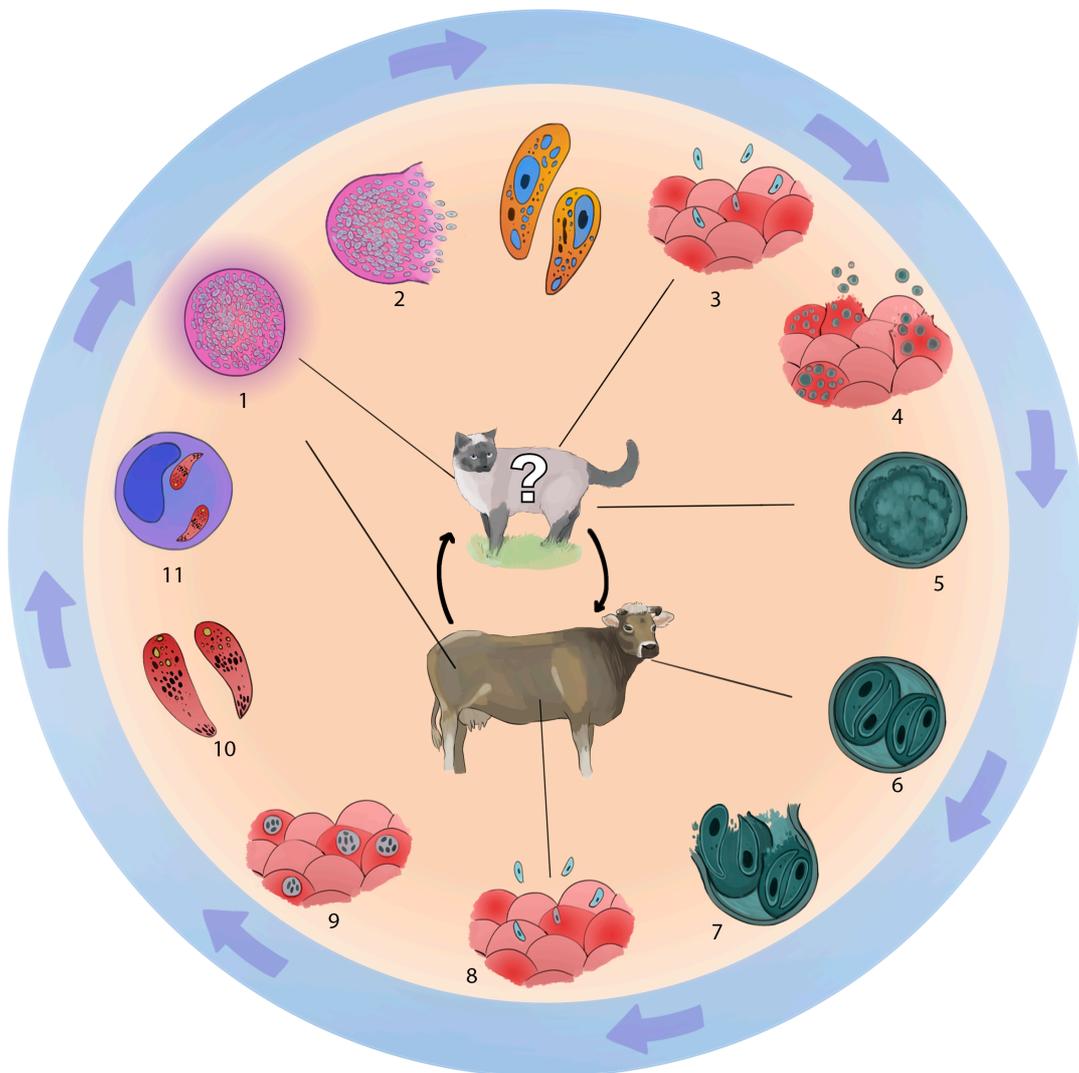
**4 – Bradizoítos:** Los bradizoítos tienen un tamaño de 6 a 7'5  $\mu\text{m}$  de largo y 1'9 a 2'3  $\mu\text{m}$  de ancho (Dubey *et al.*, 2003). El polo apical es alargado y el posterior tiene forma redondeada (Fig.5).



**Figura 5:** Bradizoíto (izquierda) y taquizoíto (derecha) de *Toxoplasma gondii*. (Dennis A. Navarro Mamani, 2014).

#### 4. Ciclo biológico:

-**Ciclo heteroxeno** (Fig.6): Por analogía con otros parásitos del género *Besnoitia*, en la besnoitiosis bovina se considera que el HD se infectaría por ingestión de quistes tisulares presentes en el HI. Cuando estos quistes tisulares (1) llegan al intestino del gato y son digeridos, se liberan los bradizoítos (2) que invaden las células endoteliales de vasos sanguíneos intestinales (3) y realizan una fase de reproducción asexual de la que resultan macro y microgametos. De la fecundación de estos gametos resultan unos ooquistes que crecen y rompen las células hospedadoras (4), siendo liberados al exterior sin esporular con las heces tras 10-15 días desde que se produce la infección (5). La eliminación de ooquistes se puede mantener de 3 a 13 días.



**Figura 6:** Ciclo heteroxeno de *B. besnoiti*

Una vez en el exterior, los ooquistes sufren una esporulación (se forman esporozoítos) (6) y se vuelven infectantes para el HI.

Los ooquistes esporulados presentes en el medio son ingeridos por el HI. En el aparato digestivo los ooquistes son digeridos y los esporozoítos liberados (7) penetran en las células endoteliales de los vasos sanguíneos (8) donde realizan una reproducción asexual y forman vacuolas parasitóforas (9). Esta primera fase de reproducción en el HI se corresponde con la fase aguda de la besnoitiosis bovina.

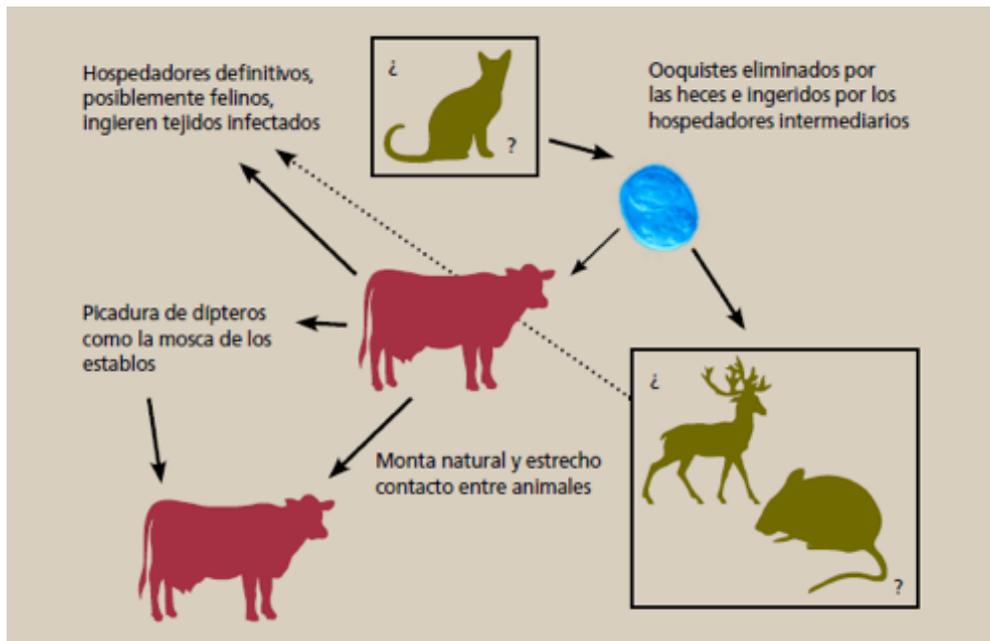
Los taquizoítos resultantes (10) invaden nuevas células endoteliales, monocitos, neutrófilos o incluso pueden circular en la sangre, distribuyéndose así por todo el organismo (11). Esta etapa de proliferación coincide con la fase de edemas de la enfermedad.

La proliferación de los taquizoítos continúa hasta que la respuesta inmunitaria del HI consigue frenarla. Entonces el parásito se enquista. Los quistes tisulares se forman principalmente en el tejido conectivo subcutáneo del HI a los 35-39 días post-infección, y su localización puede ser muy diversa. Se desarrollan principalmente en la dermis, en la conjuntiva esclerótica, en la mucosa del tracto respiratorio superior, en la mucosa del tracto genital inferior femenino y en los testículos, glándulas y conductos del aparato reproductor masculino.

**-Ciclo monoxeno (Fig.7):** En la actualidad, la única forma de transmisión comprobada de la besnoitiosis bovina es la horizontal de un HI a otro. Las vías de entrada son por inoculación mediante vectores mecánicos como tábanos y moscas hematófagas, y por contacto directo a través de pérdidas de continuidad de la piel y/o mucosas. Esta transmisión también se sospecha que podría darse en la monta, ya que ésta favorece el contacto entre animales y que se den lesiones en vulva, vagina, pene, prepucio y testículos, posibilitando así la transmisión del parásito (Castillo *et al.*, 2009; Álvarez-García *et al.*, 2014). El estadio evolutivo del parásito que penetra en el HI son bradizoítos que provienen de quistes ya formados.

También es posible que se produzca la transmisión de un animal a otro directamente por el contacto entre las mucosas que se da, por ejemplo, en el lamido (Cortes *et al.*, 2014).

La transmisión por vectores se sospechaba dada la marcada estacionalidad de la enfermedad, y fue demostrada experimentalmente en varios tipos de moscas, como, por ejemplo, diferentes especies de tábanos (*Atylotus nigromaculatus* y *Tabanocella denticornis*). Este tipo de transmisión es posible gracias a que los quistes se encuentran principalmente en la dermis y tejido conectivo subcutáneo del rostro, cavidad nasal y porción distal de las extremidades, que son el lugar predilecto de alimentación de este tipo de insectos (Bigalke, 1968).



**Figura 7:** Transmisión de *B. besnoiti* aceptado hasta la fecha, con los interrogantes que aún se plantean al respecto (Fuente: Habela M. *et al.*, 2015)

## 5 . Factores de riesgo:

**-Edad:** En áreas endémicas la enfermedad se observa sobre todo en animales mayores de 6 meses porque los terneros de menor edad presentan cierta resistencia calostrual, aunque no es imposible que se den casos en animales menores (Álvarez-García *et al.*, 2014). Hay cierta relación entre la prevalencia de la enfermedad y la edad, y se ha descrito que el porcentaje de animales seropositivos aumenta con la edad (Fernández-García *et al.*, 2010; Waap *et al.*, 2014).

**-Sexo:** Los estudios realizados hasta la fecha parecen indicar que no existe relación entre el sexo de los animales y la probabilidad de estos de infectarse. Hay estudios que sugieren que los machos podrían ser más susceptibles a ser infectados (Jacquet *et al.*, 2010), pero estos resultados podrían estar sesgados por el hecho de que los toros, al verse como los animales más valiosos del rebaño por su función reproductiva, atraen más fácilmente la atención de ganaderos y veterinarios.

**-Raza y aptitud:** La besnoitosis bovina se puede presentar tanto en rebaños de carne como de leche, y cualquier raza parece ser sensible a padecer la enfermedad (Álvarez-García *et al.*, 2014). Aun así, la mayoría de los casos documentados se dan en ganado de aptitud cárnica de sistemas extensivos debido a su modo de crianza y manejo.

**-Estacionalidad:** Varios estudios apuntan a una fuerte estacionalidad en la epidemiología de la besnoitiosis, ya que la mayoría de los casos descritos se dieron en el periodo entre primavera y otoño (Jacquiet *et al.*, 2012). Otros autores señalan la existencia de un pico de casos clínicos en los meses de verano (Legrand, 2003). Esta estacionalidad puede explicarse gracias a dos hechos: al manejo empleado habitualmente en las explotaciones durante los meses de más calor (los animales se trasladan a pastos comunes de montaña donde cohabitan ejemplares de diferentes explotaciones), y al aumento de poblaciones de artrópodos vectores durante los meses de verano.

## 6. Patogenia, cuadro clínico y lesiones:

La fase aguda del proceso suele pasar inadvertida; a lo sumo se aprecia fiebre, decaimiento, anorexia, edemas en extremidades (anasarca) y congestión en testículos. Es en la fase crónica cuando la sintomatología es más manifiesta y específica.

La mayoría de los animales resultan infectados de forma subclínica, y pueden actuar como portadores asintomáticos de la enfermedad. Las muertes en animales se producen principalmente durante la fase crónica de la enfermedad, con una tasa de mortalidad que ronda el 10%. La mayor parte de los animales infectados consiguen sobrevivir tras un largo periodo de convalecencia (Bigalke, 1968).

Una vez infectados, la enfermedad puede tener un periodo de incubación de entre 2 semanas y 2 meses. La besnoitiosis bovina presenta tres fases de intensidad creciente:

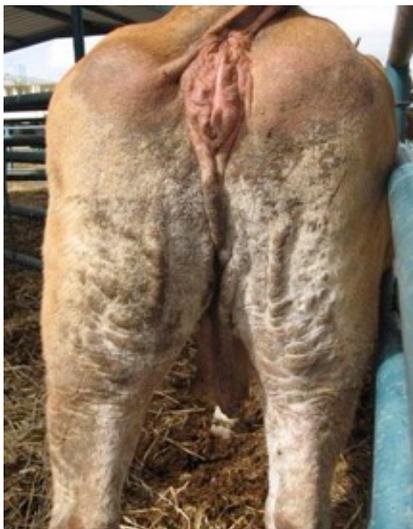
**-Fase aguda febril:** Se da al inicio de la infección, y se caracteriza por hipertermia (40-42°C) que refleja el estado de parasitemia y el estadio de multiplicación rápida de los parásitos en el organismo. En esta fase los taquizoítos invaden macrófagos, fibroblastos y células endoteliales de los vasos sanguíneos y causan vasculitis, trombosis, hiperplasia y necrosis de vénulas y arteriolas. Esta fase dura de 3 a 10 días y los animales, además de fiebre, pueden mostrar otros síntomas inespecíficos como depresión, taquicardia y descarga nasal serosa (Juste *et al.*, 1990).

En este momento, la besnoitiosis puede pasar desapercibida o confundirse con otras afecciones, pero es muy importante detectarla ahora, pues los únicos tratamientos eficaces contra *Besnoitia* sólo lo son en esta fase.

**-Fase subaguda de edemas:** El daño vascular provocado en la fase anterior da lugar a un aumento de la permeabilidad capilar que resulta en la aparición de edemas inicialmente localizados en cabeza y cuello.

Conforme la enfermedad avanza, la aparición de edemas se extiende a las extremidades y zonas más declives del cuerpo. Los ganglios linfáticos superficiales pueden aparecer inflamados, y los edemas en zonas articulares pueden provocar rigidez y dolor, llevando a los animales a desarrollar cojeras permanentes. Los toros infectados pueden presentar orquitis aguda dolorosa durante este período. Esta fase puede durar de 1 a 4 semanas (Cortes *et al.*, 2005).

**-Fase crónica de esclerodermia:** Los edemas se atenúan, la fiebre desaparece por completo y empiezan a presentarse otros signos como fotofobia, lagrimeo, engrosamiento, endurecimiento y plegamiento progresivo de la piel. En algunos casos se puede dar hiperqueratosis, o podemos encontrar desprendimientos de piel esclerosada y aparición de grietas profundas en carne viva en las zonas de pliegues que a menudo pueden infectarse por agentes oportunistas o larvas de moscas (Castillo *et al.*, 2009) (Fig.8 y 9).



**Figuras 8 y 9:** Escleroderma, hiperqueratinización, piel de elefante en periné, vulva y extremidades y en el cuello (Castillo *et al.*, 2009).

Esta fase está asociada al asentamiento del parásito en el tejido conectivo y a la formación de quistes tisulares con bradizoítos en su interior. Los animales en peores condiciones presentan mayor cantidad de quistes tisulares, y la gravedad de sus lesiones está relacionada con la carga parasitaria.

Los quistes tisulares aparecen a los 35-39 días post-infección (PI) y son fácilmente reconocibles en la conjuntiva esclerótica, región vulvar y mucosa nasal mediante inspección clínica, lo cual tiene un importante valor diagnóstico.

Además de los quistes, la forma clínica de la enfermedad puede producir también pérdida de peso, lo que habitualmente conlleva un desvieje precoz de los animales.

**-Animales asintomáticos:** En zonas en las que la besnoitiosis bovina se encuentra de forma endémica, como es el caso de la zona donde se ha realizado este estudio, la frecuencia de aparición de casos clínicos es muy limitada. La mayoría de los animales infectados son serológicamente positivos, pero sin signos clínicos de la enfermedad. En esta situación la detección clínica de animales positivos se ve muy dificultada y los infectados suponen un riesgo epidemiológico de diseminación de la enfermedad de unos rebaños a otros si los animales se encuentran, por ejemplo, en pastos comunes o se trasladan a otras explotaciones.

## **7. Inmunidad:**

En la actualidad, el tipo de respuesta inmunitaria que desarrollan los animales frente a *B. besnoiti* continúa sin conocerse por completo. Se sospecha de una respuesta mixta; celular y humoral, estando la respuesta humoral ligada a la presencia de quistes parasitarios (Esteban-Gil *et al.*, 2014).

La inmunidad humoral suele aparecer unos 15-18 días tras la infección y presenta un máximo entre el día 30 y 40 post-infección (Franc *et al.*, 1987). Sin embargo, cuando los parásitos detectan esta protección se enquistan, por lo cual este tipo de defensa se considera poco protectora.

Se ha demostrado la transferencia de anticuerpos calostrales frente a la infección de *B. besnoiti* de hembras infectadas en fase crónica a su descendencia (Shkap *et al.*, 1994).

## 2. DIAGNÓSTICO

### 1. Diagnóstico clínico-epidemiológico

Se basa en el reconocimiento de signos clínicos propios de besnoitiosis bovina apoyándose en algunos rasgos epidemiológicos de la enfermedad, como la estacionalidad o su distribución geográfica, o incluso el manejo reproductivo de la explotación.

Este tipo de diagnóstico es muy complicado en la fase aguda-febril porque los signos que presentan los animales son muy poco específicos. Cuando aparecen los edemas en la siguiente fase de la enfermedad el diagnóstico resulta más sencillo. En la fase crónica de esclerodermia, el diagnóstico de besnoitiosis bovina resulta prácticamente inequívoco. Entre los días 35 y 39 post-infección se pueden identificar quistes de *B. besnoiti* de color blanquecino sobre la esclera conjuntival y/o mucosas además de las lesiones típicas (Bigalke & Naude, 1962).

La sensibilidad diagnóstica de este método es muy limitada debido a la dificultad que presenta detectar los casos de infección crónica subclínica, que es la que se da con más frecuencia en un rebaño.

### 2. Diagnóstico diferencial (García-Lunar, 2016):

Fase aguda	Fase subaguda	Fase crónica
<ul style="list-style-type: none"><li>– Rickettsiosis y babesiosis</li><li>– Bronconeumonía infecciosa enzoótica</li><li>– Rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>– Ehrlichiosis (<i>Anaplasma phagocytophilum</i>)</li><li>– Fiebre catarral maligna</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>– Dermatitis nodular cutánea</li><li>– Sarna</li><li>– Demodicosis</li><li>– Pediculosis</li><li>– Dermatofilosis</li><li>– Paraqueratosis</li><li>– Intoxicación por leguminosas</li><li>– Síndrome de dermatitis pruriginosa en la vaca lechera</li></ul>

### 3. Diagnóstico laboratorial:

Se basa en la observación de diversas formas parasitarias en los tejidos de los animales infectados. Para ello se han descrito varias técnicas:

**-Observación directa:** consiste en la visualización de quistes de *B. besnoiti* sobre el ganado en la conjuntiva esclerótica o en la región vulvar o vaginal. Este método es muy específico, pero los quistes se desarrollan a las 5-6 semanas PI, así que ya se detecta la besnoitiosis en su fase crónica.

**-Examen microscópico:** visualización al microscopio de un frotis de sangre, un raspado cutáneo o una biopsia. Son métodos muy específicos, pero ni el examen microscópico ni el macroscópico son capaces de detectar los casos subclínicos de la enfermedad.

**-Diagnóstico molecular:** el método de PCR cuantitativa permite la detección de ADN de *B. besnoiti* en muestras de sangre en animales en fase aguda de parasitemia, y también en muestras de conjuntiva ocular, piel y mucosa vaginal en animales afectados de forma crónica. Esta prueba se basa en la ampliación de un fragmento del ARN ribosómico del parásito. Es un método altamente sensible y específico que no presenta reacciones cruzadas con otras especies de protozoos similares (Shares *et al.*, 2011). La principal desventaja de esta prueba es la dificultad que supone recoger ADN parasitario en algunas ocasiones.

**-Diagnóstico indirecto:** El diagnóstico indirecto se basa en la detección de anticuerpos frente a la infección por *B. besnoiti*. Existen varias técnicas serológicas de detección de la infección (Enzimoimmunoensayo (ELISA), Inmunofluorescencia indirecta (IFI), Western Blot (WB), pero la técnica de elección suele ser la IFI. La principal limitación de estas técnicas es la dificultad para detectar la enfermedad en su fase aguda, ya que entonces los animales no han tenido tiempo de desarrollar anticuerpos frente al parásito. Sin embargo, estas técnicas cuentan con la gran ventaja de poder detectar casos subclínicos de infección.

### 3. TRATAMIENTO:

En la actualidad no existe ningún tratamiento eficaz para evitar el desarrollo de la infección por *B. besnoiti*. En la bibliografía se encuentran varias terapias como la oxitetraciclina (Shkap *et al.*, 1987) y los anticuerpos monoclonales o los tiazólidos (Cortes *et al.*, 2014). No obstante, a pesar del número de fármacos estudiados, ninguno de ellos parece haber resultado lo suficientemente eficaz como para ser usado en el ganado bovino.

A día de hoy el tratamiento de elección para la fase febril o al inicio de la fase de edemas son sulfamidas por vía oral o intravenosa junto a la administración de suplementos vitamínicos, minerales o incluso pienso de alta calidad (Alzieu *et al.*, 2011).

Durante la fase crónica de la enfermedad, el tratamiento suele ser muy difícil y de escasa eficacia debido a la limitada accesibilidad de los principios activos al interior de los quistes parasitarios.

### 4. PROFILAXIS:

**-Vacunas:** Aunque se desarrollaron vacunas vivas atenuadas frente a *B. besnoiti* en los años 70, ninguna de ellas está actualmente disponible en Europa debido al alto riesgo de introducción del parásito en rebaños libres.

**-Sanitaria:** En zonas endémicas, la estrategia debe ir encaminada a minimizar la prevalencia de besnoitosis bovina para evitar su diseminación. Se recomienda aislar o eliminar a los animales enfermos con signos clínicos, especialmente si tienen quistes. Si la prevalencia en el rebaño es muy baja (<10%) se recomienda su eliminación, pero si es alta (>30%) se deben tomar otras medidas basadas en mejorar la bioseguridad de la explotación y prevenir la infección de nuevos animales.

También se recomienda usar otras medidas de prevención como el uso de insecticidas o trampas para insectos, restringir el acceso de reservorios salvajes de la enfermedad y controlar estrictamente las condiciones de manejo en extensivo, tanto la monta natural como el pastoreo.

Para evitar la entrada de la enfermedad en rebaños indemnes, la recomendación es realizar análisis serológicos a todos los animales de nueva entrada y controlar las medidas de bioseguridad, sobre todo en cuanto al manejo de los animales en el pastoreo y la monta.

## 4 - METODOLOGÍA

### 1. Contexto del estudio:

Este trabajo se basó en un proyecto de investigación desarrollado anteriormente en la finca “La Garcipollera” por el Departamento de Parasitología de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza.

### 2. Descripción del área:

Este estudio se ha realizado en la finca experimental “La Garcipollera”. Se trata de una finca de producción extensiva dedicada al estudio de sistemas agroganaderos de montaña propiedad del CITA (Centro de Investigación y Tecnología de Aragón). Está ubicada en Bescós de la Garcipollera (España, 42°37'N, 030°W).

En la explotación se lleva a cabo un manejo extensivo valle-puerto de producción de carne, que tiene el objetivo de aprovechar al máximo los pastos del pirineo aragonés. En verano los animales comparten los pastos de montaña con rebaños vecinos, y en invierno permanecen en praderas de fondo de valle o estabulados en la finca. En cuanto al manejo reproductivo, se usa la monta natural justo después del parto de las hembras.

Aunque no se ha observado contacto del rebaño con gatos u otros felinos salvajes, en el valle donde pastorean existe una Reserva Nacional de Caza con una de las mayores poblaciones de venado de España, uno de los principales reservorios silvestres sospechosos de transmitir besnoitiosis bovina.

Cabe destacar que, según el trabajo realizado por varios autores en la región del pirineo aragonés, la explotación se encuentra en un área tradicionalmente endémica de besnoitiosis bovina (Gutiérrez-Expósito *et al.*, 2014).

### 3. Diseño del estudio:

Con el objetivo de valorar la técnica de PCR como posible herramienta de diagnóstico de la besnoitiosis bovina – lo que podría ser de ayuda para impedir la transmisión de la enfermedad de forma generalizada en un rebaño – en este trabajo se propone comparar el diagnóstico serológico por inmunofluorescencia indirecta como prueba de referencia, con respecto al diagnóstico molecular por PCR en muestras de hisopo conjuntival.

Para ello, en abril de 2016 se tomaron muestras de sangre de vena coccígea a todos los animales adultos mayores de un año que habían sido incluidos en la época de cubriciones de otoño (122 cabezas; 12 machos y 110 hembras). Para la obtención de suero se recogieron 2 ml

en un tubo sin anticoagulante con gránulos inertes para la rápida retracción del coágulo y para una mejor obtención del mismo se centrifugó 10 minutos a 2500 rpm.

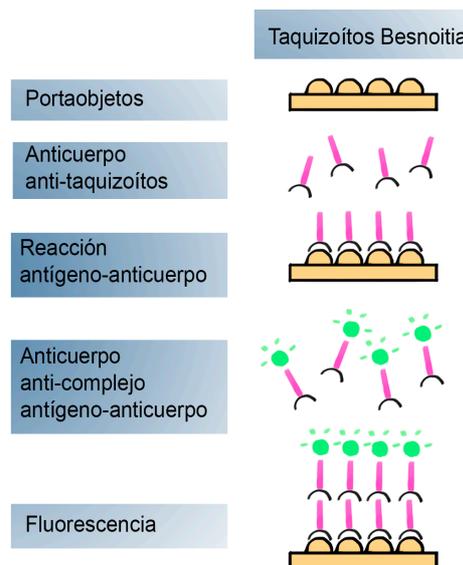
A su vez, se tomaron aleatoriamente muestras de conjuntiva ocular usando un hisopo de algodón fino estéril en 33 de los 122 animales incluidos en el estudio (27%) para posteriormente realizar un diagnóstico por la técnica de PCR.

Por otro lado, se realizó un breve examen clínico a los animales con el objetivo de buscar signos clínicos compatibles con la besnoitiosis bovina, alteraciones de la piel y presencia de quistes tisulares en la conjuntiva ocular principalmente.

#### 4. Realización de las técnicas:

**-IFI:** La inmunofluorescencia es una técnica que utiliza la capacidad de los anticuerpos para unirse de manera muy específica a moléculas diana para evidenciar la presencia de agentes o moléculas de interés en un suero problema. A la reacción se le añade un fluoróforo; una molécula fluorescente que sirve de marcador.

En la inmunofluorescencia indirecta (Fig. 10), se parte de placas o pocillos con un antígeno fijado (en este caso taquizoitos de *B. besnoiti*). A continuación, se deposita sobre esas placas el suero problema en el que, si el animal es positivo, debería haber anticuerpos anti-*Besnoitia*. Finalmente se añade un anticuerpo capaz de unirse al complejo antígeno-anticuerpo. Este último anticuerpo es el que contiene el cromóforo, y desprenderá fluorescencia sólo si se une al complejo.



**Figura 10:** Fundamentos de la IFI

**-Protocolo de la prueba:**

Para realizar esta técnica, se procedió a fijar una suspensión con  $10^7$  taquizoitos de *B. besnoiti* de la cepa BbSpain-1 cultivados en el laboratorio en un portaobjetos con pocillos usando placas de 10 pocillos. Después se lavaron y secaron las placas, y se almacenaron a  $-20^{\circ}$  hasta su utilización.

Siguiendo las indicaciones de Fernández-García y cols. (Fernández-García *et al.*, 2010), se realizaron diluciones seriadas al duplo de los sueros problema empezando por una dilución 1:50.

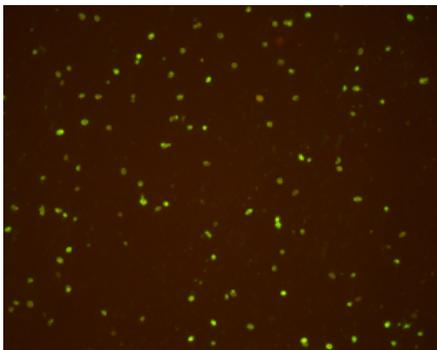
Se depositaron 10 µl de dilución de los sueros en cada pocillo junto con un pocillo control positivo y uno negativo por placa, para aumentar así la fiabilidad de la técnica. Las placas fueron incubadas a 37º durante 30 minutos en cámara húmeda y posteriormente fueron lavadas con PBS (tampón fosfato salino).

Sobre los pocillos todavía húmedos se depositó una dilución 1/150 del anticuerpo conjugado anti-IgG bovino marcado con un FITC (agente fluorescente), y las placas fueron incubadas de nuevo en cámara húmeda a 37º durante 30 minutos. Una vez incubadas se lavaron de nuevo con PBS y agua destilada, y se dejaron secar a temperatura ambiente y en oscuridad.

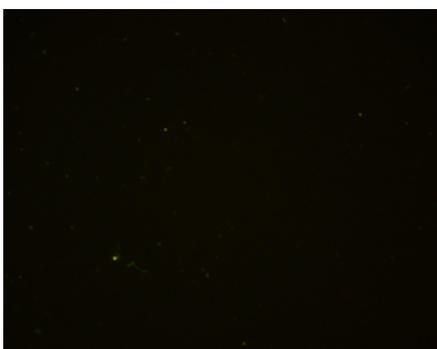
Por último, las placas se montaron con Fluokeep® y se depositó encima un cubreobjetos.

Las placas fueron observadas al microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 80i) con un objetivo de 40 aumentos. Un pocillo se consideró positivo en caso de observar un halo de fluorescencia verde completo y definido alrededor de la membrana de al menos el 80% de los taquizoítos en cada campo de observación (Fig.11).

En caso de observar taquizoítos rojos o con fluorescencia periférica incompleta, el pocillo fue considerado negativo (Fig.12).



**Figura 11:** Esta imagen se trata de un control positivo en el que se puede observar fluorescencia alrededor de los taquizoítos que había fijados en la placa.



**Figura 12:** Aspecto de un pocillo negativo en el que no hay fluorescencia asociada a la presencia de parásitos. Se observa algo de fluorescencia residual.

En cuanto al punto de corte, fue acordado que una titulación de 1/100 o superior sería considerada como seropositiva ya que, en estudios realizados con anterioridad se detectó que éste era el título de mayor sensibilidad. (Fernández-García *et al.*, 2010).

**-PCR:** La PCR es una técnica de diagnóstico molecular basada en la amplificación de un fragmento de ADN. Se trata de una técnica rápida, cuantitativa e inequívoca que nos permite confirmar la presencia de un agente.

En el caso de *B. besnoiti*, se usó una técnica puesta a punto en el laboratorio de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza que se basa en la detección de un fragmento de ARN ribosómico parasitario, y se fundamenta en la técnica descrita por Schares en 2011 aunque con algunas modificaciones (Schaes *et al.*, 2011).

-Protocolo de la prueba:

1) Extracción de ADN: En primer lugar, se procedió a extraer el material genético de las muestras de hisopado de conjuntiva ocular. La extracción se realizó mediante el kit comercial de MO BIO UltraClean® BloodSpin® DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Ref. 12200-250), siguiendo el protocolo establecido. Como el kit está diseñado para extraer ADN de muestras líquidas, se humedecieron primero los hisopos dentro de los tubos Eppendorf® del kit con agua libre de nucleasas, cuya función era arrastrar la muestra del hisopo para dejarla suspendida en el líquido y poder así extraer de ella el material genético. A continuación, se aplicaron una serie de soluciones y tiempos de incubación descritos en el protocolo. Con este kit se consiguen 200µl de una suspensión con ADN problema.

En cada serie de muestras se incluyó un control negativo que contenía todos los reactivos excepto la muestra de ADN para poder detectar posibles contaminaciones durante el proceso.

2) Optimización de la técnica: Para poder realizar esta técnica, es necesario seleccionar cebadores o primers y una sonda. Ambos se diseñaron con el programa ProbeFinder usando recursos de la biblioteca de sondas de la Universal ProbeLibrary de Roche Applied Science. Las secuencias de cebadores elegidas fueron Bb F (5'-ATTAACCAATCCGTGATAGC-3') y Bb R (5'-CCAACGATCTGTTGTTTAGC-3'). La sonda utilizada en el estudio fue la número 10 de Roche (10µM).

En base a las condiciones óptimas de amplificación descritas por otros autores, se decidió llevar a cabo la reacción en un volumen total de 25 µL usando 12,5 µl de GoTaq® ProbeqPCR Master Mix 2X, 100 nM de sonda, 10 µM de cada cebador, 5 µl de muestra de ADN y agua ultrapura hasta completar el volumen final. La reacción se llevó a cabo sobre placas de PCR de 48 pocillos. La amplificación de las muestras se realizó por duplicado; una a la concentración original, y la otra realizando una dilución 1/10 de la primera. Los resultados obtenidos fueron analizados usando el programa Bio-Rad CFX Manager.

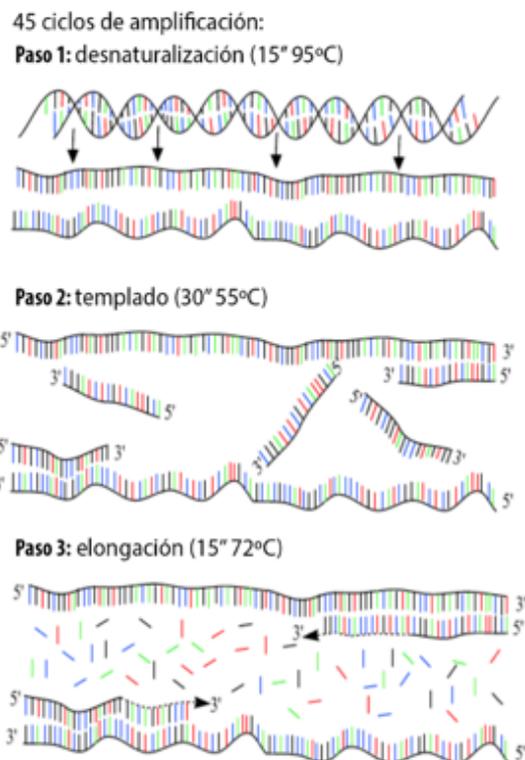
En cada placa de reacción se incluyó un control positivo de la reacción elaborado a partir de taquizoítos cultivados para comprobar que la técnica funcionaba correctamente. También se hizo un control negativo para comprobar que la muestra no había sido contaminada. Además, para confirmar o descartar la presencia de inhibiciones en el desarrollo de la técnica que pudieran dar lugar a resultados falsos negativos, se hizo un control interno de amplificación simultáneamente basado en la detección de la secuencia del gen que codifica para la proteína  $\beta$ -actina, que es uno de los genes bovinos de referencia más indicados para su uso como control en técnicas de PCR cuantitativa (Robinson *et al.*, 2007).

3) Realización de la PCR (Fig.13): La PCR consiste en una reacción en cadena de la polimerasa. En un microtubo para PCR debemos tener el ADN a amplificar (en nuestro caso el ADN extraído en el paso anterior), iniciadores o primers, dNTPs, Taq-Polimerasa y un tampón con magnesio. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador MiniOpticon System de Bio-Rad siguiendo la siguientes instrucciones:

Primero se desnaturizó la cadena de ADN poniéndola a una temperatura alta (95°C) durante 5 minutos, para posteriormente someterla a una sucesión de ciclos de amplificación.

Una vez completada la desnaturalización, se incubó la muestra a 95°C durante 15 segundos. A

**PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa**

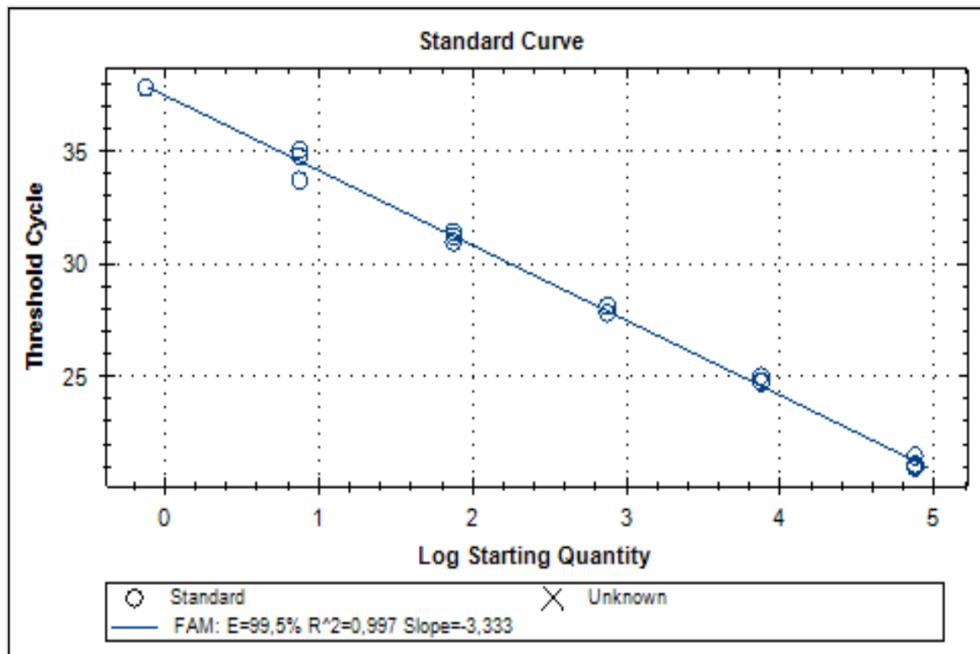


continuación se bajó la temperatura durante 30 segundos hasta los 55°C, que es la temperatura ideal para la unión de los primers a la cadena original. Finalmente se elevó la temperatura hasta alcanzar unos 72°C durante 15 segundos y luego a 77°C los últimos 5 segundos. A estas temperaturas se produce la elongación de la cadena de ADN.

Estos tres pasos componen un ciclo de la PCR. En total se realizaron 45 ciclos de replicación, de manera que, al final del procesado, obtenemos muchas copias de la cadena de DNA que nos interesa.

**Figura 13:** Fundamentos de PCR

La sensibilidad que presentó la técnica de PCR cuantitativa desarrollada en este estudio se determinó mediante la elaboración de una curva estándar a partir de diluciones logarítmicas de una muestra de ADN de taquizoítos de cultivo de concentración conocida mediante una cámara de Neubauer. Se realizaron seis diluciones seriadas de ADN equivalentes a 75000, 7500, 750, 75, 7'5 y 0'75 taquizoítos en tampón PBS, con tres réplicas de cada punto. El límite de detección de la técnica, equivalente a la cantidad mínima de ADN parasitario que esta es capaz de detectar, fue de 0'75 parásitos (Fig.14).



**Figura 14** : Curva estándar de amplificación de ADN correspondiente a  $7.5 \times 10^{-1}$ - $7.5 \times 10^4$  taquizoítos de *B. besnoiti*.

## 5 – RESULTADOS

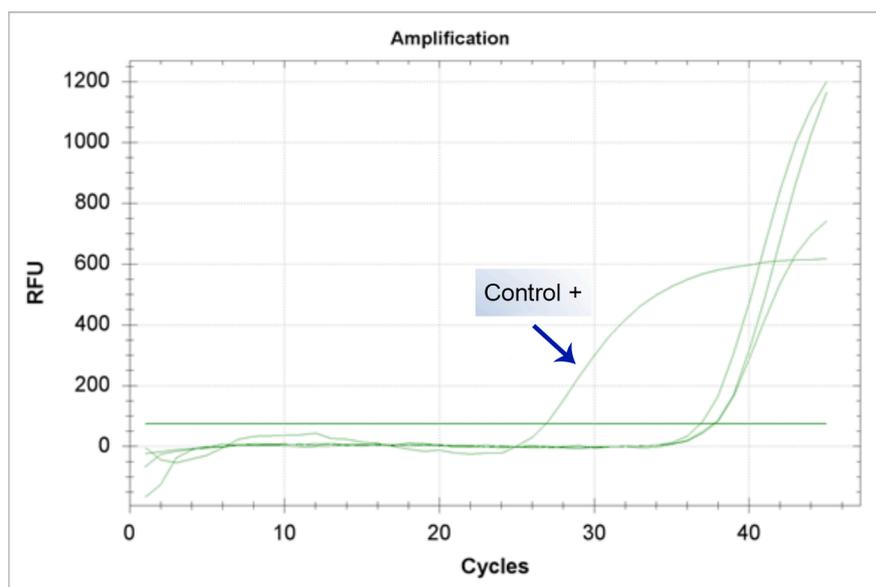
**Examen clínico:** En ninguno de los animales del estudio se observaron signos clínicos, así que se asume que en todos los casos positivos la infección se presentaba de forma subclínica.

**IFI:** De los 122 animales a estudio, 44 presentaron anticuerpos frente a la infección por *B. besnoiti*, lo que supone una prevalencia de rebaño del 36,07%. Además, en la mayoría de los casos la titulación observada fue 1/200.

**PCR:** En relación al diagnóstico molecular de la besnoitosis bovina, de los 33 animales muestreados, sólo en 3 casos se produjo amplificación en la prueba de PCR (Tab.1) (Fig.15).

Animal	Ct
2356	37'70
4295	37'82
6556	36'82

**Tabla 1:** Resultados positivos de amplificación de ADN parasitario por PCR.



**Figura 15 :** Gráfica de amplificación de las muestras de hisopado conjuntival por PCR.

Con respecto a la amplificación del gen de la  $\beta$ -actina, se detectó ADN en las 33 muestras de hisopo, con un valor de Ct medio de  $26,01 \pm 1,88$  (dentro de la normalidad), lo que sugiere que la toma de muestras fue homogénea y la amplificación del ADN fue correcta.

El punto de corte para considerar a un animal positivo a *B. besnoiti* se determinó mediante el uso de una curva standard realizada en el laboratorio de parasitología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza. Se cuentan como verdaderamente positivos los animales en los que se produzca amplificación por debajo de 37'51 ciclos de replicación. Eso significa que, en este caso, el único animal que consideraríamos verdaderamente positivo es el 6556.

Por lo tanto, según los resultados se observa que hubo un porcentaje del 3% de animales positivos en hisopo de conjuntiva en el rebaño, dato muy inferior al del rebaño completo diagnosticado por la prueba serológica de IFI (Tab.2):

Resultado	Prueba diagnóstica	
	Serología (IFI)	Molecular (PCR)
Animales positivos/Total	44/122	1/33
Prevalencia	36,07%	3,03%

**Tabla 2:** Comparación de resultados laboratoriales de las técnicas diagnósticas IFI y PCR.

-Carga parasitaria: La PCR nos da la posibilidad de determinar con exactitud la carga parasitaria encontrada en cada muestra. Para ello es necesario tomar como dato base el punto en el que la máquina amplificó ADN parasitario en las muestras.

Conociendo estos datos y el volumen de líquido en el que se hizo la extracción de ADN del hisopo, se puede realizar una estimación de la cantidad de ADN parasitario que se encontraba en la muestra original mediante una ecuación de la curva estándar:

$$y = ax + b$$

- x= cantidad equivalente de parásitos
- a= pendiente = -3'34 (determinada por la curva standard)
- b=punto de intersección entre eje y la recta
- y=Ct muestra problema=36'82

$$X = 1'47 \text{ parásitos en } 5\mu\text{l}$$

$$1'47 \times 40(*) = 58'8$$

En esta muestra se ha encontrado una cantidad de ADN compatible con la presencia de 58'8 parásitos.

\*(porque el volumen en el que introdujimos el hisopo eran 200  $\mu\text{L}$ , y  $5 \times 40 = 200$ )

## 6 - DISCUSIÓN

La prevalencia de besnoitiosis bovina obtenida mediante serología observada en esta explotación se asemeja a la descrita por otros autores en áreas endémicas próximas, que ronda el 50% de animales positivos (Gutiérrez-Expósito *et al.*, 2014).

En un estudio realizado en septiembre de 2015 (datos propios), la prevalencia observada para este mismo rebaño fue del 14'48%, considerablemente más baja que la actual. Este ascenso se puede asociar al aumento del riesgo de transmisión de la enfermedad que se da durante la época de cubrición de otoño, en la cual los animales conviven en estrecho contacto en la explotación durante varios meses.

La IFI parece una prueba muy adecuada para la detección de animales infectados de manera subclínica en fases más avanzadas de la enfermedad, pero no en fases agudas, ya que depende de que se encuentren anticuerpos frente a *B. besnoiti* en la sangre de los animales y en fases tempranas aún no se ha desarrollado la respuesta inmune humoral. Por lo tanto, en aquellas zonas en las que la enfermedad se encuentra de forma endémica y en las que la detección de la enfermedad no va encaminada hacia la aplicación de tratamientos individuales tempranos sino hacia el control de la prevalencia del rebaño, una técnica con las características de la IFI podría ser la más apropiada.

En el rebaño estudiado y a fecha del muestreo no se encontraron animales con signos clínicos que pudieran apuntar a la presencia de enfermedad, que es lo que generalmente se espera en una zona en la que la besnoitiosis se encuentra de manera endémica.

En cuanto al diagnóstico molecular, la prevalencia observada mediante la prueba de PCR es considerablemente menor que la observada por serología. Teniendo en cuenta que la enfermedad se encuentra de forma endémica en esta explotación y que todos los animales infectados lo están de forma subclínica, se puede asumir que la disonancia entre resultados por ambas pruebas podría deberse a que la PCR en muestras de hisopado conjuntival tiene muchas dificultades para detectar al parásito una vez se ha enquistado.

De todos los animales muestreados, solo uno dio positivo por PCR. Este animal había dado negativo por serología. El hecho de que resulte positivo en PCR (aunque la cantidad de parásitos encontrada sea muy pequeña), puede deberse a que el animal sea inmunotolerante. Por otro lado, hay que considerar que a veces los animales dan positivo en pruebas en piel o conjuntiva y negativo en serología debido a la capacidad de los parásitos para formar quistes que pueden permanecer en el animal y pasar desapercibidos durante toda su vida.

La PCR es una técnica que parece ser capaz de detectar de forma temprana al parásito en fases iniciales de la infección en muestras de sangre, y también de evidenciar al parásito en fases posteriores en muestras de biopsias de piel, lo cual resulta adecuado para la confirmación diagnóstica de la infección. Con respecto a la biopsia de piel, la toma de estas muestras resulta invasiva y en ocasiones puede conducir a la aparición de infecciones secundarias en los animales.

Teniendo eso en cuenta y sabiendo que la conjuntiva ocular es también un órgano diana para la aparición de quistes parasitarios de *B. besnoiti*, con este estudio se pretendía comprobar si era posible obtener resultados fiables en la detección del parásito, y por tanto de la infección, en un rebaño mediante una toma de muestras más inocua para los animales como es el hisopado conjuntival.

La comparación de los resultados de la IFI, que es la técnica que se considera de elección en un caso como el estudiado, con los obtenidos mediante hisopado conjuntival por PCR parecen apuntar a que esta última no es capaz de detectar a los animales positivos con tanta sensibilidad diagnóstica en estas condiciones.

Estos resultados de PCR podrían deberse a que, aunque el hisopo es capaz de recoger material genético del animal (como queda comprobado con la amplificación por PCR de ADN del gen de la  $\beta$ -actina), podría tener dificultades rompiendo los quistes parasitarios, que en ocasiones se encuentran a mayor profundidad o pueden tener una cubierta más resistente.

Por ello, sería de gran interés para futuros estudios plantear la evaluación de las muestras de hisopo sobre animales que han sido confirmados previamente como positivos y que presentan quistes observables a simple vista, para así poder saber con certeza que el material parasitario está presente. Por otro lado, en cuanto al método de recogida de la muestra conjuntival, otra opción a evaluar en un futuro sería el empleo de algún otro método más erosivo como puede ser el uso de escobillas de citología.

No se debe olvidar que la motivación de usar esta técnica en primer lugar era ahorrar malestar a los animales, y que, por lo tanto, la técnica de recogida de la muestra no debería suponer ni mayores lesiones ni mayor dificultad de aplicación que las técnicas usadas en la actualidad.

Si se observara una mejora significativa en los resultados obtenidos con este nuevo método en comparación con los obtenidos con los hisopos estériles y se considerara que los nuevos resultados justifican el uso de una recogida de muestras más lesiva, se podría volver a intentar hacer un estudio de los animales subclínicos del rebaño y compararlo con los resultados por IFI.

## 7 - CONCLUSIONES

- La prevalencia de anticuerpos frente a *B. besnoiti* detectada en la explotación parece confirmar el estado endémico de la infección en el rebaño.
- La técnica serológica IFI presenta mayor sensibilidad diagnóstica para la besnoitiosis bovina en comparación con el diagnóstico por PCR a partir de muestras de hisopado de la conjuntiva ocular.
- La IFI se presenta como una prueba de elección para detectar animales en fase crónica subclínica de la enfermedad, que es lo más habitual en zonas en las que la enfermedad se presenta de manera endémica.
- Los resultados obtenidos en este trabajo parecen indicar que la PCR de hisopados de la conjuntiva ocular no es un método adecuado para la detección de *Besnoitia besnoiti* en fases crónicas de la enfermedad.

### 7.1 – CONCLUSIONS

- The prevalence of anti-bodies against *B. besnoiti* detected on the farm seems to confirm the endemic status of the infection in the herd.
- The serologic technique of indirect immunofluorescence (IFAT) shows a better diagnostic sensitivity for bovine besnoitiosis when compared to the results of a RT-PCR test of conjunctival swabs.
- IFAT is the test of choice to detect animals in the chronic and subclinical phases of the disease, which are the most common modalities in areas in which the disease is considered endemic.
- The results obtained in this study seem to indicate that RT-PCR of conjunctival swabs is not a suitable way to detect *Besnoitia besnoiti* in chronic phases of the disease.

## 8 – VALORACIÓN PERSONAL

Este trabajo de fin de grado abarca por una parte una revisión bibliográfica y por otra un trabajo práctico de realización de pruebas en laboratorio, lo cual hace que su realización haya sido especialmente interesante para mí tanto personal como profesionalmente.

Es la primera vez desde que empecé la carrera que me he tenido que enfrentar a un trabajo de esta naturaleza y de esta magnitud. Me ha exigido realizar una extensa búsqueda y selección de material bibliográfico, así como gestionarlo y sintetizarlo para finalmente plasmar los detalles esenciales del tema que he tratado. Asimismo, al tratarse de un trabajo con una extensa parte de aplicación práctica, también he tenido que aprender a recoger, ordenar y gestionar material obtenido en un muestreo real realizado en una explotación, y he tenido que aplicar técnicas laboratoriales que había estudiado en cursos anteriores para obtener mis resultados.

Además de la aplicación de conocimientos obtenidos durante la carrera, he podido experimentar lo que es el trabajo de investigación en un campo que realmente me gusta y al que me gustaría dedicarme en un futuro como es la parasitología. Así que me llevo conmigo la experiencia académica, pero también una gran experiencia personal que creo que me va a servir en un futuro a la hora de orientar mis decisiones y la manera de afrontar una investigación.

Pese a que el esfuerzo realizado no haya dado frutos en el sentido de haber obtenido resultados reveladores en el diagnóstico de la besnoitiosis bovina, estoy muy satisfecha con el trabajo en sí y con lo que he aprendido realizándolo.

Las partes que más dificultades me ha supuesto han sido, una vez escogida la información y obtenidos los resultados, el hecho de tener que plasmar las conclusiones de un trabajo que ha supuesto tanto tiempo y esfuerzo en unas pocas palabras, y tener que ceñirme al máximo de páginas establecido por los protocolos de realización del trabajo.

Por último, me gustaría darles las gracias a Juan Antonio y Nabil, mis tutores, que me dieron la oportunidad de realizar este trabajo, y a Adriana, Paz, y Héctor, que me han prestado ayuda siempre que la he necesitado tanto en el laboratorio como fuera y nunca han puesto reparos a prestarme su tiempo de forma tan generosa.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abuelo A, Castillo C, Benedito JL, Pereira V, Hernández J** (2011). La Besnoitiosis Bovina (I), Ciclo biológico y epidemiología. *Mundo Ganadero Noviembre/Diciembre '11*, p.37. [http://www.mapama.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf\\_MG/MG\\_2011\\_2\\_43\\_32\\_37.pdf](http://www.mapama.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf_MG/MG_2011_2_43_32_37.pdf) (Consultado 8/4/2016).
- Álvarez-García G, Fernández-García A, Gutiérrez-Expósito D, Ruíz- Santa Quiteria JA, Aguado-Martínez A & Ortega-Mora LM** (2014). Seroprevalence of *Besnoitia besnoiti* infection and associated risk factors in cattle from an endemic region in Europe. *The Veterinary Journal*, **200**:328-331.
- Alzieu JP, Jacquet P, Liénard E, Grisez C, Prevot F, Malavieille R, Desclaux X, Hussbaum S, Bergeaud JP, Franc M, Shelcher F, Corboz N, Bastien F, Guerrier-Châtelet MC, Gaver L, Schneider V & Boulon C** (2011). Réémergence de la besnoitiose bovine: démarche diagnostique et possibilités de contrôle. *Bulletin des GTV*, **58**:71-86.
- Ashmawy KI & Abu-Akkada SS** (2014). Evidence for bovine besnoitiosis in Egypt-first serosurvey of *Besnoitia besnoiti* in cattle and water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Egypt. *Tropical Animal Health Production*, **46**:519- 522.
- Besnoit C & Robin V** (1912). Sarcosporidiose cutanée chez une vache. *Recueil Vétérinaire*, **37**:649-663.
- Bigalke RD** (1968). New concepts on the epidemiological features of bovine besnoitiosis as determined by laboratory and field investigations. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **35**:3-137.
- Bigalke RD** (1981). Besnoitiosis and globidiosis. *Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science*, **6**:429-442.
- Bigalke RD & Naude TW** (1962). The diagnostic value of cysts in the scleral conjunctiva in bovine besnoitiosis. *Journal of the South African Veterinary Medical Association*, **33**:21-27.
- Cadéac C** (1884). Identité de l'éléphantiasis et de l'anasacque du boeuf. Description de cette maladie. *Recueil Vétérinaire*, **521**:521-540.

- Castillo JA, Marcén JM, Ortega Mora LM & Álvarez García G** (2009). La besnoitiosis bovina, presentada como una enfermedad emergente europea. *Albéitar*, **127**:24-25.
- Cortes H, Leitao A, Vidal R, Vila-Vicosa MJ, Ferreira ML, Caeiro V & Hjerpe CA** (2005). Besnoitiosis in bulls in Portugal. *The Veterinary Record*, **157**:262-264.
- Cortes HC, Leitao A, Gottstein B & Hemphill A** (2014). A review on bovine besnoitiosis: a disease with economic impact in herd health management, caused by *Besnoiti besnoiti* (Franco and Borges, 1916). *Parasitology*, **141**:1406-1417.
- Dubey JP & Yabsley MJ** (2010). *Besnoitia neotomofelis* n. sp. (Protozoa: Apicomplexa) from the Southern Plains wood rat (*Neotoma micropus*). *Parasitology*, **21**:1-17.
- Dubey JP, Lindsay DS, Rosenthal BM, Sreekumar C, Hill DE, Shen SK, Kwok OCH, Rickard LG, Black SS & Rashmir-Raven A** (2002). Establishment of *Besnoitia darlingi* from opossums (*Didelphis virginiana*) in experimental intermediate and definitive hosts, propagation in cell culture and description of ultrastructural and genetic characteristics. *International Journal for Parasitology*, **32**:1053-1064.
- EFSA European Food Safety Authority** (2010). Bovine besnoitiosis: an emerging disease in Europe. Scientific statement on Bovine Besnoitiosis, Question No EFSA-Q-2009-00879, EFSA Journal 8, 1499. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1499.htm>. Adopted 28 January 2010. (Consultado 12/5/2016).
- Esteban-Gil A, Grisez C, Prevot F, Florentin S, Decaudin A, Picard- Hagen N, Berthelot X, Ronsin P, Alzieu JP, Marois M, Corboz N, Peglion M, Vilardell C, Liénard E, Bouhsira E, Castillo JA, Franc M & Jacquet P** (2014). No detection of *Besnoitia besnoiti* DNA in the semen of chronically infected bulls. *Parasitology Research*, **113**:355- 362.
- Fernandez-García A, Alvarez-Garcia G, Risco-Castillo V, Aguado- Martinez A, Marcen JM, Rojo-Montejo S, Castillo JA & Ortega- Mora LM** (2010). Development and use of an indirect ELISA in an outbreak of bovine besnoitiosis in Spain. *Veterinary Record*, **166**:818- 822.
- Franc M, Gourreau JM & Ferrie J** (1987). La besnoitiose bovine. *Le Point Vétérinaire*, **19**:445-454.

- Franco EE & Borges I** (1916). Sur la sarcosporidiose Bovine. Archivos do Instituto Bacteriologico Câmara Pestana, **4**:269-289.
- Frey CF, Gutiérrez-Expósito D, Ortega-Mora LM, Benavides J, Marcén JM, Castillo JA, Casasús I, Sanz A, García-Lunar P, Esteban-Gil A & Alvarez-García G** (2013). Chronic bovine besnoitiosis: intra-organ parasite distribution, parasite loads and parasite-associated lesions in subclinical cases. *Veterinary Parasitology*, **197**:95-103.
- García Lunar P** (2016). Estrategias para la mejora del diagnóstico serológico de la besnoitiosis bovina, *tesis doctoral para acceder al título de Doctor en Veterinaria*, p. 46.
- Göbel E, Widauer R, Reimann M & Munz E** (1985). Ultrastructure of the asexual multiplication of *Besnoitia besnoiti* (Marotel, 1912) in Vero-and CRFK-cell cultures. *Zentralblatt Fur Veterinarmedizin. Reihe B. Journal of Veterinary Medicine. Series B*, **32**:202-212.
- Gutiérrez-Expósito D, Esteban-Gil A, Ortega-Mora LM, García-Lunar P, Castillo JA, Marcén JM & Álvarez-García G** (2014). Prevalence of *Besnoitia besnoiti* infection in beef cattle from the Spanish Pyrenees. *The Veterinary Journal*, **200**:468-470.
- Habela M. A, Redondo E, Nieto J.M, Durán-Flores E, Casablanca J.L, Tovar A & Calero R** (2014). La besnoitiosis bovina en imágenes. *Albéitar portal veterinaria*.  
<http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/13771/articulos-rumiantes-archivo/la-besnoitiosis-bovina-en-imagenes.html> (Consultado 8/4/2016).
- Jacquiet P, Alzieu JP, Liénard E, Prévot F, Grisez C, Boulon C & Franc M** (2012). Is it possible to stop the spread of bovine besnoitiosis in areas of emergence? En: Proceedings of the 1st International Meeting on Apicomplexan Parasites in Farm Animals (ApiCOWplexa: Lisbon, Portugal), p. 8.
- Juste RA, Cuervo LA, Marco JC & Oregui LM** (1990). La besnoitiosis bovina: ¿desconocida en España?. *Medicina Veterinaria*, **7**:613-618.
- Legrand P** (2003). La besnoitiose bovine en Ariège. Thèse Vétérinaire Médecine, Toulouse.
- Navarro Manami DA** (2014) Factores de riesgo asociados a la seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* en mamíferos de orden carnívora y primate mantenidos en cautiverio. *Tesis doctoral para optar el Título de Doctor en Veterinaria*. P. 9.

- Martínez Fernández, A.R** (2002), Agua y transmisión parasitaria.  
<http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/480/499> (Consultado 15/5/2016).
- Peteshev VM, Galuzo IG & Polomoshov AP** (1974). Cats as definitive hosts of *Besnoitia*.  
*Izvestiya Akademii Nauk Kazakskoi SSR B* (1):33- 38.
- Robinson TL, Sutherland IA & Sutherland J** (2007). Validation of candidate bovine reference genes for use with real-time PCR. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **115**:160-165.
- Schares G, Maksimov A, Basso W, More G, Dubey JP, Rosenthal B, Majzoub M, Rostaher A, Selmair J, Langenmayer MC, Scharr JC, Conraths FJ & Gollnick, NS** (2011). Quantitative real time polymerase chain reaction assays for the sensitive detection of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle. *Veterinary Parasitology*, **178**:208- 216.
- Shkap V, Pipano E & Ungar-Waron H** (1987). *Besnoitia besnoiti*: chemotherapeutic trials in vivo and in vitro. *Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, **40**:259-264.
- Shkap V, Pipano E, Marcus S & Krigel Y** (1994). Bovine besnoitiosis: transfer of colostral antibodies with observations possibly relating to natural transmission of the infection. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **61**:273-275.
- Uzêda SRMR, Andrade LG, Corbellini AM, Antonello FS & Vogel LFP Gondim** (2014). Frequency of antibodies against *Besnoitia besnoiti* in Brazilian cattle. *Veterinary Parasitology*, **199**:242-246.
- Waap H, Nunes T, Cortes H, Leitao A & Vaz Y** (2014). Prevalence and geographic distribution of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle herds in Portugal. *Parasitology Research*, **113**:3703-3711.