



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

TEMA: DIAGNÓSTICO DE LOS HEMOTRÓPICOS *ANAPLASMA MARGINALE*, *TRYPANOSOMA SPP.* Y *BABESIA SPP.* EN TRES FINCAS GANADERAS DE LA PROVINCIA DE PASTAZA, ECUADOR

AUTOR: VIVIANA LISETTE MEDINA NARANJO

DIRECTOR: MARÍA AUGUSTA CHÁVEZ LARREA MSc.

SANGOLQUÍ

2017

CERTIFICADO DEL DIRECTOR DEL TRBAJO DE TITULACIÓN



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, "**DIAGNÓSTICO DE LOS HEMOTRÓPICOS ANAPLASMA MARGINALE, TRYPANOSOMA SPP. Y BABESIA SPP. EN TRES FINCAS GANADERAS DE LA PROVINCIA DE PASTAZA, ECUADOR**" realizado por la señorita **VIVIANA LISETTE MEDINA NARANJO**, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar a la señorita **VIVIANA LISETTE MEDINA NARANJO** para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 05 de julio del 2017

MARÍA AUGUSTA CHÁVEZ LARREA MSc.

DIRECTORA DEL PROYECTO DE TITULACIÓN

Urkund Analysis Result

Analysed Document: FINAL PAPER1.docx (D29342058)
Submitted: 2017-06-12 15:03:00
Submitted By: biblioteca@espe.edu.ec
Significance: 6 %

Sources included in the report:

Proyecto de Investigación Leo JRR V3.docx (D14266667)
Perfil Tesis Z Gonzalez V4 JRR.docx (D14266669)
Formato Trypanosoma y Efecto en la salud de los bovinos.docx (D27317160)
<http://inmunobiologia.net.ve/anacionales.html>
<http://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-015-0525-3>

Instances where selected sources appear:

13

MARIA AUGUSTA



[Signature]
Dr. Rodrigo Avalos, MSc.
Director de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **VIVIANA LISETTE MEDINA NARANJO**, con cedula de identidad N° 1804288106, declaro que este trabajo de titulación "**DIAGNÓSTICO DE LOS HEMOTRÓPICOS ANAPLASMA MARGINALE, TRYPANOSOMA SPP. Y BABESIA SPP. EN TRES FINCAS GANADERAS DE LA PROVINCIA DE PASTAZA, ECUADOR**" ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría, en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolquí, 05 de julio del 2017



VIVIANA LISETTE MEDINA NARANJO

C.C. 1804288106

AUTORIZACIÓN



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, **VIVIANA LISETTE MEDINA NARANJO**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación "**DIAGNÓSTICO DE LOS HEMOTRÓPICOS ANAPLASMA MARGINALE, TRYPANOSOMA SPP. Y BABESIA SPP. EN TRES FINCAS GANADERAS DE LA PROVINCIA DE PASTAZA, ECUADOR**" cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad, y se encuentra publicado en la página <http://www.fcv.luz.edu.ve>, de la Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Zulia, Maracaibo, Venezuela (ISSN 0798-2259), en el Volumen XXVII (3), Mayo-Junio, 2017.

Sangolquí, 18 de julio del 2017

VIVIANA LISETTE MEDINA NARANJO

C.C. 1804288106

DIAGNÓSTICO DE LOS HEMOTRÓPICOS *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma* spp. Y *Babesia* spp. MEDIANTE LAS TÉCNICAS DE ELISAⁱ Y PCR EN TRES FINCAS GANADERAS DE LA PROVINCIA DE PASTAZA, ECUADOR

DIAGNOSIS OF HEMOTROPICS *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma* spp. AND *Babesia* spp. BY ELISAⁱ AND PCR TECHNIQUES IN THREE LIVESTOCK FARMS OF PASTAZA PROVINCE, ECUADOR

Viviana Lisette Medina-Naranjo¹, Armando Reyna-Bello^{2,3}, Lucinda María Tavares-Marques³, Ana María Campos⁴, Jorge Washington Ron-Román¹, Juan Carlos Moyano⁵, Estefani Carolina Jarrín-Porras¹, Elizabeth Dayan Sandoval-Morejón¹, María Augusta Chávez-Larrea^{1*}

¹Grupo de Investigación en Sanidad Animal y Humana (GISAH), Carrera de Ingeniería en Biotecnología, Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura, Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, Sangolquí, Ecuador. ²Investigador Prometeo, Carrera de Ingeniería en Biotecnología, Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura, Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, Sangolquí, Ecuador. ³Grupo de Inmunobiología, Centro de Estudios Biomédicos y Veterinarios, ⁴Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez-IDECYT, Venezuela. Laboratorio de Microscopía Electrónica, Centro de Estudios Biomédicos y Veterinarios, Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez-IDECYT, Venezuela. ⁵Universidad Estatal Amazónica, Santa Clara, Ecuador. *Autor para correspondencia: Grupo de Investigación en Sanidad Animal y Humana (GISAH), Carrera de Ingeniería en Biotecnología, Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura, Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, Sangolquí, Ecuador. E-mail: machavez@espe.edu.ec

RESUMEN

Las enfermedades hemotrópicas afectan animales que viven en zonas tropicales y subtropicales del mundo, debido a la presencia de vectores transmisores de los agentes, tales como garrapatas y moscas hematofagas. Dentro de este grupo de enfermedades se encuentran la anaplasmosis, tripanosomosis y babesiosis bovina, las cuales afectan negativamente las producciones ganaderas, por lo que el diagnóstico certero permite el control y tratamiento racional de estas enfermedades. En Ecuador, estas enfermedades han sido poco estudiadas, por lo que el objetivo del presente trabajo fue realizar una prospección sobre la presencia de estos hemotrópicos en la Provincia de Pastaza, para lo cual se evaluaron tres fincas ganaderas, ubicadas en la región Amazónica del Ecuador, Provincia de Pastaza, donde se realizó el diagnóstico de anaplasmosis y tripanosomosis por ELISAⁱ y babesiosis mediante la prueba de PCR. En esta evaluación se obtuvo una prevalencia del 65,5 % de anticuerpos anti MSP5r de *Anaplasma marginale*; 31,03 % anti *Trypanosoma* spp. por ELISAⁱ y 0 % para *Babesia* spp. por PCR. No se encontró ningún tipo de correlación de la presencia de anticuerpos (anti *A. marginale* o *Trypanosoma* spp.) con el hematocrito ni con las proteínas totales. Igualmente no se observó diferencias significativas de los anticuerpos anti MSP5r con la presencia o ausencia de garrapatas en las fincas. En conclusión, se puede señalar la elevada seroprevalencia de *Trypanosoma* spp. y *A. marginale* en la zona estudiada, por lo que resulta eminente el establecimiento de medidas de control. Otro aspecto importante, fue el haber encontrado fincas sin garrapatas con la presencia de anticuerpos de anti MSP5r, señalando la posible presencia de otros vectores en esta zona.

Palabras claves: *Anaplasma marginale*; *Babesia* spp.; ELISA; PCR; *Trypanosoma* spp.

ABSTRACT

Hemotropic diseases affect animals living in tropical and subtropical areas of the world, due to the presence of transmitting vectors of agents such as ticks and hematophagous flies. Within this group of diseases are the anaplasmosis, trypanosomosis and bovine babesiosis which adversely affect livestock production, it is therefore accurate diagnosis allows the control and rational treatment of these diseases. In Ecuador, these diseases have been under studied, so the aim of this study was to prospect the presence of these hemotropics in the Province of Pastaza. For this, three farms were evaluated, located in the Amazon region of Ecuador, Pastaza province, where diagnosis of anaplasmosis and trypanosomosis by ELISAⁱ and babesiosis using the PCR test were performed. In this hemotropics evaluation, 65.5 % prevalence of anti-MSP5r *Anaplasma marginale* antibodies; 31.03 % anti *Trypanosoma* spp. by ELISAⁱ and 0 % for *Babesia* spp. by PCR were obtained. There wasn't found a correlation between the presence of antibodies (anti *A. marginale* or *Trypanosoma* spp.), the hematocrit and total proteins, no significant differences in anti-MSP5r antibodies with the presence or absence of ticks on farms were observed. In conclusion, the high seroprevalences of *Trypanosoma* spp. and *A. marginale* in the area under study, and therefore the establishment of control measures is eminent. Another important aspect to highlight is to have found farms without ticks and anti-MSP5r antibodies presence, indicating the possible presence of other vectors in this area.

Key words: *Anaplasma marginale*; *Babesia* spp; ELISAⁱ; PCR; *Trypanosoma* spp.

INTRODUCCION

La tripanosomosis, anaplasmosis y la babesiosis en bovino (*Bos Taurus/Bos indicus*), son un conjunto de enfermedades tropicales originadas por microorganismos que presentan tropismo por la sangre de los bovinos, por lo que en su conjunto son agentes que ocasionan enfermedades y son conocidos bajo el nombre de hemotrópicos [35]. Otra característica común de estas tres enfermedades es que los agentes son transmitidos de un animal enfermo a uno sano a través de vectores [33]. La distribución de estos hemotrópicos es principalmente en las zonas tropicales y subtropicales del mundo, siendo enzoótico en el continente americano, con prevalencia de elevadas a leves dependiendo de la región geográfica [14, 22, 44].

Clínicamente las tres enfermedades son similares, originando principalmente fiebre, anemia, decaimiento, postración, incremento de las frecuencias respiratorias y cardíaca, lo que trae como consecuencia la disminución de la producción, tanto de leche como de carne [22, 33, 35].

La tripanosomosis bovina es una enfermedad causada por *Trypanosoma vivax*, el cual es un protozoo del Orden *Kinetoplastida*, Familia *Trypanosomatidae* y Género *Trypanosoma*. Este hemoflagelado habita de modo libre en la sangre de los rumiantes, originando grandes pérdidas económicas en los rebaños bovinos, ovinos (*Ovis aries*), caprinos (*Capra hircus*) y bufalinos (*Bubalus bubalis*) de los países tropicales, donde se encuentran los tábanos (*Tabanus spp*), los cuales son los principales vectores de este microorganismo. También se han reportado otros vectores menos eficientes como dípteros e insectos hematófagos como *Stomoxys calcitrans*, *Haematobia irritans*, *Culicinae spp.* [45, 50]. Los bovinos pueden encontrarse infectados tanto por *T. evansi* y *T. theileri*, aunque éstos no parecieran afectar gravemente la salud de los animales, a diferencia de *T. vivax* que es patógeno [5, 14, 33].

Estos hemotrópicos circulan en el torrente sanguíneo, secretan trans-sialidasas que deshialinizan los eritrocitos, estimulando la eritrofagocitosis [23, 27]. Otros factores como el Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF) igualmente secretados por estos hemoflagelados, bloquean la eritropoyesis extramedular y la maduración de glóbulos rojos (GR) lo cual igualmente contribuyen en la hemodilución [42]. Recientemente se ha señalado también el daño mecánico que los parásitos infringen directamente sobre los GR mientras éstos circulan en el torrente sanguíneo, estimulando igualmente la eritrofagocitosis [9].

Otro hecho relevante de la infección con *T. vivax*, es la capacidad que tiene este parásito en dañar directamente el sistema reproductivo, originando mermas en la capacidad reproductiva del rebaño afectado [7, 22]. Por ejemplo, en machos se ha observado degeneración difusa o intralobular ocasionada por degeneración testicular, originando disminución de la calidad espermática [1]. En hembras, la infección por *T. vivax*, produce anestro durante las infecciones experimentales de cabras,

caracterizado por pérdida de cuerpo lúteo y folículos, acompañado de anomalías anatomopatológicas de los ovarios [37].

El diagnóstico de esta enfermedad se puede realizar de manera clínica basado en la observación de la sintomatología de la enfermedad, sin embargo debido a lo ambiguo de éstos, resulta poco eficiente [22], es por ello, que se recurrió al diagnóstico serológico por Ensayo Inmunoenzimático indirecto (ELISAI) [21, 30] o molecular por la Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) [18], los cuales presentan alta sensibilidad y especificidad durante todas las fases de la enfermedad [34]. Para el diagnóstico por PCR, se han empleado varias moléculas del ADN del parásito como diana, pareciendo ser los cebadores TWJ descrito por Masake y col. los más sensibles para el diagnóstico de *T. vivax* [27]. Igualmente se han señalado algunas Reacciones en Cadena de la Polimerasa-Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (PCR-RFLP) capaces de diferenciar entre *T. vivax*, *T. evansi* o *T. theileri* [48]. Para el diagnóstico por ELISAI, se han empleado desde proteínas purificadas como la Glicoproteína Variable de Superficie (VSG) de *T. evansi* [49], hasta extractos antigénicos crudos igualmente de *T. evansi*, debido a la comunidad antigénica existentes entre *T. evansi* y *T. vivax* [43]. Sin embargo, la utilización de extractos crudos, sumado a la presencia de *T. vivax* o *T. evansi* en Latinoamérica, genera reacción cruzada entre las especies impidiendo su diagnóstico certero debido a que los bovinos pueden estar infectados con cualquiera de los dos [48], aunque se reporta que *T. evansi* no pareciera ser tan patógeno en los rumiantes [15].

Anaplasma marginale, es una bacteria Gram negativa del Orden *Rickettsiales* que parasita de manera obligada los GR de los rumiantes y principalmente de los bovinos. Esta bacteria se transmite de un animal enfermo a uno sano a través de garrapatas del Género *Dermacentor* en EUA y en Latinoamérica por *Rhipicephalus microplus* (*R. microplus*) [44]. Sin embargo, esto último es controversial, debido a que en Latinoamérica pareciera ser más importante la transmisión por moscas hematófagas como el tábano (*Tabanus spp*) [5, 11, 24, 35].

Una vez que la bacteria invade los GR comienza a dividirse por fisión binaria, originando cambios estructurales y bioquímicos en la membrana del GR, ocasionando un proceso autoinmune mediado por anticuerpos contra los GR parasitados y sanos. Estas inmunoglobulinas asociadas a los GR, estimulan la eritrofagocitosis extravascular, removiendo los GR parasitados o no masivamente del torrente circulatorio [19].

El diagnóstico de esta enfermedad se realiza de manera clínica, pero debido a la ausencia de signos patognomónicos, se recomienda el empleo de las pruebas de ELISA o PCR, los cuales tienen sensibilidad y especificidad cercanas al 100 % [35]. Para la prueba de PCR se han ensayado una serie de iniciadores y la mayoría con resultados satisfactorios, por ejemplo aquellos que amplifican el gen de la Proteína Mayor de Superficie (MSP5), como es el caso de un estudio realizado en poblaciones bovinas del Ecuador [46] al igual que en Venezuela

[47]. Para el diagnóstico serológico de esta enfermedad, se ha difundido ampliamente el uso de MSP5 recombinante (MSP5r) como excelente antígeno para la realización de pruebas de ELISAi [16, 36]. En un estudio realizado en Ecuador, la prueba ELISAi demostró una sensibilidad del 96 % y especificidad del 90 % frente a PCR [30].

La babesiosis bovina es una enfermedad hemoparasitaria causada por *Babesia bovis* o *Babesia bigemina*, las cuales son parásitos del Filo *Apicomplexa*; Clase *Aconoidasida*; Orden *Piroplasmida*; Familia *Babesiidae*; Genero *Babesia* [26]. Estos parásitos se distribuyen por zonas que pueden ser de clima templado hasta tropical, siempre y cuando se pueda desarrollar su vector que es la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. La babesiosis es endémica en la mayoría de los países latinoamericanos como Argentina, Uruguay, Brasil, Colombia, México y Venezuela, a excepción de Chile debido a la Cordillera de los Andes que establece una barrera natural [28].

Mundialmente se han asignado diferentes nombres a esta enfermedad como fiebre de Texas, fiebre de garrapatas, aguas rojas, piroplasmosis, ranilla roja [6, 24, 44] y enfermedad de Nantucket, siendo ésta última una enfermedad zoonótica presente en EUA y en la Comunidad Europea [25].

Babesia spp. es un hemoprotazo que parasita de manera obligatoria los GR de los bovinos, debido al reconocimiento de receptores específicos que poseen éstos en la membrana. Una vez que *Babesia* spp. penetra en el GR, inicia su división por fisión binaria y comienza a desarrollarse. Luego salen del eritrocito rompiendo la membrana externa, ocasionando la lisis celular, liberando hemoglobina al plasma, siendo éste una de las causas principales de la aparición de la anemia durante la babesiosis [33]. En este sentido, también se ha encontrado que la anemia puede ser inmuno-mediada, bien porque las inmunoglobulinas reconocen los cambios en la membrana externa de los GR infringidos por el parásito, o bien porque antígenos excretados/secretados por *Babesia* spp. se adhieren a la membrana del eritrocito, estimulando que sea éste reconocido como cuerpo extraño, incrementando la eritrofagocitosis [44]. Es por esto que los síntomas más representativos de la enfermedad son hemoglobinuria, anemia hemolítica, estreñimiento, diarrea, fiebre, pérdida de peso, postración, convulsiones, signos clínicos nerviosos y la muerte [3].

El diagnóstico de babesiosis bovina se puede realizar de forma directa mediante frotis sanguíneo, necropsia o por la técnica de la capa leucocitaria cuantitativa y de forma indirecta mediante fijación de complemento, inmunofluorescencia indirecta, ELISA, molecular como el PCR o por la prueba denominada amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) [4, 8, 51]. Todas estas técnicas han mostrado ser muy satisfactorias para el diagnóstico del parásito, tanto en etapa temprana de la enfermedad como crónica [12, 38, 39].

Estas hemoparasitosis bovinas han sido poco estudiadas en Ecuador y menos aún las posibles interacciones que existe entre

ellas, ni la repercusión de éstas en los valores hemáticos de los rebaños bovinos afectados. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue diagnosticar estas enfermedades, determinar su prevalencia y sus repercusiones en valores de proteínas totales (PT) y hematocrito (Hto) en bovinos de la Parroquia Santa Clara, Provincia de Pastaza, en Ecuador.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Un total de 58 bovinos fueron muestreados en tres fincas o Unidades Productoras Agrícolas (UPA), pertenecientes a la Parroquia Santa Clara, Provincia de Pastaza, de Ecuador, con la siguiente distribución: 25 bovinos (43,10 %) de la UPA-1; 14 (24,14 %) de la UPA-2 y 19 (32,76 %) de la UPA-3. La población bovina total de estas tres fincas era de 181 animales, distribuidos de la siguiente manera: 46 en la UPA-1; 25 en la UPA-2 y 110 en la UPA-3.

Las muestras sanguíneas fueron recolectadas a través de una punción en la vena coccígea con ayuda de una aguja de 21 mm y se extrajo aproximadamente 5 mL de sangre periférica en un tubo al vacío sin anticoagulante y otro con el anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Las muestras tomadas en los tubos sin anticoagulante fueron centrifugadas a 2500 x G por 15 min (Clay Adams, EUA). El suero sanguíneo resultante fue congelado a -20 °C (Revco, ThermoFisher Scientific, EUA) hasta su procesamiento y análisis. Luego de efectuar la prueba de hematocrito (Hto), las muestras de sangres con EDTA fueron congeladas a -20 °C hasta su procesamiento y análisis.

Determinación del hematocrito (Hto) y las proteínas totales (PT)

Dos tubos capilares fueron llenados con cada una de las muestras de sangre en presencia de EDTA, los cuales fueron centrifugados a 10000 x G durante 5 min (TG12M Centrifuge, Madell Technology, EUA) y se determinó el porcentaje de Hto con una tabla para ello (marca Faem).

Con la finalidad de determinar PT de los animales del muestreo, los sueros de cada animal fueron descongelados y con ayuda de un refractómetro portátil (RHC300ATC, Hong Kong, China) se determinó el valor de cada animal en unidades de g/100 mL.

Extracción de ADN

Para los análisis moleculares, se utilizó el tubo con EDTA y se extrajo el ADN de las muestras sanguíneas bovinas según el protocolo modificado por De la Rosa y col. [13], que consistió en tomar una alícuota de 400 µL de sangre en tubos de micro centrífuga (Eppendorf, 1,5 µL) y a los cuales se adicionó 1 mL de solución tampón (Tris-Cl 20 mM). Posteriormente se colocó en la incubadora (Thermo-Shaker, MSC-100, China) a 25 °C durante 10 min, se centrifugó a 20800 x G por 5 min y se descartó el sobrenadante. El ADN fue concentrado repitiendo

los pasos anteriores más un segundo lavado con la solución tampón. Seguidamente, se resuspendió el precipitado con 400 µL de solución lítica (EDTA 1 mM; Tris-Cl 10 mM; y 0,1 % de Sodio dodecilsulfato (SDS)) y se incubó a 25 °C por 20 min. A continuación se agregó 2,5 µL de ribonucleasa por tubo y se incubó a 37 °C por 30 min, transcurrido este tiempo se agregó 2,5 µL de proteinasa K y se incubó a 60 °C por 2 horas (h). Inmediatamente se añadió 300 µL de acetato de sodio 5 M se agitó (Velp, Wizard, España) y se centrifugó (Hettich Zentrifugen, Mikro200, Alemania) en iguales condiciones a la anteriores. El sobrenadante se dividió en dos tubos de 1,5 mL y se agregó 2 volúmenes de etanol y acetato de sodio 0,12 M, se mezcló por inversión para precipitar el ADN, posteriormente se incubó a -20 °C durante 30 min. Se centrifugó a 20800 x G por 7 min, se descartó el sobrenadante y se realizaron 2 lavados con etanol (70 %). Finalmente, se resuspendió con 40 µL de tampón TE (Tris 10 mM; EDTA 1 mM) previamente calentado a 65 °C y se almacenaron a -80 °C en el congelador (Ilshin, DF8514, Corea) hasta su posterior uso.

Cuantificación de ADN

Se cuantificó el ADN extraído por espectrometría con la ayuda del equipo NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific®, EUA), luego se verificó la integridad del ADN por electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %, teñidos con SYBR Safe (Invitrogen®, EUA) y foto documentado (Transiluminador Bio Doc-It System®, EUA).

Ensayo inmunoenzimático indirecto (ELISAI) para el diagnóstico de la anaplasmosis bovina.

Los ELISAI para el diagnóstico de la anaplasmosis se realizaron según protocolo de Navarrete (2016) [30]. Inicialmente se sensibilizó la placas con 100 µL/pocillo de la proteína recombinante MSP5r a 2 µg/mL, diluido en buffer de carbonato-bicarbonato 50 mM (pH 9,6) y se incubó la placa a 4 °C en cámara húmeda (Labnet, 311DS, EUA) por toda la noche. Posteriormente, se lavó la placa 3 veces seguidas con solución de lavado (NaCl 1,50 M; Tween20 0,1 %) (Bio-Tek Instruments, ELx50, EUA) y se bloqueó cada pocillo con 200 µL de solución de leche de soya al 5 % diluida en tampón fosfato salino (PBS) (NaH₂PO₄ 0,20 M; Na₂HPO₄ 0,20 M; NaCl 0,15 M) conteniendo 5 mg/mL de IgY anti *E. coli*. La placa se incubó a 37 °C en cámara húmeda por 1h, luego de lo cual, se volvió a lavar 3 veces y se colocaron 100 µL/pocillo, de los sueros diluidos 1:200 con PBS-Tween (Tween20 0,1 %). Nuevamente, se incubó la placa a 37 °C en cámara húmeda por 1h, se lavó la placa 5 veces y se añadió 100 µL de conjugado (Bethyl, A1013, EUA) anti IgG bovino diluido en buffer PBS-Tween (1:40000). Se volvió a

incubar a 37 °C por 1h, se lavó 5 veces con solución de lavado y se colocó 50 µL del cromógeno 3, 3', 5, 5'-tetrametilbencidina (TMB) (Sigma-Aldrich, 860336-1) diluido en solución tampón fosfato-citrato (Fosfato Citrato 0,05 M; H₂O₂ 0,5 %; TMB-Dimetil sulfóxido) en cada pocillo y se conservó a temperatura ambiente por 30 min con agitación. Al final, se añadió 50 µL de solución stop (H₂SO₄, 1 N) y se leyeron las absorbancias de la placa en un lector de ELISA (Bio-Tek Instruments, ELx800, EUA) a 450-630 nm. Para establecer el punto de corte se emplearon 20 sueros negativos provenientes de la hacienda "El Prado" del Instituto Agropecuario Superior Andino (IASA I), de la Universidad de las Fuerzas Armadas, Parroquia San Fernando, Cantón Rumiñahui, Provincia de Pichincha; los cuales fueron negativos por PCR a la presencia de *Anaplasma marginale* y *Trypanosoma* spp. y además provienen de una zona con ausencia de los vectores, dada que están a una altitud de 2748 msnm.

ELISAI para determinar la presencia de Trypanosoma spp.

Para realizar este ELISAI según el protocolo descrito por González (2016) [21], se procedió con un protocolo similar al descrito anteriormente, con las siguientes modificaciones; se sensibilizaron los pocillos de la placa con extracto soluble de *Trypanosoma evansi* a 10 µg/mL, dilución de sueros 1:100 y conjugado 1:15000 (Bethyl, A1013, EUA). Para el revelado, se colocó 100 µL de cromógeno ácido 2, 2' azino-bis-3-ethylbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS) (Sigma- Aldrich, A1888) en tampón citrato (0,05 M, pH 4; ABTS 2 %; H₂O₂ 0,5 %) a cada pocillo y se agitó a temperatura ambiente por 45 min. Por último, se leyeron las absorbancias de la placa en un lector de ELISA a 405 nm (Bio-Tek Instruments, ELx800, EUA). En el ensayo se utilizaron los mismos 20 sueros negativos del IASA I como controles para establecer el punto de corte.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para determinar la presencia de Babesia spp.

Se analizaron los ADN de las muestras bovinas mediante la PCR con el uso de cebadores PIRO A (5'-AATACCCAATCCTGACACAGGG-3') y PIRO B (5'-TTAAATACGAATGCCCCAAC-3') descritos previamente por Carret y col. [10], que amplifican el gen 18S rRNA en condiciones pre establecidas que consistieron en 0,25 µM de cada cebador, 1,5 mM de MgCl₂, 0,8 µM de dNTPs, 0,5 U/µL de Taq polimerasa y 100 ng de ADN para un volumen final de 25 µL por tubo [18]. Las condiciones del proceso de amplificación empleadas se describen en la TABLA I.

TABLA I
CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN POR PCR PARA LA DETECCIÓN DE *BABESIA* SPP.

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5	1
Desnaturalización	94	1	35
Hibridación	55	1	35
Extensión	72	1	35
Extensión final	72	5	1
Mantenimiento	4	∞	-

°C: Grados centígrados; min: minutos; ∞: infinito; -: no existe.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la elaboración de este estudio, se evaluaron 58 bovinos pertenecientes a tres fincas, muy cercanas una de otra, ubicadas en la Provincia de Pastaza, Ecuador. El total de la población de las tres fincas era de 181 animales y se tomaron al azar el 41,3 % (19/46) en la UPA-1; 56 % (14/25) en la UPA-2 y 22,7 % (25/110) en la UPA-3 de su rebaño.

En relación a los resultados obtenidos por la técnica de ELISAI se estableció primeramente el punto de corte a través de la Densidad Óptica (DO) para detectar anticuerpos anti MSP5r de *A. marginale* (DO=0,267) y *Trypanosoma* spp. (DO=0,245). Para

establecer las seroprevalencias se consideró como positivos todos aquellos sueros que presentaron DO superiores a sus respectivos puntos de cortes.

Los resultados del diagnóstico de *A. marginale* en los animales muestreados (n=58/181) se presentan en la TABLA II, donde se describe que el 65,51 % (38/58) arrojaron resultados positivos a la presencia de anticuerpos anti MSP5r, del cual el 57,89 % (11/19) corresponde a la UPA-1; el 71,43 % (10/14) para la UPA-2 y el 68 % (17/25) para la UPA-3, lo que significa que más de la mitad de la población muestreada está o ha estado en contacto con la bacteria.

TABLA II
RESULTADOS DE LA DETECCIÓN DE ANTICUEROS ANTI *ANAPLASMA MARGINALE* Y *TRYPANOSOMA* SPP. POR ELISA EN TRES FINCAS DE LA PROVINCIA DE PASTAZA

Finca	<i>Anaplasma marginale</i>		<i>Trypanosoma</i> spp.		Total de animales analizados	Población de animales por UPA
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo		
UPA-1	11 (57,89 %)	8 (42,10 %)	6 (31,58 %)	13(68,42 %)	19	46
UPA-2	10 (71,43 %)	4 (28,57 %)	6 (42,86 %)	8 (57,14 %)	14	25
UPA-3	17 (68 %)	8 (32 %)	6 (24 %)	19 (76 %)	25	110
TOTAL	38 (65,51 %)	20 (34,48 %)	18 (31,03 %)	40 (68,96 %)	58	181

UPA: Unidad de Producción Agrícola; %: porcentaje.

En Ecuador, algunos trabajos revelan igualmente altas prevalencias a esta bacteria, por ejemplo en el Cantón Zamora, Provincia de Zamora Chinchipe, Muñoz y col. [29], encontraron por frotis una prevalencia de 68 %. Escobar y col. [17], reportaron 85,48 % de prevalencia a *A. marginale*, en la zona central del litoral ecuatoriano en el Cantón Quevedo, Provincia de Los Ríos. Para esto, este grupo estandarizó una prueba de PCR anidado, en el cual utilizaron el gen de la MSP4 como blanco. Incluso se han logrado identificar prevalencias superiores como por ejemplo, Soto [40] evaluando esta enfermedad en bovinos sacrificados en el centro de faenamiento de Quito, a través de un PCR y un ELISAc comercial determinaron una prevalencia del 91,7 y 91,1 %, respectivamente de los animales muestreados.

Curiosamente se ha señalado que el vector principal en Latinoamérica es la garrapata *Rhipicephalus microplus* (*R. microplus*), sin embargo, esta garrapata solo pudo ser identificada en la UPA-3, siendo las otras dos UPA libres de este artrópodo. Estos resultados muestran que en las tres fincas se encontraron anticuerpos anti MSP5r de *A. marginale*, indistintamente a la presencia o no de garrapatas; de hecho no se encontró diferencias significativas en las prevalencias determinadas en las tres fincas. Este resultado confirma lo que sostienen algunos autores sobre que el verdadero vector de *A. marginale* en Latinoamérica son principalmente los tábanos y no *R. microplus* [11, 24].

En este sentido, en un trabajo realizado en Costa Rica se determinó que el segundo factor de riesgo más importante para presentar títulos de anticuerpos a *A. marginale*, lo constituye la presencia de tábanos, luego de la estación de lluvia. Igualmente se pudo observar que la presencia de la mosca del establo (*Stomoxys calcitrans*), estaba más relacionada a la aparición de títulos de anticuerpos anti MSP5r que la presencia de garrapatas [31].

En cuanto a los resultados del diagnóstico de *Trypanosoma spp.* (TABLA II), se encontró un 31,03 % (18/58) de animales positivos en la zona, del cual el 31,58 % (6/19); 42,86 % (6/14) y 24 % (6/25) corresponden a las UPA 1, 2 y 3, respectivamente.

De manera general en la población se encontró que el 31,03 % de los animales del muestreo eran positivos a *Trypanosoma spp.* en la prueba de ELISAi.

Estos resultados son comparables a los encontrados por Ortega-Montalvo y col. [32], en un centro de faenamiento de Quito, donde se reportó un 30 % de animales positivos por PCR a *Trypanosoma vivax*. En otro estudio del presente año, a través de la técnica ELISA se determinó una seroprevalencia de 48 % y 75 % realizado en los camales de Quito y Santo Domingo de los Tsáchilas, respectivamente [21].

Al comparar estos valores estimados con los países vecinos, se encontró que en Colombia se ha reportado una prevalencia determinada por PCR-RFLP de 23 % a *T. vivax*, 11 % a *T. evansi* y 11 % a *T. theileri* [48]. En Venezuela, se ha determinado por ELISA la prevalencia de 33 % a *Trypanosoma spp.* en un muestreo en todo el país [43].

En cuanto a las pruebas de PCR realizadas para el diagnóstico

de *Babesia spp.* en la zona, no se encontraron animales positivos, es posible que esta ausencia de animales positivos en el muestreo se deba a la poca presencia de garrapatas en la zona. Como bien se ha mencionado anteriormente, de las tres fincas muestreadas, sólo en una existió la presencia de garrapatas. Es posible que la escasa presencia del vector del microorganismo, no permita la dispersión de *Babesia spp.* en la zona.

En la zona muestreada, el pasto predominante en la UPA-1 y UPA-2 era *Axonopus scoparius*, el cual requiere de siete meses para su recuperación. Es por ello, que en la zona se establece el sistema de producción llamado sogueo, en el cual se amarra al animal con una soga larga y sólo se deja pastorear en círculo por un tiempo determinado. Debido al lento desarrollo de esta gramínea, el pastoreo se realiza cada siete meses en un lugar determinado [20]. Esto es fundamental para el desarrollo de las garrapatas según algunos autores [2], cambios en los factores ambientales dificultan el establecimiento de *R. microplus*. Por ejemplo, se estima que sus larvas pueden sobrevivir unos cuatro meses sin alimentarse [41], es por esto que *R. microplus* quizás no sobreviva a estos períodos tan prolongados de pastoreo en ausencia de su hospedador, lo que pudiera explicar la ausencia de garrapatas en las explotaciones donde se utiliza *Axonopus scoparius* y por ende de *Babesia spp.* en la zona. El empleo de este tipo de pasto, pareciera a su vez ser un control agroecológico del vector y de la enfermedad.

En la TABLA III, se observa que 24,14 % (14/58) animales fueron negativos a las tres pruebas, 44,83 % (26/58) fueron positivos a *A. marginale*, solamente 10,35 % (6/58) a *Trypanosoma spp.* y 20,69 % (12/58) tenían coinfección de *A. marginale* y *Trypanosoma spp.* En el muestreo ningún animal resultó positivo a *Babesia spp.*

TABLA III
DISTRIBUCION DE HEMOTRÓPICOS POR UPA

UPA	<i>Babesia spp.</i>	<i>Anaplasma marginale</i>	<i>Trypanosoma spp.</i>	Frecuencia
1	-	-	-	5
1	-	+	-	14
1	-	-	+	3
1	-	+	+	3
2	-	-	-	3
2	-	+	-	5
2	-	-	+	1
2	-	+	+	5
3	-	-	-	6
3	-	+	-	7
3	-	-	+	2
3	-	+	+	4

UPA: Unidad de Producción Agrícola; -: negativo; +: positivo.

Cuando en el estudio se evaluó la interacción entre animales positivos a *A. marginale* y a *Trypanosoma* spp., se encontró que doce animales presentaron títulos de anticuerpos de los dos hemotrópicos. Este fenómeno fue identificado en las tres fincas del muestreo, en UPA-1 el 21 % de los animales presentaron doble infección, en UPA-2 el 35 % y en UPA-3 el 12 %. Esto sugiere que la existencia de *A. marginale* y *Trypanosoma* spp. en

los animales, son completamente independientes el uno del otro. No pareciera que uno de ellos desplaza al otro y es por esto que se puede encontrar un elevado número de animales con doble infección. Al analizar la distribución de los hemotrópicos por UPA, no se encontró diferencia significativa ($P>0,05$), en cuanto a la presencia de ninguno de los tres hemotrópicos evaluados (TABLA IV).

TABLA IV
DISTRIBUCIÓN DE ANIMALES POSITIVOS A *BABESIA* SPP., *ANAPLASMA MARGINALE* Y *TRYPANOSOMA* SPP. MEDIANTE PCR Y ELISA.

Total de muestras analizadas	PRUEBA DE DIAGNÓSTICO			Porcentaje de animales (%)
	PCR	ELISAI		
	<i>Babesia</i> spp.	<i>Anaplasma marginale</i>	<i>Trypanosoma</i> spp.	
14	-	-	-	24,13
26	-	+	-	44,82
6	-	-	+	10,34
12	-	+	+	20,69

PCR: reacción en cadena de la polimerasa; ELISAI: ensayo inmunoenzimático indirecto; %: porcentaje; -: negativo; +: positivo.

La medición de PT de todos los animales muestreados permitió observar que el promedio fue de 6,801 g/100 mL (mín=2,15; máx=9; Std Dev=1,2169), demostrándose que siete bovinos (12,07 %) tenían menos de 5,7 g/100 mL, y quince bovinos (25,86 %) estaban sobre el límite superior de 7,5 g/100 mL. Únicamente dos bovinos (3,45 %) presentaron un Hto bajo el límite de 24 %, determinado para la zona en estudio. Para los animales enfermos que presentan anticuerpos anti *A. marginale*, el promedio de Hto fue de 31,42 g/100 mL (mín=22; máx=39; Std Dev=5,5), y PT fue de 7,06 g/100 mL (mín=2,7; máx=9; Std Dev=0,98). Para los animales positivos a *Trypanosoma* spp. el Hto fue de 31,5 g/100 mL (mín=25; máx=39; Std Dev=3,63) y PT fue de 6,97 g/100 mL (mín=2,7; máx=8,05; Std Dev=1,14). No se evidenciaron diferencias significativas ($P>0,05$), en cuanto a la presencia de ninguno de los tres hemotrópicos evaluados (TABLA V). De hecho, el análisis univariado según los datos de *A. marginale* o *Trypanosoma* spp., no demostró diferencia significativa ($P>0,05$) en relación a Hto ó PT.

TABLA V
RESULTADOS DE HEMATOCRITO Y PROTEÍNAS TOTALES POR RESULTADOS DE HEMOTRÓPICOS

PARÁMETRO	ANAPLASMA MARGINALE		TRYPANOSOMA SPP.	
	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
HEMATOCRITO (HTO)				
MÍNIMO	23	22	22	25
MÁXIMO	46	39	46	39
PROMEDIO	31,65	31,42	31,5	31,5
STD DEV	5,5	3,8	4,81	3,63
P-VALOR	0,6663		0,4544	
PROTEÍNAS TOTALES (PT) (G/100ML)				
MÍNIMO	2,15	2,7	2,15	2,7
MÁXIMO	7,9	9,0	9,0	8,05
PROMEDIO	6,3	7,06	6,72	6,97
Std Dev	1,46	0,98	1,25	1,14
P-valor	0,5054		0,8162	

Std Dev: desviación estándar (en inglés: Standard Deviation); Hto: hematocrito; PT: proteínas totales; g: gramos; mL: mililitros; P-valor: valor de la probabilidad.

Cuando se evaluó estadísticamente la influencia de los hemotrópicos *A. marginale* y *Trypanosoma* spp. sobre el Hto y PT, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados. Siendo estas enfermedades anemisantes, tendría sentido esperar influencia de los hemotrópicos en el Hto y PT, esto pudiera explicarse en que los casos de anaplasmosis detectados por ELISAI eran casos crónicos o lo que se conoce como portadores persistentes sin afectación clínica [30]. El fenómeno antes descrito igualmente ocurre para los casos de tripanosomosis, con el agravante que el ELISAI para este hemoflagelado no discrimina entre *T. vivax*, *T. theileri* y *T. evansi*; los dos últimos no afectan clínicamente a los bovinos [14], lo cual podría indicar de la presencia de *T. evansi* y *T. theileri* en la población muestreada es mayoritaria.

CONCLUSIONES

En este trabajo realizado en la zona de Pastaza, Ecuador, se encontró un 65,5 % de anticuerpos anti MSP5r de *A. marginale*, 31,03 % anti *Trypanosoma* spp. por ELISAI y 0 % para *Babesia* spp. por PCR. Siendo esto el primer reporte realizado en Ecuador donde se evalúan los tres hemotrópicos a la vez, bajo métodos biotecnológicos de diagnóstico realizados en el país.

Además los resultados del presente trabajo muestran la elevada prevalencia de *A. marginale* y *Trypanosoma* spp. en la zona, lo que debe poner en alerta a veterinarios y autoridades competentes para establecer medidas de control estrictas para estas enfermedades.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen el apoyo recibido de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE por el financiamiento del presente trabajo. Igualmente se agradece de manera especial al Proyecto Prometeo de la Secretaria de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT) de la República del Ecuador por su patrocinio en este trabajo; a los propietarios de las UPA que permitieron evaluar a sus animales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ADAMU, S.; FATIHU, M.Y.; USEH, N.M.; MAMMAN, M.; SEKONI, V.O.; ESIEVO, K.A., Sequential testicular and epididymal damage in Zebu bulls experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. **Vet. Parasitol.** 143(1): 29-34. 2007.
- [2] ALI, A.M.; PARIZI, L.; FERREIRA, B.; DA SILVA, I., A revision of two distinct species of *Rhipicephalus*: *R. microplus* and *R. australis*. **Ciencia Rural.** 46(7): 1240-1248. 2016.

- [3] BABES, V., Sur l'hémoglobulinurie bactérienne du boeuf. **De L'Académie Des Sciences.** 1: 692-694. 1888.
- [4] BAL, M.S.; MAHAJAN, V.; FILIA, G.; KAUR, P.; SINGH, A., Diagnosis and management of bovine babesiosis outbreaks in cattle in Punjab state. **Vet. World.** 9(12): 1370-1374. 2016.
- [5] BALDACCHINO, F.; MUENWORN, V.; DESQUESNES, M.; DESOLI, F.; CHAROENVIRIYAPHAP, T.; DUVALLET, G., Transmission of pathogens by Stomoxys flies (*Diptera, Muscidae*): a review. **Parasite.** 20: 26. 2013.
- [6] BENAVIDES, E.; POLANCO, N.; VIZCAÍNO, O.; BETANCUR, O., Criterios y Protocolos para el diagnóstico de hemoparásitos en bovinos. **Cien. Anim. Univ. La Salle.** 1: 1-11. 2013.
- [7] BETANCUR-HURTADO, O.J.; JIMENEZ-CASTRO, P.D.; GIRALDO-RIOS, C., Reproductive failures associated with *Trypanosoma (Duttonella) vivax*. **Vet. Parasitol.** 229: 54-59. 2016.
- [8] BEUGNET, F.; MOREAU, Y., Babesiosis. **Rev. Sci. Tech.** 34(2): 627-639. 2015.
- [9] BOADA-SUCRE, A.; ROSSI SPADAFORA, M.; TAVARES-MÁRQUES, L.; FINOL, H.; REYNA-BELLO, A., *Trypanosoma vivax* Adhesion to Red Blood Cells in Experimentally Infected Sheep. **Pathol. Res. Intern.** 2016: 1-9. 2016.
- [10] CARRET, C.; WALAS, F.; CARCY, B.; GRANDE, N.; PRECIGOUT, E.; MOUBRI, K.; SCHETTERS, T.P.; GORENFLOT, A., *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. **J. Eukaryot Microbiol.** 46(3): 298-303. 1999.
- [11] CORONADO, A., Is a *Boophilus microplus* the main vector of *Anaplasma marginale*? Technical note. **Rev. Cientif. FCV-LUZ.** IX (5): 408-411. 2001.
- [12] CRIADO-FORNELIO, A., A review of nucleic-acid-based diagnostic tests for Babesia and Theileria, with emphasis on bovine piroplasms. **Parasitol.** 49 (Suppl 1): 39-44. 2007.
- [13] DE LA ROSA, O.; MÁRQUES, A.; VÁSQUEZ, B.; SEIJAS, G.; DICKSON, L., Optimización de un protocolo para aislamiento de ADN a partir de sangre periférica en bovinos. **Segundo Congreso Venezolano de Ciencia y Tecnología e Innovación.** Caracas. 13/13-18. Vol. 2. Venezuela. Pp: 437-438. 2013.
- [14] DESQUESNES, M., Trypanosomes. En: **Livestock Trypanosomoses and their Vectors in Latin America.** World organisation for animal health (Ed). OIE. Francia. 186 pp. 2004.
- [15] DESQUESNES, M.; DARGANTES, A.; LAI, D.H.; LUN, Z.R.; HOLZMULLER, P.; JITTAPALAPONG, S., *Trypanosoma evansi* and Surra: a review and perspectives on transmission, epidemiology and control, impact, and zoonotic aspects. **Biomed. Res. Int.** 2013: 20. 2013.

- [16] ELEIZALDE, M.C.; CABALLERO, A.; REYNA-BELLO, A., Evaluación y mejoramiento del ensayo inmunoenzimático (ELISA) para el diagnóstico de la anaplasmosis bovina, utilizando la MSP5 recombinante como antígeno. **Revista Científica, FCV-LUZ**. XVII(4): 349-356. 2007.
- [17] ESCOBAR, A.; CEVALLOS, O.; VILLAREAL, P.; CARRANZA, M.; PINARGOTE, E., Prevalencia y detección por PCR anidada de *Anaplasma marginale* en bovinos y garrapatas en la zona central del Litoral ecuatoriano. **Cien. Tecnol.** 8(11): 11-17. 2015.
- [18] FIGUEROA, J.V.; LIRA, J.J.; CASTAÑEDA, R.; ÁLVAREZ, J.A.; ROJAS, C.; BAUTISTA, C.R., Optimización de una prueba de PCR-RFLP para la detección y diferenciación de *Babesia* sp en garrapatas *Rhipicephalus microplus*. **CENID-Parasitol. Vet. INIFAP**. 1: 978-983. 2014.
- [19] GIARDINA, S.; ASO, P.; BRETANA, A., Antigen recognition on *Anaplasma marginale* and bovine erythrocytes: an electron microscopy study. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 38(1-2): 183-191. 1993.
- [20] GONZÁLEZ, R.; ANZÚLEZ, S.; VERA, A.; RIERA, L., Gramíneas. En: **Manual de pastos tropicales para la Amazonía Ecuatoriana** INIAP: Programa de Ganadería Bovina y Pastos. Pp 2-20. 1991.
- [21] GONZALEZ, Z.E., Optimización de la técnica inmunoenzimática ELISA para la detección de anticuerpos IgG contra *Trypanosoma* spp. en el ganado bovino. Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE. Tesis de Grado. Ecuador. 95 pp. 2016.
- [22] GONZATTI, M.; GONZALEZ-BARADAT, B.; ASO, P.M.; REYNA-BELLO, A., *Trypanosoma (Duttonella) vivax* and Trypanosomosis in Latin America: Secadera/ Huequera/ Cacho Hueco. En: **Trypanosomes and Trypanosomiasis**. Pp 261-285. 2014.
- [23] GUEGAN, F.; PLAZOLLES, N.; BALTZ, T.; COUSTOU, V., Erythrophagocytosis of desialylated red blood cells is responsible for anaemia during *Trypanosoma vivax* infection. **Cell Microbiol.** 15(8): 1285-1303. 2013.
- [24] GUGLIELMONE, A.A., Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. **Vet. Parasitol.** 57(1-3): 109-119. 1995.
- [25] HOLMAN, P.J.; SPENCER, A.M.; TELFORD, S.R., 3rd; GOETHERT, H.K.; ALLEN, A.J.; KNOWLES, D.P.; GOFF, W.L., Comparative infectivity of *Babesia divergens* and a zoonotic *Babesia divergens*-like parasite in cattle. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 73(5): 865-870. 2005.
- [26] LEMPEREUR, L.; BECK, R.; FONSECA, I.; MARQUES, C.; DUARTE, A.; SANTOS, M.; ZUQUETE, S.; GOMES, J.; WALDER, G.; DOMINGOS, A.; ANTUNES, S.; BANETH, G.; SILAGHI, C.; HOLMAN, P.; ZINTL, A., Guidelines for the Detection of Babesia and Theileria Parasites. **Vector Borne Zoonotic Dis.** 17(1): 51-65. 2017.
- [27] MASAKE, R.; MAJIWA, P.; MOLOO, J.; MAKAU, J.; NJUGUNA, J.; MAINA, M.; KABATA, J.; OLE-MOIYOI, O.; NANTULYA, V., Sensitive and specific detection of *Trypanosoma vivax* using the polymerase chain reaction. **Exp. Parasitol.** 85(2): 193-205. 1997.
- [28] MONTENEGRO-JAMES, S., Prevalence and control of babesiosis in the Americas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 87 (Suppl 3): 27-36. 1992.
- [29] MUÑOZ, T.; AYORA, P.; JIMENEZ, V., Prevalencia de *Anaplasma marginale* mediante extendidos sanguíneos en el Cantón Zamora, Provincia de Zamora Chinchipe. **Centro de Biotecnol.** 3(1): 44-51. 2014.
- [30] NAVARRETE, K., Optimización de un ensayo inmunoenzimático indirecto (iELISA) para la detección de anticuerpos IgG contra *Anaplasma marginale* en el ganado bovino. Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE. Tesis de Grado. Ecuador. 78 pp. 2016.
- [31] OLIVEIRA, J.; MONTOYA, J.; ROMERO, J.; URBINA, A.; SOTO-BARRIENTOS, N.; MELO, E.; RAMOS, C.; ARAÚJO, F., Epidemiology of bovine anaplasmosis in dairy herds from Costa Rica. **Vet. Parasitol.** 177(3-4): 359-365. 2011.
- [32] ORTEGA-MONTALVO, H.A.; RON-ROMÁN, J.; REYNA-BELLO, A.; CHÁVEZ-LARREA, M.A., First report and molecular identification of *Trypanosoma vivax* in cattle from Ecuador. **13th International Congress of Parasitology**. México D.F. 14/10-15. México. 1 pp. 2014.
- [33] RADOSTITS, O.; GAY, C.; HINCHCLIFF, K.; CONSTABLE, P. En: **Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. Joyce Rodenhuis (Ed). 10th Ed. Elsevier. London. 2065 pp. 2006.
- [34] RAMÍREZ-IGLESIAS, J.; ELEIZALDE, M.; GÓMEZ-PIÑERES, E.; MENDOZA, M., *Trypanosoma evansi*: A comparative study of four diagnostic techniques for trypanosomosis using rabbit as an experimental model. **Exp. Parasitol.** 128(1): 91-96. 2011.
- [35] REYNA-BELLO, A., Anaplasmosis bovina: logros y retos. En: **Logros & Desafíos de la ganadería de doble propósito**. Fundación GIRARZ. Pp 703-710. 2014.
- [36] REYNA-BELLO, A.; CLOECKAERT, A.; VIZCAÍNO, N.; GONZATTI, M.; ASO, P.; DUBRAY, G.; ZYGMUNT, M., Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5 for serological diagnosis of bovine anaplasmosis in Venezuela. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** 5(2): 259-262. 1998.
- [37] RODRÍGUEZ-VIVAS, R.I.; OJEDA-CHI, M.M.; ROSADO-AGUILAR, J.A.; TRINIDAD-MARTÍNEZ, I.C.; TORRES-ACOSTA, J.F.; TICANTE-PÉREZ, V.; CASTRO-MARIN, J.M.; TAPIA-MOO, C.A.; VÁZQUEZ-GÓMEZ, G., Red deer (*Cervus elaphus*) as a host for the cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in Yucatan, Mexico. **Exp. Appl. Acarol.** 60(4): 543-552. 2013.

- [38] SALIH, D.; HUSSEIN, A.; SINGLA, L., Diagnostic approaches for tick-borne haemoparasitic diseases in livestock **J. Vet. Med. Anim. Health.** 7(2): 45-56. 2015.
- [39] SALIH, D.A.; EL HUSSEIN, A.R.; AHMED, J.; SEITZER, U., Comparison between reverse line blot and enzyme-linked immunosorbent assay in diagnosis of major tick-borne diseases of cattle in Southern Sudan. **Transbound Emerg. Dis.** 57(1-2): 61-62. 2010.
- [40] SOTO, K., Determinación de la prevalencia de anaplasmosis en el ganado bovino faenado en la empresa metropolitana de rastro de Quito (EMRQ) mediante la aplicación de las técnicas de diagnóstico: microscopía de frotis sanguíneos, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y ensayo inmunoenzimático competitivo (cELISA). Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE. Tesis de Grado. Ecuador. 145-130 pp. 2010.
- [41] SOULSBY, E., Protozoa En: **Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos.** Interamericana: México. Pp 521-523. 1987.
- [42] STIJLEMANS, B.; BRYNS, L.; KORF, H.; BIENIASZ-KRZYWIEC, P.; SPARKES, A.; VANSINTJAN, L.; LENG, L.; VANBEKBERGEN, N.; MAZZONE, M.; CALJON, G.; VAN DEN ABEELE, J.; ODONGO, S.; DE TREZ, C.; MAGEZ, S.; VAN GINDERACHTER, J.; BESCHIN, A.; BUCALA, R.; DE BAETSELIER, P., MIF-Mediated Hemodilution Promotes Pathogenic Anemia in Experimental African Trypanosomosis. **PLOS Negl. Trop. Dis.** 12(9): 1-26. 2016.
- [43] SUÁREZ, C.; GARCÍA, F.; CORONADO, A.; PERRONE, T.; REYNA-BELLO, A.; PARRA, N., Factores de riesgo asociados a la tripanosomosis bovina en explotaciones ganaderas de Venezuela. **Zoot. Trop.** 27(4): 363-372. 2009.
- [44] SUÁREZ, C.E.; NOH, S., Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. **Vet. Parasitol.** 180(1-2): 109-125. 2011.
- [45] SVOBODOVÁ, M.; VOLF, P.; VOTÝPKA, J., Trypanosomatids in ornithophilic bloodsucking Diptera. **Med. Vet. Entomol.** 29(4): 444-447. 2015.
- [46] TANA, L.R., Identificación de *Anaplasma marginale* y su caracterización molecular por análisis de secuencia ribosomal 16S en poblaciones bovinas del Ecuador. Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE. Tesis de Grado. Ecuador. 67 pp. 2015.
- [47] TAVARES-MÁRQUES, L.; REYNA-BELLO, A., Estandarización de la técnica de PCR para el diagnóstico de la anaplasmosis bovina y ovina. **Agron. Trop.** 56: 501-510. 2006.
- [48] TORCOROMA, L.; ARDILLA, Y.; RINCÓN, D.; DÚRAN, C.; AGUILAR, J., A new PCR-RFLP for species specific diagnosis of South American Animal Trypanosomiasis. **Ame. J. Anim. Vet. Sci.** 9(2): 128-136. 2014.
- [49] UZCANGA, G.; PÉREZ-ROJAS, Y.; CAMARGO, R.; A., I.; NODA, J.; CHACÍN, R.; PARRA, N.; RON, L.; RODRÍGUEZ-HIDALGO, R.; BUBIS, J., Serodiagnosis of bovine trypanosomosis caused by non-tsetse transmitted *Trypanosoma (Duttonella) vivax* parasites using the soluble form of a Trypanozoon variant surface glycoprotein antigen. **Vet. Parasitol.** 218: 31-42. 2016.
- [50] VOTÝPKA, J.; SZABOVÁ, J.; RÁDROVÁ, J.; ZIDKOVÁ, L.; SVOBODOVÁ, M., *Trypanosoma culicavium* sp. nov., an avian trypanosome transmitted by Culex mosquitoes. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 62(3): 745-754. 2012.
- [51] YANG, Y.; LI, Q.; WANG, S.; CHEN, X.; DU, A., Rapid and sensitive detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. **Vet. Parasitol.** 219: 71-76. 2016.