

Primer borrador del genoma de cepas virulenta y atenuada de *Babesia bovis* de origen mexicano

First draft of the genome of virulent and attenuated strains of *Babesia bovis* from mexico

DOI: 10.34188/bjaerv6n1-008

Recebimento dos originais: 20/12/2022

Aceitação para publicação: 02/01/2023

Bernardo Sachman Ruiz

Doctorado en Ciencias por la Universidad Nacional Autónoma de México / Centro de Ciencias Genómicas

Institución: Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Dirección: Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla No.8534, Jiutepec, Morelos, México. CP 62550
Correo electrónico: sachman.bernardo@inifap.gob.mx

Luis Lozano Aguirre

Doctorado en Ciencias por la Universidad Nacional Autónoma de México / Centro de Ciencias Genómicas

Institución: Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México

Dirección: Circuito Universidad Sn, Cuernavaca, Morelos, México. CP 62209

Correo electrónico: llozano@ccg.unam.mx

José Juan Lira Amaya

Maestría en Ciencias por la Universidad Nacional Autónoma de México / Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Institución: Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Dirección: Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla No.8534, Jiutepec, Morelos, México. CP 62550
Correo electrónico: lira.juan@inifap.gob.mx

Grecia Martínez García

Ingeniero en Biotecnología por la Universidad Politécnica del Estado de Morelos / Facultad de Ingeniería en Biotecnología

Institución: Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Dirección: Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla No.8534, Jiutepec, Morelos, México. CP 62550.
Correo electrónico: martinez.grecia@inifap.gob.mx

Jesús Antonio Álvarez Martínez

PhD, Pathobiology, University of Missouri-Columbia / Graduate School / College of Veterinary Medicine

Institución: Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Dirección: Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla No.8534, Jiutepec, Morelos, México. CP 62550
Correo electrónico: alvarez.jesus@inifap.gob.mx

Carmen Rojas Martínez

Doctorado en Ciencias y Manejo de Recursos Naturales Tropicales por la Universidad Autónoma de Yucatán / Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Institución: Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
Dirección: Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla No.8534, Jiutepec, Morelos, México. CP 62550
Correo electrónico: rojas.carmen@inifap.gob.mx

Rebeca Montserrat Santamaría Espinosa

Maestría en Ciencias por la Universidad Autónoma del Estado de Morelos / Facultad de Ciencias Agropecuarias
Institución: Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
Dirección: Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla No.8534, Jiutepec, Morelos, México. CP 62550
Correo electrónico: santamaria.rebeca@inifap.gob.mx

Julio Vicente Figueroa Millán

PhD, Microbiology Area Program, University of Missouri-Columbia / Graduate School / College of Veterinary Medicine
Institución: Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
Dirección: Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla No.8534, Jiutepec, Morelos, México. CP 62550
Correo electrónico: figueroa.julio@inifap.gob.mx

RESUMEN

Babesia bovis, un parásito protozoario intraeritrocítico transmitido por garrapatas, es uno de los agentes etiológicos de la babesiosis bovina, una enfermedad altamente prevalente en las regiones tropicales y subtropicales que causa una morbilidad y mortalidad significativas en el Ganado. Para poder eventualmente comparar los genomas de una cepa virulenta y una atenuada de *B. bovis*, el objetivo de este estudio fue secuenciar y ensamblar un borrador del genoma para cada cepa del parásito. Eritrocitos de bovino infectados con las dos poblaciones de *B. bovis* fueron sujetos a una extracción de ADN genómico con fenol y cloroformo orgánico. Se utilizaron 20-30 µg de ADN genómico de cada población de parásitos para la preparación de bibliotecas de ADN, con réplicas técnicas para cada cepa, utilizando el Kit Nextera Xt. La secuenciación de las bibliotecas se llevó a cabo con el procedimiento tipo escopeta en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Se obtuvieron 5,239,525 pares de lecturas de extremo pareado de buena calidad para la cepa atenuada de *B. bovis*, y 8,237,626 pares de lecturas pareadas para la cepa virulenta. Los genomas se ensamblaron utilizando el programa Spades v3.13.1. obteniéndose un total de 625 contigs con una cobertura de 480x para la cepa atenuada y un total de 2,274 contigs con una cobertura de 130x para la cepa virulenta. La secuenciación y el ensamblado del genoma demostró que la cepa atenuada de *B. bovis* contiene 7,962,396 pb, mientras que la cepa virulenta 8,760,816 pb, lo que representa una diferencia de 9.11% en el recuento total de pares de bases. Resta realizar la anotación de los genomas para identificar las diferencias que posiblemente estén asociadas a la virulencia o patogenicidad de *B. bovis*.

Palabras clave: *Babesia bovis*, cepa virulenta, cepa atenuada.

ABSTRACT

Babesia bovis, a tick-borne intraerythrocytic protozoan parasite, is one of the etiologic agents of bovine babesiosis, a highly prevalent disease in tropical and subtropical regions that causes significant morbidity and mortality in cattle. To eventually compare the genomes of a virulent and

an attenuated strain of *B. bovis*, the aim of this study was to sequence and assemble a draft genome for each strain of the parasite. Bovine erythrocytes infected with the two populations of *B. bovis* were subjected to organic phenol and chloroform extraction of genomic DNA. 20-30 µg of genomic DNA from each parasite population was used for the preparation of DNA libraries, with technical replicates for each strain, using the Nextera Xt Kit. The sequencing of the libraries was carried out with the shotgun procedure at the Institute of Biotechnology, UNAM. 5,239,525 good quality paired-end read pairs were obtained for the attenuated *B. bovis* strain, whereas 8,237,626 paired-end read pairs for the virulent strain. Genomes were assembled using the Spades v3.13.1 program obtaining a total of 625 contigs with a coverage of 480x for the attenuated strain and a total of 2,274 contigs with a coverage of 130x for the virulent strain. Genome sequencing and assembly showed that the attenuated *B. bovis* strain contains 7,962,396 bp, while the virulent strain contains 8,760,816 bp, representing a 9.11% difference in total base pair count. It remains to perform the annotation of the genomes to identify the differences that are possibly associated with the virulence or pathogenicity of *B. bovis*.

Keywords: *Babesia bovis*, virulent strain, attenuated strain.

1 INTRODUCCIÓN

Babesia bovis, un parásito protozoano intraeritrocítico transmitido por garrapatas que pertenece al filo apicomplexa, es uno de los agentes etiológicos de la babesiosis bovina, una enfermedad altamente prevalente en los países tropicales y subtropicales que causan una morbilidad y mortalidad significativas en el ganado. Este trabajo presenta el primer borrador de las secuencias del genoma de cepas atenuada y virulenta de *B. bovis* de origen mexicano.

El ganado infectado con cepas virulentas de *B. bovis* presenta anemia hemolítica y puede manifestar babesiosis cerebral (Álvarez *et al.*, 2019; 2020). En condiciones de cultivo *in vitro*, se han logrado obtener cepas atenuadas de varias especies de *Babesia* (Yunker *et al.*, 1987; Winger *et al.*, 1989; Shkap *et al.*, 2007). Los parásitos derivados de cultivo *in vitro* son menos virulentos, pueden inducir inmunidad en el ganado desafiado con cepas virulentas (Cantó *et al.*, 1996; Rojas *et al.*, 2016; Rojas *et al.*, 2018) y no se transmiten mediante garrapatas al ganado susceptible (Rojas *et al.*, 2011). Para poder eventualmente comparar los genomas de una cepa virulenta y una atenuada de *B. bovis*, el objetivo de este estudio fue secuenciar y ensamblar un borrador del genoma para cada cepa de parásitos, virulenta y atenuada.

2 MATERIAL Y MÉTODOS

La cepa atenuada fue derivada del cultivo *in vitro* utilizando un sistema estacionario microaerofílico (Rojas *et al.*, 2018; Rojas *et al.*, 2016) y se ha mantenido alternativamente en cultivo continuo y criopreservación en nitrógeno líquido a -196 °C en el CENID-SAI (Cantó *et al.*, 1996; Rojas *et al.*, 2011; Rojas *et al.*, 2016; Rojas *et al.*, 2018). Brevemente, se descongeló un criostabilado de la cepa atenuada de *B. bovis* a 37 °C y se resuspendió en solución VyM (Rojas *et*

al., 2016). Después de una centrifugación a 450 g durante 30 minutos a 25 °C, se añadió 1.0 ml de una suspensión de eritrocitos bovinos al 10% en medio de cultivo M-199 suplementado con suero bovino al 40% a la pastilla de *B. bovis*. La mezcla se transfirió a una placa de cultivo de tejidos de 24 pozos y se incubó a 37 ° C en una atmósfera de 90% N₂, 5% O₂ y 5% de CO₂ a presión atmosférica constante. El medio de cultivo se reemplazó cada 24 h y se estableció un subcultivo cuando el porcentaje de eritrocitos parasitados alcanzó el 4%, agregando una suspensión de eritrocitos al 10% y transfiriendo la suspensión a una botella de cultivo de 50 ml.

La cepa virulenta se ha mantenido a través de pasajes con garrapatas en animales susceptibles y criopreservación en nitrógeno líquido en el CENID-SAI (Cantó et al., 1996; Rojas et al., 2011; Alvarez et al., 2020). Se descongeló un crioestabilado de 5 ml de la cepa virulenta de *B. bovis* con una parasitemia del 2% a 37 ° C y se reactivó en un ternero esplenectomizado como se ha descrito antes para la recolección de eritrocitos infectados con *B. bovis* (Cantó et al., 1996). Los eritrocitos bovinos infectados con las dos poblaciones de *B. bovis* fueron sujetas a la extracción de ADN genómico por los protocolos tradicionales de extracción con fenol y cloroformo orgánico (Strauss, 2001; Genis et al., 2009). Para llevar a cabo el proyecto de secuenciación de genoma completo, se utilizaron 20-30 µg de ADN genómico de cada población de parásitos para la preparación de bibliotecas de ADN, con réplicas técnicas para cada cepa, mediante el uso del Kit Nextera Xt (Illumina, San Diego, CA), realizado en las instalaciones del núcleo de secuenciación de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT-UNAM). Los genomas se ensamblaron utilizando el programa Spades v3.13.1 con parámetros de cameros “-careful, -k 21,31,41,51,61,71” (Bankevich et al., 2012).

3 RESULTADOS

Se obtuvieron 5,239,525 pares de lecturas de extremo pareado para la cepa atenuada de *B. bovis*, y 8,237,626 pares de lecturas pareadas para la cepa virulenta (Cuadro 1). El control de calidad se realizó con el programa TRIM Galore V0.6.4 utilizando parámetros predeterminados. Se utilizaron un total de 625 contigs con una cobertura de 480x para la cepa atenuada y un total de 2,274 contigs con una cobertura de 130x para la cepa virulenta (Cuadro 1), para mapear las secuencias contra el genoma de referencia, cepa *B. bovis* T2BO (PRJNA18731). El mapeo se realizó con el programa Mummer v3.1 con parámetros predeterminados. Para eliminar la contaminación del ADN bovino, se realizaron alineaciones de secuencia con el genoma de referencia *Bos Taurus* (CM000177.4).

Cuadro 1. Cepas de *B. bovis* analizadas y comparadas con la cepa de referencia T2Bo.

Datos Secuenciación \ Cepas	<i>B. bovis</i> atenuada	<i>B. bovis</i> virulenta	<i>B. bovis</i> T2Bo
# Contigs	625	2,274	7
Tamaño del Genoma	7,962,396	8,760,816	8,228,827
GC (%)	41.54	42.0	38.96
Cobertura (X)	480	130	10
N50	172,356	100,409	1,797,577
L50	15	25	2
# N's por-100 Kpb	0	0	N/D
No. acceso GenBank	JAIUGG000000000.1	JAIUGF000000000.1	AAXT000000000

N's = Nucleótidos. Estadísticas basadas en tamaños de contigs \geq 500 pb. N/D, No disponible

La secuenciación y el ensamblado del genoma demostró que la cepa atenuada de *B. bovis* contiene 7,962,396 pb, mientras que la cepa virulenta 8,760,816 pb, lo que representa una diferencia de 9.11% en el recuento total (Cuadro 1). Curiosamente, el contenido de GC es ligeramente menor en la cepa atenuada de *B. bovis* (41.54%) versus la cepa virulenta (42.0%), mientras que en el genoma de referencia el contenido de GC es 38.968% y la longitud total es de 8.2 Mbp (Brayton et al., 2007).

Este proyecto de secuenciación tipo escopeta del genoma se ha depositado en GenBank bajo el número de acceso JAIUGF000000000.1, BioSample: SAMN20446764, BioProject: PRJNA750231 para la cepa virulenta de *B. bovis*; y número de acceso JAIUGG000000000.1, Biosample SAMN20446769, BioProject: PRJNA750232 para la cepa atenuada de *B. bovis*. Las versiones descritas en este documento son la primera versión. Las lecturas de secuencia sin procesar se han depositado en el Archivo de lecturas de secuencia (SRA) bajo el No. PRJNA805286 y PRJNA750232 para las cepas virulenta y atenuada, respectivamente.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Proyecto No. A1-S-43508; Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática IBT, UNAM; e INIFAP, Proyecto N° 1672534936.

REFERENCIAS

- Alvarez JA, Rojas C, Figueroa JV. 2019. Diagnostic tools for the identification of *Babesia* sp. in persistently infected cattle. *Pathogens* 8(3):143. doi.org/10.3390/pathogens8030143
- Alvarez JA, Rojas C, Figueroa JV. 2020. An overview of current knowledge on in vitro *Babesia* cultivation for production of live attenuated vaccines for bovine babesiosis in Mexico. *Front Vet Sci.* 7: 364. https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00364
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol.* 19(5): 455-77. https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021
- Brayton KA, Lau AO, Herndon DR, Hannick L, Kappmeyer LS, Berens SJ, Bidwell SL, Brown WC, Crabtree J, Fadrosch D, Feldblum T, Forberger HA, Haas BJ, Howell JM, Khouri H, Koo H, Mann DJ, Norimine J, Paulsen IT, Radune D, Ren Q, Smith RK Jr, Suarez CE, White O, Wortman JR, Knowles DP Jr, McElwain TF, Nene VM. 2007. Genome sequence of *Babesia bovis* and comparative analysis of apicomplexan hemoprotozoa. *PLoS Pathog.* 19;3(10):1401-1413. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030148
- Canto AG, Figueroa MJV, Alvarez MJA, Ramos AJA, Vega MCA. Capacidad inmunoprotectora de una clona irradiada de *Babesia bovis* derivada del cultivo in vitro. *Tec Pecu Mex.* (1996) 34:127-35. https://cienciaspecuarias.inifap.gob.mx/index.php/Pecuarias/article/view/710/0
- Genis AD, Perez J, Mosqueda JJ, Alvarez A, Camacho M, Muñoz Mde L, Rojas C, Figueroa JV. 2009. Using *msa-2b* as a molecular marker for genotyping Mexican isolates of *Babesia bovis*. *Infect Genet Evol.* 9(6):1102-1107. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.03.012
- Rojas-Martínez C, Rodríguez-Vivas RI, Figueroa-Millan JV, Acosta-Viana KY, Gutiérrez-Ruiz EJ, Álvarez-Martínez JA. 2016. *In vitro* culture of *Babesia bovis* in a bovine serum-free culture medium supplemented with insulin, transferrin, and selenite. *Exp Parasitol.* 170:214-219. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.10.002
- Rojas-Martínez C, Rodríguez-Vivas RI, Figueroa-Millan JV, Bautista-Garfias CR, Castaneda-Arriola RO, Lira-Amaya JJ, Vargas-Uriostegui P, Ojeda-Carrasco JJ, Álvarez-Martínez JA. 2018. Bovine babesiosis: Cattle protected in the field with a frozen vaccine containing *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* cultured in vitro with a serum-free medium. *Parasitol Intl.* (2018) 67:190-195. https://doi.org/10.1016/j.parint.2017.11.004
- Rojas-Ramírez EE, Mosqueda-Gualito JJ, Álvarez-Martínez JA, Hernández-Ortíz R, Ramos-Aragón JA, Rojas-Martínez C. 2011. Transmissibility of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* attenuated strains by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks. *Rev Mex Cienc Pecu.* 2(3): 267-281. www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242011000300003&lng=es.
- Shkap V, Rasulov I, Abdurasulov S, Fish L, Leibovitz B, Krigel Y, Molad T, Mazuz ML, Savitsky I. 2007. *Babesia bigemina*: Attenuation of an Uzbek isolate for immunization of cattle with live calf- or culture-derived parasites. *Vet Parasitol.* 146 (3-4): 221-226. doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.02.018.

Strauss WM. 2001. Preparation of genomic DNA from mammalian tissue. En: *Current Protocols in Mol Biol*; Ausubel FM. Jhon Wiley & Sons: West Sussex, UK; Vol 42 (1), Chapter 2: Unit 2.2. doi: 10.1002/0471142727.mb0202s42.

Winger CM, Canning EU, Culverhouse JD. 1989. A strain of *Babesia divergens*, attenuated after long term culture. *Res Vet Sci.* 46 (1): 110-113. doi.org/10.1016/S0034-5288(18)31128-7.

Yunker CE, Kuttler KL, Johnson LW. 1987. Attenuation of *Babesia bovis* by in vitro cultivation. *Vet Parasitol.* 24 (1-2): 7-13. doi.org/10.1016/0304-4017(87)90125-7.