



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

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

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

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

**TEMA: “DIAGNÓSTICO MOLECULAR Y PREVALENCIA DE *Babesia*
spp. MEDIANTE PCR-RFLP EN GANADO BOVINO DE LA
PROVINCIA DE MANABÍ – ECUADOR”**

AUTOR: ARBOLEDA GARCÍA, MARIO ANDRÉS

DIRECTORA: CHÁVEZ LARREA, MARÍA AUGUSTA MSc.

SANGOLQUÍ

2019



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, ***“DIAGNÓSTICO MOLECULAR Y PREVALENCIA DE Babesia spp. MEDIANTE PCR-RFLP EN GANADO BOVINO DE LA PROVINCIA DE MANABÍ – ECUADOR”*** fue realizado por el señor ***Arboleda García, Mario Andrés*** el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 28 de junio de 2019

Firma:



María Augusta Chávez Larrea, Msc.

C.C 0201274842



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, *Arboleda García, Mario Andrés* declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: *Diagnóstico molecular y prevalencia de Babesia spp. mediante PCR-RFLP en ganado bovino de la provincia de Manabí – Ecuador* es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, 22 de julio de 2019

Firma

Mario Andrés Arboleda García
C.C1722244397



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

*Yo, Arboleda García, Mario Andrés autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Diagnóstico molecular y prevalencia de Babesia spp. mediante PCR-RFLP en ganado bovino de la provincia de Manabí – Ecuador** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.*

Sangolquí, 22 de julio de 2019

Firma

A handwritten signature in blue ink, which appears to read 'Mario Andrés Arboleda', is written over a horizontal dashed line.

**Mario Andrés Arboleda García
C.C1722244397**

DEDICATORIA

“No es grande el que siempre triunfa, sino el que jamás se desalienta”.

José Luis Martín Descalzo

Quisiera dedicar este trabajo a mi madre, la mujer más fuerte y valiente que he conocido, quien me enseñó que hay suficiente fuerza dentro de mí para superar cualquier adversidad que me presente la vida.

A mi hermana, Verónica, con quien he compartido grandes momentos y siempre me ha brindado su apoyo.

A mi abuelita Alicia, quien ya no se encuentra a mi lado, pero su cariño y motivación permanece en mi corazón.

Mario Andrés Arboleda García

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo está dedicado con todo mi cariño para mi madre y mi hermana, quienes pusieron su confianza y apoyo en mí para que lograra cumplir un objetivo más en mi vida.

Un agradecimiento sincero a mi directora de tesis, Dra. María Augusta Chávez por darme la oportunidad y la confianza para realizar mi trabajo de titulación en el laboratorio de Biotecnología Animal.

Al Dr. Armando Reyna-Bello y al Dr. Jorge Ron Román por los conocimientos brindados durante la realización de esta investigación.

A Alma Koch, MSc. y a Claudia Segovia PhD., a quienes admiro y agradezco por sus consejos y conocimientos, que motivaron en mí el ser un mejor profesional y ser humano.

A mis compañeras y amigas de la universidad, Annie, Fer, Michu y Tephy con quien compartí dentro y fuera de las aulas, quienes se convirtieron en amigas de vida, gracias por todo su apoyo y diversión.

A los dueños de las fincas ganaderas del Cantón Pedernales, provincia de Manabí, Ecuador por permitir la recolección de muestras.

A los tesistas, pasantes y técnicos del laboratorio de Biotecnología Animal e Inmunología y Virología que brindaron su apoyo durante la realización de esta investigación, especialmente Mario Hernández a quien agradezco su ayuda durante la realización de este proyecto.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	i
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACIÓN	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
LISTADO DE ABREVIATURAS	xvi
RESUMEN.....	xvii
ABSTRACT	xviii
CAPITULO 1.....	19
INTRODUCCIÓN.....	19
1.1 Formulación del Problema.....	19
1.2 Justificación	21
1.3 Objetivos.....	23
1.3.1 Objetivo General.....	23

1.3.2	Objetivos Específicos	23
CAPITULO 2.....		24
MARCO TEÓRICO		24
2.1	Babesiosis	24
2.2	Babesiosis bovina	26
2.2.1	Signos clínicos	27
2.2.2	Taxonomía	30
2.2.3	Morfología	30
2.2.4	Transmisión	32
2.2.5	Ciclo biológico	32
2.2.6	Tratamiento.....	35
2.3	Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).....	37
2.4	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)	37
2.5	Georreferenciación	38
2.6	Sistema de Hipótesis.....	38
CAPITULO 3.....		39
MATERIALES Y MÉTODOS.....		39
3.1	Revisión Bibliográfica	39
3.2	Participantes.....	39
3.3	Duración de la investigación	40
3.4	Zona de estudio.....	40

3.5	Procedimiento.....	40
3.5.1	Fase de campo	40
3.5.2	Fase de laboratorio.....	43
3.5.3	Obtención de datos del registro zootécnico y encuesta	48
3.5.4	Análisis Estadístico.....	48
3.5.5	Estadística inferencial.....	51
CAPITULO 4.....		52
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		52
4.1	ANÁLISIS DE LA MUESTRA	52
4.1.1	Distribución de animales por finca.....	52
4.1.2	Distribución de animales muestreados de acuerdo al tipo de finca.....	52
4.1.3	Distribución de animales muestreados de acuerdo al sexo.....	53
4.1.4	Distribución de animales muestreados de acuerdo a la raza	53
4.1.5	Distribución de animales muestreados de acuerdo a la edad.....	54
4.1.6	Mediciones de tendencia central y distribución estándar	55
4.2	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR convencional).....	56
4.3	PCR – RFLP (Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción)	57
4.3.1	PREVALENCIA DE <i>Babesia</i> spp.....	57
4.4	ANÁLISIS UNIVARIADO	60
4.4.1	Prevalencia por tipo de finca	60
4.4.2	Prevalencia por sexo.....	61
4.4.3	Prevalencia por raza.....	62

4.4.4	Prevalencia por edad.....	62
4.4.5	Prevalencia en función de la temperatura.....	63
4.4.6	Prevalencia en función del hematocrito.....	64
4.4.7	Prevalencia en función de las proteínas totales	64
4.4.8	Correlación entre la prevalencia encontrada y los valores de temperatura, hematocrito y proteínas totales.....	65
4.5	FACTORES DE RIESGO	67
4.6	GEORREFERENCIACIÓN.....	69
	CAPITULO 5.....	71
	CONCLUSIONES.....	71
	CAPITULO 6.....	72
	RECOMENDACIONES.....	72
	BIBLIOGRAFÍA.....	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 <i>Vectores comprobados de ixodid de Babesia spp. de importancia veterinaria y/o médica</i>	25
Tabla 2 <i>Principales hallazgos clínicos en bovinos clínicamente sanos y enfermos.</i>	29
Tabla 3 <i>Principales hallazgos hematológicos en bovinos clínicamente sanos y enfermos.</i>	29
Tabla 4 <i>Principales parámetros bioquímicos en bovinos clínicamente sanos y enfermos.</i>	29
Tabla 5 <i>Medicamentos químicos utilizados para tratar la babesiosis.</i>	36
Tabla 6 <i>Componentes de PCR para detección de Babesia spp.</i>	46
Tabla 7 <i>Condiciones de amplificación por PCR para la detección de Babesia spp.</i>	46
Tabla 8 <i>Cuadro de contingencia para el cálculo de RR y OR.</i>	50
Tabla 9 <i>Distribución de animales muestreados de acuerdo al tipo de finca del cantón Pedernales, provincia de Manabí, Ecuador .</i>	53
Tabla 10 <i>Distribución de animales muestreados de acuerdo al sexo del cantón Pedernales, provincia de Manabí, Ecuador.</i>	53
Tabla 11 <i>Distribución de animales muestreados de acuerdo a la edad del cantón Pedernales, provincia de Manabí, Ecuador.</i>	54
Tabla 12 <i>Mediciones de tendencia central de la temperatura, hematocrito y proteínas totales.</i> .56	56
Tabla 13 <i>Resultados de PCR convencional para Babesia spp. de las muestras provenientes de las 31 fincas ganaderas del cantón Pedernales, provincia de Manabí, Ecuador.</i>	58
Tabla 14 <i>Prevalencia de Babesia bovis y Babesia bigemina de las 48 muestras obtenidas mediante PCR-RFLP</i>	59
Tabla 15 <i>Temperatura, hematocrito y proteínas totales como variables binomiales.</i>	66
Tabla 16 <i>Correlación entre Babesia spp. y hematocrito, proteínas totales y temperatura.</i>	66

Tabla 17 <i>Factores de riesgo de infección por Babesia spp. en la población bovina de Pedernales, Manabí</i>	67
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Distribuciones geográficas de vectores de garrapatas de la babesiosis bovina.	27
Figura 2 Babesias en diversos hospedadores y tejidos.....	31
Figura 3 Ciclo de vida de <i>Babesia</i>	35
Figura 4 Fragmentos esperados después de la digestión enzimática con AluI.	47
Figura 5 Amplificación de la región del gen 18S rRNA de 6 muestras positivas 316, 342, 352, R07, R10 y R14 a <i>Babesia</i> spp del cantón Pedernales, provincia de Manabí, Ecuador.	57
Figura 6 Fragmentos digeridos con AluI.	57
Figura 7 Resultados de PCR convencional para la identificación de <i>Babesia</i> spp. en las 31 fincas ganaderas del cantón Pedernales, provincia de Manabí, Ecuador.	58
Figura 8 Distribución geográfica de <i>Babesia</i> spp. en el ganado bovino de la parroquia Pedernales, cantón Pedernales, provincia de Manabí - Ecuador.	69
Figura 9 Distribución geográfica de <i>Babesia</i> spp., <i>Trypanosoma</i> spp. y Brucelosis en el ganado bovino de la parroquia Pedernales, cantón Pedernales, provincia de Manabí - Ecuador.	70

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Modelo de encuesta aplicada en la finca ganadera.

Anexo 2 Modelo encuesta epidemiológica.

Anexo 3 Registro de muestras y registro para muestras en laboratorio.

Anexo 4 Base de datos utilizada para análisis estadísticos.

Anexo 5 Distribución de la muestra de acuerdo a las fincas ganaderas (FG) del cantón Pedernales, provincia de Manabí, Ecuador.

Anexo 6 Distribución de animales muestreados de acuerdo a la raza del cantón Pedernales, provincia de Manabí, Ecuador.

Anexo 7 Distribución de datos de los animales muestreados en función de la temperatura del cantón Pedernales, provincia de Manabí, Ecuador.

Anexo 8 Distribución de datos de los animales muestreados en función del hematocrito del cantón Pedernales, provincia de Manabí, Ecuador.

Anexo 9 Distribución de datos de los animales muestreados en función de las proteínas totales del cantón Pedernales, provincia de Manabí, Ecuador.

Anexo 10 Prevalencia de *Babesia* spp. obtenida mediante PCR convencional de las 31 fincas ganaderas del cantón Pedernales, provincia de Manabí, Ecuador.

Anexo 11 Prevalencia de *Babesia* spp. en función del tipo de finca ganadera del cantón Pedernales, provincia de Manabí, Ecuador.

Anexo 12 Prevalencia de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en función del tipo de finca ganadera del cantón Pedernales, provincia de Manabí, Ecuador.

Anexo 13 Prevalencia de *Babesia* spp. en función del sexo del ganado bovino del cantón Pedernales, provincia de Manabí, Ecuador.

Anexo 14 Prevalencia de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en función del sexo del ganado bovino del cantón Pedernales, provincia de Manabí, Ecuador.

Anexo 15 Prevalencia de *Babesia* spp. en función de la raza del ganado bovino del cantón Pedernales, provincia de Manabí, Ecuador.

Anexo 16 Prevalencia de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en función de la raza del ganado bovino del cantón Pedernales, provincia de Manabí, Ecuador.

Anexo 17 Prevalencia de *Babesia* spp. en función de la edad del ganado bovino del cantón Pedernales, provincia de Manabí, Ecuador.

Anexo 18 Prevalencia de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en función de la edad del ganado bovino del cantón Pedernales, provincia de Manabí, Ecuador.

Anexo 19 Prevalencia de *Babesia* spp. en función de la temperatura del ganado bovino del cantón Pedernales, provincia de Manabí, Ecuador.

Anexo 20 Prevalencia de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en función de la temperatura del ganado bovino del cantón Pedernales, provincia de Manabí, Ecuador.

Anexo 21 Prevalencia de *Babesia* spp. en función del hematocrito del ganado bovino del cantón Pedernales, provincia de Manabí, Ecuador.

Anexo 22 Prevalencia de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en función del hematocrito del ganado bovino del cantón Pedernales, provincia de Manabí, Ecuador.

Anexo 23 Prevalencia de *Babesia* spp. en función de las proteínas totales del ganado bovino del cantón Pedernales, provincia de Manabí, Ecuador.

Anexo 24 Prevalencia de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en función de las proteínas totales del ganado bovino del cantón Pedernales, provincia de Manabí, Ecuador.

Anexo 25 Prevalencia de *Babesia* spp. de acuerdo a las localidades del cantón Pedernales, provincia de Manabí, Ecuador.

LISTADO DE ABREVIATURAS

PCR: Reacción de cadena de polimerasa

RFLP: Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción

ADN: Ácido desoxiribonucleico

bp: Pares de bases

PIRO A: Cebador para apicomplexas

PIRO B: Cebador reverso para apicomplexas

rRNA: ARN ribosomal

dNTPs: Desoxiribonucleótidos trifosfato

Kbp: Kilo pares de base

pH: Concentración de iones H⁺, medida de acidez o basicidad de una disolución

rpm: Revoluciones por minuto

spp.: Especie

Taq: *Thermus aquaticus*

UV: Luz ultra violeta

Mw: Magnitud de momento

m.s.n.m: Metro sobre el nivel del mar

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

PBS: Tampón fosfato salino

CTAB: Bromuro de cetiltrimetilamonio

DMSO: Sulfóxido de dimetilo

TBE: Tris/Borato/EDTA

n: tamaño muestra

RESUMEN

Babesiosis bovina es una enfermedad transmitida por garrapatas, causada por parásitos protozoarios del género *Babesia*. Se encuentra en regiones tropicales y subtropicales donde presenta anemia, hemoglobinuria, cese de la rumia, debilidad, palidez de mucosa y en casos muy graves la muerte. Las técnicas de diagnóstico molecular están reemplazando a los métodos microscópicos y serológicos debido a su alta sensibilidad en la detección de animales asintomáticos y con niveles bajos de parasitemia, por esta razón esta investigación tuvo como objetivo diagnosticar molecularmente *Babesia* spp. mediante PCR-RFLP al ganado bovino del cantón Pedernales, provincia de Manabí - Ecuador. Se obtuvieron 462 muestras de animales distribuidas en 31 fincas ganaderas del Cantón Pedernales, provincia de Manabí – Ecuador, recolectadas en los meses de octubre y diciembre del 2018. El ADN extraído fue analizado mediante PCR convencional utilizando los cebadores piro A y piro B que amplifican una porción del gen 18S rRNA de *Babesia* spp. de ~400 pb, se obtuvo una prevalencia de 64,35% a *Babesia* spp. Se seleccionaron 48 muestras positivas al azar y se las digirió utilizando la endonucleasa de restricción AluI, que permitió la identificación de 6/48 muestras positivas a *B. bovis* y 42/48 muestras positivas a *B. bigemina*. Los resultados se compararon con pruebas rápidas de laboratorio como hematocrito, proteínas totales y temperatura, y con datos obtenidos mediante una encuesta zootécnica y epidemiológica, sin embargo, análisis estadísticos realizados mostraron que ni el sexo, raza, edad, hematocrito, proteínas totales, temperatura, movilización de animales fuera de la finca o presencia de garrapatas son indicativos de la presencia o ausencia de *Babesia* spp.

PALABRAS CLAVE:

- **BABESIOSIS BOVINA**
- **PCR-RFLP**
- **FACTORES DE RIESGO**

ABSTRACT

Bovine babesiosis is an important disease transmitted by ticks, caused by protozoan parasites of the genus *Babesia*. It is present in tropical and subtropical regions where it is characterized by anemia, hemoglobinuria, cessation of rumination, weakness, pallor of the oral and genital mucose and in very serious cases death. Molecular diagnostic is replacing microscopic and serological techniques due to its high sensitivity in the detection of asymptomatic animals and low levels of parasitaemia, this research aimed to molecularly diagnose *Babesia* spp. by PCR-RFLP in bovine cattle of the Pedernales canton, province of Manabí - Ecuador. Samples were collected from 462 animals distributed in 31 cattle farms of the Pedernales canton, province of Manabí - Ecuador, collected in the months of October and December 2018. DNA extracted from samples was analyzed by conventional PCR using piro A and pyro B primers, that amplify a portion of the 18S rRNA gene of *Babesia* spp. of ~ 400 bp, analysis showed a prevalence of 64.35% to *Babesia* spp. 48 positive samples were selected at random and subjected to enzymatic digestion using the restriction endonuclease AluI, which allowed the identification of 6/48 samples positive for *B. bovis* and 42/48 samples positive for *B. bigemina*. Results were compared with rapid laboratory tests such as hematocrit, total proteins and temperature, and with data obtained through a zootechnical and epidemiological survey; however, the statistical analyzes carried out showed that neither sex, race, age, hematocrit, total proteins, temperature, mobilization of animals outside the farm or presence of ticks can be indicative of whether an animal is a carrier or not of the parasite.

KEY WORDS:

- **BOVINE BABESIOSIS**
- **PCR-RFLP**
- **RISK FACTORS**

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del Problema

La Babesiosis bovina es una enfermedad transmitida por garrapatas, causada por protozoos pertenecientes al phylum apicomplexa, orden piroplasmida y género *Babesia*, que causan una alta morbilidad y mortalidad a nivel mundial (McCosker, 1981), *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* muestran una alta prevalencia en áreas tropicales y subtropicales, con la mayor incidencia entre 32° N y 30° S de latitud, donde se encuentran comúnmente los vectores de la garrapata *Boophilus* (Ristic, 1988), causando pérdidas económicas en los rebaños de ganado de los países que se encuentran en estas zonas (Bock, Jackson, De Vos, & Jorgensen, 2004).

La primera referencia registrada de babesiosis se encuentra probablemente en el libro bíblico Éxodo 9:3, en el cual se describe una plaga del ganado durante el reinado del faraón Ramsés II que podría haber sido fiebre roja del ganado, causada por *Babesia bovis*, y podría haber incluido hemoglobinuria como un signo prevalente (Vial & Gorenflot, 2006). Muchos años después, como respuesta a una enfermedad del ganado persistente, el gobierno rumano estableció en 1887 una comisión encabezada por el Dr. Victor Babes para investigar y determinar la causa y solución del problema. El Dr. Babes concluyó que la causa de la enfermedad, denominada hemoglobinuria enzoótica, era un pequeño organismo intraeritrocítico que, en 1888, llamó *Haematococcus bovis* (Babes, 1888). Starcovici, miembro del equipo de investigación de Babes, cambió el nombre al agente etiológico por *Babesia bovis* en 1893 (Starcovici, 1893). Poco después, el agente de la Fiebre del Ganado de Texas presente en Estados Unidos, inicialmente llamado Pyrosoma, fue

descubierto por Smith y Kilbourne en 1893 (Smith & Kilborne, 1893) y luego fue identificado como *Babesia bigemina*.

En Argentina, Lignières (1903) describió dos formas de la enfermedad 'Tristeza' (babesiosis), Forma A y Forma C. Estas más tarde serían conocidas como *Babesia bigemina* y *B. argentina* (*B. bovis*). En Bolivia, Nicholls, Ibata, and Rodas (1980) reportó una prevalencia del 97% de anticuerpos a *B. bovis* en ganado lechero en la región oriental tropical del país. En los llanos del este de Colombia que se encuentran al sur de los ríos Upia y Meta, extendiéndose a lo largo del piedemonte de la cordillera de los Andes, se realizaron estudios de campo por Corrier et al. (1978) donde se determinó una prevalencia media de *B. bigemina* y *B. argentina* del 62% y 13%, respectivamente de 3,035 muestras de suero tomada de 37 ranchos.

En el Ecuador, la prevalencia de *Babesia* spp. varía según las regiones, Medina Naranjo et al. (2017) reportó una prevalencia de 0% para *Babesia* spp. en tres fincas ganaderas de la provincia de Pastaza mediante la técnica de PCR. Por otro lado, León Jaramillo (2017) reportó, en la provincia de Zamora Chinchipe, una prevalencia general de *Babesia* spp. mediante la técnica nPCR de 71,43%. En cuanto a la región insular Jumbo Moreira (2018) reportó una prevalencia de 25,88% para *Babesia* spp. en 19 fincas ganaderas bovinas de la Isla Santa Cruz de la provincia de Galápagos utilizando la técnica de PCR.

Conocer el estado de los animales permitirá idear medidas para el control y prevención de enfermedades transmitidas por garrapatas, como babesiosis, que causan pérdidas económicas en el sector ganadero del país, por lo que la presente investigación se enfoca en el uso de herramientas moleculares para la determinación de la presencia y prevalencia de *Babesia* spp. en ganado del cantón de Pedernales provincia de Manabí además de identificar la posible relación con parámetros fisiológicos y zootécnicos de cada animal.

1.2 Justificación

Los principales vectores de *Babesia* son las garrapatas del género *Boophilus*. Las manifestaciones clínicas asociadas con esta enfermedad son típicas de un proceso de enfermedad por anemia hemolítica, pero varían según el agente y los factores del huésped, es decir, la edad (Jacobson, 2006) y el estado inmunológico (Homer, Aguilar-Delfin, Telford, Krause, & Persing, 2000). Babesiosis se observa predominantemente en el ganado adulto con *B. bovis* el cual es, generalmente, más patógeno que *B. bigemina* y *B. divergens* (Uilenberg, 2006).

Según reportes de los ganaderos, registrados por el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), en Manabí, en enero de 2017 se han presentado 120 animales muertos por síntomas asociados a la presencia de hemoparásitos. De acuerdo a la encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continúa realizada en el año 2017 por el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC), la provincia con mayor número de cabezas de ganado es Manabí con un número de cabezas de ganado de 896.476 y una producción de leche de 587.252 litros. Datos del Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca MAGAP (2019) indican que en esta provincia se realizan continuamente ferias ganaderas organizadas por la Corporación de Ganaderos de Manabí (CORPOGAM), donde se promueve la venta de ganado que es llevado a sectores de todo el país. Por lo que un control de las enfermedades que puedan presentar los animales es necesario.

El 16 de abril de 2016, la costa ecuatoriana fue sacudida por un terremoto que alcanzó la magnitud 7.8 Mw con epicentro frente a las costas de Muisne. Las intensidades que alcanzó este evento fueron de hasta 9 EMS-98 en la población de Pedernales, provincia de Manabí, donde se registraron los mayores daños (Cisneros & Nocquet, 2017). Esta catástrofe causó el colapso de casas, vías y animales muertos o heridos que se reflejó a través de la reducción de la producción

de leche y carne, contaminación del suelo y el agua, aumento de los sitios de reproducción de los vectores y alta exposición y proliferación de vectores de enfermedades como babesiosis bovina (Asokan & Vanitha, 2017).

Los costos debidos a la babesiosis se deben no solo por la mortalidad, el mal manejo, los abortos, la pérdida de producción de leche/carne y por las medidas de control, sino también por su impacto en la salud internacional y comercio de ganado (Bock et al., 2004). McLeod and Kristjanson (1999) desarrollaron un modelo de hoja de cálculo (Costo de garrapata) para evaluar el impacto general de las garrapatas y las enfermedades transmitidas por garrapatas. Calcularon que las pérdidas y el control de la babesiosis y la anaplasmosis le costaron a la industria ganadera australiana US \$ 16.9 millones por año.

Las técnicas microscópicas para el examen de sangre usadas en el diagnóstico de babesiosis aguda, poseen baja sensibilidad y no permiten su uso en estudios epidemiológicos en los que es necesario identificar animales portadores (Almería et al., 2001). Varios métodos serológicos estandarizados para el diagnóstico de babesiosis se han empleado ampliamente en estudios de campo epidemiológicos, pero entre los inconvenientes de estas técnicas están la aparición de reacciones cruzadas entre *B. bovis* y *B. bigemina* (Passos, Bell-Sakyi, & Brown, 1998) y la falta de discriminación entre la exposición previa y las infecciones actuales (Wagner et al., 1992). Por lo que la aplicación de pruebas basadas en PCR para el estudio de babesiosis brindan una alta sensibilidad y especificidad para la detección de infecciones tanto en huéspedes vertebrados como en garrapatas (Oliveira-Sequeira, Oliveira, Araujo Jr, & Amarante, 2005).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Diagnosticar molecularmente *Babesia* spp. mediante PCR-RFLP al ganado bovino de la provincia de Manabí - Ecuador.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Aplicar el método de PCR-RFLP para determinar la presencia y prevalencia de *Babesia* spp. en muestras sanguíneas obtenidas de ganado bovino de la provincia de Manabí - Ecuador.
- Evaluar la relación entre los parámetros fisiológicos y zootécnicos con la presencia de *Babesia* spp. en el ganado bovino de la provincia de Manabí - Ecuador.
- Georeferenciar las fincas muestreadas y determinar los factores riesgo para la presencia de *Babesia* spp. en el ganado bovino de la provincia de Manabí - Ecuador.

CAPITULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1 Babesiosis

La babesiosis también conocida como piroplasmosis, fiebre de la garrapata, agua roja, fiebre de Texas, fiebre esplénica, tristeza, etc., es el nombre de la enfermedad que se origina debido a la infección de eritrocitos por parte de protozoos del género *Babesia* transmitida por garrapatas (Ristic, 1988). El papel del vector de las garrapatas para estos parásitos fue descubierto por Smith and Kilborne (1893), quienes fueron los primeros en demostrar la transmisión de artrópodos de un agente patógeno.

En la naturaleza, las babesias se transmiten biológicamente por las garrapatas de la familia Ixodidae o garrapatas duras, sin embargo, otros medios mecánicos de transmisión, como moscas y fómites que transfieren sangre a un huésped susceptible, pueden inducir teóricamente una infección (Ristic, 1988).

Existen 22 vectores confirmados de 18 especies de *Babesia* que infectan animales o humanos agrícolas o de compañía enlistados en la Tabla 1. La mayoría de especies de garrapatas transmiten solo una especie de *Babesia* de importancia económica o médica, y la mayoría de *Babesia* spp. son transmitidas por relativamente pocas especies de garrapatas; aunque *B. caballi*, tiene 7 vectores confirmados (Battsetseg et al., 2001). Se han informado treinta asociaciones de vectores de *Babesia* adicionales, con credibilidad de transmisión epidemiológica, pero sin confirmación (J. S. Gray, Estrada-Peña, & Zintl, 2019).

Tabla 1

Vectores comprobados de ixodid de Babesia spp. de importancia veterinaria y/o médica

Hospedero	Especie de <i>Babesia</i>	Distribución geográfica de la enfermedad	Vectores comprobados
Bovino	<i>Babesia bigemina</i>	Trópicos y subtrópicos	<i>Rhipicephalus annulatus</i> <i>R. australis</i> <i>R. decoloratus</i> <i>R. microplus</i> <i>R. evertsi</i> <i>R. bursa</i>
	<i>Babesia bovis</i>	Trópicos y subtrópicos	<i>R. annulatus</i> <i>R. australis</i> <i>R. microplus</i>
	<i>B. divergens</i>	Europa, África del Norte, Rusia	<i>Ixodes ricinus</i>
	<i>B. major</i>	Europa, norte de África, Asia templada	<i>Haemaphysalis punctata</i>
	<i>B. occultans</i>	África (sur de Europa, Rusia)	<i>Hyalomma rufipes</i>
	<i>B. orientalis</i>	Este de Asia	<i>R. haemaphysaloides</i>
Equino	<i>B. ovata</i>	Este de Asia	<i>Ha. longicornis</i>
	<i>B. caballi</i>	Europa	<i>Dermacentor reticulatus</i>
		Asia templada	<i>D. silvarum</i>
		América del norte	<i>D. (Anocentor) nitens</i>
		América del norte	<i>D. albipictus</i>
Canino	<i>B. canis</i>	Sur de Europa, norte de África	<i>Hy. marginatum</i>
		África sub-sahariana	<i>Hy. truncatum</i>
	<i>B. rossii</i>	África sub-sahariana	<i>R. evertsi</i>
		Europa	<i>D. reticulatus</i>
		África del Sur	<i>Ha. elliptica</i>
<i>B. vogeli</i>	Trópicos y subtrópicos	<i>R. sanguineus</i> s.l.	
<i>B. gibsoni</i>	En todo el mundo	<i>Ha. longicornis</i>	
Humano	<i>B. divergens</i>	Europa	<i>I. ricinus</i>
	<i>B. venatorum</i>	Europa	<i>I. ricinus</i>
	<i>B. microti</i>	Europa	<i>I. ricinus</i>
		América del norte	<i>I. scapularis</i>

Fuente: J. S. Gray et al. (2019)

Parásitos del género *Babesia* pueden afectar tanto a mamíferos domésticos como salvajes (Penzhorn, 2006), sin embargo, la industria ganadera es la que presenta el mayor impacto económico. Las especies más estudiadas que afectan a bovinos son *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Babesia divergens* (Bock et al., 2004).

2.2 Babesiosis bovina

La industria del ganado se ve particularmente afectada por los parásitos de *Babesia*, ya que más de la mitad de los 1,2 mil millones de bovinos del mundo están en riesgo de infección y enfermedad (Gohil, Herrmann, Günther, & Cooke, 2013), el transporte de animales domésticos en todo el mundo ha sido responsable de la introducción de vectores de garrapatas y *Babesia* spp. en diferentes áreas y es en el hemisferio sur donde se producen las mayores pérdidas económicas (Bock et al., 2004). Las especies que afectan al ganado que se encuentran más ampliamente representadas en la literatura son *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Babesia divergens*, la distribución global de estas especies depende de la distribución de garrapatas Ixodidae como se evidencia en la figura 1 (Young & Morzaria, 1986). Tanto *B. bovis* como *B. bigemina* se transmiten más comúnmente entre el ganado bovino por los vectores de garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y *Rhipicephalus annulatus* (J. S. Gray et al., 2019) mostrando una alta prevalencia en áreas tropicales y subtropicales (Bock et al., 2004), mientras que *Babesia divergens* tiene una distribución restringida a Europa en asociación con su vector de tres anfitriones *Ixodes ricinus* (Ristic, 1988).

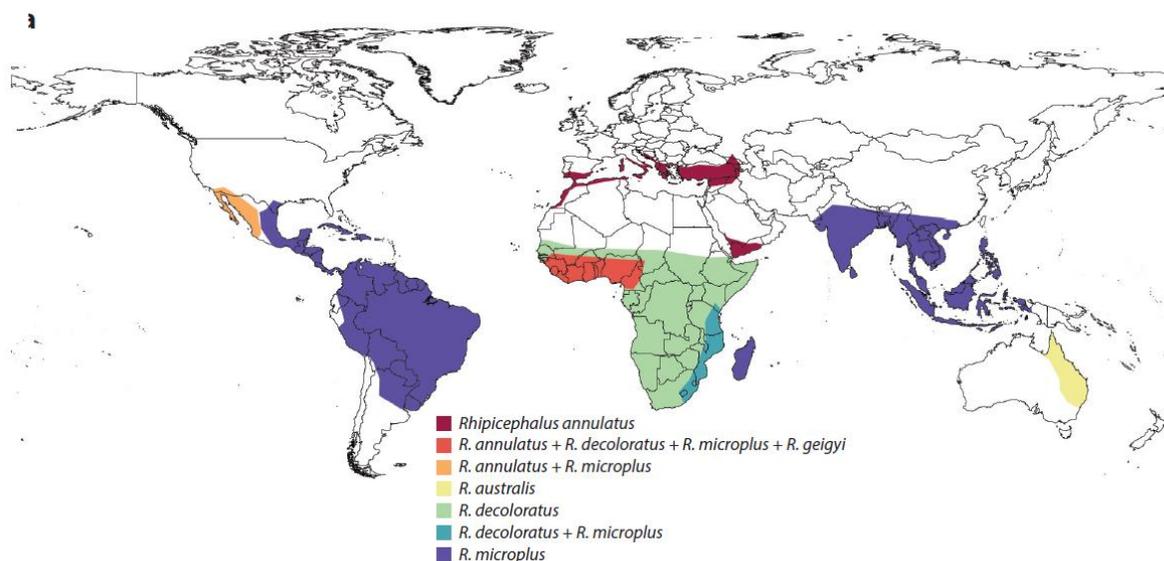


Figura 1. Distribuciones geográficas de vectores de garrapatas de la babesiosis bovina.

Se muestra solo la distribución de las garrapatas *Boophilus*, que transmiten las especies bovinas más importante económicamente, *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*.

Fuente: J. S. Gray et al. (2019)

2.2.1 Signos clínicos

El ganado que padece babesiosis muestra sintomatología similar a la malaria, como destrucción masiva de eritrocitos debido a la multiplicación de hemoparásitos dentro las células (Bock et al., 2004), fiebre, anemia hemolítica y en casos graves la muerte (Ristic, 1988). Esta enfermedad cuenta con una alta morbilidad y mortalidad en todo el mundo (McCosker, 1981) que depende de las condiciones en las que los animales son mantenidos. No hay evidencia de que el ganado pueda resistir la infección babesial hasta el punto de inhibir completamente la multiplicación de todas las cepas, esto se aplica tanto al ganado infectado por primera vez como al ganado que ha estado expuesto una o varias veces (Miller, 2012).

En casos más prolongados se pueden detectar otros síntomas como son el aumento marcado de la temperatura corporal (40-41) °C, pérdida de apetito, cese de la rumia, dificultad para respirar, hemoglobinuria, debilidad, palidez marcada de la mucosa oral y genital, disminución de la producción de leche y reluctancia a moverse (Zulfiqar et al., 2012). La fiebre durante las infecciones puede hacer que las vacas preñadas aborten y los toros muestren una fertilidad reducida que dura de seis a ocho semanas (Yüksek, Altuğ, & Gül, 2007). El ganado infestado con *Babesia* spp. generalmente tienen un largo período de infección subclínica. Durante estas infecciones crónicas se pueden observar variaciones cíclicas en el nivel de parasitemia detectable (Miller, 2012).

La inmunidad a la infección por *Babesia* depende de la resistencia innata del huésped además de la capacidad de respuesta específica a los antígenos babesiales dependientes de la raza, el estado fisiológico debido a la edad y la exposición previa del ganado a la infección. (Ristic, 1988).

El bazo desempeña un papel crítico en la protección contra *Babesia* spp. porque los fagocitos e histiocitos residentes ingieren y eliminan los glóbulos rojos infectados. Dado que la anemia suele ser más grave de lo que predice la parasitemia, es probable que se eliminen los glóbulos rojos no infectados (Vannier, Diuk-Wasser, Mamoun, & Krause, 2015).

Entro los signos clínicos hematológicos que presentan animales con babesiosis se encuentran la disminución del 50% en la medida del hematocrito o PCV (packed cell volume) (Magona et al., 2008), mientras que hallazgos bioquímicos revelaron una disminución en el número de proteínas totales y en el nivel de albúmina con un aumento de las globulinas séricas (Hussein, Mohammed, & Mohammed, 2007). Las tablas 2, 3 y 4 muestran un resumen de signos clínicos, hematológicos y bioquímicos presentes en animales con babesiosis.

Tabla 2

Principales hallazgos clínicos en bovinos clínicamente sanos y enfermos.

Signo clínico	Sano	Enfermo
Condición corporal	Buena	Delgada
Membrana mucosa	Rojo brillante, humedecido sin lesiones y con vasos sanguíneos episclerales llenos.	Vasos sanguíneos episclerales pálidos y vacíos.
Temperatura	38.7°C	40.1°C
Pulso	57 latidos/minuto	89 latidos/minuto
Respiración	21 ciclos respiratorios/min	39 ciclos respiratorios/min
Nodos linfáticos	Sin hinchazón, movable, sin calor, indoloro.	Sin hinchazón, movable, sin calor.
Orina	Amarillo claro	Marrón oscuro a café.

Tabla 3

Principales hallazgos hematológicos en bovinos clínicamente sanos y enfermos.

Parámetro	Sano	Enfermo
RCB (Red blood cells count)	7.67±0.43 (T/l)	3.09±0.38 (T/l)
Hb (Hemoglobina)	118.93±3.07 (g/l)	45.37±0.98 (g/l)
PCV (Packed cell volume)	36.47±0.75 %	14.25±1.28 %
WBC (White blood cells count)	7.25±0.42 (G/l)	6.77±0.67 (G/l)

Tabla 4

Principales parámetros bioquímicos en bovinos clínicamente sanos y enfermos.

Parámetro	Sano	Enfermo
------------------	-------------	----------------

Proteínas totales	6.92±0.15 (gm %)	5.82±0.28 (gm %)
Albumina	3.64±0.0085 (gm %)	1.86±0.16 (gm %)
Globulina	3.28±0.0098 (gm %)	3.96±0.38 (gm %)
Glucosa	71.31±3.48 (mg %)	32.71±3.12 (mg %)

Fuente: (Hussein et al., 2007)

2.2.2 Taxonomía

La posición taxonómica de los parásitos responsables de la babesiosis de acuerdo a (Bock et al., 2004) es la siguiente:

Reino: Protista

Alveolata

Filo: Apicomplexa

Clase: Aconoidasida

Orden: Piroplasmida

Familia: Babesiidae

Género: *Babesia*

Los babesios se clasifican como parásitos apicomplexos del suborden Piroplasmidea y de la familia Babesiidae debido a su invasión exclusiva de eritrocitos, la multiplicación por brotes y la falta de hemozoína (Hunfeld, Hildebrandt, & Gray, 2008).

2.2.3 Morfología

De acuerdo a su morfología las babesias se dividen en dos grupos (Laha, Das, & Sen, 2015):

- i. babesias pequeñas (1.0–2.5 μm de largo)
- ii. babesias grandes (2.5–5.0 μm de largo)

2.2.3.1 *Babesia bovis*

Poseen forma pequeña ($2.0 \mu\text{m} \times 1.5 \mu\text{m}$), ligeramente más grande que *B. divergens*, las formas de anillos vacuolados son particularmente comunes (Laha et al., 2015).

2.2.3.2 *Babesia bigemina*

Poseen forma pequeña ($1.5\mu\text{m} \times 0.4\mu\text{m}$), usualmente permanecen en forma emparejada, se encuentran superficialmente en los glóbulos rojos en formas gruesas y piriformes o circulares (Laha et al., 2015). La figura 2 muestra algunos ejemplos de formas de babesia en diferentes tejidos.

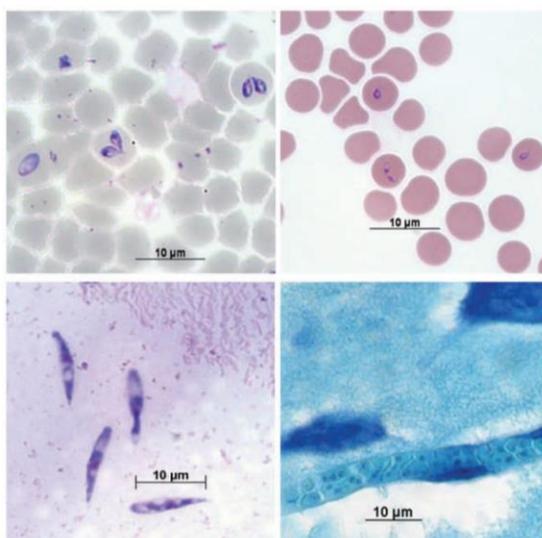


Figura 2. Babesias en diversos hospedadores y tejidos.

A) *Babesia bigemina* en eritrocitos bovinos. Frotis de sangre teñido con Giemsa. B) *Babesia bovis* en eritrocitos bovinos. Frotis de sangre teñido con Giemsa. C) *Babesia bigemina* kinetes en hemolinfa de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Frotis de hemolinfa teñido con Giemsa. D) *Babesia bovis* en un cerebro capilar bovino. Corte histológico del tejido cerebral teñido con Giemsa.

Fuente: Mosqueda, Olvera-Ramirez, Aguilar-Tipacamu, and Canto (2012)

2.2.4 Transmisión

Todas las especies de babesia se transmiten de forma natural por la picadura de garrapatas infectadas. Durante la picadura de la garrapata, los esporozoitos se inyectan en el huésped e infectan directamente los glóbulos rojos, este proceso separa a *Babesia* spp. de *Theileria* spp., donde los esporozoitos no infectan fácilmente los glóbulos rojos, sino que inicialmente penetran en un linfocito o macrófago en el que tiene lugar el desarrollo en esquizontes (Uilenberg, 2006). En el huésped, los esporozoitos se convierten en piroplasmas dentro del eritrocito infectado, dando como resultado dos o cuatro células hijas que abandonan la célula huésped para infectar a otros eritrocitos hasta que el huésped muera o la inmunidad del huésped elimine los parásitos (Hunfeld et al., 2008). El bazo con su función de filtro linfático-reticular es esencial para resistir las infecciones primarias de *Babesia* spp. al eliminar específicamente las células infectadas de la circulación, probablemente a través de una combinación de microcirculación del bazo y actividad celular fagocítica estimulada (J. Gray, Zintl, Hildebrandt, Hunfeld, & Weiss, 2010).

2.2.5 Ciclo biológico

Babesia ha desarrollado estrategias únicas para completar su ciclo de vida y transmisión. Los objetivos reproductivos esenciales son: (i) perpetuar su existencia parasitaria por propagación, y (ii) garantizar la transmisión de huésped a huésped a través de etapas infecciosas especializadas. Ambos objetivos están mediados por la combinación de dos ciclos de reproducción asexual y un ciclo de reproducción sexual, que alternan entre el huésped vertebrado y el vector de garrapata (Jalovecka, Sojka, Ascencio, & Schnittger, 2019). La característica más notable del ciclo de vida de *Babesia* es que los organismos ingeridos por las garrapatas en una generación son

extremadamente infecciosos para el ganado durante una etapa parasitaria de la siguiente generación de garrapatas (Miller, 2012).

El ciclo de vida sigue el esquema de desarrollo arquetípico de los miembros de Apicomplexa, que incluye tres fases sucesivas: merogonía, gamogonía y esporogonia como se observa en la Figura 3 (White & Suvorova, 2018). El huésped vertebrado está infectado por el esporozoito infeccioso durante la alimentación de la garrapata. Los esporozoitos invaden los glóbulos rojos del huésped, donde se convierten en trofozoitos. Los trofozoitos se dividen en merozoitos a través del proceso de merogonía (fisión binaria), luego salen y re-infectan otros eritrocitos del huésped. La gamogonía (reproducción sexual) se inicia por la unión sexual de los merozoitos con los gametocitos intraeritrocíticos, la etapa transitoria que infecta el vector de garrapata (huésped definitivo). Los gametocitos que son captados en la luz intestinal de la garrapata durante la alimentación se convierten en gametos. Los gametos de Babesia, conocidos como `ray bodies` o Strahlenkörper, se fusionan y crean un cigoto móvil denominado ookinete. El ookinete penetra en la matriz peritrófica (membrana no celular semipermeable que rodea la luz del intestino medio de la garrapata) e invade las células intestinales de la garrapata. Una vez dentro del epitelio, el cigoto experimenta división meiótica, lo que resulta en la producción de kinetes. Los kinetes se diseminan a través de la garrapata del líquido corporal (hemolinfa) a los tejidos periféricos de la garrapata, incluidas las células ováricas. La invasión de los ovarios de garrapatas provoca la infección de los óvulos y conduce a la transmisión transovarial de Babesia. En paralelo, los kinetes primarios invaden otros órganos de la garrapata y, a través de la esquizogonía (fisión múltiple), se multiplican para crear los kinetes secundarios que invaden las glándulas salivales de la garrapata. Dentro de las células de las glándulas salivales, los kinetes invasores se convierten en un sincitio multinucleado (esporoblasto), que permanece latente durante la ecdysis de garrapata, lo que

garantiza la transmisión transestadial del parásito. Una vez que el siguiente estadio de garrapata infectado inicia la alimentación de sangre en un huésped, se activa el esporoblasto y se producen múltiples esporozoitos infecciosos de forma continua por el proceso de esporogonía y se liberan en el torrente sanguíneo del huésped (Jalovecka et al., 2019).

Los parásitos de *Babesia* han desarrollado estrategias para adaptarse a la alimentación y muda de sus garrapatas vectores (Jalovecka, Hajdusek, Sojka, Kopacek, & Malandrin, 2018). Debido a que las garrapatas duras (Ixodidae) se alimentan solo una vez por estadio (Sonenshine & Roe, 2013), *Babesia* ha desarrollado la capacidad de perdurar en las diferentes etapas de desarrollo de las garrapatas, este mecanismo es conocido como transmisión transestadial (Mehlhorn & Schein, 1985). *B. bovis* solo es capaz de ser transmitida mediante larvas, mientras que la transmisión de *B. bigemina* no se produce hasta las etapas adulta y ninfal (J. S. Gray et al., 2019). Una estrategia adicional para la perpetuación de *Babesia* es la transmisión transovárica, que permite la propagación del parásito de una sola garrapata materna a miles de descendientes (Mehlhorn & Schein, 1985).

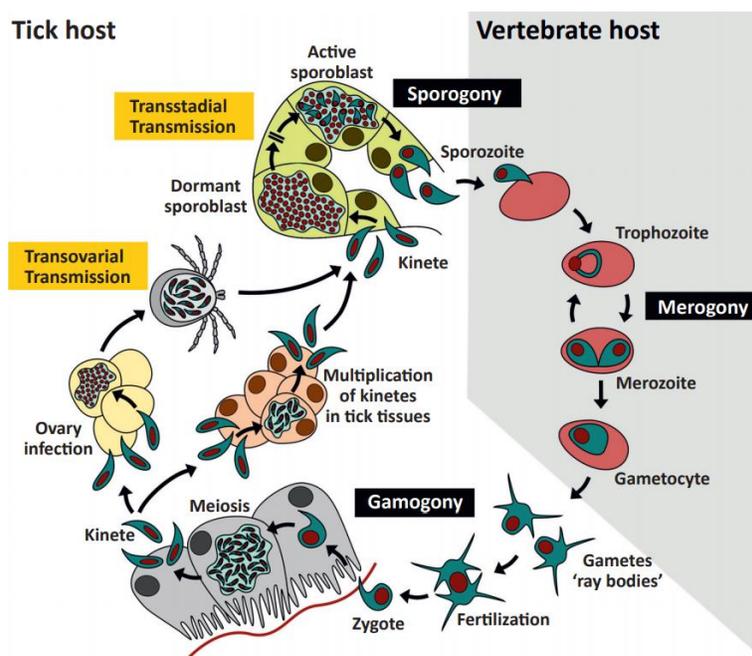


Figura 3. Ciclo de vida de *Babesia*.

Fuente: Jalovecka et al. (2019)

2.2.6 Tratamiento

El control de la babesiosis bovina puede ser mediante el control de garrapatas, la inmunización, los medicamentos contra la babesia o una combinación de estos métodos. En el pasado, el tratamiento de la babesiosis del ganado era menos importante que la erradicación de la enfermedad, principalmente en los países donde el objetivo era erradicar el vector de la garrapata. En áreas endémicas, los animales enfermos deben tratarse lo antes posible con un medicamento antiparasitario. El éxito del tratamiento depende del diagnóstico temprano y la administración rápida de fármacos eficaces (Mosqueda et al., 2012). La Tabla 5 resume los medicamentos utilizados para el tratamiento de la babesiosis bovina, su nombre químico, dosis, vía de administración y referencias.

Tabla 5

Medicamentos químicos utilizados para tratar la babesiosis.

Compuesto	Nombre químico	Babesia spp.	Dosis	Ruta	Uso actual
Imidocarb	3,3'-bis (2-imidazolin-2-yl)-carbanalidae	<i>B. bovis</i> <i>B. bigemina</i> <i>B. divergens</i> <i>B. caballi</i>	1-3 mg kg ⁻¹	IM, SC	Si
Diminazene aceturate	4,4'(azoamino) dibenzamidine	<i>B. bovis</i> <i>B. bigemina</i> <i>B. divergens</i> <i>B. caballi</i>	3-5 mg kg ⁻¹	IM	Si
Nerolidol	cis-3,7,11-Trimethyl-1,6,10-dodecatrien-3-ol	<i>B. bovis</i> <i>B. bigemina</i> <i>B. ovata</i> <i>B. caballi</i>	10 µM 25 µM	-	En investigación
Artesunate	(3R,5aS,6R,8aS,9R,10S,12R,12aR)-decahidrido-3,6,9-trimethyl-3,12-epoxy-12H-pyranol(4,4/1-1,2-benzodioepin-10-ol) hydrogen succinate	<i>B. bovis</i> <i>B. gibsoni</i> <i>B. caballi</i> <i>B. microti</i>	2.6 µM 10 µg ml ⁻¹ 10 mg kg ⁻¹	-	En investigación
Triclosan	2',4',4'-triclora-2'-hydroxyphenil ether	<i>B. bovis</i> <i>B. bigemina</i> <i>B. caballi</i>	100µg ml ⁻¹ 50 µg ml ⁻¹	-	En investigación
Epoxomicin	α',β'-epoxyketone	<i>B. bovis</i> <i>B. bigemina</i> <i>B. ovata</i> <i>B. caballi</i> <i>B. microti</i>	10 nM 5 nM 0.05-0.5 mg kg ⁻¹	-	En investigación
Gossypol	1,1',6,6',7,7'-hexahydroxy-5,5'-diisopropyl-3,3'dimethyl [2,2'-binaphthalene]8,8'-dicarboxaldehyde]	<i>B. bovis</i>	100 µM	-	En investigación
Atovaquone	1,4-hydroxynaphthoquinone	<i>B. divergens</i>	1 mg kg ⁻¹	-	En investigación

IM: Intramuscular, SC: Subcutánea

Fuente: Mosqueda et al. (2012)

2.3 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

La Reacción en cadena de la polimerasa o PCR, por sus siglas en inglés, es una prueba más sensible para la detección de infecciones con *Babesia* spp. que el frotis sanguíneo y es capaz de proporcionar una caracterización molecular de las especies de Babesia (Vannier et al., 2015). Esta técnica ha mostrado ser muy sensible en particular al detectar *B. bovis* y *B. bigemina* en ganado portador de la enfermedad (Chaudhry, Suleman, Younus, & Aslim, 2010).

2.4 Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

Es una adaptación de la técnica de Reacción en cadena de la polimerasa, la cual es un ensayo molecular simple, que requiere solo el equipo estándar utilizado para la biología molecular y proporciona resultados adecuados para el análisis simultáneo de varias especies (Sousa et al., 2015). (Figuroa-Millán et al., 2015) implementaron la técnica de PCR-RFLP para la detección de *Babesia* spp. de ADN extraído de eritrocitos infectados con 18 distintos aislados geográficos de *B. bigemina* y *B. bovis* lo que demuestra la efectividad de esta técnica para la detección y diferenciación de especies de babesia.

El primer paso en un análisis de PCR-RFLP es la amplificación de un fragmento que contiene la variación. A esto le sigue el tratamiento del fragmento amplificado con una enzima de restricción apropiada. Dado que la presencia o ausencia del sitio de reconocimiento de la enzima de restricción da como resultado la formación de fragmentos de restricción de diferentes tamaños, la identificación de alelos se puede realizar mediante resolución electroforética de los fragmentos (Rasmussen, 2012).

2.5 Georreferenciación

La georreferencia que se aplica en esta investigación, asignando a los mapas una "referencia métrica" relacionada con el sistema de coordenadas terrestres del geoespacio real o sus asignaciones (Salam & Azam, 2017), sirve para identificar las poblaciones que presenten o no prevalencia a *Babesia* spp., esperando que este estudio proporcione un mapa guía para el control de esta enfermedad.

2.6 Sistema de Hipótesis

Considerando los antecedentes antes expuestos la presente investigación se plantean las siguientes hipótesis:

- i. H0: La técnica PCR-RFLP no permite detectar *Babesia* spp. en muestras de sangre de ganado bovino de la provincia de Manabí – Ecuador.

H1: La técnica PCR-RFLP permite detectar *Babesia* spp. en muestras de sangre de ganado bovino de la provincia de Manabí – Ecuador.

- ii. H0: No existe relación entre la presencia de *Babesia* spp. con los parámetros fisiológicos y zootécnicos en el ganado bovino de la provincia de Manabí – Ecuador.

H1: Existe relación entre la presencia de *Babesia* spp. con los parámetros fisiológicos y zootécnicos en el ganado bovino de la provincia de Manabí – Ecuador.

CAPITULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Revisión Bibliográfica

Se realizó la revisión bibliográfica utilizando las siguientes palabras claves: “Babesiosis”, “Babesiosis bovina”, “PCR-RFLP”, “*Babesia bovis*”, “*Babesia bigemina*”, “Ciclo de vida de babesia”. Consta de artículos publicados desde 1888 hasta el año 2019, se utilizaron las bases de datos PubMed, Google Académico, PlosOne, Science direct y Springer Link para la búsqueda de artículos relevantes se utilizó la herramienta informática EndNote para la sistematización de los artículos.

3.2 Participantes

La presente investigación se encuentra enmarcada dentro del proyecto de vinculación con la sociedad: “Fortalecimiento del sistema sanitario para el monitoreo y detección de enfermedades emergentes en el ganado bovino, frente a desastres naturales, caso terremoto de pedernales 2016”.

El responsable del desarrollo de la investigación es el señor Mario Andrés Arboleda García, egresado de la carrera de Ingeniería en Biotecnología, con la colaboración de la Dra. María Augusta Chávez MSc., docente investigadora de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, Dr. Armando Reyna PhD, docente investigador de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE extensión Santo Domingo de los Tsáchilas, Dr. Jorge Ron Román PhD. Docente investigador de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE carrera de Ingeniería Agropecuaria – IASA, Ing. Cristina Cholota Técnico del Laboratorio de Biotecnología Animal, Ing. Fernanda Pérez graduada de la carrera de Ingeniería en biotecnología, Ing. Jimmy Jumbo graduado de la carrera de Ingeniería en biotecnología Mario Hernández tesista del laboratorio de Biotecnología Animal, Andrés Mullo

tesista del laboratorio de Sanidad Animal – IASA y estudiantes de las carreras de Ingeniería en Biotecnología (ESPE – matriz), Ingeniería Agropecuaria – IASA I para la recolección y procesamiento de las muestras.

3.3 Duración de la investigación

La investigación tuvo una duración de 9 meses, se inició en el mes de octubre de 2018 y se culminó en junio de 2019.

3.4 Zona de estudio

Las muestras de sangre y la información zootécnica del ganado bovino fueron recolectadas de 31 fincas ganaderas de las localidades la Pimienta, Mariano de Guacucal, Pedernales, Chemere del Salto, Agua Sabrosa, Limones, Venado, Cañaberal, La Calderón, Chemere Arriba, El Puente y Dógola, parroquia Pedernales, Cantón Pedernales, provincia de Manabí, Ecuador. El cantón posee una superficie de 1932 km², se encuentra a una altitud media de 21 m.s.n.m. y su clima varía entre tropical y subtropical con precipitaciones de hasta 3.000 milímetros anuales.

3.5 Procedimiento

3.5.1 Fase de campo

3.5.1.1 Tamaño de la muestra

El muestreo se realizó mediante un método probabilístico aleatorio estratificado, en el cual se clasificó las fincas ganaderas en tres estratos: fincas pequeñas (menores a 50 cabezas de ganado), medianas (de 51 a 200 cabezas de ganado) y grandes (mayores a 201 cabezas de ganado). Mediante afijación proporcional, cada estrato tuvo un número de elementos en la muestra proporcional a su tamaño (Whitley & Ball, 2002). Se utilizó la siguiente fórmula para estimar el número de bovinos a muestrear en aproximadamente 30 fincas disponibles para el muestreo.

$$n = \frac{\frac{z^2 \times p \times (1 - p)}{e^2}}{1 + \left(\frac{z^2 \times p \times (1 - p)}{e^2 \times N} \right)}$$

donde, N = tamaño de la población, e = margen de error, z = puntuación z y p es la probabilidad de ocurrencia del fenómeno (0.5 porque no se conoce la prevalencia).

El reporte estadístico del Sector Agropecuario realizado por el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC) en el 2011, indicó que existen 951509 cabezas de ganado en la provincia de Manabí, por lo que se usó este dato como tamaño de la población.

$$n = \frac{\frac{1.96^2 \times 0.5 \times (1 - 0.5)}{0.05^2}}{1 + \left(\frac{1.96^2 \times 0.5 \times (1 - 0.5)}{0.05^2 \times 951509} \right)}$$

Con lo que se obtuvo que se debería muestrear un total de ~384 bovinos en las aproximadamente 31 fincas disponibles, sin embargo, se lograron muestrear un total de 462 bovinos en 31 fincas del cantón Pedernales, provincia de Manabí.

3.5.1.2 Encuesta y registro de animales

Se llenaron dos encuestas (Anexo 1 y 2) por cada finca ganadera con la ayuda de cada dueño o responsable, para conocer el manejo, mantenimiento, situación sanitaria de la finca, sistema de producción de la finca, aspectos sanitarios y posibles manifestaciones clínicas de los animales observadas por el dueño o responsable. De la misma manera se llenó un registro (Anexo 3) con información clínica, hematológica y bioquímica de cada animal realizada por pruebas rápidas del laboratorio.

3.5.1.3 Toma de la temperatura de los animales

Para la toma de temperatura de los animales se utilizó un termómetro rectal, para todas las medidas, se colocó el termómetro en el recto de manera tal que toque la pared del recto del animal

y después de unos segundos se tomó la medida de temperatura. La medición finalizó cuando el termómetro digital emitió la medida de temperatura y el termómetro se retiró del recto.

3.5.1.4 Prueba de hematocrito

La prueba de hematocrito mide la proporción de glóbulos rojos en la sangre, a partir de la muestra de sangre tomada de la vena coccígea del ganado. El primer paso consistió en llenar un capilar apoyando uno de los extremos sobre la muestra de sangre, cuando el capilar se encontró lleno un 75% se taponó el extremo más próximo a la sangre con plastilina. A continuación, se centrifugó el capilar durante 5 minutos a 12000 rpm en una centrífuga específica para microhematocrito y con la ayuda de una regla se midió la longitud que ocupa en el capilar la columna formada por glóbulos rojos sedimentados. Si el valor del hematocrito disminuye a menos de lo normal es una señal de anemia, cuando el cuerpo del animal disminuye la producción de glóbulos rojos o aumenta la destrucción de glóbulos rojos (Grünwaldt et al., 2005).

3.5.1.5 Proteínas totales

La concentración total proteína en el suero se determinó usando un refractómetro, el cual mide la cantidad de luz que se refracta a medida que pasa a través de una muestra de suero. Cuanto mayor sea la concentración de proteína, más refracción de la luz se produce (Riche, 2007).

3.5.1.6 Toma de puntos de georreferenciación

En cada finca ganadera se tomó el punto de georreferenciación y se lo registró en la base de datos (Anexo 4), mediante el Sistema de posicionamiento global (GPS) para posterior análisis de los datos.

3.5.1.7 Extracción de sangre de la vena coccígea

La extracción de sangre periférica se realizó mediante el método de venopunción. Se utilizó agujas de seguridad para extracción de sangre venosa por sistema de vacío, calibre 20G, camisas de agujas de punción intravenosa-vacutainer, dos tubos al vacío (BD Vacutainer), sin anticoagulante y con anticoagulante EDTA. Se sujetó al animal para evitar que se aleje durante el procedimiento, se levantó la cola verticalmente con una mano y aproximadamente a 150 mm de la base de la cola se ubicó la ranura que se encuentra en la línea media ventral de la cola. La aguja fue insertada pocos milímetros, la muestra se recolectó en tubos rotulados y se aplicó presión en el lugar de la punción para detener el sangrado (Weaver, Atkinson, Jean, & Steiner, 2018).

3.5.2 Fase de laboratorio

3.5.2.1 Extracción de ADN a partir de sangre total

La extracción de ADN se realizó utilizando el protocolo del Centro de Terapia Génica, Brno, República Checa, modificado, por Albán & Tamayo (2009), cuyo procedimiento consistió en los siguientes pasos:

1. En un tubo de 1,5 mL colocar 500 μ L de una muestra de sangre en EDTA y congelar a -80°C por un tiempo mínimo de 20 minutos.
2. Descongelar a temperatura ambiente, añadir 1 mL de agua destilada grado biología molecular y agitar las muestras por 5 minutos en un agitador tipo orbital.
3. Comprobar que exista lisis completa de los eritrocitos y centrifugar a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C .
4. Retirar el sobrenadante con cuidado de no alterar el pellet y repetir nuevamente los pasos anteriores.

5. Resuspender el pellet en 500µL de PBS y mezclar por inversión.
6. Centrifugar a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C y descartar el sobrenadante.
7. Repetir los pasos 5 y 6.
8. Adicionar 1 mL de buffer de lisis (CTAB 2%, Tris-HCL 100 mM, EDTA 20 mM, NaCl 1.4 M, pH 7.5), 10 µL de proteinasa K (20 mg/mL) y homogenizar mediante vortex para incubar con agitación a 70°C por 1 hora.
9. Nuevamente homogenizar por agitación y llevar a incubar a 95°C por 10 minutos para inactivar la proteinasa K.
10. Centrifugar a 10000 rpm por 10 minutos y colocar el sobrenadante (1 mL) en un nuevo microtubo de 2 mL.
11. Colocar 700 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y homogenizar mediante un orbital para centrifugar a 10000 rpm por 15 minutos.
12. Remover el sobrenadante y colocar en un nuevo microtubo de 1.5mL. Completar el volumen del tubo con etanol frio al 100% y mezclar suavemente invirtiendo los tubos, para después dejar reposar 30 minutos a -20°C.
13. Colectar las cadenas de ácidos nucleicos por centrifugación a 14.000 rpm por 30 minutos a 4° C y descartar con pipeta el sobrenadante.
14. Lavar el pellet con 500 µL de etanol al 70% frio y se centrifugar a 14.000 rpm por 15 minutos.
15. Descartar el sobrenadante, y dejar secar el pellet dentro de la cabina de bioseguridad por 20 minutos hasta que se evapore el etanol.
16. Diluir el pellet en 100 µL de Tris-borato EDTA (TE), dejando a 65° C por 20 minutos con agitación. Finalmente, almacenar las cadenas de ácidos nucleicos a -20 °C.

3.5.2.2 Cuantificación de ADN

Tras el proceso de extracción de ADN se cuantificó mediante espectrofotometría UV el ADN (ng/ μ L), utilizando el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA), para lo cual se realizó la limpieza del equipo con 2 uL de Ácido clorhídrico 0.5 N seguido de 3 lavados con 2 uL de agua destilada. Luego se programó al equipo para cuantificación de ácidos nucleicos, se colocó el blanco y se colocó 2 μ L de cada muestra para medir su concentración.

3.5.2.3 Determinación de la calidad de ADN

Se realizó una corrida electroforética para evidenciar la calidad de ADN, colocando 5 μ L de ADN y 1 μ L de buffer de carga Blue Juice 10x, en un gel de agarosa al 0,8%. Se corrió el gel a 300 mA y 120 V durante 1 hora y se visualizó el gel mediante radiación UV.

3.5.2.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR convencional)

Se amplificó una región variable del gen 18S rRNA, presente en *Babesia* spp., utilizando los oligonucleótidos Piro A (5'-AATACCCAATCCTGACACAGGG-3') y Piro B (5'-TTAAATACGAATGCCCCAAC-3') mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Las condiciones de la reacción fueron modificadas a partir de la metodología estandarizada por Medina Naranjo et al. (2017) (Tabla 6 y Tabla 7), se obtuvo un volumen final de 25 μ L.

Tabla 6

Componentes de PCR para detección de Babesia spp.

Reactivos	Unidad	Stock	Concentración Final	Volumen (μL)
H ₂ O	μL	N/A	-	15,63
Buffer + MgCl ₂	10x	10,00	1,00	2,50
Piro A	μM	10,00	0,25	0,63
Piro B	μM	10,00	0,25	0,63
MgCl ₂	mM	25,00	1,50	0,00
dNTP	μM	40,00	0,80	0,50
DMSO	%	100,00	1,80	0,45
Taq	U/μL	5,00	0,75	0,15
ADN	ng	-	100	1
TOTAL				25,00

Tabla 7

Condiciones de amplificación por PCR para la detección de Babesia spp.

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5	1
Desnaturalización	94	0,75	35
Hibridación	55	0,75	35
Extensión	72	1	35
Extensión final	72	5	1
Mantenimiento	4	∞	-

3.5.2.5 Visualización de productos de PCR

Los productos de amplificación de PCR fueron visualizados mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,5% en solución TBE 1X, teñido con Sybr Safe (Invitrogen), durante de 50 minutos a 300 mA y 120 V. Finalizada la corrida se visualizó el gel mediante radiación UV.

3.5.2.6 Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

Debido a que la PCR convencional no permite el reconocimiento entre especies de *Babesia* spp., se utilizaron polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP). Mediante el uso de la herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST), se obtuvieron las secuencias de *Babesia bovis* (378 bp) y *Babesia bigemina* (393 bp).

Con base en un análisis bioinformático utilizando el software DS Gene 1.5 realizado con la secuencia de ADN ribosomal de cada especie de *Babesia*, se identificó el sitio de reconocimiento para *B. bovis* y *B. bigemina* en la parte variable del gen ADNr del parásito. La endonucleasa de restricción Alu I (secuencia de reconocimiento 5'AG↓CT3'), disponible en el laboratorio, cortó al amplicón correspondiente al DNA ribosomal de *B. bigemina* (393pb) en tres fragmentos de 38, 144 y 211 pb, mientras que al amplicón correspondiente al DNA ribosomal de *B. bovis* (378pb) cortó en tres fragmentos de 38, 146 y 194 pb. La figura 4 muestra los cortes esperados después de la digestión enzimática.

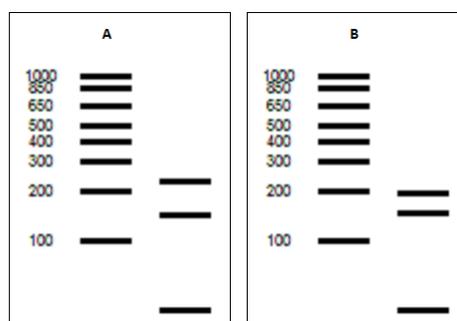


Figura 4. Fragmentos esperados después de la digestión enzimática con AluI.

A) *B. bigemina* y B) *B. bovis*

El producto amplificado por PCR convencional con los oligonucleótidos se sometió a digestión con la endonucleasa de restricción (ER) AluI de acuerdo con las especificaciones del proveedor.

3.5.2.7 Visualización de productos de la digestión enzimática

Los productos de la digestión enzimática fueron visualizados mediante electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 2% en una solución TBE 1X, teñido con Sybr Safe (Invitrogen), durante 1h50m a 300 mA y 110 V con un marcador molecular de 100 pb. Finalizada la corrida se visualizó el gel mediante radiación UV.

3.5.3 Obtención de datos del registro zootécnico y encuesta

Las variables obtenidas del registro zootécnico usadas para la determinación de los factores de riesgo fueron: sexo, edad y raza, en cuanto a las encuestas, las variables utilizadas fueron: tipo de finca (carne, leche o doble propósito), movilidad de los animales, uso de antiparasitario y situación de garrapatas en la finca ganadera. A partir de las coordenadas en x e y obtenidas del registro zootécnico se realizó la georreferenciación.

3.5.4 Análisis Estadístico

3.5.4.1 Diseño no experimental

La presencia de *Babesia* spp. fue evidenciada mediante la amplificación de fragmentos del gen rRNA de la subunidad pequeña ribosomal 18S mediante PCR, por lo que a esta variable se la conoce como una variable cualitativa nominal (Gómez-Gómez, Danglot-Banck, & Vega-Franco, 2003). Se utilizarán pruebas no paramétricas que no requieren plantear inferencias acerca de los parámetros de la población (media y dispersión) y cuando el factor de estudio y la variable de

respuesta son variables cualitativas. Las pruebas estadísticas más apropiadas para determinar si existe asociación entre ellas son chi cuadrado y la prueba de Fisher (Singh, 2006).

3.5.4.2 Variable de respuesta

Las variables de respuesta en este estudio fueron la presencia y prevalencia de los agentes patógenos en cuestión.

3.5.4.3 Error aleatorio

Los errores generados en la investigación fueron generados únicamente por los factores ambientales y/o errores del operador.

3.5.4.4 Análisis

Los análisis realizados en la investigación fueron analizados mediante el software estadístico Microsoft Excel y Epi Info™ Version 7.2.

3.5.4.5 Estadística descriptiva

Los datos generados en los registros y encuestas, además de los datos obtenidos en el laboratorio (PCR y digestión enzimática) arrojarán distribuciones de frecuencias y medidas de tendencia central.

3.5.4.6 Datos de prevalencia

La prevalencia es la relación entre el número de casos positivos a un determinado agente y el número total de muestras.

$$Prevalencia\ puntual = Ct/Nt$$

dónde

Ct: número de casos positivos para *Babesia* spp. (prevalentes).

Nt: número total de animales muestreados en la población.

La prevalencia de los patógenos en esta investigación se la calculó mediante los resultados de PCR-RFLP.

3.5.4.7 Factor de riesgo (FR)

Para el análisis de los FR del estudio se utilizó la medida RR (Risk Ratio), ya que la prevalencia detectada fue mayor al 10% (caso contrario se habría utilizado la medida epidemiológica OR (Odds Ratio), en función de los registros y encuestas realizadas además de las pruebas rápidas de laboratorio, donde se detallan ciertos factores de riesgo que podrían influir en la presencia o no de *Babesia* spp. La presente investigación, es un estudio de tipo transversal.

El RR (riesgo relativo) (también llamado índice de riesgo) es la relación entre el riesgo de ocurrencia de una enfermedad entre los animales expuestas y la de los animales no expuestas, mide la fuerza de asociación entre el factor de riesgo y la presentación del evento (Cerdeira, Vera, & Rada, 2013).

Tabla 8

Cuadro de contingencia para el cálculo de RR y OR.

	Casos	No casos	TOTAL
Expuestos	A	b	a+b
No expuestos	C	d	c+d
TOTAL	a+c	b+d	a+b+c+d

RR, es el cociente entre el riesgo en el grupo expuesto a determinados factores y el riesgo en el grupo no expuesto.

$$RR = \frac{a/a+b}{c/c+d}$$

OR, es el cociente entre la posibilidad de exposición en los casos (enfermos) (a/b) y la posibilidad de exposición del grupo control (no enfermos) (c/d).

$$OR = \frac{a/b}{c/d} = \frac{a \times d}{b \times c}$$

3.5.4.8 Resultados de PCR

Los resultados positivos para *Babesia* spp. obtenidos de PCR fueron discriminados mediante la presencia de bandas amplificadas, mientras que los resultados negativos por la ausencia de bandas amplificadas.

3.5.5 Estadística inferencial

Gracias a los datos que arrojó la estadística descriptiva se llevaron a cabo pruebas de chi cuadrado para comparar la prevalencia de *Babesia* spp. con los parámetros zootécnicos, clínicos, hematológicos y bioquímicos.

3.5.5.1 Conclusiones

La conclusión de esta investigación fue la presencia o ausencia del parásito de *Babesia* spp., la prevalencia de esta enfermedad y la correlación entre los resultados positivos de PCR-RFLP y los parámetros zootécnicos (sexo, edad, raza), clínicos (temperatura), hematológicos (hematocrito) y bioquímicos (proteínas totales).

CAPITULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Se recolectaron 462 muestras en 31 fincas ganaderas de las localidades la Pimienta, Mariano de Guacucal, Pedernales, Chemere del Salto, Agua Sabrosa, Limones, Venado, Cañaberal, La Calderón, Chemere Arriba, El Puente y Dógola, parroquia Pedernales, Cantón Pedernales, provincia de Manabí, Ecuador. Las muestras fueron recolectadas en dos periodos realizados en los meses de octubre y diciembre de 2018. Estas muestras representan el 10,04% de animales totales dentro de las 31 fincas ganaderas (FG) muestreadas.

4.1.1 Distribución de animales por finca

En el anexo 5 se representa la distribución de los animales muestreados ($n=462$) en cada finca. El valor más alto de distribución de muestras (9,96%), lo tuvo la finca ganadera 12 (FG12), por el contrario, el valor más bajo de distribución de muestras (0,43%) lo tuvo la finca ganadera 30 (FG30).

4.1.2 Distribución de animales muestreados de acuerdo al tipo de finca

En la tabla 9 se observa la distribución de animales muestreados ($n=462$) de acuerdo al tipo de finca (carne, leche o doble propósito). La mayor cantidad de muestras provienen de haciendas cuya finalidad es la producción de leche (42,86%), mientras que la menor cantidad de muestras provienen de haciendas cuya finalidad es la producción de carne (14,72%).

Tabla 9

Distribución de animales muestreados de acuerdo al tipo de finca del cantón Pedernales, provincia de Manabí, Ecuador .

Tipo Finca	Número de animales muestreados	Porcentaje
Carne	68	14,72%
Leche	198	42,86%
Doble propósito	196	42,42%
TOTAL	462	100,00%

4.1.3 Distribución de animales muestreados de acuerdo al sexo

En la tabla 10 se representa la distribución de animales muestreados (n=462) de acuerdo al sexo, la mayoría de muestras tomadas pertenecieron a hembras (93,07%).

Tabla 10

Distribución de animales muestreados de acuerdo al sexo del cantón Pedernales, provincia de Manabí, Ecuador.

Sexo	Frecuencia	Porcentaje
Macho	32	6,93%
Hembra	430	93,07%
TOTAL	462	100,00%

Como se evidenció en la tabla 9, la mayoría de animales muestreados pertenecían a haciendas de tipo lechero por lo que, era de esperar que la mayoría de animales fuera hembras (tabla 10).

4.1.4 Distribución de animales muestreados de acuerdo a la raza

En el anexo 6 se representa la distribución de los animales muestreados (n=462) de acuerdo a la raza. La mayor cantidad de muestras provienen de ganado de raza Brahman (27,27%), esta raza se ha desarrollado como una importante raza de carne

en zonas tropicales húmedas y subtropicales secas, es adecuada para cruzamientos, dando un excelente vigor híbrido en la progenie (Fortes et al., 2012).

A pesar del alto porcentaje de muestras tomadas de la raza de carne Brahman, una gran cantidad de muestras fueron tomadas de animales mestizos, en las que se incluían razas productoras de leche como Brown Swiss, Girolando, Gyr, Holstein y Jersey (Hayes, Bowman, Chamberlain, & Goddard, 2009).

4.1.5 Distribución de animales muestreados de acuerdo a la edad

En la tabla 11 se representa la distribución de los animales muestreados (n=462) de acuerdo a la edad. La mayor cantidad de muestras provienen de ganado de 37 a 72 meses de edad (52,16%), no se tomaron muestras de ganado de 0 a 6 meses de edad. Faber, Faber, McCauley, and Ax (2005), mencionan que los terneros son menos susceptibles que los adultos a presentar síntomas de enfermedades. Los terneros están protegidos por anticuerpos del calostro materno durante aproximadamente 3 a 6 primeros meses de vida (Struff & Sprotte, 2007).

Tabla 11

Distribución de animales muestreados de acuerdo a la edad del cantón Pedernales, provincia de Manabí, Ecuador.

Edad	Frecuencia	Porcentaje
0-6 meses	0	0,00%
7-18 meses	21	4,55%
19-36 meses	119	25,76%
37-72 meses	241	52,16%
73-96 meses	57	12,34%
97 + meses	24	5,19%
TOTAL	462	100,00%

4.1.6 Mediciones de tendencia central y distribución estándar

Las medidas de tendencia presentadas en la tabla 12 representan un centro en torno al cual se encuentra ubicado el conjunto de los datos presentados en los anexos 7, 8 y 9, es decir, las medidas de tendencia central que permitieron evaluar en qué medida los datos difieren entre sí. Como muestra en la tabla 12, la desviación estándar tanto de temperatura como de proteínas totales (0,5976°C y 0,9265 g/dL respectivamente) presenta valores bajos, lo que indica que los datos no se encuentran dispersos con respecto a la media. En cuanto a los valores de la media, mediana y moda de temperatura y proteínas totales, los valores son muy similares evidenciando una consistencia en los datos.

La desviación estándar del hematocrito (4,2787%) presenta un valor alto debido a que el valor más bajo obtenido fue de 16 (frecuencia de 1) y el valor más alto fue de 42 (frecuencia de 2) (anexo 8), estos valores se encuentran muy dispersos con respecto a la media. El valor bajo obtenido en el hematocrito podría indicar anemia en el ganado bovino (Nkuo-Akenji, Chi, Cho, Ndamukong, & Sumbele, 2006), sin embargo pruebas complementarias como hemoglobina o VCM (volumen corpuscular medio) serían necesarias para confirmar el diagnóstico. El valor alto obtenido pudo deberse a que el animal se encontraba deshidratado en el momento de la toma de muestra (Erickson, Goff, & Uemura, 2015).

Tabla 12

Mediciones de tendencia central de la temperatura, hematocrito y proteínas totales.

Factor	Media	Mediana	Moda	Desviación estándar	Máximo	Mínimo
Temperatura (°C)	38,6345	38,7	38,7	0,5976	40,2	36,4
Hematocrito (%)	31,0022	31,00	29,00	4,2787	42,00	16,00
Proteínas totales (g/dL)	7,3970	7,20	7,0	0,9265	11,10	5,30

4.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR convencional)

Se utilizaron 100 ng de ADN genómico extraído de las 460 muestras de sangre para el ensayo de PCR convencional utilizando los cebadores piro A (5'AATACCCAATCCTGACACAGGG3') y piro B (5'TTAAATACGAATGCCCCCAAC 3') que amplificaron una porción del gen 18S rRNA de *Babesia* spp. de un tamaño de aproximadamente 400 pb, este resultado se corrobora con investigaciones realizadas por Olmeda et al. (1997) y Figueroa-Millán et al. (2014), los resultados de la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) se presentan en la figura 5. El control positivo se obtuvo mediante clonación a partir de una muestra positiva a *Babesia* spp. obtenida por Medina Naranjo et al. (2017).

Las bandas presentes en la figura 5 poseen una intensidad variada, esto puede deberse a que existió una mayor cantidad de ADN plantilla de *Babesia* spp. en las bandas que mostraron una mayor intensidad y viceversa (Levin, 2012).

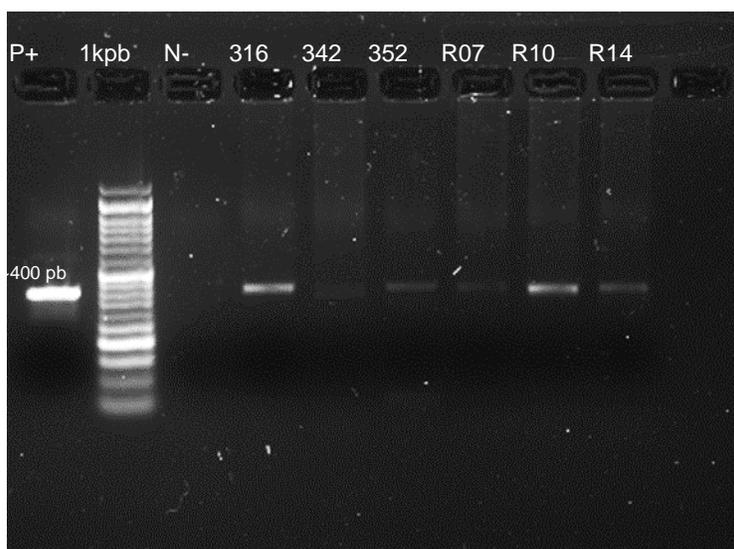


Figura 5. Amplificación de la región del gen 18S rRNA de 6 muestras positivas 316, 342, 352, R07, R10 y R14 a *Babesia* spp del cantón Pedernales, provincia de Manabí, Ecuador.

4.3 PCR – RFLP (Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción)

Se realizó la digestión de 48 muestras positivas a la Reacción en Cadena de la Polimerasa, seleccionadas al azar, utilizando la endonucleasa de restricción AluI, figura 6, los resultados se presentan en la tabla 14.

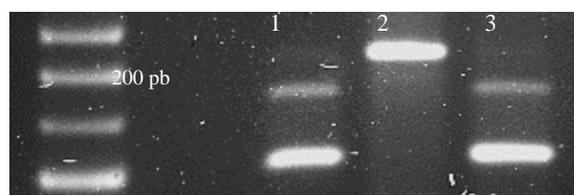


Figura 6. Fragmentos digeridos con AluI.

Muestra 1 y muestra 3, *B. bovis*; muestra 2, *B. bigemina*.

4.3.1 PREVALENCIA DE *Babesia* spp.

Un total de 296 muestras obtenidas en las 31 fincas ganaderas resultaron positivas y 164 resultaron negativas a la técnica de PCR convencional para la identificación de *Babesia* spp. (tabla 13), con lo que se calculó una prevalencia de 64,35%.

Tabla 13

Resultados de PCR convencional para Babesia spp. de las muestras provenientes de las 31 fincas ganaderas del cantón Pedernales, provincia de Manabí, Ecuador.

<i>Babesia</i> spp.	Frecuencia	Porcentaje
Negativo	164 muestras	35,65%
Positivo	296 muestras	64,35%
TOTAL	460 muestras	100,00%

La prevalencia, obtenida por PCR convencional, por cada finca ganadera se muestra en la figura 7 y en el anexo 10, se observa que la finca ganadera que presentó la mayor prevalencia (100%) es la finca ganadera 30 (FG30) y por el contrario la finca ganadera que presento la menor prevalencia (25%) es la finca ganadera 26 (FG26).

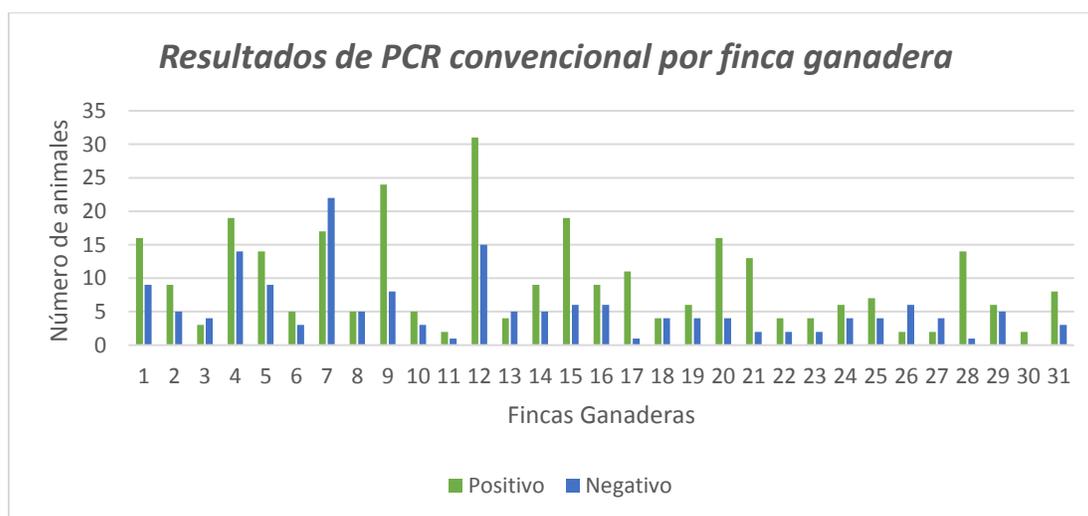


Figura 7. Resultados de PCR convencional para la identificación de *Babesia* spp. en las 31 fincas ganaderas del cantón Pedernales, provincia de Manabí, Ecuador.

La alta prevalencia a *Babesia* spp. encontrada en este estudio se correlaciona con la prevalencia (71,43%) encontrada por León Jaramillo (2017) en 96 muestras de sangre bovina tomadas de animales asintomáticos del sector Sur de la provincia de Zamora Chinchipe, mediante las técnica de nPCR.

El resultado obtenido podría deberse a la alta sensibilidad de la técnica de PCR en la detección de animales asintomáticos y con niveles bajos de parasitemia, este procedimiento permite una detección de parasitemias tan bajas como 0.01% (Carret et al., 1999). Durrani, Mehmood, and Shakoori (2010) confirmaron que la prueba de PCR es más sensible para detectar infecciones de bajo grado en animales portadores en comparación con el examen microscópico de frotis de sangre, en su investigación determinaron la eficacia general del examen microscópico de frotis de sangre, IFA y PCR (6.8%, 23.5% y 41.2%, respectivamente) en parásitos sanguíneos en el ganado.

Otra explicación podría ser el sitio de muestreo, que posee un clima tropical, adecuado para el desarrollo y proliferación del vector portador de la enfermedad (Altay, Aydin, Dumanli, & Aktas, 2008). Gasque (2008), menciona que la transmisión mecánica es posible para *Babesia* spp., sin embargo, no es suficiente para mantener la infección de no existir el vector o garrapata.

Tabla 14

Prevalencia de Babesia bovis y Babesia bigemina de las 48 muestras obtenidas mediante PCR-RFLP.

	Positivo	Negativo	Prevalencia
<i>B. bovis</i>	6	42	12,50%
<i>B. bigemina</i>	42	6	87,50%

Los resultados obtenidos (tabla 14) muestran que de 48 muestras, elegidas al azar, digeridas con la endonucleasa de restricción AluI, 42 mostraron ser *Babesia bigemina* (87,50%) y 6 mostraron ser *Babesia bovis* (12,50%), resultado que concuerda con resultados obtenidos por Oliveira-Sequeira et al. (2005), que reportó una prevalencia de *Babesia bigemina* del 56.2% y una prevalencia de *Babesia bovis* del 4,7%.

La alta proporción de *B. bigemina* en comparación con *B. bovis* podría deberse a la capacidad de *B. bigemina* para permanecer a través de generaciones de *Rhipicephalus* spp. en ausencia de reinfección, lo que no ocurre en *B. bovis*; sin embargo, el alto grado de patogenicidad de *B. bovis* en el ganado bovino, que conduce a una parasitemia inferior al 1% durante la infección aguda, también puede explicar los resultados obtenidos (Jaimes-Dueñez, Triana-Chávez, Holguín-Rocha, Tobon-Castaño, & Mejía-Jaramillo, 2018). La presencia de hemoglobina fetal (HbF) en terneros se ha citado como una posible razón para el aumento de la resistencia a *B. bovis* (Bhat, Singh, Singh, & Rath, 2017).

Las tasas de infección de la garrapata a *B. bigemina* son considerablemente más altas, por lo tanto, las tasas de transmisión de esta especie también son más altas a comparación con *B. bovis*. Como resultado, *B. bigemina* es la más prevalente de las dos especies en rebaños donde ambas están presentes (Fivaz, Petney, & Horak, 2012).

B. bovis se asocia comúnmente con una enfermedad más grave a medida que los eritrocitos infectados quedan secuestrados en los capilares cerebrales, lo que causa síntomas nerviosos y muerte rápida a pesar de tener una baja parasitemia circulante en la sangre circulante (Chaudhry et al., 2010). *B. bigemina* causa una enfermedad más leve, sin embargo, tiene una parasitemia mucho mayor (Terkawi et al., 2011).

4.4 ANÁLISIS UNIVARIADO

4.4.1 Prevalencia por tipo de finca

El valor $p = 0,0169 < 0,05$ obtenido mediante análisis estadístico, indica que la prevalencia obtenida mediante PCR convencional, varía de acuerdo al tipo de finca ganadera. La prevalencia de acuerdo al tipo de finca se muestra en el anexo 11, las fincas destinadas para la

producción de leche y doble propósito presentaron la mayor prevalencia (42,91% y 45,61% respectivamente). El resultado va asociado con la distribución de muestreo, ya que las fincas destinadas para la producción de leche y doble propósito tuvieron la más alta distribución de animales muestreados, 42,86% y 42,42% respectivamente.

El valor $p = 0,0324 < 0,05$ obtenido mediante análisis estadístico, indica que la prevalencia obtenida mediante PCR-RFLP, varía de acuerdo al tipo de finca ganadera. En el anexo 12 se puede observar que las 6 muestras positivas a *B. bovis* provenían de haciendas de doble propósito lo que explica el valor p obtenido, mientras que para *B. bigemina* la mayor cantidad de resultados positivos provenían de haciendas destinadas para la producción de leche (45,24%).

4.4.2 Prevalencia por sexo

El valor $p = 0,4105 > 0,05$ obtenido mediante análisis estadístico, indica que la prevalencia obtenida mediante PCR convencional, no varía de acuerdo al sexo del ganado bovino. La prevalencia de acuerdo al tipo de finca se muestra en el anexo 13, se evidencia que la mayoría de resultados positivos provenían de hembras muestreadas, este resultado va asociado con la distribución de muestreo, ya que se muestrearon 430/462 hembras (93,07%).

El valor $p = 0,2495 > 0,05$ obtenido mediante análisis estadístico, indica que la prevalencia obtenida mediante PCR-RFLP, no varía de acuerdo al sexo del ganado bovino. En el anexo 14 se puede observar que las 6 muestras positivas a *B. bovis* provenían de hembras, de igual manera para *B. bigemina* la mayor cantidad de resultados positivos provenían de hembras 39/42 (92,86%).

4.4.3 Prevalencia por raza

El valor $p = 0,8339 > 0,05$ obtenido mediante análisis estadístico, indica que la prevalencia obtenida mediante PCR convencional, no varía entre las diferentes razas de ganado bovino. El anexo 15 indica que, de todas las razas muestreadas, Brahman fue la raza con mayor prevalencia (24,66%) a *Babesia* spp., este resultado va asociado con el número de distribución de animales muestreados pertenecientes a la raza Brahman (27,27%).

Existe cierta imprecisión en la literatura sobre la susceptibilidad relativa de las razas *Bos indicus* y *Bos taurus* a *Babesia* spp., pero la mayoría de los estudios concluyen que *Bos indicus* es mucho más resistente (Bock et al., 2004).

El valor $p = 0,9822 > 0,05$ obtenido mediante análisis estadístico, indica que la prevalencia obtenida mediante PCR-RFLP, no varía entre las diferentes razas del ganado bovino. En el anexo 16 se puede observar que la mayor cantidad de resultados positivos a *B. bovis* provenían de 2 muestras de ganado de raza Brahman y otras 2 muestras de ganado de raza Brown Swiss, de igual manera para *B. bigemina* la mayor cantidad de resultados positivos provenían de 8 muestras de ganado raza Brahman y 8 muestras de ganado raza Brown Swiss.

4.4.4 Prevalencia por edad

El valor $p = 0,7158 > 0,05$ obtenido mediante análisis estadístico, indica que la prevalencia obtenida mediante PCR convencional, no varía entre las diferentes edades del ganado bovino. La prevalencia de acuerdo a la edad se muestra en el anexo 17, se evidencia que la mayoría de resultados positivos 152/296 (51,35%) provenían de ganado bovino de 37 a 72 meses de edad, este resultado va asociado con la distribución de muestreo, ya que se tomaron muestras de 241/462 (52,16%) animales de 37 a 72 meses de edad.

El valor $p = 0,6875 > 0,05$ obtenido mediante análisis estadístico, indica que la prevalencia obtenida mediante PCR-RFLP, no varía entre las diferentes edades del ganado bovino. En el anexo 18 se puede observar que 3 muestras positivas a *B. bovis* provenían de ganado de 19 a 36 meses y 2 muestras provenían de ganado de 37 a 72 meses de edad, mientras que para *B. bigemina* la mayor cantidad de resultados positivos provenían de ganado bovino de 37 a 72 meses de edad (92,86%).

4.4.5 Prevalencia en función de la temperatura

El valor $p = 0,0135 < 0,05$ obtenido mediante análisis estadístico, indica que la prevalencia obtenida mediante PCR convencional, varía entre los rangos de temperatura medida en el ganado bovino. La prevalencia en función de la temperatura se muestra en el anexo 19, el ganado bovino con un rango de temperatura normal es el que presentó la mayor prevalencia 240/296 (81,08%).

El valor $p = 0,0309 < 0,05$ obtenido mediante análisis estadístico, indica que la prevalencia obtenida mediante PCR-RFLP, varía entre los rangos de temperatura medida en el ganado bovino. En el anexo 20 se puede observar que 3/6 (50%) muestras positivas a *B. bovis* provenían de ganado bovino con un rango de temperatura normal, de manera similar para *B. bigemina* la mayor cantidad de resultados positivos 37/42 (88,10%) provenían de ganado bovino con un rango de temperatura normal.

Tanto como para *B. bigemina* y *B.bovis*, generalmente el primer signo clínico es fiebre alta con temperaturas rectales que pueden llegar hasta los 45,5°C (Gasque, 2008).

4.4.6 Prevalencia en función del hematocrito

El valor $p = 0,2715 > 0,05$ obtenido mediante análisis estadístico, indica que la prevalencia obtenida mediante PCR convencional, no varía entre los rangos de hematocrito medido en el ganado bovino. La prevalencia en función del hematocrito se muestra en el anexo 21, el ganado bovino con un rango de temperatura normal es el que presentó la mayor prevalencia 284/296 (95,95%).

El valor $p = 1 > 0,05$ obtenido mediante análisis estadístico, indica que la prevalencia obtenida mediante PCR-RFLP, no varía entre los rangos de hematocrito medido en el ganado bovino. En el anexo 22 se puede observar que 6/6 (100%) muestras positivas a *B. bovis* provenían de ganado bovino con un rango de hematocrito normal, de manera similar para *B. bigemina* todos los resultados positivos 42/42 (100,00%) provenían de ganado bovino con un rango de hematocrito normal.

4.4.7 Prevalencia en función de las proteínas totales

El valor $p = 0,8975 > 0,05$ obtenido mediante análisis estadístico, indica que la prevalencia obtenida mediante PCR convencional, no varía entre los rangos obtenidos de proteínas totales en el ganado bovino. La prevalencia en función de proteínas totales se muestra en el anexo 23, el ganado bovino con un rango de temperatura normal es el que presentó la mayor prevalencia 254/296 (85,81%).

El valor $p = 0,0247 < 0,05$ obtenido mediante análisis estadístico, indica que la prevalencia obtenida mediante PCR-RFLP, varía entre los rangos obtenidos de proteínas totales en el ganado bovino. En el anexo 24 se puede observar que 4/6 (66,67%) muestras positivas a *B. bovis* provenían de ganado bovino con un rango de proteínas totales normal, de manera similar para *B.*

bigemina la mayoría de resultados positivos 39/42 (92,86%) provenían de ganado bovino con un rango de proteínas totales normal. Un aumento de la concentración de proteínas totales en el suero puede presentarse en casos de deshidratación en el momento del muestreo (Tothova, Nagy, & Kovac, 2016).

Los porcentajes obtenidos de prevalencia en función de temperatura, hematocrito y proteínas totales respectivamente, se encuentran en su mayoría en rangos normales de cada uno de estos factores, lo que sugiere que existe estabilidad enzoótica de la enfermedad. La aparición de babesiosis en una población de ganado depende en gran medida de la frecuencia con que se transmite la especie causante (Fivaz et al., 2012). Si hay una transmisión frecuente del parásito, todos los terneros se infectarán durante los primeros 6 a 8 meses de vida. Los terneros en este grupo de edad están protegidos por factores adquiridos por la madre y no específicos, y se desarrollará inmunidad sin evidencia de enfermedad (Bock et al., 2004).

Las razas de ganado nativas de las regiones endémicas de *Babesia* a menudo tienen un cierto grado de resistencia natural a la enfermedad y las consecuencias de la infección no son tan graves como cuando se trata de razas exóticas (Fivaz et al., 2012).

4.4.8 Correlación entre la prevalencia encontrada y los valores de temperatura, hematocrito y proteínas totales

Para el análisis el hematocrito, proteínas totales y temperatura fueron transformadas en variables binomiales de acuerdo al rango de valores normales en ganado vacuno, como se indica en la tabla 15.

Tabla 15

Temperatura, hematocrito y proteínas totales como variables binomiales.

Factor	Normal	Anormal
Temperatura	Carne (36,7-39,1°C)	Carne (<36,7 o >39,1°C)
	Leche (38,0-39,3°C)	Leche (<38,0 o >39,3°C)
	Doble propósito (36,7-39,3°C)	Doble propósito (<36,7 o >39,3°C)
Hematocrito	24-46%	<24% o >46%
Proteínas totales	5,7-8,1 g/dL	<5,7 o >8,1%

Fuente: Erickson et al. (2015) y Radostits, Gay, Hinchcliff, and Constable (2006)

El valor p obtenido (tabla 16), $p > 0,05$, al correlacionar la presencia de *Babesia* spp. y hematocrito (normal, anormal), proteínas totales (normal, anormal), temperatura (normal, anormal), indica que no existe una diferencia significativa entre los animales en un rango normal y anormal de cada uno de los factores.

Tabla 16

Correlación entre Babesia spp. y hematocrito, proteínas totales y temperatura.

Factor	Valor p
Hematocrito	0,2300
Proteínas totales	0,4091
Temperatura	0,1758

4.5 FACTORES DE RIESGO

Los valores obtenidos al realizar los análisis estadísticos en Epiinfo se muestran en la tabla 17.

Tabla 17

Factores de riesgo de infección por Babesia spp. en la población bovina de Pedernales, Manabí.

Factor	Risk ratio (95% CI)	Límite inferior	Límite superior	Chi cuadrado	Valor p
<i>Trypanosoma</i> spp.	1,0439	0,9909	1,0997	2,2506	0,0668
Sexo	1,0829	0,5433	2,1586	0,0512	0,4105
Movilización de animales fuera de la finca	1,0600	0,8554	1,3136	0,2802	0,2983
Presencia de garrapatas	0,5264	0,2318	1,1953	2,4757	0,0578

IC: intervalo de confianza

Se analizaron los resultados obtenidos en investigaciones paralelas de estudios a cerca de la prevalencia de *Trypanosoma* spp. de las mismas 462 muestras (tabla 16). El análisis mostro que *Trypanosoma* spp. no mostro ser un factor de riesgo (RR = 1,0439; IC del 95% = 0,9909-1,0997, $p = 0,0668$), ya que el IC95% contiene al valor nulo (RR=1), indicando que no se obtuvo una asociación significativa con la prevalencia obtenida de *Babesia* spp.

Los valores RR obtenidos para los factores sexo (macho y hembra) y movilización de animales fuera de la finca (si, no) son muy cercanos al valor nulo (RR=1), lo que indica que la probabilidad de que la enfermedad esté presente en un grupo es la misma probabilidad que la enfermedad ocurra para el otro grupo y por ende no son un factor de riesgo para *Babesia* spp.

El factor presencia de garrapatas (si, no) en el ganado vacuno (RR = 0,5264; IC del 95% = 0,2318-1,1953, $p = 0,0578$), al presentar un valor RR menor a 1 indica que hay menor asociación entre la presencia de garrapatas y la enfermedad, esto podría deberse a que el propietario o

encargado de la finca ganadera respondía a la pregunta de la encuesta de manera subjetiva y si existía presencia o ausencia de garrapatas de manera general, no específicamente a garrapatas vectores de *Babesia* spp. El uso de medicamentos como Imidocarb o Diaceturato de Diminazeno en los animales muestreados pudo haber alterado la toma de datos sobre la presencia de garrapatas durante el muestreo.

Los resultados obtenidos muestran que no se puede asegurar que existe una relación entre el sexo, hematocrito, proteínas totales, temperatura, movilización de animales fuera de la finca o presencia de garrapatas y la prevalencia de *Babesia* spp. encontrada en este estudio, es decir ninguno de estos factores puede ser utilizado para determinar si un animal es portador del parásito. Esto es debido a que, a pesar de la alta prevalencia detectada mediante PCR convencional, las pruebas rápidas de laboratorio realizadas y el diagnóstico hecho mediante observación durante el muestreo, los animales se encontraban en condiciones normales. Gasque (2008) menciona que, por lo general, babesiosis no produce enfermedad clínica, sin embargo, en animales de avanzada edad los síntomas pueden ser muy severos dependiendo de la patogenicidad y zona geográfica.

Los animales con babesiosis subclínica se convierten en portadores crónicos del protozoo y por lo tanto en fuentes de infección por los vectores específicos o garrapatas. Usualmente el diagnóstico de infecciones por piroplasma se basan en hallazgos clínicos y en examen microscópico de frotis de sangre teñidos con Giemsa, sin embargo, este método no es lo suficientemente sensible o suficientemente específico para detectar portadores crónicos (Altay et al., 2008), en especial cuando ocurren infecciones mixtas, es por eso que el uso de técnicas moleculares permiten una detección sensible y específica de los hemoparásitos.

4.6 GEORREFERENCIACIÓN

Se realizó la georreferenciación a partir de los resultados de prevalencia por finca ganadera obtenidos (figura 8 y 9), lo que permitió evidenciar la ubicación en la que aparece la enfermedad con respecto a la ubicación geográfica. El anexo 25 permite observar la prevalencia de *Babesia* spp. de acuerdo a las localidades del cantón Pedernales, provincia de Manabí, Ecuador.

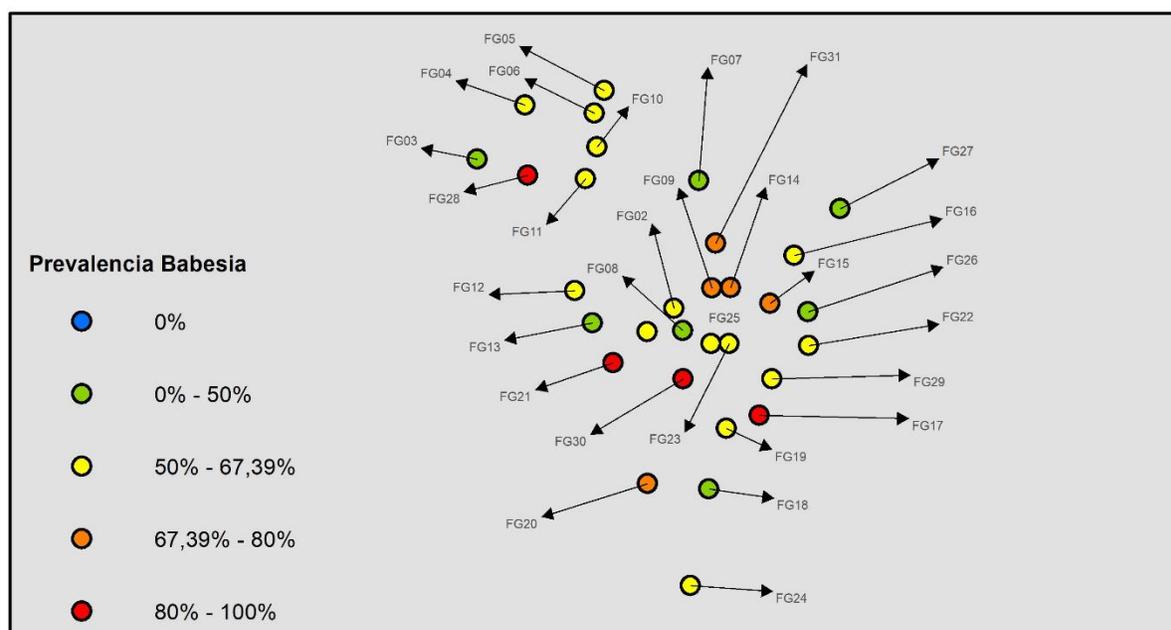


Figura 8. Distribución geográfica de *Babesia* spp. en el ganado bovino de la parroquia Pedernales, cantón Pedernales, provincia de Manabí - Ecuador.

La figura 8 muestra la distribución geográfica de los resultados a *Babesia* spp., se observa que las fincas ganaderas FG17, FG21, FG28 y FG30 presentaron la mayor prevalencia a la enfermedad (91,67%, 86,67%, 93,33% y 100% respectivamente). A medida que las fincas ganaderas se alejan de estos puntos existe una disminución en la prevalencia.

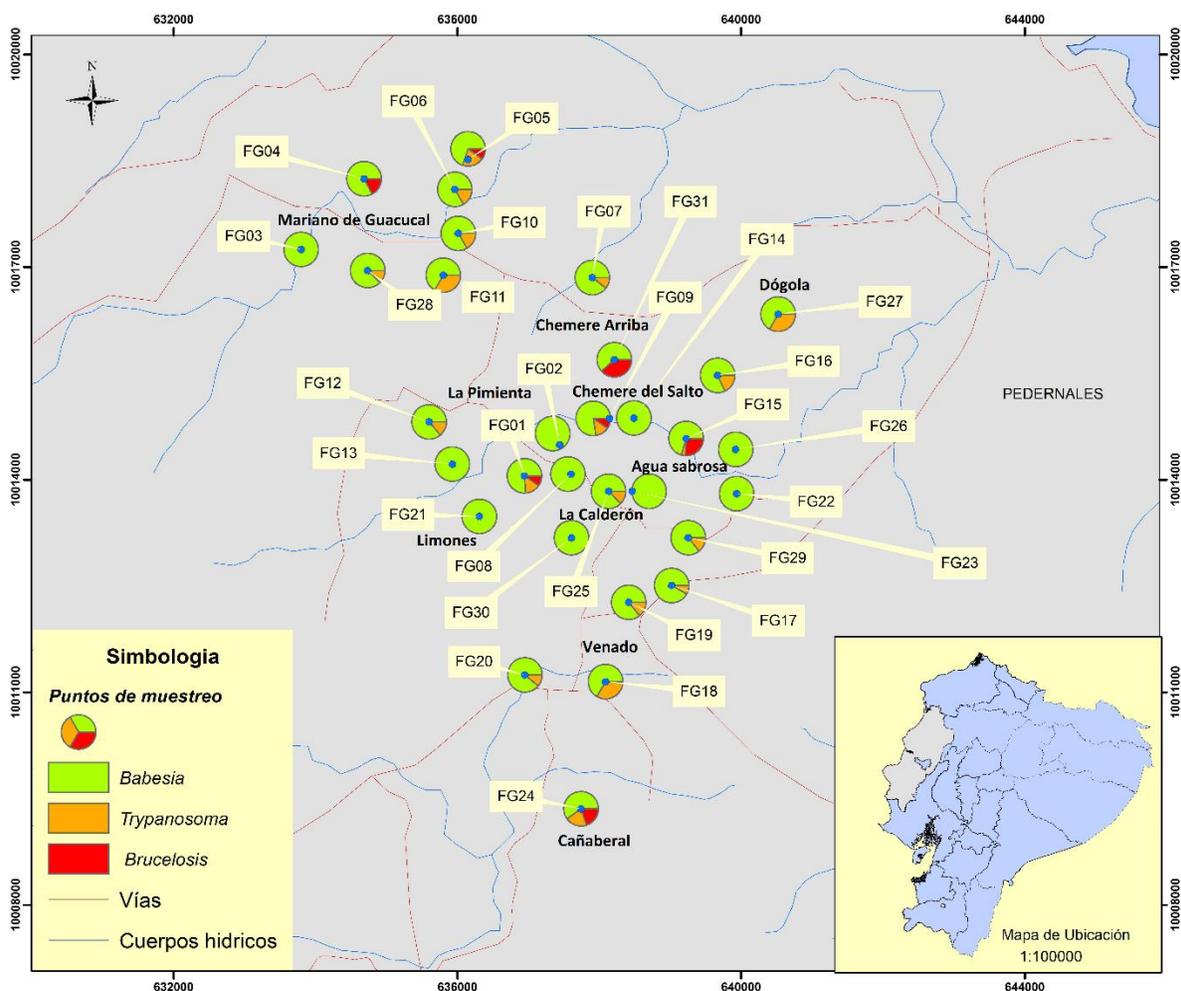


Figura 9. Distribución geográfica de *Babesia* spp., *Trypanosoma* spp. y Brucelosis en el ganado bovino de la parroquia Pedernales, cantón Pedernales, provincia de Manabí - Ecuador.

En la figura 9, se observa que todas las fincas ganaderas que presentan casos positivos a *Babesia* spp. se encuentran cerca de cuerpos hídricos. Catley and Irungu (2000), mencionan que los cuerpos de agua son fuentes de contagio de enfermedades debido a que aquí se reúnen animales de diferente procedencia aumentando la probabilidad de exposición con animales enfermos en busca de agua.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

Se determinó una prevalencia de 64,35% para *Babesia* spp. mediante PCR convencional en el cantón Pedernales, provincia de Manabí – Ecuador.

La prevalencia a *Babesia bovis* fue de 12,50% y la prevalencia a *Babesia bigemina* fue de 87,50% mediante el uso de Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción.

No existió diferencia significativa en la temperatura, hematocrito o proteínas totales entre los animales positivos y negativos a *Babesia* spp.

A pesar de la alta prevalencia encontrada, no se encontraron factores de riesgo asociados.

La presencia de *Babesia* spp. en las 31 fincas ganaderas indica que existe una situación endémica estable, por lo que probablemente la enfermedad clínica ocurre raramente o no ocurre en absoluto.

La Georreferenciación de los resultados obtenidos, permitió evidenciar la distribución de la enfermedad en las diferentes localidades, lo que permitirá tomar medidas de control que eviten la dispersión de la enfermedad.

CAPITULO 6

RECOMENDACIONES

Realizar un nuevo muestreo durante la época de lluvia, para evaluar si existe una variación en la prevalencia o estado de los animales.

Es necesario realizar pruebas complementarias de laboratorio (hemoglobina y volumen corpuscular medio) que confirmen el estado fisiológico de los animales muestreados.

Utilizar la información generada a partir de esta investigación para un estudio epidemiológico avanzado adicional y para aplicar medidas de control de enfermedades transmitidas por hemotrópicos.

Realizar un análisis filogenético de las muestras obtenidas que permitan idear medidas de control específicas para *Babesia* spp. en Ecuador.

BIBLIOGRAFÍA

- Almería, S., Castella, J., Ferrer, D., Ortuno, A., Estrada-Peña, A., & Gutierrez, J. F. (2001). Bovine piroplasms in Minorca (Balearic Islands, Spain): a comparison of PCR-based and light microscopy detection. *Veterinary parasitology*, 99(3), 249-259.
- Altay, K., Aydin, M. F., Dumanli, N., & Aktas, M. (2008). Molecular detection of Theileria and Babesia infections in cattle. *Veterinary parasitology*, 158(4), 295-301.
- Asokan, G. V., & Vanitha, A. (2017). Disaster response under One Health in the aftermath of Nepal earthquake, 2015. *Journal of epidemiology and global health*, 7(1), 91-96.
- Babes, V. (1888). Sur l'hémoglobinurie bacterienne du boeuf. *107*, 692-694.
- Battsetseg, B., Xuan, X., Ikadai, H., Bautista, J. L. R., Byambaa, B., Boldbaatar, D., . . . Igarashi, I. (2001). Detection of Babesia caballi and Babesia equi in Dermacentor nuttalli adult ticks. *International journal for parasitology*, 31(4), 384-386.
- Bhat, S. A., Singh, N. K., Singh, H., & Rath, S. S. (2017). Molecular prevalence of Babesia bigemina in Rhipicephalus microplus ticks infesting cross-bred cattle of Punjab, India. *Parasite epidemiology and control*, 2(3), 85-90.
- Bock, R., Jackson, L., De Vos, A., & Jorgensen, W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology*, 129(S1), S247-S269.
- Carret, C., Walas, F., Carcy, B., Grande, N., Précigout, É., Moubri, K., . . . Gorenflot, A. (1999). 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. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(3), 298-301.

- Catley, A., & Irungu, P. (2000). Participatory research on bovine trypanosomosis in Orma cattle, Tana River District, Kenya. *International Institute for Environment and Development and KETRI, London*.
- Chaudhry, Z. I., Suleman, M., Younus, M., & Aslim, A. (2010). Molecular detection of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* in crossbred carrier cattle through PCR. *Pakistan Journal of Zoology*, 42(2).
- Cisneros, D. A., & Nocquet, J.-M. (2017). Actualización preliminar del Sistema Nacional de Referencia Espacial-SIRGAS-Ecuador, posterior al terremoto de Pedernales 7.8 Mw, 16 de abril de 2016. *Revista Geofísica*(67), 41.
- Corrier, D. E., Cortes, J., Thompson, K., Riaño, H., Becerra, E., & Rodriguez, R. (1978). A field survey of bovine anaplasmosis, babesiosis and tick vector prevalence in the eastern plains of Colombia. *Tropical animal health production*, 10(1), 91-92.
- Durrani, A. Z., Mehmood, N., & Shakoori, A. R. (2010). Comparison of three diagnostic methods for *Theileria annulata* in Sahiwal and Friesian cattle in Pakistan. *Pak J Zool*, 42(4), 467-472.
- Erickson, H. H., Goff, J. P., & Uemura, E. E. (2015). *Dukes' physiology of domestic animals*: John Wiley & Sons.
- Faber, S. N., Faber, N. E., McCauley, T. C., & Ax, R. L. (2005). Case study: effects of colostrum ingestion on lactational performance 1. *The professional animal scientist*, 21(5), 420-425.
- Figueroa-Millán, J. V., Lira-Amaya, J. J., Castañeda-Arriola, R., Álvarez-Martínez, J. A., Rojas-Martínez, C., & Bautista-Garfias, C. R. (2014). Optimización de una prueba de PCR-RFLP para detección y diferenciación de *Babesia* sp en garrapatas *Rhipicephalus microplus*. *CENID-Parasitología, Veterinaria, INIFAP*.

- Figueroa-Millán, J. V., Lira-Amaya, J. J., Polanco-Martínez, D. J., Álvarez-Martínez, J. A., Rojas-Martínez, C., & Bautista-Garfias, C. R. (2015). Diferenciación de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* mediante el uso de una prueba molecular en adn extraído de garrapatas repletas. *Entomología veterinaria, Vol 2*.
- Fivaz, B., Petney, T., & Horak, I. (2012). *Tick vector biology: medical and veterinary aspects*: Springer Science & Business Media.
- Fortes, M. R. S., Lehnert, S. A., Bolormaa, S., Reich, C., Fordyce, G., Corbet, N. J., . . . Reverter, A. (2012). Finding genes for economically important traits: Brahman cattle puberty. *Animal Production Science, 52*(3), 143-150.
- Gasque, R. (2008). Enciclopedia bovina. *Universidad Nacional Autónoma de México. México*.
- Gohil, S., Herrmann, S., Günther, S., & Cooke, B. M. (2013). Bovine babesiosis in the 21st century: advances in biology and functional genomics. *International journal for parasitology, 43*(2), 125-132.
- Gray, J., Zintl, A., Hildebrandt, A., Hunfeld, K.-P., & Weiss, L. (2010). Zoonotic babesiosis: overview of the disease and novel aspects of pathogen identity. *Ticks and tick-borne diseases, 1*(1), 3-10.
- Gray, J. S., Estrada-Peña, A., & Zintl, A. (2019). Vectors of Babesiosis. *Annual review of entomology, 64*, 149-165.
- Grünwaldt, E. G., Guevara, J. C., Estevez, O. R., Vicente, A., Rousselle, H., Alcuten, N., . . . Stasi, C. R. (2005). Biochemical and haematological measurements in beef cattle in Mendoza plain rangelands (Argentina). *Tropical animal health and production, 37*(6), 527-540.

- Hayes, B. J., Bowman, P. J., Chamberlain, A. J., & Goddard, M. E. (2009). Invited review: Genomic selection in dairy cattle: Progress and challenges. *Journal of dairy science*, 92(2), 433-443.
- Homer, M. J., Aguilar-Delfin, I., Telford, S. R., Krause, P. J., & Persing, D. H. (2000). Babesiosis. *Clinical microbiology reviews*, 13(3), 451-469.
- Hunfeld, K.-P., Hildebrandt, A., & Gray, J. S. (2008). Babesiosis: recent insights into an ancient disease. *International journal for parasitology*, 38(11), 1219-1237.
- Hussein, A. H., Mohammed, N., & Mohammed, H. K. (2007). *Theileriosis and babesiosis in cattle: haemogram and some biochemical parameters*. Paper presented at the Proceedings of XIII International Congress of International Society of Animal Hygiene.
- Jacobson, L. S. (2006). The South African form of severe and complicated canine babesiosis: clinical advances 1994–2004. *Veterinary parasitology*, 138(1-2), 126-139.
- Jaimes-Dueñez, J., Triana-Chávez, O., Holguín-Rocha, A., Tobon-Castaño, A., & Mejía-Jaramillo, A. M. (2018). Molecular surveillance and phylogenetic traits of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* in cattle (*Bos taurus*) and water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Colombia. *Parasites & vectors*, 11(1), 510.
- Jalovecka, M., Hajdusek, O., Sojka, D., Kopacek, P., & Malandrin, L. (2018). The complexity of piroplasms life cycles. *Frontiers in cellular infection microbiology*, 8, 248.
- Jalovecka, M., Sojka, D., Ascencio, M., & Schnittger, L. (2019). Babesia Life Cycle—When Phylogeny Meets Biology. *Trends in parasitology*.
- Jumbo Moreira, J. (2018). *Diagnóstico de Anaplasma marginale, Trypanosoma spp. y Babesia spp. en 19 fincas ganaderas bovinas de la Isla Santa Cruz de la provincia de Galápagos*,

mediante las técnicas de ELISA y PCR. (Carrera de Ingeniería en Biotecnología).
Universidad de las Fuerzas Armada ESPE.,

Laha, R., Das, M., & Sen, A. (2015). Morphology, epidemiology, and phylogeny of Babesia: An overview. *Tropical parasitology*, 5(2), 94.

León Jaramillo, D. (2017). *Prevalencia molecular de Babesia bovis y Babesia bigemina en explotaciones ganaderas del sector sur de la provincia de Zamora Chinchipe, Ecuador.*
Loja: Universidad Nacional de Loja,

Levin, R. E. (2012). PCR detection of aflatoxin producing fungi and its limitations. *International journal of food microbiology*, 156(1), 1-6.

Lignières, J. (1903). Bovine babesiosis. New investigations and observations on the multiplicity, the evolution and natural transmission of the parasites involved in the disease and on vaccination. *Archives de Parasitologie*, 7, 398-407.

MAGAP, M. d. A. y. G. (2019). MAGAP participa en ferias agrícolas ganaderas.

Magona, J. W., Walubengo, J., Olaho-Mukani, W., Jonsson, N. N., Welburn, S. C., & Eisler, M. C. (2008). Clinical features associated with seroconversion to Anaplasma marginale, Babesia bigemina and Theileria parva infections in African cattle under natural tick challenge. *Veterinary parasitology*, 155(3-4), 273-280.

McCosker, P. J. (1981). The global importance of babesiosis. *Babesiosis*, 1-24.

McLeod, R., & Kristjanson, P. (1999). Economic impact of ticks and tick-borne diseases to livestock in Africa, Asia and Australia. *Report to the International Livestock Research Institute, Nairobi, Kenya.*

Medina Naranjo, V., Reyna-Bello, A., Tavares-Marques, L., Campos, A., Ron-Roman, J., Carlos Moyano, J., . . . Chavez-Larrea, M. (2017). Diagnosis of hemotropic Anaplasma

- marginale, Trypanosoma spp. and Babesia spp. by elisai and pcr techniques in three livestock farms of Pastaza Province, Ecuador. *Revista cientifica-facultad de ciencias veterinarias*, 27(3), 162-171.
- Mehlhorn, H., & Schein, E. (1985). The piroplasms: life cycle and sexual stages. In *Advances in parasitology* (Vol. 23, pp. 37-103): Elsevier.
- Miller, L. (2012). *Immunity to blood parasites of animals and man* (Vol. 93): Springer Science & Business Media.
- Mosqueda, J., Olvera-Ramirez, A., Aguilar-Tipacamu, G., & Canto, G. J. (2012). Current advances in detection and treatment of babesiosis. *Current medicinal chemistry*, 19(10), 1504-1518.
- Nicholls, M., Ibata, G., & Rodas, F. V. (1980). Prevalence of antibodies to Babesia bovis and Anaplasma marginale in dairy cattle in Bolivia. *Tropical animal health production*, 12(1), 48-49.
- Nkwo-Akenji, T. K., Chi, P. C., Cho, J. F., Ndamukong, K. K. J., & Sumbele, I. (2006). Malaria and helminth co-infection in children living in a malaria endemic setting of mount Cameroon and predictors of anemia. *Journal of Parasitology*, 92(6), 1191-1196.
- Oliveira-Sequeira, T. C. G., Oliveira, M. d. S., Araujo Jr, J. P., & Amarante, A. F. T. (2005). PCR-based detection of Babesia bovis and Babesia bigemina in their natural host Boophilus microplus and cattle. *International journal for parasitology*, 35(1), 105-111.
- Olmeda, A., Armstrong, P., Rosenthal, B., Valladares, B., Del Castillo, A., De Armas, F., . . . Spielman, A. (1997). A subtropical case of human babesiosis. *Acta tropica*, 67(3), 229-234.
- Passos, L. M. F., Bell-Sakyi, L., & Brown, C. G. D. (1998). Immunochemical characterization of in vitro culture-derived antigens of Babesia bovis and Babesia bigemina. *Veterinary parasitology*, 76(4), 239-249.

- Penzhorn, B. L. (2006). Babesiosis of wild carnivores and ungulates. *Veterinary parasitology*, 138(1-2), 11-21.
- Radostits, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W., & Constable, P. D. (2006). *Veterinary Medicine E-Book: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*: Elsevier Health Sciences.
- Rasmussen, H. B. (2012). Restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments (PCR-RFLP) and gel electrophoresis-valuable tool for genotyping and genetic fingerprinting. In *Gel electrophoresis-principles and basics*: InTechopen.
- Riche, M. (2007). Analysis of refractometry for determining total plasma protein in hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) at various salinities. *Aquaculture*, 264(1-4), 279-284.
- Ristic, M. (1988). Babesiosis of domestic animals and man. *CR Acad. Sci.*
- Salam, N., & Azam, S. (2017). Prevalence and distribution of soil-transmitted helminth infections in India. *BMC Public Health*, 17(1), 201.
- Smith, T., & Kilborne, F. L. (1893). *Investigations into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever* (Vol. 1): US Government Printing Office.
- Sonenshine, D. E., & Roe, R. M. (2013). *Biology of ticks* (Vol. 2): Oxford University Press.
- Sousa, D. R. T. d., Santos, C. S. d. S., Wanke, B., Júnior, S., Santos, M. C. d., Cruz, K. S., . . . Souza, J. V. B. d. (2015). PCR-RFLP as a useful tool for diagnosis of invasive mycoses in a healthcare facility in the North of Brazil. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(3), 231-235.
- Starcovici, C. (1893). Bemerkungen über den durch Babes entdeckten Blutparasiten und die durch denselben hervorgebrachten Krankheiten, die seuchenhafte Hämoglobinurie des Rindes (Babes), das Texasfieber (Th. Smith) und der Carceag der Schafe (Babes). 14, 1-8.

- Struff, W. G., & Sprotte, G. (2007). Bovine colostrum as a biologic in clinical medicine: review. *Int J Clin Pharmacol Therapeut*, 45, 193-202.
- Terkawi, M. A., Thekiso, O. M. M., Katsande, C., Latif, A. A., Mans, B. J., Mathee, O., . . . Yokoyama, N. (2011). Serological survey of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle in South Africa. *Veterinary parasitology*, 182(2-4), 337-342.
- Tothova, C., Nagy, O., & Kovac, G. (2016). Serum proteins and their diagnostic utility in veterinary medicine: a review. *Veterinárni medicína*, 61(9), 475-496.
- Uilenberg, G. (2006). Babesia—a historical overview. *Veterinary parasitology*, 138(1-2), 3-10.
- Vannier, E. G., Diuk-Wasser, M. A., Mamoun, C. B., & Krause, P. (2015). Babesiosis. *Infectious Disease Clinics*, 29(2), 357-370.
- Vial, H. J., & Gorenflot, A. (2006). Chemotherapy against babesiosis. *Veterinary parasitology*, 138(1-2), 147-160.
- Wagner, G., Cruz, D., Holman, P., Waghela, S., Perrone, J., Shompole, S., & Rurangirwa, F. (1992). Non-immunologic methods of diagnosis of babesiosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87, 193-199.
- Weaver, A. D., Atkinson, O., Jean, G. S., & Steiner, A. (2018). *Bovine surgery and lameness*: John Wiley & Sons.
- White, M. W., & Suvorova, E. S. (2018). Apicomplexa cell cycles: something old, borrowed, lost, and new. *Trends in parasitology*.
- Whitley, E., & Ball, J. (2002). Statistics review 4: sample size calculations. *Critical care*, 6(4), 335.
- Young, A. S., & Morzaria, S. P. (1986). Biology of babesia. *Parasitology Today*, 2(8), 211-219.

Yüksek, N. A., Altuğ, N., & Gül, A. (2007). Therapeutic effect of the combination of trichlobendazole and levamisole in sheep with endoparasite infection. *Yüzüncü yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 18(1), 19-24.

Zulfiqar, S., Shahnawaz, S., Ali, M., Bhutta, A. M., Iqbal, S., Hayat, S., . . . Saeed, A. (2012). Detection of *Babesia bovis* in blood samples and its effect on the hematological and serum biochemical profile in large ruminants from Southern Punjab. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 2(2), 104-108.