



**Evaluación de la transmisión transovárica de *Anaplasma marginale* y *Babesia* spp. en garrapatas teleoginas *Rhipicephalus microplus* de la Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas**

Rodríguez Alba, Yasmin Sthefania

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Ph.D. Reyna Bello, Armando

16 de octubre del 2020



### Document Information

Analyzed document	TESIS_FINAL (004)AR.docx (D81786844)
Submitted	10/15/2020 7:21:00 PM
Submitted by	Reyna Bello Armando
Submitter email	aareyna@espe.edu.ec
Similarity	1%
Analysis address	aareyna.espe@analysis.orkund.com

### Sources included in the report

<b>W</b>	URL: <a href="https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2846/1/T-ESPE-030491.pdf">https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2846/1/T-ESPE-030491.pdf</a> Fetched: 12/23/2019 8:29:39 AM	2
<b>W</b>	URL: <a href="https://www.researchgate.net/publication/315829740_Diagnosis_of_hemotropics_Anapla...">https://www.researchgate.net/publication/315829740_Diagnosis_of_hemotropics_Anapla ...</a> Fetched: 3/16/2020 5:08:04 AM	1
<b>SA</b>	<b>Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / PROYECTO DE TITULACION JIMMY JUMBO.pdf</b> Document PROYECTO DE TITULACION JIMMY JUMBO.pdf (D35649533) Submitted by: fwproano@espe.edu.ec Receiver: fwproano.espe@analysis.orkund.com	1

Firmado digitalmente por  
 ARMANDO REYNA BELLO  
 Nombre de reconocimiento (DN):  
 c=EC, o=SECURITY DATA S.A. 1,  
 ou=ENTIDAD DE CERTIFICACION DE  
 INFORMACION,  
 serialNumber=290620182334,  
 cn=ARMANDO REYNA BELLO  
 Fecha: 2020.11.26 14:02:08 -05'00'



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

3

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “Evaluación de la transmisión transovárica de *Anaplasma marginale* y *Babesia spp.* en garrapatas teleoginas *Rhipicephalus microplus* de la Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas.”, fue realizado por el señorita **Rodríguez Alba, Yasmin Sthefania** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 16 de octubre de 2020.

Firmado digitalmente por ARMANDO REYNA BELLO  
Nombre de reconocimiento (DN): c=EC, o=SECURITY DATA S.A. 1, ou=ENTIDAD DE CERTIFICACION DE INFORMACION, serialNumber=290620182334, cn=ARMANDO REYNA BELLO  
Fecha: 2020.11.26 14:01:26 -05'00'

**Armando Reyna Bello Ph.D.**

Docente – Investigador ESPE-ES

C.C.: 1758891830



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

4

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, Rodríguez Alba, Yasmin Sthefania, con cédula de ciudadanía n° 1900617562, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: "Evaluación de la transmisión transovárica de *Anaplasma marginale* y *Babesia spp.* en garrapatas teleoginas *Rhipicephalus microplus* de la Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas." es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 16 de octubre de 2020.

---

Rodríguez Alba Yasmin Sthefania

C.C.: 1900617562



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo, Rodríguez Alba, Yasmin Sthefania con cédula de ciudadanía n° 1900617562, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: "Evaluación de la transmisión transovárica de *Anaplasma marginale* y *Babesia spp.* en garrapatas teleoginas *Rhipicephalus microplus* de la Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas." en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 16 de octubre de 2020.

---

Rodríguez Alba Yasmin Sthefania

C.C.: 1900617562

## DEDICATORIA

Con todo mi amor, esfuerzo y sacrificio, este trabajo va dedicado a mi mami Fanny María, quien con su apoyo y sus consejos me impulsan cada día a ser una mejor persona, una mejor mujer, quien debe luchar por sus sueños y ha estado en cada paso guiándome en el camino de la vida, a mi papito Miguel Ángel que de igual forma ha estado siempre para mí, sin dejarme caer, quien con su ejemplo me inspiró que el esfuerzo siempre es gratificante, que el valor de la humildad es una de las virtudes más grandes que un ser humano puede tener. A Donald, Nadya y Miguel Andrés mis hermanos y Lily mi mascota, quienes a su manera supieron brindarme su apoyo y compañía, quiero que sepan que siempre daré lo mejor de mí, porque su cariño y apoyo es lo mejor que tengo y quiero que sepan que siempre voy a estar para ustedes en este camino largo llamado vida.

Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico:

es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un

cuento de hadas

“Marie Curie”

## AGRADECIMIENTO

A la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, por los conocimientos y enseñanzas que me brindaron mis maestros durante toda la etapa de mi desarrollo profesional.

Al Instituto de Investigación en Zoonosis – CIZ de la Universidad Central del Ecuador, por permitirme desarrollar todo el proceso de mi investigación.

A Armando Reyna Bello Ph.D, por haber despertado en mí la pasión por la ciencia, la investigación, por su confianza, compromiso, dedicación y sobre todo por sus valiosos conocimientos compartidos en el desarrollo de mi tesis y mi crecimiento profesional.

Al Ing. Gustavo Echeverria, por siempre estar dispuesta a dar lo mejor de sí, por su infinita ayuda y contribución, por transmitirme sus conocimientos sin reservas durante todo el proceso de mi investigación.

A la Dra. Sandra Enríquez, por su apoyo incondicional, su dedicación y sobre todo por transmitirme sus conocimientos durante el desarrollo de mi investigación.

A la Dra. María Augusta Chávez, por su apoyo incondicional y guía durante toda mi carrera de Ingeniería y el desarrollo de esta investigación.

Al señor Diego Navas, a la familia Aponte, Dr. Francisco, Ing. Pablo, Ing. Jimmy, Jessica, Mateo, Hugo, Kerly, Génesis, Angela, Karol y Pablo; quienes me ayudaron durante el proceso de muestreo, el cual fue la base de mi investigación.

A mí querida familia, no me alcanzan las palabras para agradecerles todo su apoyo incondicional, su amor, su esperanza, sus regaños, sin ello no hubiese sido posible alcanzar con éxito mis objetivos y metas.

A Laura, Pancho, Daniel, Andrea, Heidy, Mayerli, Mateo, Erika, Dennys, mis compañeros y amigos que han estado junto a mí en esta etapa de estudios, gracias por estar siempre apoyándome en las buenas y en las malas.



**ÍNDICE DE CONTENIDOS**

URKUND .....	2
CERTIFICACIÓN.....	3
RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA .....	4
AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN .....	5
DEDICATORIA .....	6
AGRADECIMIENTO .....	7
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	9
LISTADO DE TABLAS .....	14
LISTADO DE FIGURAS .....	15
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	16
RESUMEN .....	18
ABSTRACT.....	19
Capítulo I: Introducción.....	20
Formulación del Problema .....	20
Justificación del Problema.....	22
Objetivos de la Investigación.....	24
<i>Objetivo General</i> .....	24

	10
<i>Objetivos Específicos</i> .....	24
Capítulo II: Marco teórico .....	25
Anaplasmosis .....	25
<i>Historia</i> .....	25
<i>Anaplasma marginale en América Latina</i> .....	26
<i>Anaplasmosis bovina</i> .....	27
<i>Características de Anaplasma marginale</i> .....	28
<i>Sintomatología clínica de Anaplasmosis</i> .....	29
<i>Taxonomía</i> .....	30
<i>Biología de transmisión de A. marginale en la garrapata Rhipicephalus microplus</i> .....	30
<i>Variabilidad genética de A. Marginale.</i> .....	33
<i>Métodos de diagnóstico de Anaplasma marginale</i> .....	34
Babesiosis .....	34
<i>Historia</i> .....	34
<i>Distribución Babesia spp. en América Latina</i> .....	35
<i>Babesiosis bovina</i> .....	36
<i>Sintomatología clínica de Babesiosis</i> .....	37
<i>Características de Babesia spp.</i> .....	37
<i>Taxonomía</i> .....	38
<i>Biología de transmisión de Babesia spp. en la garrapata R. microplus</i> .....	38

	11
<i>Métodos de diagnóstico de Babesia spp.</i> .....	40
Garrapata <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	42
<i>Etiología de la garrapata Rhipicephalus microplus</i> .....	43
<i>Taxonomía de Rhipicephalus microplus</i> .....	43
<i>Morfología de la garrapata Rhipicephalus microplus</i> .....	44
<i>Ciclo de vida de la garrapata Rhipicephalus microplus</i> .....	45
Hipótesis .....	47
Capítulo III: Materiales y métodos.....	47
Obtención de las muestras de sangre de bovinos y garrapatas hembras teleoginas ..	49
Diagnóstico de <i>A. marginale</i> y <i>Babesia</i> spp. en bovinos .....	51
<i>Extracción de ADN de la muestra sanguínea</i> .....	51
<i>Cuantificación de ADN</i> .....	51
<i>Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) convencional</i> .....	52
<i>Electroforesis en gel de agarosa</i> .....	56
<i>Obtención de las larvas</i> .....	56
<i>Extracción de ADN y ARN en garrapatas hembras adultas y larvas</i> .....	57
Diagnóstico de <i>A. marginale</i> , <i>Babesia</i> spp., <i>B. bigemina</i> y <i>B. bovis</i> en garrapatas hembras adultas y larvas.....	58
Cuantificación de la carga parasitaria de <i>Babesia</i> spp. y rickettsemia de <i>A. marginale</i> mediante RT qPCR.....	58

	12
<i>RT qPCR para A. marginale</i> .....	59
<i>RT qPCR para Babesia spp.</i> .....	59
Análisis estadístico .....	59
<i>Diseño no experimental</i> .....	59
<i>Variable de respuesta</i> .....	59
<i>Error aleatorio</i> .....	59
<i>Datos de PCR</i> .....	60
<i>Datos de la Tasa de transmisión</i> .....	60
<i>Datos de RT qPCR</i> .....	61
Capítulo IV: Resultados y Discusión.....	62
Selección de animales experimentales.....	62
Prevalencia de los Hemotrópicos en bovinos con garrapatas teleoginas <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	63
<i>Prevalencia de Anaplasma marginale</i> .....	63
<i>Prevalencia de Babesia spp., Babesia bovis y Babesia bigemina</i> .....	66
Prevalencia de los Hemotrópicos garrapatas teleoginas <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	70
<i>Prevalencia de Anaplasma marginale</i> .....	70
<i>Prevalencia de Babesia spp.</i> .....	70
Prevalencia de los Hemotrópicos en pool de larvas <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	71
<i>Prevalencia de Anaplasma marginale</i> .....	71

	13
<i>Prevalencia de Babesia spp.</i> .....	71
Tasa de transmisión de los hemotrópicos en las garrapatas teleoginas y en el pool de larvas.....	75
<i>Tasa de transmisión de Anaplasma marginale</i> .....	75
<i>Tasa de transmisión de Babesia spp.</i> .....	77
Viabilidad de los hemotrópicos mediante RT qPCR.....	81
<i>Viabilidad de Anaplasma marginale en muestras de garrapatas teleoginas y pool de larvas</i> .....	81
<i>Viabilidad de Babesia spp. en muestras de garrapatas teleoginas y pool de larvas</i>	86
Capítulo V: Conclusiones.....	92
Capítulo VI: Recomendaciones.....	94
Capítulo VII: Bibliografía.....	95
Capítulo VIII: Anexos .....	106

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Componentes de PCR para la detección de <i>Anaplasma marginale</i> . .....	52
<b>Tabla 2.</b> Set de primers para la detección de <i>Babesia bigemina</i> y <i>Babesia bovis</i> .....	54
<b>Tabla 3.</b> Componentes de la Multiplex nPCR para la detección de <i>B. bigemina</i> y <i>B. bovis</i> .....	55
<b>Tabla 4.</b> Prevalencia de Hemotrópicos en los bovinos, garraptas y pool de larvas.....	72
<b>Tabla 5.</b> Tasa de transmisión de <i>A. marginale</i> a partir de bovinos infectados a sus garrapatas teleoginas y a sus larvas.....	75
<b>Tabla 6.</b> Tasa de transmisión de <i>Babesia</i> spp. a partir de bovinos infectados a sus garrapatas teleoginas y a sus larvas.....	78
<b>Tabla 7.</b> Tasa de transmisión de <i>B. bigemina</i> y <i>B. bovis</i> a partir de bovinos infectados a sus garrapatas teleoginas y a sus larvas.....	79
<b>Tabla 8.</b> Detección y cuantificación absoluta del número de copias de <i>Anaplasma marginale</i> en muestras de garrapatas teleoginas.....	84
<b>Tabla 9.</b> Detección y cuantificación absoluta del número de copias de <i>Babesia</i> spp. en muestras de garrapatas teleoginas.....	88
<b>Tabla 10.</b> Detección de la viabilidad de los hemotrópicos en las garrapatas teleoginas y en pool de larvas.....	91

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo de desarrollo de <i>Anaplasma marginale</i> en bovinos y garrapatas teleoginas.....	33
<b>Figura 2.</b> Ciclo de vida de <i>Babesia sensu stricto</i> . ....	40
<b>Figura 3.</b> Anatomía general de las garrapatas hembras duras masculinas y femeninas.....	45
<b>Figura 4.</b> Ciclo de vida de las garrapatas teleoginas de <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	47
<b>Figura 5.</b> Diagrama resumen de la metodología realizada durante la fase de estudio .....	49
<b>Figura 6.</b> Zona de muestreo de las diferentes Unidades de Producción animal (UPA) en este estudio .....	50
<b>Figura 7.</b> Curva estándar construída con las pruebas de qRT-PCR. (A). Curvas de amplificación. (B). Curva estándar. Se presentan los valores del coeficiente de correlación (R <sup>2</sup> ) y la ecuación de la reacta.....	62
<b>Figura 8.</b> Detección por PCR convencional del gen <i>msp5</i> de <i>Anaplasma marginale</i> en muestras de ADN de bovinos. ....	64
<b>Figura 9.</b> Detección por PCR convencional del gen <i>18 S rRNA</i> del género <i>Babesia</i> spp. en muestras de de ADN de bovinos. ....	67
<b>Figura 10.</b> Detección por PCR convencional del gen <i>rap-1</i> para <i>B. bovis</i> y <i>spei-avai</i> para <i>B. bigemina</i> en muestras de ADN de garrapatas <i>R. microplus</i> y Bovinos .....	68

<b>Figura 11.</b> Gráfica de amplificación por PCR en tiempo real en escala logarítmica de <i>Anaplasma marginale</i> . .....	82
<b>Figura 12.</b> Curva de calibración estándar de <i>Anaplasma marginale</i> .....	83
<b>Figura 13.</b> Gráfica de amplificación por PCR a tiempo real en escala logarítmica de <i>Babesia</i> spp. ....	87
<b>Figura 14.</b> Curva de calibración estándar de <i>Babesia</i> spp. ....	88

#### LISTADO DE ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>dNTPs</b>	Desoxiribonucleótidos trifosfato
<b>g</b>	Gramos
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>kg</b>	Kilogramos
<b>L</b>	Litro
<b>M</b>	Molar
<b>mL</b>	Mililitros



<b>nM</b>	Nanomolar
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>spp.</b>	Todas las especies individuales dentro de un género
<b>μL</b>	Microlitro
<b>μM</b>	Micromolar
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>V</b>	Voltios
<b>C-</b>	Control negativo
<b>C+</b>	Control positivo
<b>Ct</b>	Número de ciclos en un ensayo de RT-PCR necesario para amplificar el ARN para alcanzar un nivel detectable.
<b>Cp</b>	Número de copias parasitarias de los hemotrópicos
<b>Gna</b>	Número de garrapatas positivas para <i>A. marginale</i>
<b>Gnb</b>	Número de garrapatas positivas para <i>Babesia</i> spp.
<b>Lna</b>	Número de pools de larvas positivas para <i>A. marginale</i>
<b>Lnb</b>	Número de pools de larvas positivas para <i>Babesia</i> spp.

## RESUMEN

Babesiosis y anaplasmosis bovina son enfermedades causadas por los hemotrópicos *Babesia* spp. y *Anaplasma marginale* respectivamente, consideradas enfermedades transmitidas por garrapatas *Rhipicephalus microplus*, que ocasionan principalmente fiebre, anemia y algunas veces la muerte de los animales. En el Ecuador no existen reportes sobre la transmisión natural de estos hemotrópicos a las garrapatas por parte de bovinos infectados, por lo que el objetivo de esta investigación fue identificar *A. marginale* y *Babesia* spp mediante PCR y RT-qPCR en bovinos, garrapatas teleoginas y en sus larvas. Se evaluaron 40 muestras de bovinos y las garrapatas de los animales positivos fueron analizadas mediante PCR y por RT-qPCR. Durante este estudio, la PCR mostró una prevalencia del 52.5%(21/40) para *A. marginale* y 22.5% (9/40) para *Babesia* spp. en los bovinos; de igual forma, se detectó un 23.39% (29/124) y un 0% (0/29) de *A. marginale* en las garrapatas teleoginas y en su descendencia respectivamente, en cuanto a *Babesia* spp. se detectó un 55.17% (32/58) y un 6.25% (2/32) del parasito en las garrapatas teleoginas y en su descendencia respectivamente. La viabilidad de los hemotropicos se pudo demostrar por RT-qPCR en un 10.34% (3/29) para *A. marginale* y un 53.13% (17/32) para *Babesia* spp., no obstante no se encontraron larvas qPCR positivas para *A. marginale*, pero si en el 100% (2/2) para *Babesia* spp. Este estudio demuestra que no existió la transmisión transovarica de *A. marginale* pero si de *Babesia* spp.

### PALABRAS CLAVES:

- ANAPLASMOSIS
- BABESIOSIS
- GARRAPATAS
- LARVAS

## ABSTRACT

Babesiosis and bovine anaplasmosis are diseases caused by the hemotropic *Babesia* spp. and *Anaplasma marginale* respectively, considered diseases transmitted by *Rhipicephalus microplus* ticks, which mainly cause fever, anemia and sometimes death of the animals. In Ecuador there are no reports on the natural transmission of these hemotropics to ticks by infected cattle, so the objective of this research was to identify *A. marginale* and *Babesia* spp by PCR and RT-qPCR in cattle, teleogyne ticks and in their larvae. 40 bovine samples were evaluated and ticks from positive animals were analyzed by PCR and RT-qPCR. During this study, PCR showed a prevalence of 52.5% (21/40) for *A. marginale* and 22.5% (9/40) for *Babesia* spp. in bovines; likewise, 23.39% (29/124) and 0% (0/29) of *A. marginale* were detected in teleogynous ticks and their offspring respectively, regarding *Babesia* spp. 55.17% (32/58) and 6.25% (2/32) of the parasite were detected in teleogynous ticks and their offspring respectively. The viability of the hemotropics could be demonstrated by RT-qPCR in 10.34% (3/29) for *A. marginale* and 53.13% (17/32) for *Babesia* spp., However no qPCR-positive larvae were found for *A. marginale*, but 100% (2/2) for *Babesia* spp. This study shows that there was no transovarian transmission of *A. marginale* but there was of *Babesia* spp.

### KEY WORDS:

- ANAPLASMOSIS
- BABESIOSIS
- TICKS
- LARVAE

## Capítulo I: Introducción

### Formulación del Problema

Una de las enfermedades más comunes de los bovinos en las zonas tropicales y subtropicales del mundo son los hemotrópicos, entre ellas la babesiosis y anaplasmosis, causada por los parásitos protozoarios *Babesia bigemina* (*B. bigemina*) y *Babesia bovis* (*B. bovis*) y por la rickettsia *Anaplasma marginale* (*A. marginale*) respectivamente. Estas enfermedades se transmiten biológicamente por varias especies de garrapatas hembras, principalmente de los géneros *Rhipicephalus*, *Dermacentor* e *Ixodes* y mecánicamente en el caso de *A. marginale* por moscas hematófagas o fómites contaminados con sangre. En Latinoamérica estos organismos son transmitidos por la garrapata común del ganado *Rhipicephalus microplus* (*R. microplus*) (Khamesipour, Dida, Anyona, Razavi, & Rakhshandehroo, 2018; Reyna-bello, 2014; Suarez & Noh, 2011). Estos organismos también conocidos como hemotrópicos, se multiplican en el interior de los glóbulos rojos trayendo como consecuencia su destrucción, lo que se expresa clínicamente en su forma aguda por fiebre y anemia, con efectos secundarios, como bajo consumo de alimentos, baja producción de leche, pérdida de peso y riesgo de muerte de los animales (Benavides, Romero, & Villamil, 2016). Siendo estas enfermedades endémicas de muchos países tropicales y subtropicales, producen pérdidas económicas directas e indirectas con implicaciones en el comercio lechero y cárnicos (Benavides et al., 2016; Reyna-bello, 2014).

El Ecuador posee regiones tropicales y subtropicales, por lo tanto por las condiciones ambientales es apto para la multiplicación de los vectores de estas

enfermedades (Guillén & Muñoz, 2015), la especie de garrapata más común es la denominada *R. microplus*, aunque también se puede encontrar en menor cantidad la especie *Amblyomma cajennense* (Guillén & Muñoz, 2015), la primera interviene en la transmisión de hemotrópicos que afectan la salud de los bovinos, siendo el vector principal de las especies *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* y de la rickettsia *Anaplasma marginale* (Benavides et al., 2016; Guglielmone, 1995; Uilenberg, 2006).

El diagnóstico de la Anaplasmosis bovina se realiza de manera clínica o mediante frotis sanguíneo teñido con Giemsa, pero debido a la poca sensibilidad de este y a la ausencia de sintomatología clínica, se recomienda el empleo de las pruebas como PCR o ELISA, que son técnicas que tienen una alta sensibilidad y especificidad cercanas al 100% (Reyna-bello, 2014). Ejemplo de esto, es que un estudio realizado en Ecuador por Navarrete-Arroyo, (2016) para detectar *A. marginale*, en este caso, la prueba de ELISAi mostró una especificidad del 90 % y una sensibilidad del 96 % comparada con PCR.

El diagnóstico de babesiosis bovina al igual que el de la anaplasmosis se puede hacer de manera directa mediante un frotis sanguíneo, frotis por aposición de tejido cerebral en necropsias o por la técnica de la capa de blancos y de manera indirecta mediante ELISA, inmunofluorescencia indirecta o molecular como la PCR (Mosqueda, Olvera-Ramirez, Aguilar-Tipacamu, & Canto, 2012; T. Muñoz, 2016). Todas estas técnicas han demostrado ser muy útiles para el diagnóstico del protozoario, tanto en una etapa temprana como en una etapa crónica de la enfermedad (Benavides et al., 2016).

Por lo tanto si no hay un manejo adecuado de los vectores y de los animales, las poblaciones de garrapatas hembras pueden crecer hasta niveles endémicos, dificultando su control (Rodríguez-Vivas et al., 2014).

### **Justificación del Problema**

La anaplasmosis y babesiosis bovina son enfermedades que afectan a los animales que viven en las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo, debido a la existencia de vectores, tales como las garrapatas y moscas hematófagas, afectando negativamente las producciones ganaderas, tanto en carne como en leche. No obstante algunos de los autores consideran que la transmisión transovárica de *A. marginale* no se presenta en las garrapatas hembras o raramente ocurre (Baldacchino et al., 2013; Reynabello, 2014), y se considera que en América Latina es más trascendental la transmisión de *A. marginale* por moscas hematófagas como el tábano (*Tabanus spp.*) (Eleizalde & Reynabello, 2014; Medina-Naranjo et al., 2017). La importancia de *R. microplus*, como vector de *A. marginale* al ser de un solo hospedador, se ha minimizado, ya que una vez que la larva infesta al bovino pasa toda su vida en el mismo animal y sólo lo abandona cuando la hembra ingurgitada se desprende para ovipositar y morir (Polanco & Rios, 2016; Strickland, Gerrish, Hourrigan, & Schubert, 1978). Otros autores señalan que esta rickettsia se transmite biológicamente por varias especies de garrapatas hembras, en las regiones tropicales y subtropicales del mundo e indican que, *R. microplus* es el vector principal; debido a su movilidad y longevidad (Estrada et al., 2014). Algunos estudios han demostrado que *A. marginale* puede transmitirse intraestadialmente y transestadialmente en *R. microplus*, pero la transmisión transovarial pocos estudios lo han demostrado hasta ahora.

Aunque existen estudios realizados en Brasil como el de Esteves et al., (2015), en el cual observaron lotes de larvas de *R. microplus* obtenidas de hembras ingurgitadas incubadas a 18 °C en el laboratorio, estas larvas resultaron positivas para *A. marginale* (11% por PCR); en contraste, a larvas de hembras ingurgitadas incubadas a 28 °C no presentaron ADN de *A. marginale*; por lo tanto basados en estos resultados los autores hipotetizan que *A. marginale* requiere mayor tiempo para colonizar los ovarios de la garrapata, y que la incubación a 28 °C no lo permite, sin embargo, la incubación a 18 °C prolonga la oviposición y la rickettsia podría colonizar los ovarios y de esta forma sobrevivir durante el invierno en algunas zonas del mundo. A pesar de estos reportes, existen estudios realizados en México que confirman la transmisión transovarica de *A. marginale* como es el caso de Estrada & Hernandez-ortiz. (2020), utilizando un PCR multiplex anidado (nPCR) en el cual las larvas ovipositadas por garrapatas hembras *R. microplus* incubadas a 28 °C desarrollaron una rickettsemia del 7,5%.

Por otra parte, existen varios estudios que demuestran que las especies de Babesia se transmiten mediante garrapatas hembras que se infectan al ingerir parásitos que se encuentran en la sangre del bovino infectado, el estudio de Oliveira-sequeira et al. (2005) demostró que existe la transmisión vertical (infección transovarial) y cuando el patógeno permanece en el vector de una etapa de vida "estadio" a la siguiente (tranestadial) (Howell et al., 2007a). Considerando así los principales vectores de *B. bigemia* y *B. Bovis* en Latinoamérica es la especie *R. microplus* y en países de Norteamérica la especie de *R. annulatus* (Alvarez, Rojas, & Figueroa, 2019).

En Ecuador, estas enfermedades han sido poco estudiadas, por lo que evidenciar material genético en las garrapatas teleoginas y sus larvas, permitirá controlar su

transmisión y de esta manera se logrará un mejor manejo de las poblaciones de garrapatas hembras y por lo tanto de las enfermedades. Para realizar el presente estudio se obtuvieron muestras de garrapatas teleoginas provenientes de diferentes fincas de Santo Domingo de los Tsáchilas, siendo una región de alta prevalencia de garrapatas *R. microplus* (Guillén & Muñoz, 2015).

## **Objetivos de la Investigación**

### ***Objetivo General***

Evaluar la transmisión transovárica de *Anaplasma marginale* y *Babesia* spp. en garrapatas hembras teleoginas *Rhipicephalus microplus* de la Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas.

### ***Objetivos Específicos***

- Determinar la tasa de transmisión de *Anaplasma marginale* y *Babesia* spp. de bovinos infestados con garrapatas hembras teleoginas *Rhipicephalus microplus* mediante PCR convencional.
- Determinar la viabilidad de *Anaplasma marginale* y *Babesia* spp. en la transmisión transovárica de garrapatas hembras teleoginas a larvas infestantes mediante la técnica de RT PCR cuantitativa.



## Capítulo II: Marco teórico

### Anaplasmosis

#### *Historia*

En el año de 1893 Smith y Kilborne, en el transcurso de sus investigaciones relacionadas con la fiebre de las garrapatas en Texas, realizaron la primera observación de *Anaplasma marginale* como pequeños corpúsculos puntiformes o en forma de cocos, dentro de los glóbulos rojos de los animales enfermos, postulando que esta era una etapa evolutiva de la Babesia (Amasino, 2017).

En el año de 1910 Sir Arnold Theiler utilizó el término “Anaplasma” para describir un microorganismo que se encontraba presente en los glóbulos rojos de bovinos de África que sufrían de una anemia infecciosa aguda. Este fue el primer investigador en interpretar estos pequeños corpúsculos como representantes de un nuevo género de parásito y propuso el nombre de *Anaplasma marginale*, debido a la ausencia de citoplasma y a su ubicación marginal dentro del glóbulo rojo del animal infectado, por lo que a la enfermedad la denominó como Anaplasmosis (Theiler, 1910).

Pilcher, en el año de 1961, concluyó que *Anaplasma marginale* pertenecía al género Rickettsia y determinó además, que los eritrocitos parasitados con Anaplasma consumen el doble del oxígeno que los eritrocitos normales y esto no ocurre en eritrocitos parasitados con virus (Suarez & Noh, 2011).

Kreir y Ristic en el año de 1973, basándose en las características morfológicas de *Anaplasma* como la ausencia de núcleo y organelos, la clasificaron dentro de la familia Anaplasmataceae del orden de las Rickettsias (Amasino, 2017).

### ***Anaplasma marginale* en América Latina**

Se ha descrito que en América Latina la transmisión de *Anaplasma marginale* se debe a su vector *Rhipicephalus microplus* (Suarez & Noh, 2011). No obstante, esto es controversial, debido a que en América Latina se considera, ser más trascendental la transmisión por moscas hematófagas como el tábano (*Tabanus* spp.) (Baldacchino et al., 2013; Guglielmone, 1995; Medina-Naranjo et al., 2017; Reyna-bello, 2014). Aunque la transmisión intra-estadial y trans-estadia es posible, requiere la transferencia de garrapatas de uno a otro huésped, lo cual es numéricamente insignificante para las garrapatas hembras de un solo hospedador y ocurre a una tasa baja para los machos *R. microplus* (Baldacchino et al., 2013). Por lo tanto, las garrapatas deben considerarse amplificadores de la carga parasitaria en lugar de vectores (Ramiro Muñoz-Guarnizo et al., 2017). Tabanids y stomoxes son considerados responsables de la transmisión mecánica de *Anaplasma*, a través de sangre contaminada que hay en las piezas bucales de las moscas cuando pican a los bovinos (Baldacchino et al., 2013). La transmisión mecánica es probablemente la ruta principal de *A. marginale* en ciertas áreas de los EE. UU., América Central y del Sur, y África, cuando no hay garrapatas como vectores. En este sentido, en un ensayo realizado en Ecuador por Medina-Naranjo et al., (2017), muestran que en tres fincas de la Provincia de Pastaza se encontraron anticuerpos anti MSP5r de *Anaplasma marginale*, indistintamente a la presencia o no de garrapatas.

Este resultado afirma lo que sustentan algunos autores sobre que el principal vector de *Anaplasma marginale* en América Latina, pues, pareciera ser principalmente los tábanos y no *R. microplus* (Coronado, 2001).

En el Ecuador, algunas investigaciones demostraron altas prevalencias de esta rickettsia, por ejemplo en el Cantón Zamora, en la Provincia de Zamora Chinchipe, Muñoz et al., (2014), encontraron por frotis sanguíneo una prevalencia de la bacteria del 68%. Otro estudio reciente realizado en la misma provincia de Zamora Chinchipe por Muñoz et al., (2020) determinaron la prevalencia y diversidad genética de *A. marginale* en bovinos en un total de 185 bovinos, el diagnóstico molecular se realizó con base en un ensayo de nPCR dirigido al gen *msp5* obteniendo un 63,8% de prevalencia. Escobar et al., (2015), reportaron un 85,48 % de prevalencia a *Anaplasma marginale* en el Cantón Quevedo, en la Provincia de Los Ríos, para estos resultados, se estandarizó una prueba de PCR anidado (nPCR), en el cual utilizaron como diagnóstico el gen de la *msp4*. Pero se ha logrado encontrar prevalencias mucho más altas como por ejemplo Soto, (2010), evaluaron la rickettsia en bovinos sacrificados del centro de faenamiento de Quito, mediante PCR y un ELISAc determinando una prevalencia del 91,7 y 91,1 %, respectivamente. Jumbo, (2018) aplicó PCR para amplificar fragmentos del gen *msp5* de *A. marginale* en la Isla Santa Cruz de la Provincia de Galápagos los resultados de la PCR detectaron una prevalencia del 67,06% para *A. marginale*.

### ***Anaplasmosis bovina***

Es una enfermedad causada por *Anaplasma marginale*, una bacteria Gram negativa que pertenece al Orden Rickettsia, familia *Anaplasmataceae*, que parasita de

forma obligada los glóbulos rojos de los bovinos (Reyna-bello, 2014). Esta rickettsia se transmite de un animal infectado a uno sano a través de las garrapatas hembras del Género *Dermacentor* en Estados Unidos y en América Latina por la especie *Rhipicephalus microplus* (Suarez & Noh, 2011). Después de un par de meses, los animales que sobreviven a la anaplasmosis aguda, después de una infección primaria, recuperan su condición física y se hacen asintomáticos, siendo incapaces de eliminar completamente la bacteria, convirtiéndose en animales persistentemente infectados de por vida, independientemente de re-exposiciones a la rickettsia, sirviendo como reservorio para la transmisión de la enfermedad en el campo (Kocan, Guglielmone, & Mele, 2003), esto se debe a la capacidad de *A. marginale* para evadir el sistema inmunitario a través de un mecanismo de variación antigénica de la bacteria, donde los epítopes de las Proteínas Principales de Superficie (MSPs) MSP1, MSP2 y MSP3 cambian a lo largo del tiempo de la infección (Eleizalde & Reyna-Bello, 2014).

### ***Características de Anaplasma marginale***

*Anaplasma marginale* es una bacteria intraeritrocitaria de una forma redonda, basófila, de un tamaño pequeña de 0.3 a 1µm, única o doble, en su mayoría localizada a lo largo del margen del eritrocito. Compuesta por un cuerpo inicial, que invade el glóbulo rojo y se multiplica para formar inclusiones con 4 a 8 cuerpos iniciales, se caracteriza como por la ausencia de cromatina y por carecer de retículo endoplásmico (Suarez & Noh, 2011).

### ***Sintomatología clínica de Anaplasmosis***

El período de incubación varía 4 semanas y depende del número inicial de organismos que infectan; durante este tiempo, el animal permanece asintomático. Los primeros signos clínicos se hacen evidentes durante la etapa de desarrollo, cuando más del 15% de los eritrocitos están infectados (Kocan et al., 2003). La duración de este período comprende entre los cuatro a nueve días, tras la detección de la infección eritrocítica por frotis. Los glóbulos rojos infectados son fagocitados por las células reticuloendoteliales en el bazo e hígado de los bovinos, lo que resulta en desarrollo de anemia leve a severa e ictericia sin hemoglobinemia o hemoglobinuria (Kocan et al., 2010; Kocan et al., 2003). Este organismo, que es una bacteria intracelular obligada, penetra por invaginación al eritrocito, luego se internaliza en una vacuola y se multiplica por fisión binaria en un cuerpo de inclusión, pudiéndose observar durante la etapa aguda hasta dos o tres cuerpos de inclusión en un mismo eritrocito (Kocan et al., 2003). En esta etapa aguda, los signos clínicos pueden incluir fiebre, pérdida de peso, aborto, letargo, ictericia y, a menudo la muerte de bovinos mayores a los 2 años de edad (Reyna-bello, 2014). La anemia llega a su máximo de 1 a 6 días después de la parasitemia y persiste durante 4 a 15 días, por lo que provoca que hasta el 75% de los eritrocitos se pierdan de la circulación (Amasino, 2017). Posteriormente, si el animal sobrevive, los parámetros de hematología regresan a los valores normales, sin embargo los organismos se mantienen circulando dentro del bovino. Por lo que los animales que sobreviven a una infección aguda permanecen como animales portadores o persistentemente infectados durante toda la vida del animal (Aubry & Geale, 2011; Benavides et al., 2016; Kocan et al., 2010, 2003; Reyna-bello, 2014) .

**Taxonomía**

Taxonomía tomada de: (Kocan et al., 2003).

**Pertenece:** Genogrupo II de las *Ehrlichias*

**Dominio:** Bacteria

**Clase:** Proteobacteria

**Subclase:** Alfa

**Orden:** Rickettsiales

**Familia:** Anaplasmataceae

**Género:** *Anaplasma*

**Especie:** *A. marginale*

**Biología de transmisión de *A. marginale* en la garrapata *Rhipicephalus microplus***

Estudios recientes han demostrado que la proteína de superficie (MSP) 1a codificada por el gen *msp1α* han demostrado que participa en la adhesión, de *A. marginale* a los eritrocitos de los bovinos y a las células de garrapatas (J. De la Fuente et al., 2001; McGarey et al., 1994). Aunque la población de *R. microplus* cumple un papel importante en la transmisión de *A. marginale*, el análisis genético de MSP1a sugiere la adaptación de cepas a diferentes mecanismos de transmisión. Por lo que, MSP1a contiene un número variable de péptidos repetidos en tándem en la región amino-

terminal, mientras que el resto de la proteína está altamente conservada entre los aislados (José de la Fuente et al., 2007). El número de repeticiones varía entre los aislados geográficos de *A. marginale* pero es constante dentro de un aislado y se ha utilizado como un marcador genético estable de identidad; debido a que la secuencia de las repeticiones en tándem es la parte más variable de la proteína entre los aislados, es más probable que esta región de la proteína esté involucrada en la adhesión a las células huésped, un requisito previo a la infección; es decir la región repetida en tándem de MSP1a es necesaria y suficiente para mediar la adhesión de MSP1a a las células de garrapata y eritrocitos bovinos (J. De la Fuente et al., 2001; José de la Fuente et al., 2007).

Según José de la Fuente et al., (2003), cepas de *A. marginale* con aminoácidos cargados negativamente como el ácido aspártico y ácido glutámico en la posición 20 de la región de repetición en tándem de MSP1a se une al extracto de células de garrapatas, mientras que las cepas con aminoácidos como glicina en esta posición no se adhieren a estas células, lo que sugiere una relación compleja entre el genotipo MSP1a y el fenotipo transmisible por garrapatas.

El ciclo biológico de *Anaplasma marginale* es muy complejo y está en coordinación con el ciclo de alimentación de la garrapata, se sabe que los eritrocitos infectados del bovino durante la succión de sangre son la fuente de infección de las células intestinales de las garrapatas hembras, en donde se encuentran dividiéndose por fisión binaria e invade las glándulas salivales, de donde vuelven a infectar al hospedador en su próxima alimentación (Kocan et al., 2003). *Anaplasma marginale* se presenta en

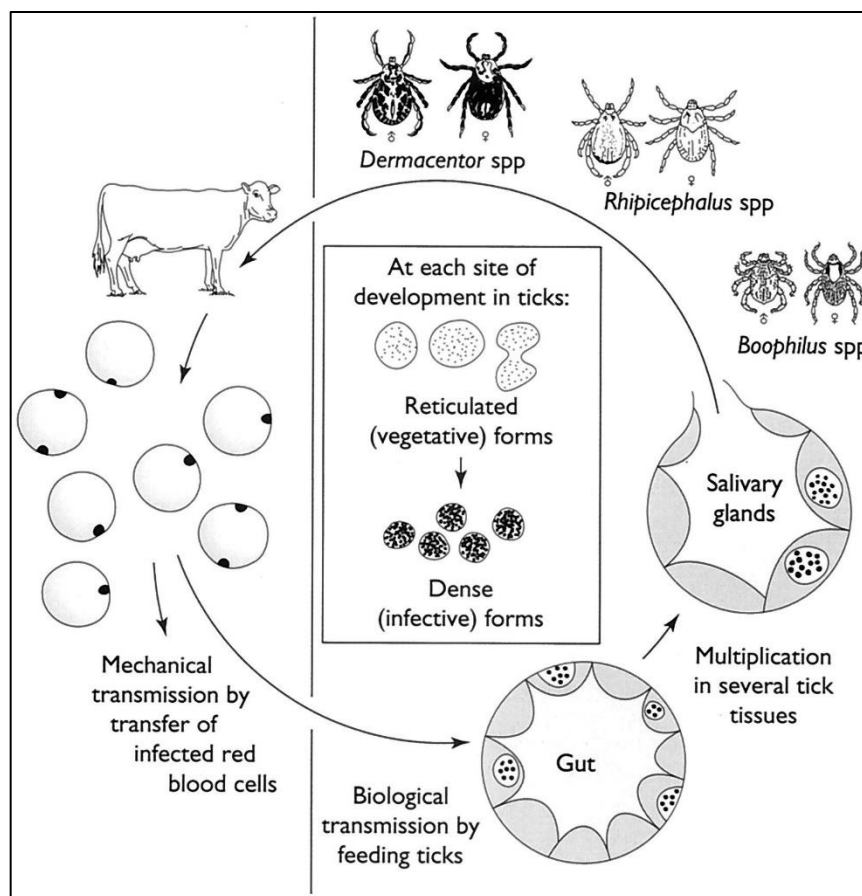
dos formas, reticulada o vegetativa en la cual se da la división y la forma densa o infectiva, en esta forma la bacteria es capaz de sobrevivir fuera de la célula del hospedador por un periodo corto de tiempo (Kocan et al., 2010).

La infección biológica de esta bacteria, se da mediante las garrapatas hembras la cual forma parte de su ciclo de desarrollo, en donde se ha demostrado que existe una transmisión intraestadial (dentro del estadio) y transestadial (de estadio a estadio), pero no parece ocurrir una transmisión transovarica en la garrapata (Baldacchino et al., 2013; Coronado, 2001). La transmisión en el hospedador bovino se puede dar por dos formas; la primera por transmisión mecánicamente mediante fómites contaminados como por ejemplo: agujas, instrumentos de nariz y descorne, herramientas de castración entre otros y la segunda forma a través de moscas hematófagas del género *Stomoxys* y *Tabanus*, pero también puede ocurrir una transmisión transplacentaria (Quiroz-Castañeda, Amaro-Estrada, & Rodríguez-Camarillo, 2016).



Figura 1.

*Ciclo de desarrollo de Anaplasma marginale en bovinos y garrapatas teleoginas.*



### **Variabilidad genética de A. Marginale.**

A pesar del gran impacto económico de la anaplasmosis bovina, no se cuenta con una vacuna segura y eficaz para su control sin embargo, la inmunización de bovinos con proteínas de membrana purificadas puede inducir protección contra la infección y la enfermedad (Reyna-bello, 2014). Algunas de estas proteínas han sido caracterizadas y

designadas como Proteínas Principales de Superficie (MSPs), MSP1 a MSP5, las cuales se han evaluado como posibles antígenos candidatos para la producción de vacunas y ensayos de diagnóstico (Eleizalde & Reyna-Bello, 2014; Kocan et al., 2003). Estudios previos han demostrado que el gen *msp5* es muy utilizado para realizar un diagnóstico molecular certero mediante la PCR, en animales que son persistentemente infectados (Suarez & Noh, 2011). Este gen de copia simple altamente conservado y su producto de expresiones es reconocido por su antigenicidad, por lo que se emplea como el principal antígeno en el diagnóstico de la anaplasmosis (Kocan et al., 2003; Reyna-bello, 2014).

### ***Métodos de diagnóstico de Anaplasma marginale***

El diagnóstico de la anaplasmosis bovina se puede realizar mediante la visualización de cuerpos compatibles con *A. marginale* en frotis de sangre teñidos con Giemsa (Suarez & Noh, 2011). Este método es capaz de detectar niveles de parasitemia de 0,1 a 0,2 %; sin embargo, aunque se sabe que el diagnóstico en animales portadores se dificulta con el uso de esta técnica, los dos métodos recomendados para la detección de éstos son la identificación mediante técnicas moleculares del ADN de la rickettsia en sangre y la detección de anticuerpos específicos en suero contra *Anaplasma marginale* (Reyna-bello, 2014).

## **Babesiosis**

### ***Historia***

La babesiosis fue reportada por primera vez por Viktor Babes en Rumania en el año de 1888, quien identificó al parásito después de evaluar muestras de sangre de

bovinos con signos de anemia hemolítica y hemoglobinuria, posteriormente en EE. UU, Smirh y Kilbone en 1893, realizaron un estudio en donde concluyeron que las garrapatas hembras (*Rhipicephalus annulatus*) era el vector de la enfermedad llamada como fiebre de garrapatas hembras, concluyendo que *Babesia* spp. son parásitos intraeritrocitarios obligados que son transmitidos por las garrapatas hembras (Muñoz, 2016). Las especies de mayor importancia en Sudamérica son *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*, estos parásitos causan la babesiosis bovina, una enfermedad que también se la conoce como fiebre de garrapatas, fiebre de agua roja, fiebre de Texas o piroplasmosis (Suarez & Noh, 2011).

#### ***Distribución Babesia spp. en América Latina***

Esta enfermedad está presente en la mayoría de países tropicales y subtropicales del mundo y su distribución va dependiendo de su vector, en Sudamérica se conoce que es *R. microplus* y es una parte importante de su ciclo de desarrollo. Varios estudios seroepidemiológicos se han llevados a cabo en varios países de América Central y Sudamérica como Guyanas, El Salvador, Costa Rica, Argentina, Brasil, Paraguay, Colombia, Venezuela, y Ecuador encontrándose diferentes grados de estabilidad enzootica (Guglielmone, 1995). Los estudios de *Babesia* spp. en el Ecuador no son muy extensos y la poca información científica disponible se encuentra en trabajos de universidades, por ejemplo Jumbo, (2018), realizó un estudio en 170 bovinos de la Isla Santa Cruz de la Provincia de Galápagos, mediante PCR para amplificar fragmentos del gen 18Ss-rRNA y determinó una prevalencia de 25,88% para *Babesia* spp. Medina-Naranjo et al., (2017) realizaron un PCR para amplificar el gen 18S del

ribosoma y determinaron la usencia de *Babesia* spp en la Provincia de Pastaza, debido a la carencia de garrapatas en la zona, como consecuencia al tipo de pastoreo realizado y al pasto empleado en la zona. Otro estudio realizado por Medina-Naranjo et al., (2020), evaluaron *Babesia* spp. mediante PCR a 291 muestras de bovinos de la Provincia de Manabí, hicieron clonación de las muestras positivas y secuenciación de las mismas para evaluar filogenéticamente la distribución geográfica de las cepas encontradas. Los resultados de este estudio arrojaron que había presencia de *Babesia* spp en un 25,77%, además que la exposición de bovinos a las garrapatas tiene más probabilidad de presentar *Babesia* spp. en relación a los no expuestos a este artrópodo. Al evaluar la filogénia de las cepas encontradas, observaron que las *B. bovis* y *B. bigemina* eran similares a algunos aislados Europeos y a otros africanos.

### ***Babesiosis bovina***

La babesiosis es una enfermedad producida por un protozoo del género *Babesia* de la familia Babesiidae, que pertenece al orden Piroplasmida (Muñoz, 2016). Las 2 especies que se encuentran con mayor frecuencia en el ganado bovino son *Babesia bovis* y *B. bigemina* que son parásitos intraeritrocitarios obligados y la transmisión se da exclusivamente por garrapatas hembras (Suarez & Noh, 2011). Se ha descrito que *B. bovis* es transmitida por las larvas de *R. microplus*, mientras que *B. bigemina* es transmitido por larvas, ninfas y adultos, por este motivo, el período de incubación de la Babesiosis por *B. bovis* es más corto a diferencia de *B. bigemina*, además es más escaso en sangre periférica y se ubica de preferencia en capilares de órganos como el riñón,

hígado, cerebro y bazo. Ambos son transmitidos principalmente por la garrapata común del ganado *R. microplus* (Mosqueda et al., 2012).

### **Sintomatología clínica de Babesiosis**

Los síntomas más comunes que provoca la babesiosis bovina son la fiebre y la anemia que van a ir acompañados con debilidad muscular, depresión, falta de apetito, incremento de la tasa respiratoria, usualmente hemoglobinuria y en algunos casos puede provocar la muerte del animal (Mosqueda et al., 2012; Suarez & Noh, 2011). La patogenia de *Babesia bovis* se caracteriza por presentar vasodilatación, edema, hipotensión, incremento de la permeabilidad capilar, desordenes de coagulación y daños endoteliales. La adhesión de eritrocitos infectados en los vasos capilares del cerebro y los pulmones ocasionan babesiosis cerebral y síndrome de estrés respiratorio (Amasino, 2017). *Babesia bigemina* se caracteriza por generar una rápida hemólisis intravascular, por esta razón la hemoglobinuria se presenta más temprano y más constantemente que en una infección causada por *Babesia bovis*, a diferencia de *Babesia bovis*, no presenta desordenes de coagulación, menor grado de citoadherencia y estado de hipotensión (Suarez & Noh, 2011). La infección con *Babesia bigemina* se presenta más temprano que en la infección con *Babesia bovis*, esto se debe al desarrollo del esporozoito en su ciclo de vida (forma infectiva) (Pulido-Herrera et al., 2015).

### **Características de Babesia spp.**

La babesiosis bovina es causada por un protozoo intraeritrocítico de forma pirifoide, oval o ameboide, de reproducción asexual y sexual, con merogonia en

vertebrados y esporogonia y gametogonia en invertebrados (Suarez & Noh, 2011). La especie de *B. bovis* es de menor tamaño que *B. bigemina*, su diámetro oscila entre los 2µm, su ciclo de vida se presenta en diferentes estadios por lo que su forma en cada estadio es diferente, *B. bigemina* es de mayor tamaño que *B. bovis*, su diámetro puede llegar a alcanzar todo el eritrocito, de igual manera se presenta en diferentes formas a causa de que su ciclo de vida se presenta diferentes estadios (Uilenberg, 2006).

### ***Taxonomía***

Taxonomía tomada de: (Jorgensen et al., 2011)

**Phylum:** Apicomplexa

**Clase:** Sporozoa

**Orden:** Piroplasmorida

**Familia:** Babesiidae

**Género:** *Babesia*

**Especie:** *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*

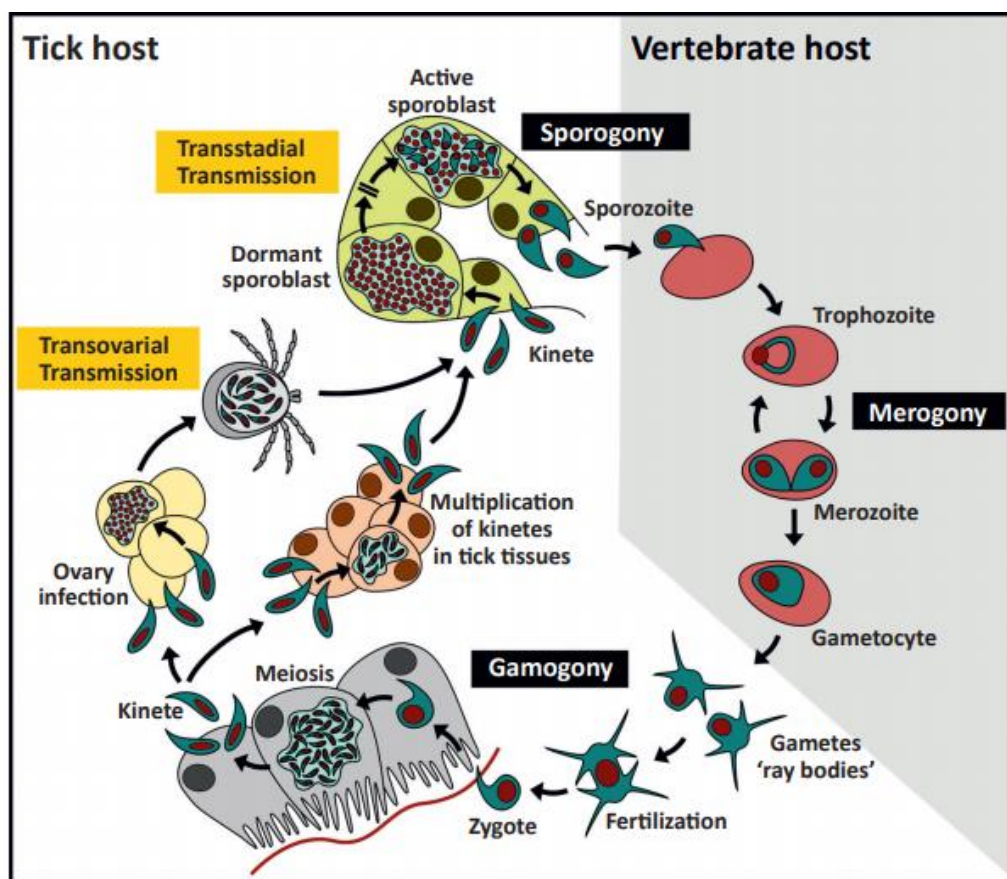
### ***Biología de transmisión de Babesia spp. en la garrapata R. microplus***

Según estudios en *R. microplus* se ha demostrado que la transmisión transovárica y transestadial de *Babesia* spp. si ocurre, lo que ha permitido la diseminación de estos Hemotrópicos a nivel mundial (Howell et al., 2007b; Oliveira-sequeira et al., 2005). *Babesia* spp. y sus dos anfitriones, la garrapata vector y el

hospedador vertebrado, representan un sistema complejo en el que las interacciones permiten la transmisión del protozoo (Suarez & Noh, 2011). En primer lugar, el contacto directo entre la garrapata y su anfitrión, es decir, la picadura de la garrapata dura de 2 días a 2 semanas, aproximadamente dependiendo de la etapa larva, ninfa o hembra adulta (Mosqueda et al., 2012). La infección de las garrapatas hembras pasa por herencia a su progenie, pero estas mismas larvas infectantes dejan de serlo cuando disminuye la temperatura del medio (Howell et al., 2007). El bovino se infecta tras la mordedura de la garrapata por la inoculación de esporozoitos de *Babesia* spp., con la saliva; los esporozoitos penetran directamente en los eritrocitos donde se desarrollan todas las fases del parásito. Cuando los eritrocitos infectados con *Babesia* spp. son ingeridos durante la succión de sangre por las garrapatas hembras, la mayoría de los protozoarios se degeneran y se destruyen, sin embargo, algunos estadios específicos del parásito como los pre-gametocitos, sobreviven para desarrollarse en gametocitos (Mosqueda et al., 2012). Los gametos se fusionan en el lumen del tracto digestivo de la garrapata hembra para poder formar un alargado cigoto que penetra en las células del intestino medio e invaden otros tejidos de la garrapata, de esta manera llega a los ovarios donde muchos de los huevos son infectados con *Babesia*, permitiendo así la transmisión transovárica (Suarez & Noh, 2011).

Figura 2.

*Ciclo de vida de Babesia sensu stricto.*



### ***Métodos de diagnóstico de Babesia spp.***

La toma de una muestra sanguínea de calidad, venosa (yugular o coccígea) o capilar (oreja, punta de la cola) es crucial para iniciar el diagnóstico de infecciones por *Babesia* en el laboratorio, en el cual generalmente se realiza la coloración con Giemsa en frotis de sangre delgados para la visualización de posibles eritrocitos infectados



(Mosqueda et al., 2012). La prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFAT) se ha utilizado mucho en el pasado para detectar anticuerpos contra *Babesia spp.*, aunque tiene poca especificidad para la detección (Mosqueda et al., 2012). El ensayo inmunoenzimático (ELISA) ha sustituido en gran parte a la IFAT como prueba de diagnóstico de elección para *Babesia spp.*, debido a la objetividad en la interpretación de los resultados y a la capacidad de procesar grandes cantidades de muestra por día (Suarez & Noh, 2011).

Las infecciones son difíciles de detectar debido al bajo número de parásitos en sangre periférica, por lo tanto, los métodos moleculares basados en el ADN se han desarrollado con grandes ventajas, demostrando una sensibilidad y especificidad muy altas, cuyo enfoque se ha ido desarrollando en la detección de especies de *Babesia* en sus hospedadores y vectores (Alvarez et al., 2019). Una de estas técnicas moleculares es la PCR, utilizada para amplificar, a partir de un solo fragmento de ADN, millones de copias (Mosqueda et al., 2012). Sin embargo, a veces la PCR no es lo suficientemente sensible, por lo que se debe realizar una PCR anidada, además la PCR convencional no puede diferenciar entre parásitos vivos o muertos, por lo que se usa otra variante de la PCR como es Real-Time PCR (RT-PCR), esta técnica implica el análisis del genoma del parásito mediante la incorporación de sondas fluorogénicas que liberan señal fluorescente durante la amplificación de ADN, el ensayo tiene alta sensibilidad, especificidad y reproducibilidad, también es mucho más sensible que el análisis microscópico de frotis de sangre teñidos con Giemsa (Alvarez et al., 2019). Estas características favorecen su uso para el diagnóstico y cuantificación de animales infectados persistentemente (Mosqueda et al., 2012).

### **Garrapata *Rhipicephalus microplus***

Las garrapatas hembras son ectoparásitos hematófagos, prácticamente de todos los vertebrados terrestres, aves y de algunos anfibios y reptiles, la adaptación evolutiva de las garrapatas hembras a la hematofagia, es la razón principal por la que causan grandes pérdidas económicas, sin embargo, su importancia ha sido reconocida por su impacto en la salud animal y humana, por el daño que causan al alimentarse y por la transmisión de diversos organismos patógenos (Polanco-Echeverry & Ríos-Osorio, 2017). Se consideran responsables de más de 100.000 enfermedades en humanos, animales salvajes y domésticos (Benavides et al., 2016). Actualmente son reconocidas más de 907 especies distribuidas a nivel mundial y son considerados los segundos vectores más importantes de enfermedades en humanos después de los mosquitos (Domínguez et al., 2010).

*Rhipicephalus microplus*, denominada la “garrapata común del ganado”, es la especie de mayor importancia en el ámbito veterinario por su impacto en la salud de los bovinos, debido a su papel como vector de hemotrópicos como *Babesia* spp. y *Anaplasma* spp., se puede encontrar en diversos huéspedes, entre ellos el ganado bovino, búfalos, caballos, asnos, cabras, ovejas, ciervos, cerdos, perros y algunos animales silvestres (Polanco-Echeverry & Ríos-Osorio, 2017). Una alta carga de garrapatas hembras en los animales puede llevar a disminuir la producción de leche, carne y afectar el cuero del animal (Domínguez et al., 2010; Rodríguez-Vivas et al., 2014). Esta garrapata se encuentra ampliamente distribuida en Latinoamérica y

Ecuador, lugares en donde causan pérdidas económicas significativas anuales en la ganadería bovina (Guillén & Muñoz, 2015).

### ***Etiología de la garrapata Rhipicephalus microplus***

*Rhipicephalus microplus* es un miembro de la familia Ixodidae (garrapatas hembras duras). Anteriormente se conocía a esta garrapata como *Boophilus microplus*, pero análisis entomológicos la han convertido en un subgénero del género *Rhipicephalus* (Benavides et al., 2016).

### ***Taxonomía de Rhipicephalus microplus***

Taxonomía tomada de: (Estrada-Peña et al., 2003)

**Reino:** Animalia

**Phylum:** Artropoda

**Subphylum:** Chelicerata

**Clase:** Arachnida

**Orden:** Parasitiformes

**Familia:** Ixodidae

**Género:** *Rhipicephalus*

**Especie:** *Rhipicephalus microplus*

### **Morfología de la garrapata *Rhipicephalus microplus***

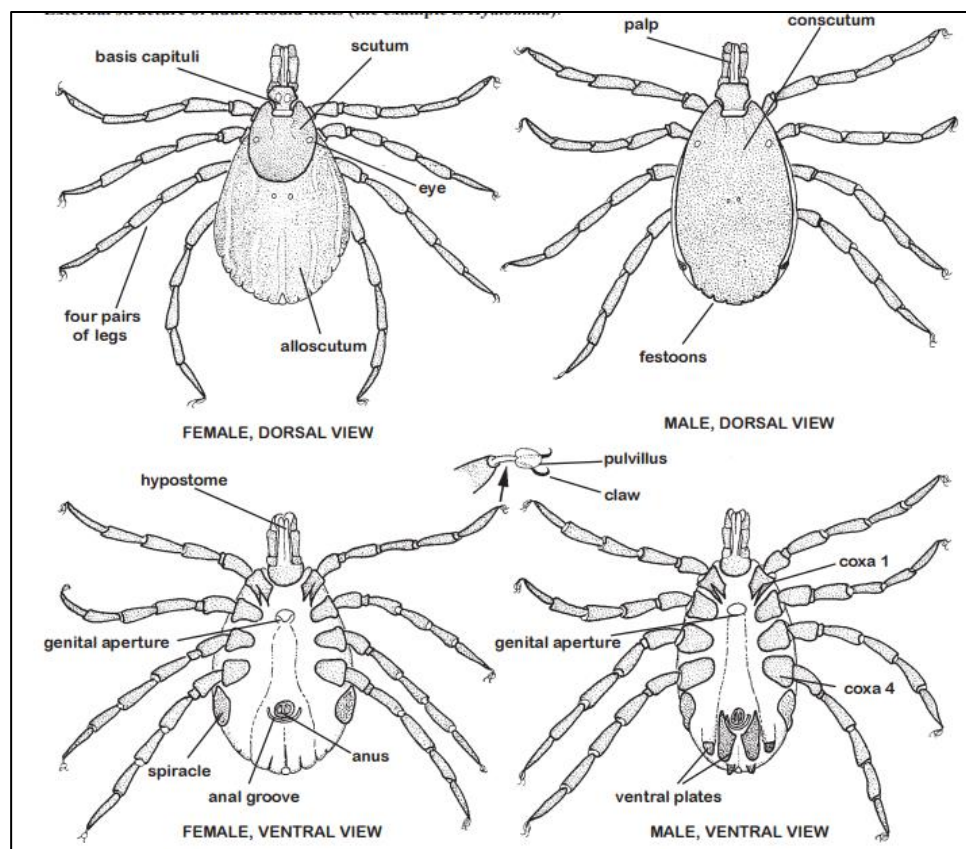
Las garrapatas hembras duras poseen un escudo dorsal (scutum) y su aparato bucal (capitulum) que sobresale cuando se lo observa desde arriba (Benavides et al., 2016). Las garrapatas hembras *R. microplus* poseen un capitulum con base hexagonal, la placa espiracular tiene forma redonda u ovalada y los pedipalpos son pequeños, comprimidos y acanalados dorsalmente y lateralmente, los machos tienen placas adanales y accesorias. El surco anal está ausente o poco definido en las hembras, y levemente visible en los machos. Estas garrapatas hembras carecen de festones y ornamentos (Rodríguez-Vivas et al., 2014; Smith, 1978).

- Las garrapatas hembras *R. microplus* adultas poseen un capitulum corto y derecho, las patas son de color amarillo pálido y existe un amplio espacio entre el primer par de patas y el hipostoma (trompa). El cuerpo tiene forma entre ovalada-rectangular, el escudo es ovalado y más ancho en la porción anterior. El hipostoma es corto y derecho (Benavides et al., 2016).

- Las ninfas de esta especie poseen un scutum de color marrón anaranjado, el cuerpo tiene forma ovalada y es más ancho en la porción anterior, el color del cuerpo varía de marrón a azul grisáceo, con áreas blancas en la parte anterior y en los bordes (Guillén & Muñoz, 2015).

- Las larvas de *R. microplus* poseen un capitulum corto y derecho y un cuerpo de color marrón o crema. Las larvas poseen seis patas en lugar de ocho (Benavides et al., 2016).

Figura 3.

*Anatomía general de las garrapatas hembras duras masculinas y femeninas***Ciclo de vida de la garrapata *Rhipicephalus microplus***

*Rhipicephalus microplus* es una garrapata de un sólo hospedador, pasa todos sus estadios de vida en un animal (Brayton, 2012). Las garrapatas hembras durante su vida, pasan a través de cuatro estadios: huevos, larvas, ninfas y adultos. Los tres últimos estadios se caracterizan por ser estados activos del ciclo, en los cuales estos ectoparásitos se alimentan de sangre en cada una de las fases (Benavides et al., 2016).

El ciclo de vida de una garrapata se divide en tres etapas:

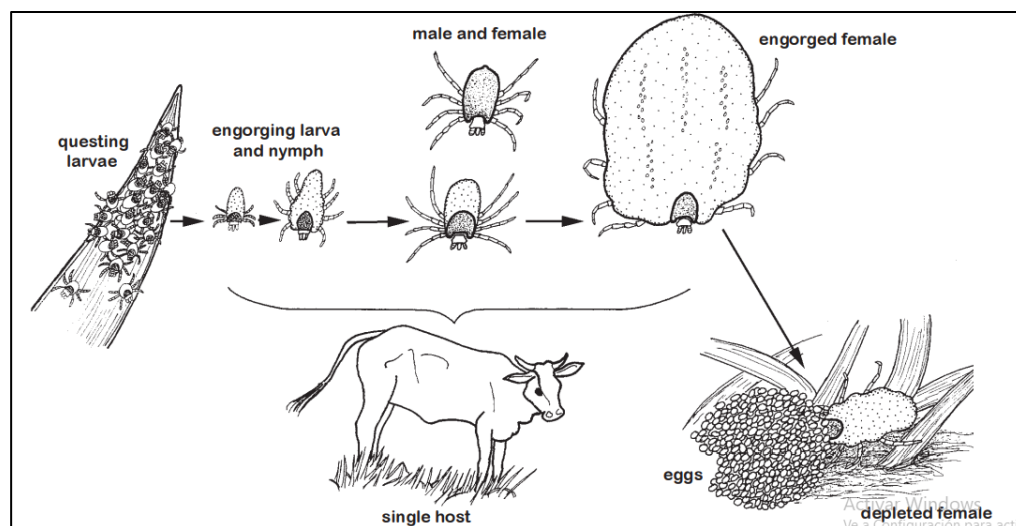
La primera denominada no parasitaria o de vida libre comprende desde que la garrapata hembra ingurgitada o teleogina se desprende de su hospedero, hasta la aparición de las larvas en el pasto u otras plantas (Benavides et al., 2016). En esta etapa ocurre la oviposición de 2000 a 3000 huevos, la incubación y eclosión de estos, lo cual dura entre 30 a 33 días generalmente, sin embargo se debe tener en cuenta que la duración de esta fase depende directamente de las condiciones ambientales de humedad y temperatura, cantidad de sangre digerida y la especie (Guillén & Muñoz, 2015).

La segunda fase, ocurre cuando las larvas pasan del pasto al hospedador, este es hallado gracias a quimiorreceptores que detectan diferentes gases, entre ellos el dióxido de carbono, amoníaco, ácido láctico, entre otros.

Finalmente está la fase parasitaria en donde las larvas se alimentan intermitentemente de su hospedador hasta ingerir la cantidad de sangre y fluidos de los tejidos para mudar a ninfas, que seguirán alimentándose y realizan nuevamente una transformación, esta vez en machos y hembras adultos, la reproducción de garrapatas hembras se realiza sobre el hospedador asegurando así el origen de otra generación de garrapatas hembras (Polanco & Rios, 2016). Las garrapatas hembras pueden completar su ciclo de vida en un plazo de 8 a 12 semanas, esta característica puede causar una gran carga de garrapatas hembras en los animales (Benavides et al., 2016).

Figura 4.

*Ciclo de vida de las garrapatas teleoginas de Rhipicephalus microplus*



### Hipótesis

**H1:** Existe transmisión transovárica de *A. marginale* y *Babesia spp* en garrapatas hembras teleoginas *Rhipicephalus microplus*.

**Ho:** No existe transmisión transovárica de *A. marginale* y *Babesia spp* en garrapatas hembras teleoginas *Rhipicephalus microplus*.

### Capítulo III: Materiales y métodos

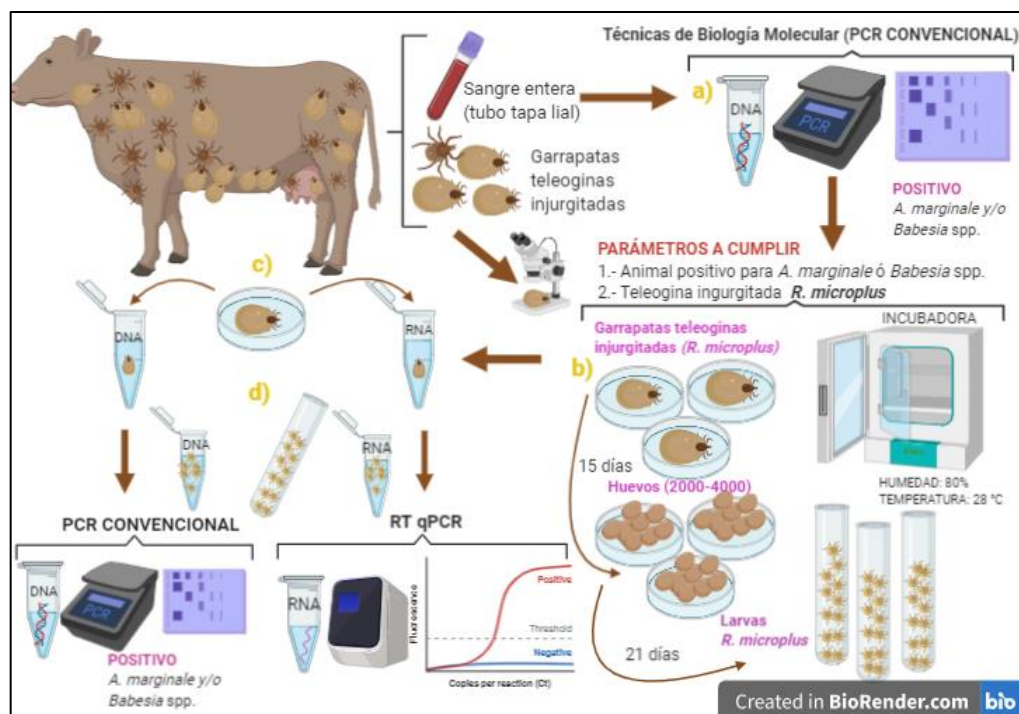
Para el proceso de selección de los animales, se tomaron los bovinos que se encontraban parasitados con al menos dos garrapatas teleoginas, de las diferentes UPA (Unidades de Producción animal) (ANEXO A) de la zona de Santo Domingo de los Tsáchilas. Se partió de la toma de muestra de sangre en tubo tapa lila (con

anticoagulante) y garrapatas hembras teleoginas teleoginas de los bovinos, las muestras fueron trasladadas al laboratorio, en donde se siguió el siguiente procedimiento (Figura 5.): a) La identificación mediante técnicas de biología molecular (PCR convencional) de bovinos positivos para *A. marginale* o *Babesia* spp.; b) Las garrapatas teleoginas tomadas en el campo que provenían de los bovinos positivos, eran identificadas y aquellas de la especie *R. microplus* se colocaron en la incubadora (80% humedad y a 28°C) para continuar con el ciclo biológico; c) Una vez finalizando la fase de ovoposición (aproximadamente de 15 días) se tomaron las garrapatas teleoginas y se extrajo el ADN y ARN. El ADN permitió identificar las garrapatas teleoginas positivas para *A. marginale* y/o *Babesia* spp. mediante PCR convencional, y el ARN permitió determinar la viabilidad de *A. marginale* ó *Babesia* sp. en la garrapata mediante RT qPCR; y d) después de un periodo de tiempo de 21 días de eclosión de los huevos de las garrapatas hembras positivas para cualquiera de los dos Hemotrópicos, se tomó un pool de larvas (20 a 30 larvas) de *R. microplus* para identificar la presencia de estos dos Hemotrópicos mediante PCR convencional, y se tomó otro pool de larvas de la misma garrapata para determinar la viabilidad de los mismos mediante RT qPCR.



Figura 5.

Diagrama resumen de la metodología realizada durante la fase de estudio



### Obtención de las muestras de sangre de bovinos y garrapatas hembras teleginas

Para la obtención de las muestras se realizaron 8 salidas de campo a diferentes Unidades de Producción animal de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas (ANEXO A)(Figura 6.) entre febrero del año 2019 y marzo del año 2020, región con una temperatura media diaria de 29°C y una humedad promedio de 84% según el Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI, 2020).

Para la selección de los bovinos muestreados se tomó en cuenta el criterio de estar parasitados con al menos 2 garrapatas teleoginas. Estos animales seleccionados, se le extrajo sangre entera de la vena coccígea en tubo tapa lila (con anticoagulante) y a su vez, del mismo animal se tomaron de 2 a 15 garrapatas teleoginas en un frasco sellado con agujeros que contenía algodón y papel filtro húmedo para mantenerlas vivas hasta llegar al laboratorio.

**Figura 6.**

*Zona de muestreo de las diferentes Unidades de Producción animal (UPA) en este estudio*



## **Diagnóstico de *A. marginale* y *Babesia* spp. en bovinos**

### ***Extracción de ADN de la muestra sanguínea***

El protocolo de extracción de ADN de las muestras de sangre que se usó es el descrito por salting-out para pequeños volúmenes de sangre (Riera, Rojas, & Zapata, 2010). Se basa en la lisis inicial de los glóbulos rojos mediante una solución hipotónica conocida como el Buffer GR (Tris- HCl, 10mM [pH 8.0], triton X-100 1% y sacarosa 600mM), seguida de una lisis total de las células mediante el Buffer GB (Tris- HCl, 10mM [pH 8.0], NaCl 400 mM y EDTA 2mM) y sus estructuras subcelulares mediante el empleo de detergente (SDS al 20%), con la posterior eliminación de las proteínas con Proteinasa K en buffer PK, seguido de la precipitación salina (salting-out) con acetato de potasio (KCH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>). Finalmente se precipito el ADN con etanol absoluto a -20°C toda la noche y, al siguiente día se realizó un lavado del ADN con etanol al 70% y posteriormente el precipitado fue resuspendido con Buffer TE (Tris 10 mM-EDTA 1mM (10:1)).

### ***Cuantificación de ADN***

Posterior al proceso de extracción el ADN obtenido se cuantificó por espectrofotometría, mediante el equipo NanoDrop 2000 (Thermo® SCIENTIFIC), se empezó programando al equipo para cuantificación de ácidos nucleicos, se colocó la solución blanco y finalmente se pipeteó 2 µL de la muestra para medir la concentración y pureza de ADN, más tarde se verificó la calidad e integridad del ADN mediante electroforesis en geles al 0.8 % de agarosa, teñido con Bromuro de Etidio (MP biomedical®) y se digitalizó la foto con la ayuda de un foto-documentador (Transiluminador Bio Doc-It System®).

### **Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) convencional**

#### **PCR para *Anaplasma marginale*.**

Las técnicas de diagnóstico basadas en PCR para la detección de ADN de *A. marginale* que se empleó en este estudio fue desarrollada por Tana-Hernández et al., (2017) y se modificó según era necesario, para amplificar el gen *msp5*, éste gen se seleccionó debido a que es altamente conservado y es el principal antígeno de diagnóstico de anaplasmosis bovina (Corona & Martínez, 2011; Reyna-Bello et al., 1998; Tavares & Reyna-Bello, 2006).

La reacción se realizó en un volumen final de 12,5 uL en tubos de PCR de 0.2 mL con un producto de 806 bp, que fue amplificado mediante el uso de los primers 19A (5'-GTGTTCTGGGGTACTCCTA-3') y 19B (5'-TGATCTGGTCAGCCCCAGCT-3') (Reyna-Bello et al., 1998).

#### **Tabla 1.**

*Componentes de PCR para la detección de *Anaplasma marginale*.*

<b>Componentes</b>	<b>Concentración Final</b>	<b>Volumen Final (uL)</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	-	6,57cx
<b>Buffer</b>	1X	1,25
<b>dNTPs Mix</b>	800 uM/dNTP	0,38
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	3.0 mM	0,88
<b>DMSO</b>		0,63
<b>Primer Reverse</b>	1.0 mM	0.08

Componentes	Concentración Final	Volumen Final (uL)
<b>Primer Forward</b>	1 .0mM	0.08
<b>Taq polimerasa</b>	1.25 U/ul	0.13
<b>DNA</b>	100 ng/uL	2,5
<b>Volumen Total</b>		12.5

La prueba de PCR se realizó con 40 ciclos de (94°C durante 30 seg, 64°C de alineamiento durante 30 seg, y 70°C durante 30 seg) utilizando primeramente 94 °C de desnaturalización durante 5 min y 70 °C durante 10 min para la extensión final, este programa se lo llevó a cabo en el termociclador C1000 Touch™ Thermal Cyclor (Biorad, USA), el programa se llevó a cabo según (Tavares & Reyna-Bello, 2006).

#### **PCR para Babesia spp.**

Para la identificación de *Babesia* spp. se empleó un kit de PCR convencional, AccuPower® Babesia PCR Kit de la marca BIONEER, el cual está diseñado para detectar 17 especies del género Babesia a partir de la sangre infectada. Los pasos fueron realizados según el protocolo del fabricante (Bioneer, 2015).

#### **Nested-PCR para Babesia Bigemina y Babesia Bovis.**

La técnica de diagnóstico basada en Nested-PCR para la detección de ADN de *B. bigemina* y *B. bovis* en extractos de ADN a partir de sangre de bovinos y muestras de glándulas salivales de garrapatas hembras que se empleó en este estudio fue desarrollada por Figueroa et al., (1993) y se modificó según era necesario, para amplificar el gen RAP-1 para *B. bovis* y el gen Spel-Aval para *B. bigemina* que han sido

ampliamente utilizados para el diagnóstico de babesiosis (AbouLaila, Yokoyama, & Igarashi, 2010; Figueroa et al., 1993; Mtshali, Tsotetsi, Thekiso, & Mtshali, 2014; Oliveira-sequeira et al., 2005; Silva et al., 2009).

La reacción se realizó en un volumen final de 25 uL en tubos de PCR de 0.2 mL con un producto de 298 bp para *B. bovis* y 170 bp para *B. bigemina*, que fue amplificado mediante el uso del siguiente set de Primers, ver tabla 2 (Mtshali et al., 2014).

**Tabla 2 .**

*Set de primers para la detección de Babesia bigemina y Babesia bovis*

<b>Set de primers</b>	
<b>Primera ronda</b>	BigF (5'-CATCTAATTTCTCTCCATACCCCTCC-3'), BigR(5'-CCTCGGCTTCAACTCTGATGCCAAAG-3'), BovF(5'-CACGAGGAAGGAACTACCGATGTTGA-3'), BovR(5'-CCAAGGAGCTTCAACGTACGAGGT-3')
<b>Segunda ronda</b>	BigNF (5'-CGCAAGCCCAGCACGCCCCGGTGC-3'), BigNR(5'- CCGACCTGGATAGGCTGTGTGATG-3'), BovNF (5'-TCAACAAGGTACTCTATATGGCTACC-3') BovNR (5'-CTACCGAGCAGAACCTTCTTCACCAT-3')

**Tabla 3.**

*Componentes de la Multiplex nPCR para la detección de B. bigemina y B. bovis.*

<b>Componentes</b>	<b>Concentración Final</b>	<b>Volumen Final (uL)</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	-	15,75
<b>Buffer</b>	1X	2,5
<b>dNTPs Mix</b>	0.2 mM	0,5
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	1.5 mM	0,75
<b>P1(BigF)</b>	0.4 mM	0,1
<b>P2(BigR)</b>	0.4 mM	0,1
<b>P3(BovF)</b>	0.4 mM	0.1
<b>P4(BovF)</b>	0.4 mM	0.1
<b>Taq polimerasa</b>	0.2 U/ul	0.1
<b>DNA</b>	100 ng/uL	5
<b>Volumen Total</b>		25

Se empleó las siguientes temperaturas: Desnaturalización inicial a 95°C durante 3 min, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, la hibridación a 56°C durante 45 segundos y la extensión a 72°C durante un min. Por ultimo una extensión final a 72°C durante 10 min.

Para el nested-PCR, 1 ul del producto de la primera PCR es adicionado para el segundo mix conteniendo la misma composición de reactivos descrito en la tabla 2. Con

excepción de los primers, en esta segunda ronda se usaron los primers BigNF/BigNR; BovNF/BovNR.

### ***Electroforesis en gel de agarosa***

El producto de PCR se identificó por electroforesis en un gel de agarosa al 2% (p/v) teñido con bromuro de etidio en una realción (1:10.000) usado como agente intercalante para teñir los ácidos nucleicos, cada pocillo del gel contenía 5  $\mu$ L del producto de la PCR incluido el control positivo y negativo, por último se colocó 3  $\mu$ L de marcador de peso molecular de 100bp y se dejó correr la electroforesis durante 35 minutos a 100 voltios, finalmente el gel se reveló empleando el fotodocumentador (Transiluminador Bio Doc-It System®).

### ***Obtención de las larvas***

#### **Identificación de garrapatas hembras *Rhipicephalus microplus*.**

Para la identificación de la especie de garrapata *R. microplus* las muestras fueron llevadas al laboratorio de la Unidad de Entomología Aplicada del Instituto de Investigación en Zoonosis – CIZ de la Universidad Central del Ecuador, cada muestra fue observada bajo un estéreo-microscopio de tal manera que la morfología permitió identificar el género y la especie de garrapata mediante claves entomológicas (Nava et al., 2019).

#### **Incubación de las garrapatas teleoginas**

De cada animal se tomó de 2 a 15 garrapatas hembras teleoginas ingurgitadas éstas fueron identificadas como *R. microplus* y trasladadas a la incubadora en la cual se adaptaron condiciones de humedad del 80% y una temperatura de 28°C, cada garrapata



se colocó en una caja Petri de Plástico de 94 x 16 mm para el proceso de ovoposición. Al periodo de tiempo de 15 días los huevos fueron trasladados a un tubo de plástico con algodón para su eclosión a la fase larval, manteniéndose bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad.

### ***Extracción de ADN y ARN en garrapatas hembras adultas y larvas***

Una vez que las garrapatas hembras teleoginas terminaron el periodo ovoposición, se realizó un corte longitudinal de la garrapata bajo un estereomicroscopio con la ayuda de un bisturí N° 12, es decir, se dividió en dos a la garrapata. Una parte sirvió para hacer la extracción de ADN y la otra parte para hacer la extracción de ARN de la garrapata.

### **Extracción de ADN**

La extracción de ADN de las garrapatas hembras adultas y de las larvas obtenidas en la incubadora se las realizó con el kit de extracción con E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit de la marca OMEGA Bio-tek, el procedimiento se realizó según el protocolo del fabricante con las modificaciones que fueron necesarias, para lo cual se empezó con 30 mg de muestra del tejido de la garrapata y un pool de 30 larvas, finalmente el ADN extraído se eluyó en 50 µL de tampón de elución del kit (Omega Bio-Tek, 2019).

### **Extracción de ARN**

El siguiente paso del diagnóstico molecular es determinar la viabilidad de los hemotrópicos en las garrapatas hembras y en su descendencia, mediante la extracción del ARN intacto, esto se realizó en las muestras de garrapatas hembras y larvas en las que ya se comprobó por PCR convencional la presencia de los Hemotrópicos. La

extracción de ARN de las garrapatas hembras adultas y de las larvas obtenidas en la incubadora se las realizó con el kit de extracción ulRNA Column Purification Kit de la marca ABM Good, el procedimiento se realizó según el protocolo del fabricante, se empezó con 30 mg de muestra del tejido de la garrapata y un pool de 30 larvas, finalmente el ARN extraído se eluyó en 50 µL de RNase-free H<sub>2</sub>O del kit (ABM, 2019b).

### **Cuantificación de ADN y ARN**

Luego del proceso de extracción el ADN y ARN obtenido de la garrapata adulta y del pool de larvas se cuantificó de la misma forma que el ADN de sangre de bovinos.

### **Diagnóstico de *A. marginale*, *Babesia* spp., *B. bigemina* y *B. bovis* en garrapatas hembras adultas y larvas**

Las muestra de ADN obtenidas de garrapatas hembras adultas y larvas se sometieron a la técnica de la PCR convencional, seguidamente el resultado fue evidenciado mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% del mismo modo que con el ADN de sangre de bovinos, se usó el protocolo ya descrito.

### **Cuantificación de la carga parasitaria de *Babesia* spp. y rickettsemia de *A. marginale* mediante RT qPCR**

Para determinar la viabilidad y poder cuantificar la carga de los hemotrópicos se realizó mediante la técnica RT qPCR en un solo paso, para lo cual se utilizó One-Step BrightGreen RT qPCR Kit® de la marca ABM Good, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante en el equipo Rotor-Gene Q de la marca QIAGEN (ABM, 2019a).

**RT qPCR para *A. marginale***

En el caso de *A. marginale* se amplificó el gen *msp5*, usando los primers ya descritos anteriormente (Reyna-Bello et al., 1998).

**RT qPCR para *Babesia* spp.**

En el caso del género *Babesia* spp. se amplificó el gen del rRNA de la sub unidad pequeña ribosomal 18S (18ss-rRNA) mediante el uso de los primers BJ1 (5'-GTCTTGTAATTGGAATGATGG-3 ') y BN2 (5'-TAGTTTATGGTTAGGACTACG-3') del Instituto de Investigación en Zoonosis – CIZ .

**Análisis estadístico*****Diseño no experimental***

Se buscó la presencia de *Anaplasma marginale* verificando la amplificación del gen de la proteína MSP5 y la presencia de *Babesia* spp. verificando la amplificación del gen rRNA de la subunidad pequeña ribosomal 18S mediante PCR convencional.

***Variable de respuesta***

Las variables de respuesta a este estudio son la presencia, tasa de transmisión y viabilidad de los hemotrópicos.

***Error aleatorio***

Los errores que se proveen en esta investigación son generados únicamente por los factores ambientales y errores de operador.

### **Datos de PCR**

En el análisis de PCR convencional se separaron los positivos para *Anaplasma marginale* y *Babesia* spp. mediante la presencia de bandas de los genes que se deseaba amplificar y los negativos por la ausencia de bandas, esto en el gel de agarosa.

### **Datos de la Tasa de transmisión**

La tasa de transmisión es una variable que está definida por la relación entre el número de casos positivos a un determinado organismo respecto al número total de muestras. Se estableció la tasa de transmisión de los patógenos en estudio utilizando los resultados de PCR. En este estudio se determinó la tasa de transmisión de los hemotrópicos de los bovinos a las garrapatas hembras teleoginas y a su progenie usando la siguiente ecuación:

$$\%T = \frac{N^{\circ} \text{positivo}}{N^{\circ} \text{TOTAL}} \times 100\% \quad \text{Ecuación 1.}$$

Dónde:

**%T:** tasa de transmisión de *A. marginale* y *Babesia* spp. de bovinos a garrapatas hembras teleoginas y a larvas.

**N° positivo:** número de garrapatas hembras/(pool de larvas) positivas para *A. marginale* y *Babesia* spp.

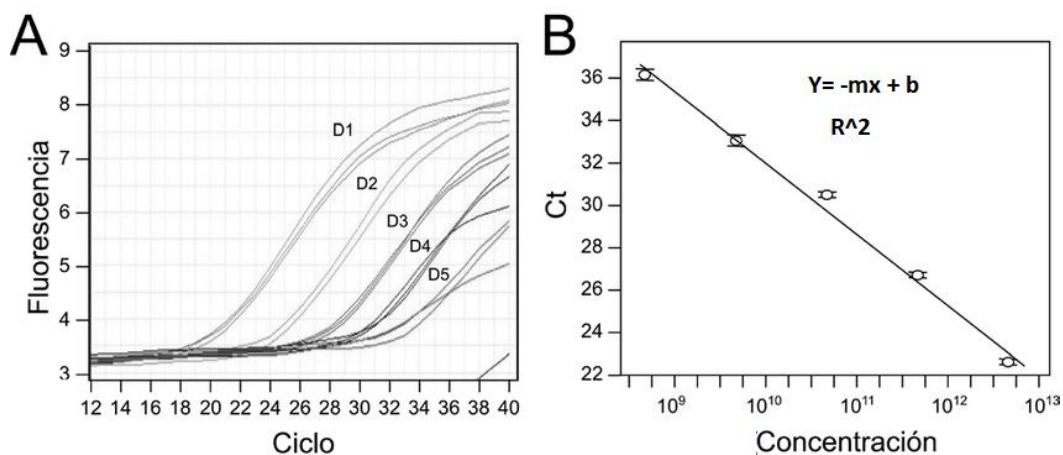
**N° TOTAL:** Número de garrapatas hembras/(pool de larvas) totales muestreadas de cada animal.

### ***Datos de RT qPCR***

En el análisis del RT-qPCR se separaron los casos positivos para *Anaplasma marginale* y *Babesia* spp. mediante la presencia de la curva de amplificación por encima del límite de detección (Threshold o umbral) y los negativos por debajo del umbral. La cuantificación absoluta se utilizó para determinar la presencia de los agentes hemotrópicos, este tipo de ensayo nos permitió determinar el número exacto de moléculas de ADNc en la muestra. Para llevarlo a cabo, se usó una muestra de ARN con una cantidad exacta en ng/ $\mu$ l (número de copias) como estándar absoluto externo. Este estándar fue un fragmento de ARN de una muestra positiva demostrada por PCR convencional. Este estándar externo se usó para hacer diluciones seriadas (D1=1/10, D2=1/100, D3=1/1000, D4=1/10.000, D5=1/100.000), en este caso se usaron las siguientes concentraciones (200, 20, 2, 0,2, y 0,02) ng/ $\mu$ l y generar una curva, a partir de los valores de Ct obtenidos para cada concentración y el logaritmo de la concentración correspondiente. Esta curva de calibración permitió interpolar directamente los valores de Ct de las muestras problema y obtener su concentración (Figura 7.).

**Figura 7.**

*Curva estándar construída con las pruebas de qRT-PCR. (A). Curvas de amplificación. (B). Curva estándar. Se presentan los valores del coeficiente de correlación (R<sup>2</sup>) y la ecuación de la recta.*



Donde la ecuación de la curva viene dada por:

$$Ct = -m \log(N_0) + Ct(1)$$

## Capítulo IV: Resultados y Discusión

### Selección de animales experimentales

Se muestrearon 123 bovinos que provenían de las 8 UPAS los cuales tenían al menos 2 garrapatas teleoginas, se pudo determinar que el 32.52% (40/123) de animales cumplían con los criterios propuestos: estar parasitados de la garrapata *R. microplus* además esta garrapata tenía que ser teleogina, por consiguiente el 23,58 % (29/123) de

animales se descartó porque la especie de garrapata era *Amblyomma cajennense* y el 43.90% (54/123) de garrapatas no eran teleoginas.

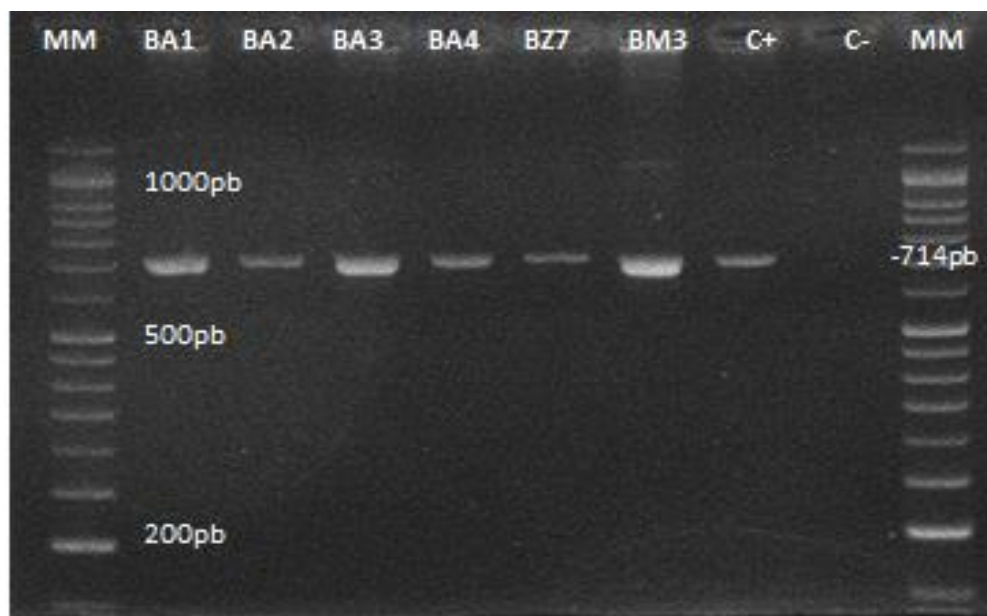
**Prevalencia de los Hemotrópicos en bovinos con garrapatas teleoginas *Rhipicephalus microplus***

***Prevalencia de Anaplasma marginale***

En los 40 bovinos se realizó la detección de *A. marginale* mediante PCR convencional usando los primers 19A y 19B para el gen *mSP5*, el cual codifica un fragmento de aproximadamente 714pb de la proteína MSP5 como lo indica la **Figura 8**. Mediante la PCR se pudo detectar una prevalencia del 52.5% (21/40) de individuos que eran positivos para la rickettsia (Tabla 4).

**Figura 8.**

*Detección por PCR convencional del gen msp5 de Anaplasma marginale en muestras de ADN de bovinos.*



*Nota 1.* La figura representa un gel de agarosa al 2%. Carril 1-10: (MM) marcador de peso molecular de 100pb. Carril 2-3-4-5-6-7: muestras de Bovinos, (BA1, BA2, BA3, BA4) pertenecen a la UPA 3, (BZ7) pertenece a la UPA 4, (BM3) pertenece a la UPA 6. Carril 8:

La alta frecuencia de *A. marginale* (52.5%) en los 21/40 animales adultos indican una situación endémica estable en las UPA, la positividad para *A. marginale* en bovinos que no presentaban sintomatología clínica, nos demuestra que sobrevivieron a una infección aguda o se infectaron de jóvenes y quedaron persistentemente infectados, caracterizado por ciclos bajos de rickettsemia (Aubry & Geale, 2011; Benavides et al., 2016; Kocan et al., 2010). Ha sido descrito que la PCR permite identificar animales persistentemente infectados, al detectar niveles muy bajos de



reckettsemia en bovinos portadores (0.0001%) (Aubry & Geale, 2011), pero también permite identificar animales con una infección aguda (Estrada et al., 2014).

*Anaplasma marginale* ya ha sido previamente reportada en la Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, como es el caso de Tana-Hernández et al., (2017), los cuales reportaron una prevalencia del 86,1% de la rickettsia mediante PCR convencional en la parroquia Luz de América, otros estudios realizados en Ecuador, revelan igualmente altas prevalencias a esta bacteria, por ejemplo, un estudio realizado en la provincia de Zamora Chinchipe por Muñoz et al., (2020) determinaron la prevalencia y diversidad genética de *A. marginale* en un total de 185 bovinos. El diagnóstico molecular se realizó con base en un ensayo de nPCR dirigido al gen *msp5* obteniendo un 63,8% de prevalencia.

Escobar et al., (2015), encontraron una prevalencia del 85,48% y 13,46% de un total de 85 de bovinos muestreados y 108 garrapatas *R. microplus* respectivamente en la zona del Litoral del Ecuador, comprendida entre las provincias de los Rios y Guayas. Incluso se han logrado encontrar prevalencias superiores como por ejemplo Soto, (2010), determinaron una prevalencia del 91,7 y 91,1 %, mediante PCR y un ELISAc en bovinos sacrificados en el centro de faenamiento de Quito.

Otro estudio realizado en la Isla Santa Cruz de la Provincia de Galápagos como el de Jumbo, (2018) aplicó PCR usando el mismo par de cebadores de este estudio 19Ay 19B, no obstante, los resultados de la PCR detectaron fragmentos de aproximadamente 750 pb y una prevalencia del 67,06% para *A. marginale*.

Otros estudios en donde usaron el mismo par de cebadores es en Venezuela, donde los resultados de esos estudios confirman o son similares con los nuestro en donde Reyna-Bello et al., (1998), obtienen una banda de 714 pb y Tavares & Reyna-Bello, (2006), obtienen una banda de 806pb.

Debido a esta discordancia, en la base de datos GenBank se pudo demostrar que con la secuencia de primers utilizados en este estudio *in silico*, el tamaño del fragmento que buscamos es de 714pb, lo que demuestra que la PCR convencional realizada en este estudio permitió amplificar el gen de la proteína MSP5 de *A. marginale*.

#### ***Prevalencia de Babesia spp., Babesia bovis y Babesia bigemina***

Para detectar *Babesia* spp. se utilizó el Babesia PCR Kit, el cual está diseñado para detectar 17 especies del género Babesia, mediante la detección del gen RNAr de la sub unidad pequeña ribosomal 18S (18Ss-rRNA), el tamaño del fragmento según el kit comercial es de 902pb y el fragmento que se encontró en este estudio era de aproximadamente 902pb como lo indica la Figura 9.

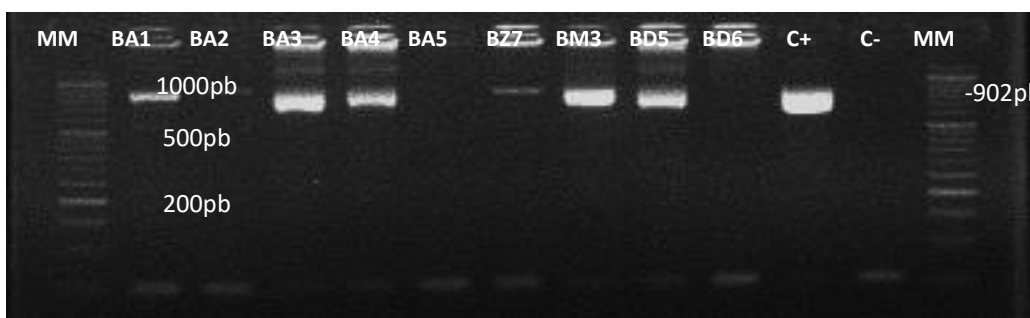
Para la detección específica de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en bovinos se usaron los cebadores para la PCR anidada (BigR, BigF, BovF y BovR) y (BigNR, BigNF, BovNF y BovNR) para el gen *rap-1* (*B. bovis*) y el gen *spei-avai* (*B. bigemina*) que codifican fragmentos de aproximadamente 310pb y 170pb respectivamente como lo indica la Figura 10.

De la misma manera, de los 40 bovinos analizados se obtuvo un 22,5% (9/40) de animales que eran positivos para el género *Babesia* spp. de estos últimos el 100% (9/9) presentaban doble infección a *Babesia bigemina* y a *Babesia bovis* (Tabla 4).

En este estudio los 9 animales que dieron positivo para el género de *Babesia* spp. a su vez presentaban doble infección con *A. marginale*, es decir de los 21 animales positivos para la rickettsia 9 de ellos eran positivos para los dos hemotrópicos y ningún animal fue solo positivo para *Babesia* spp.

#### Figura 9.

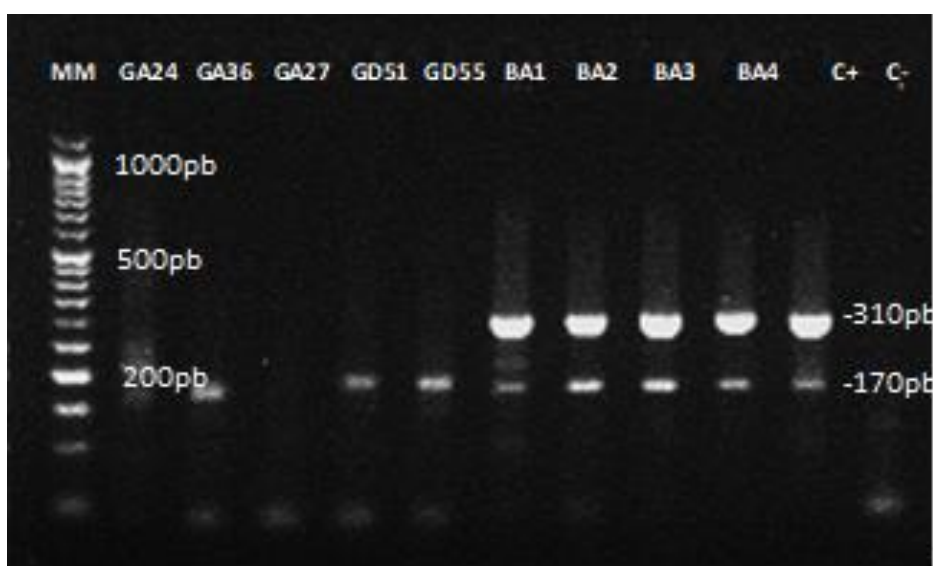
*Detección por PCR convencional del gen 18 S rRNA del género Babesia spp. en muestras de de ADN de bovinos.*



**Nota 2.** La figura representa un gel de agarosa al 2%. **Carril 1-13:** (MM) marcador de peso molecular de 100pb. **Carril 2-3-4-5-6-7-8-9-10:** muestras de Bovinos, (BA1, BA2, BA3, BA4, BA5) pertenecen a la UPA 3, (BZ7) pertenece a la UPA 4, (BM3) pertenece a la UPA 6, (BD5, BD6) pertenecen a la UPA 7. **Carril 11:** (C+) control positivo del kit comercial de PCR de 902pb. **Carril 12:** (C-) control negativo agua ultra pura.

**Figura 10.**

*Detección por PCR convencional del gen rap-1 para B. bovis y spei-avai para B. bigemina en muestras de ADN de garrapatas R. microplus y Bovinos*



**Nota 3.** La figura representa un gel de agarosa al 2%. **Carril 1:** (MM) marcador de peso molecular de 100pb. **Carril 2-3-4-5-6:** muestras de garrapatas (GA24, GA36, GA27) pertenecen a la UPA 3, (GD51, GD55) pertenece a la UPA 7. **Carril 7-8-9-10:** muestras de bovinos (BA1, BA2, BA3, BA4) pertenece a la UPA 3. **Carril 11:** (C+) control positivo para *B. bovis* fragmento de 310pb y *B. bigemina* fragmento de 170pb. **Carril 12:** (C-) control negativo agua ultra pura.

Los estudios de *Babesia* spp. en el Ecuador no son muy extensos sin embargo, Jumbo, (2018) realizó un muestreo de 170 bovinos de la Isla Santa Cruz de la Provincia de Galápagos, mediante PCR para amplificar fragmentos del gen 18Ss-rRNA de *Babesia* spp. y determinó una prevalencia de 25,88% para *Babesia* spp. Medina-Naranjo et al., (2017) realizaron un PCR para amplificar el gen 18S del ribosoma y determinaron la

ausencia de *Babesia* spp en la Provincia de Pastaza, sugiriendo la probabilidad que esto era debido a la ausencia de garrapatas en la zona. Otro estudio realizado por Medina-Naranjo et al., (2020), evaluaron *Babesia* spp. mediante PCR a 291 muestras de bovinos de la Provincia de Manabí, resultando de este estudio una presencia de *Babesia* spp en un 25,77% de los animales muestreados, además señalaron que la exposición de bovinos a las garrapatas les confiere mayor riesgo de presentar *Babesia* spp. en relación a los no expuestos a este artrópodo.

En cuanto a *B. bovis* y *B. bigemina* varios estudios usando el mismo set de primers confirmaron nuestros resultados como es el Figueroa et al., (1993) realizado en Columbia, USA, en el que desarrollaron un método basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) multiplex de alta sensibilidad para detectar *B. bovis* y *B. bigemina* demostrando obtener el mismo tamaño de los dos fragmentos como en nuestro estudio. Un segundo estudio en el que se usó el mismo set de primers es el de Mtshali et al., (2014), en South Africa, en donde se analizaron 268 muestras de animales mediante PCR anidada, los resultados revelaron que la prevalencia fue del 35,5% y del 76,1% para *B. bovis* y *B. bigemina* respectivamente. Estos resultados, y los nuestros evidencian que el nPCR multiplex es eficiente para determinar la presencia de *B. bovis* y *B. bigemina* en las muestras de bovinos.

En este estudio los animales que dieron positivo para *Babesia* spp. se caracterizaban por presentar una carga parasitaria de garrapatas teleoginas alta, media y baja. No obstante, no se detectaron animales con clínica de anaplasmosis ni babesiosis bovina, debido a que las mucosas y la temperatura eran todas normales

(ANEXO B), por lo que asumimos que en este ensayo todos los animales eran persistentemente infectados.

### **Prevalencia de los Hemotrópicos garrapatas teleoginas *Rhipicephalus microplus***

La amplificación de fragmentos de ADN de *Anaplasma marginale*, *Babesia* spp. y de las especies *B. bigemina* y *B. bovis* en las garrapatas teleoginas fue realizado de la misma manera ya descrita anteriormente.

### **Prevalencia de *Anaplasma marginale***

A partir de los 21 bovinos positivos para los hemotrópicos *Anaplasma marginale* y *Babesia* spp. se tomaron 124 garrapatas teleoginas que estaban infestando estos mismo bovinos y fueron colocadas en la incubadora para inducir su ovoposición durante un periodo de tiempo que osciló entre 15 y 20 días.

Posterior a su ovoposición, se realizó la prueba de PCR para *A. marginale* a estas 124 garrapatas teleoginas, de las cuales el 23.39% (29/124) dieron positivas para la *Rickettsia* (Tabla 4).

### **Prevalencia de *Babesia* spp.**

Del mismo modo se realizó la prueba a 58 garrapatas teleoginas regurgitadas de los 9 bovinos bovinos positivos para *Babesia* spp. de las cuales el 55.17% (32/58) dio positivo para el género *Babesia* spp., y de éstos el 40.63% (13/32) era positivo para *B. bovis* y el 65.63% (21/32) dio positivo para *B. bigemina* (Tabla 4).

Es decir se concluye que el 40.63% (13/32) de garrapatas teleoginas regurgitadas presento doble infección para *B. bovis* y *B. bigemina* y el 25% (8/32) dio positivo solamente para *B. bigemina*.

#### **Prevalencia de los Hemotrópicos en pool de larvas *Rhipicephalus microplus***

La amplificación de fragmentos de ADN de *Anaplasma marginale*, *Babesia* spp. y de las especies *B. bigemina* y *B. bovis* en el pool de larvas fue realizado de la misma manera ya descrita anteriormente.

#### **Prevalencia de *Anaplasma marginale***

La detección de los hemotrópicos en el pool de larvas se lo realizo finalizando el periodo de eclosión de los huevos, que aproximadamente fue de 21 a 28 días después de la ovoposición de los mismos. En el caso de *A. marginale* la prueba se lo realizó en los 29 pools de larvas que provenían de las 29 garrapatas teleoginas positivas para la rickettsia, de las cuales todas resultaron ser negativas por PCR a la presencia de *A. marginale* (Tabla 4).

#### **Prevalencia de *Babesia* spp.**

Lo mismo se realizó en el caso de las 32 garrapatas teleoginas positivas para el protozoario, dando como resultado el 6.25% (2/32) positivo para el género *Babesia* spp. de este último el 100% (2/2) presentaba doble infección para *B. bigemina* y *B. bovis* (Tabla 4).

Tabla 4.

*Prevalencia de Hemotrópicos en los bovinos, garrapatas y pool de larvas.*

<b>Prueba</b>	<b>Bovinos positivos</b>	<b>Garrapatas teleoginas positivas</b>	<b>Pool de larvas positivas</b>
<b>PCR- <i>A. marginale</i></b>	52.5% (21/40)	23.39% (29/124)	0% (0/29)
<b>PCR- <i>Babesia</i> spp.</b>	22.5% (9/40)	55.17% (32/58)	6.25% (2/32)
<b>Multiplex nPCR-<i>Babesia bigemina</i></b>	100% (9/9)	65.63% (21/32)	100% (2/2)
<b>Multiplex nPCR-<i>Babesia bovis</i></b>	100% (9/9)	40.63 (13/32)	100% (2/2)

La metodología utilizada en el presente estudio permitió la detección de infecciones persistentes de los hemotrópicos tanto en bovinos como en garrapatas teleoginas y en su descendencia, los resultados de este estudio nos permitió confirmar que si existe transmisión transovarica de *Babesia* spp. con un 6.25% (2/32) pero no de *A. marginale* 0% (0/29). No obstante, aunque algunos autores consideran que la transmisión transovárica de *A. marginale* no se presenta en las garrapatas hembras, existe evidencia que indica lo contrario, como es el caso de Estrada & Hernandez-ortiz.(2020), un estudio realizado en México en donde afirma que existe tanto la transmisión de *A. marginale* de garrapatas teleoginas a su progenie como la transmisión de larvas incubadas a 28 °C infectadas, es decir que se obtuvieron en el laboratorio y al colocarlas en al huésped mamífero sin estar éste enfermo, éste se enfermó con



rickettsia provenientes de las larvas, éste ensayo experimental se demostró mediante la amplificación del gen *msp5* y *msp1α* utilizando un PCR multiplex anidado (nPCR).

Ésta evidencia indica que *R. microplus* es capaz de transmitir *A. marginale* a su progenie y que estas larvas infectadas pueden transmitir la infección a huéspedes susceptibles.

La capacidad de las garrapatas de transmitir *A. marginale* ha sido evidenciado previamente. Por ejemplo, un estudio realizado en Argentina por Aguirre, Gaido, Vinabal, De Echaide, & Guglielmone, (1994), demostraron que la capacidad de transmisión de *A. marginal* de un ternero infectado a otro a través de una garrapata depende del nivel de rickettsiemia, ellos demostraron que con un 0,3% de rickettsiemia en la sangre del primer bovino se puede transmitir la infección.

Retomando la transmisión transovárica Esteves et al. (2015), observaron que lotes de larvas de *R. microplus* resultaron positivas para *A. marginale* (11% por PCR), obtenidas de hembras ingurgitadas incubadas a 18 °C en el laboratorio, en contraste, a larvas de hembras ingurgitadas incubadas a 28 °C, las cuales no presentaron ADN de *A. marginale*; por lo tanto basados en estos resultados, una posible explicación es que esta rickettsia requiere mayor tiempo para colonizar los ovarios por lo que la incubación a 18° C prolonga la ovoposición y le permite infectar los huevos de manera que las larvas nacerían infectadas y de esta forma podrían ser las transmisoras de la anaplasmosis durante el invierno en algunas zonas de Brasil.

En nuestro caso, se trabajó todo el tiempo a temperatura de 28°C, lo que pudiera explicar la carencia de *A. marginale* en las larvas. Esto hecho, nos permite inferir que en temperaturas más tropicales, superiores a los 28°C, la transmisión vertical no ocurre.

Por otra parte, varios autores que investigaron los aspectos cuantitativos de la transmisión transovarica de *Babesia* spp. han informado que las hembras de *R. microplus* se infectan con mayor frecuencia con *B. bigemina* que con *B. bovis*, como se confirma en nuestro estudio. En el estudio de Oliveira-sequeira et al. (2005), evaluaron la transmisión vertical de *B. bigemina* y *B. Bovis* de la garrapata a los huevos, demostrando que la frecuencia de las muestras de huevos infectadas con *B. bigemina* (33.3%) fue significativamente mayor que la observada para *B. bovis* (7.1%), estos porcentajes podrían estar relacionados con una mayor densidad de parásitos en la sangre de *B. bigemina* (Brayton, 2012).

Estos resultados confirman con nuestro estudio, en el que se encontró mayor muestras positivas de garrapatas teleoginas para *B. bigemina* 65.63% (21/32) que para *B. bovis* 40.63% (13/32), esto nos permitía sugerir que *B. bigemina* se encontraba en una mayor carga parasitaria que *B. bovis* en los animales muestreados. Por otro lado, ellos evaluaron los huevos de las garrapatas y al evaluar el umbral de detección, los esporokinetes realizan varios ciclos de esporogonía en los huevos, lo que aumenta la disponibilidad del ADN para la amplificación, a diferencia de las larvas.

## Tasa de transmisión de los hemotrópicos en las garrapatas teleoginas y en el pool de larvas

### *Tasa de transmisión de Anaplasma marginale*

De cada bovino positivo se detectó la tasa de transmisión de la Rickettsia a la garrapata y a su progenie, esto se hizo mediante el número de muestras positivas respecto al total de las muestras recolectadas x100% (Ecuación 1), en el caso de las garrapatas que provienen de los bovinos positivos para *A. marginal* este resultado va desde el (0 al 100)%, éste valor depende del número de garrapatas teleoginas tomadas de cada animal, en el caso del pool de larvas la tasa de transmisión fue de 0 % pues todas resultaron negativas (Tabla 5.).

**Tabla 5.**

*Tasa de transmisión de A. marginale a partir de bovinos infectados a sus garrapatas teleoginas y a sus larvas.*

<b>Bovino (N=21)</b>	<b>N° garrapatas teleoginas/bovino</b>	<b>% Transmisión en las garrapatas</b>	<b>% Transmisión en pool de larvas</b>
<b>BA1</b>	7	71.43% (5/7)	0% (0/5)
<b>BA2</b>	10	10% (1/10)	0% (0/1)
<b>BA3</b>	9	0% (0/9)	...
<b>BA4</b>	6	50% (3/6)	0% (0/3)
<b>BZ7</b>	8	12.5% (1/8)	0% (0/1)
<b>BM1</b>	6	50% (3/6)	0% (0/3)
<b>BM2</b>	3	66.67% (2/3)	0% (0/2)
<b>BM3</b>	5	20% (1/5)	0% (0/1)
<b>BM4</b>	3	100% (3/3)	0% (0/3)

<b>Bovino (N=21)</b>	<b>N° garrapatas teleoginas/bovino</b>	<b>% Transmisión en las garrapatas</b>	<b>% Transmisión en pool de larvas</b>
<b>BD1</b>	11	36.36% (4/11)	0% (0/4)
<b>BD2</b>	10	20% (2/10)	0% (0/2)
<b>BD5</b>	7	14.28% (1/7)	0% (0/1)
<b>BD7</b>	4	0% (0/4)	...
<b>BD9</b>	2	0% (0/2)	...
<b>BD10</b>	2	0% (0/2)	...
<b>BD11</b>	6	33.33% (2/6)	0% (0/2)
<b>BE5</b>	3	33.33% (1/3)	0% (0/1)
<b>BE7</b>	5	0% (0/5)	...
<b>BE9</b>	2	0% (0/2)	...
<b>BE11</b>	4	0% (0/4)	...
<b>BE12</b>	11	0% (0/11)	...
<b>TOTA</b>	124	29	0

*Nota 4.* La tabla representa la tasa de transmisión de *Anaplasma marginale* Bovinos parasitados con garrapatas teleoginas a sus larvas en las diferentes UPAS (Unidades de producción animal). BOVINOS: BA1, BA2, BA3, BA4 (pertenece a la UPA 3), BZ7 (pertenece a la UPA 4), BM1, BM2, BM3, BM4 (pertenece a la UPA6), BD1, BD2, BD5, BD7, BD9, BD10, BD11 (pertenece a la UPA 7), BE5, BE7, BE9, BE11, BE12 (pertenece a la UPA 8)

Un estudio realizado en Argentina de Aguirre et al., (1994), en donde demostraron que la capacidad de transmisión de *A. marginal* de un ternero infectado a otro a través de una garrapata depende del nivel de rickettsiemia del bovino, ellos demostraron que con un 0,3% de rickettsiemia en la sangre del primer bovino se puede transmitir la infección, pero si el animal tiene un porcentaje de rickettsiemia del 0,02% era incapaz de transmitir la infección al segundo ternero mediante la garrapata. Lo que

nos permite inferir porque en nuestro estudio no todas las garrapatas fueron positivas a *A. marginale* aunque el bovino si era positivo por PCR.

Tomando en cuenta que la prueba de PCR es capaz de detectar rickettsias hasta de 0,0001% (Aubry & Geale, 2011), algunos de los animales utilizados en el muestreo, pudieran tener una bacteremia inferior al umbral de transmisión.

Por otra parte estudios como el de José de la Fuente et al. (2003), postula y afirma en su ensayo experimental que para infectar las células del bovino, *A. marginale* cuenta en su superficie con proteínas que funcionan como adhesinas MSP1a (interacción garrapata-patógeno) y MSP1b (interacciones huésped-patógeno), pero solamente la proteína MSP1a es capaz de adherirse a las células de la garrapata y por lo tanto está involucrada en la transmisión de *A. marginale* por garrapatas teleoginas, mientras que MSP1b está involucrada en la infección de *A. marginal* al bovino.

Entonces analizando esto, otra posibilidad es que la cepa de *A. marginale* de nuestro estudio no infecta las garrapatas como señala José de la Fuente et al., (2003).

#### ***Tasa de transmisión de Babesia spp.***

De la misma manera, de los 9 bovinos positivos para *Babesia spp.* se detectó la tasa de transmisión tanto a la garrapata teleogina como a sus larvas y este resultado va desde el (14.28 al 100)% y (0 al 28.57)% respectivamente (Tabla 6).

**Tabla 6.**

*Tasa de transmisión de Babesia spp. a partir de bovinos infectados a sus garrapatas teleoginas y a sus larvas*

<b>Bovino (N=9)</b>	<b>N° garrapatas teleoginas/bovino</b>	<b>% Transmisión en las garrapatas</b>	<b>% Transmisión en pool de larvas</b>
<b>BA1</b>	7	14.28 % (1/7)	0% (0/1)
<b>BA2</b>	10	70% (7/10)	28.57% (2/7)
<b>BA3</b>	9	44.44 % (4/9)	0% (0/4)
<b>BA4</b>	6	50% (3/6)	0% (0/3)
<b>BZ7</b>	8	37.5% (3/8)	0% (0/3)
<b>BM3</b>	5	60% (3/5)	0% (0/3)
<b>BD5</b>	7	71.43% (5/7)	0% (0/5)
<b>BD10</b>	2	100% (2/2)	0% (0/2)
<b>BE11</b>	4	100% (4/4)	0% (0/4)
<b>TOTAL</b>	58	32	2

*Nota 5.* La tabla representa la tasa de transmisión de *Babesia* spp. de Bovinos parasitados con garrapatas teleoginas a sus larvas en las diferentes UPAS (Unidades de producción animal). BOVINOS: BA1, BA2, BA3, BA4 (pertenece a la UPA 3), BZ7 (pertenece a la UPA 4), BM3 (pertenece a la UPA6), BD5, BD10 (pertenece a la UPA 7), BE11 (pertenece a la UPA 8)

En cuanto a las especies *B. bigemina* y *B. bovis* se determinó la tasa de transmisión, dando como resultado una tasa que varía del (0 al 100) % para las dos especies de Babesia, sin embargo *B. bigemina* se transmitió en dos bovinos al 100% de

sus garrapatas y finalmente hablando de los dos pools de larvas positivos para el género de *Babesia* spp los dos pools dieron positivo para una doble infección de *B. bigemina* y *B. bovis* (Tabla 7).

**Tabla 7.**

*Tasa de transmisión de B. bigemina y B. bovis a partir de bovinos infectados a sus garrapatas teleoginas y a sus larvas.*

Bovino (N=9)	BOVINOS		% Transmisión en las garrapatas		% Transmisión en pool de larvas	
	<i>B. bigemina</i>	<i>B Bovis</i>	<i>B. bigemina</i>	<i>B Bovis</i>	<i>B. bigemina</i>	<i>B. bovis</i>
BA1	+	+	0% (0/1)	0% (0/1)	...	...
BA2	+	+	57.14 % (4/7)	28.57% (2/7)	100% (2/2)	100% (2/2)
BA3	+	+	50% (2/4)	25% (1/4)	...	...
BA4	+	+	33.33% (1/3)	33.33% (1/3)	...	...
BZ7	+	+	33.33% (1/3)	33.33% (1/3)	...	...
BM3	+	+	100% (3/3)	100% (3/3)	...	...
BD5	+	+	100% (5/5)	40% (2/5)	...	...
BD10	+	+	50% (1/2)	0% (0/2)	...	...
BE11	+	+	100% (4/4)	75% (3/4)	...	...
<b>TOTAL</b>			21	13	2	2

*Nota 6.* La tabla representa la tasa de transmisión de *Babesia bigemina* y *Babesia bovis* de Bovinos parasitados con garrapatas teleoginas a sus larvas en las diferentes UPAS (Unidades de producción animal). BOVINOS BA1, BA2, BA3, BA4 (pertenece a la UPA 3), BZ7 (pertenece a la UPA 4), BM3 (pertenece a la UPA6), BD5, BD10 (pertenece a la UPA 7), BE11 (pertenece a la UPA 8)

Varios estudios han demostrado la transmisión transovarica de Babesia, lo que se considera como una de las estrategias evolutivas más exitosas entre los miembros de la Apicomplexa (Howell et al., 2007a, 2007b; Oliveira-sequeira et al., 2005). Una sola hembra de garrapatas duras pone miles de huevos; esto permite la diseminación de Babesia a partir de una sola garrapata infectada (Uilenberg, 2006).

Estudios como el de Howell et al., (2007a), probó la hipótesis de que las tasas de infección de *B. bovis* son las mismas para la progenie de larvas derivadas de hembras alimentadas durante una infección aguda o persistente; el porcentaje de larvas infectadas varió de 0 a 20% cuando se derivó de hembras alimentadas en terneros persistentemente infectados y del 4 al 6% cuando se derivan de hembras alimentadas durante la fase aguda de la parasitemia. En este ensayo no hubo diferencias significativas en las tasas de infección de la progenie, lo que implica que el riesgo asociado con la introducción de ganado con infección persistente o con infección aguda es igual.

Por otra parte si evaluamos el número total de garrapatas con infección de *B. bigemina* (21) frente a *B. bovis* (13), es mucho mayor la frecuencia de infección por *B. bigemina*, esto demuestra que es más eficiente como agente infeccioso en los bovinos y en las garrapatas, como se señaló anteriormente en la prevalencia de las dos especies. Esto sugiere que la transmisión del parásito a la garrapata pudiera estar relacionada con una mayor densidad de parásitos de *B. bigemina* en la sangre del bovino, como lo demostró (Oliveira-sequeira et al., 2005).



### **Viabilidad de los hemotrópicos mediante RT qPCR**

Para determinar la viabilidad de los hemotrópicos en las garrapatas teleoginas y en las larvas, se realizó una prueba de PCR cuantitativa de transcripción inversa (RT-qPCR), esta técnica permitió la cuantificación absoluta de la carga parasitaria y rickettsemia de las muestras y su viabilidad. En este caso, las muestras de partida fueron los ARNm, molécula que nos permitió determinar la viabilidad de los dos Hemotrópicos dentro de la garrapata y en su descendencia. Se Usó el ARN mensajero porque participa en la traducción de las proteínas en todos los organismos vivos, éste es muy lábil y dura poco tiempo en la célula, por lo que su determinación puede ser usada como demostración de la viabilidad de un organismo (Salazar et al., 2013).

### ***Viabilidad de Anaplasma marginale en muestras de garrapatas teleoginas y pool de larvas***

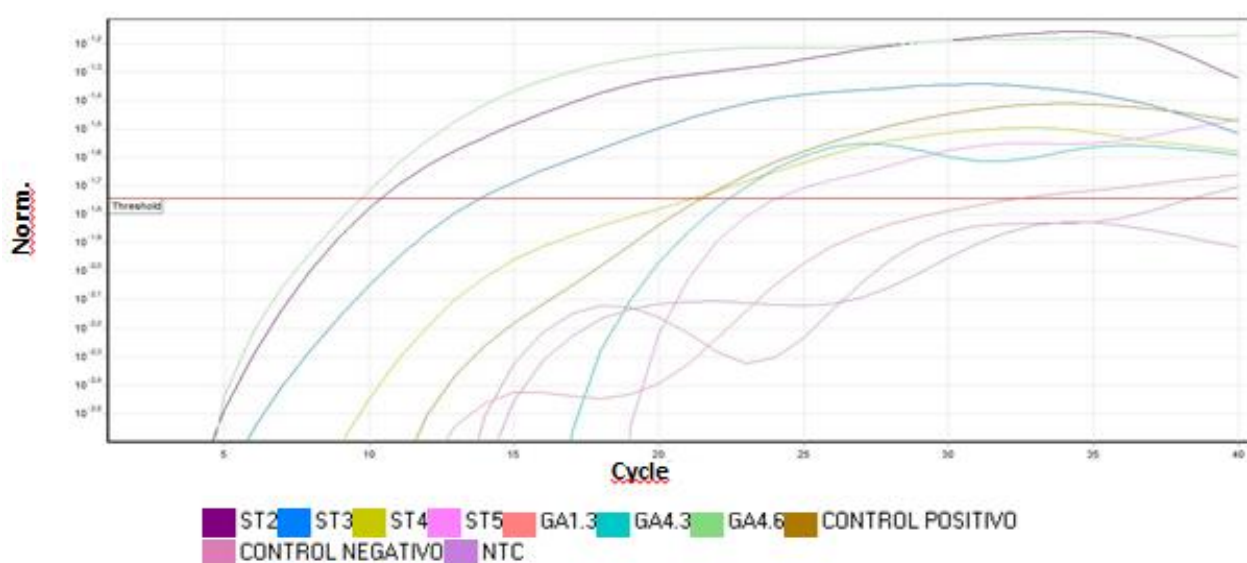
Para la cuantificación de la carga rickettsemia de *A. marginale* se partió de las muestras positivas en la PCR convencional tanto de garrapatas teleoginas (Gna=29) como de pool de larvas (Lna=0), el nivel de expresión del gen *msp5* se evaluó mediante el método "Quantitation - Standard Curve" (Rutledge, 2003), utilizando el sistema de amplificación en Tiempo Real "Step One". Para ello se preparó una curva estándar a partir del ARNm de una muestra positiva para los parásitos, un control positivo, un control negativo y un control No Template.

Finalmente se detectó la rickettsia en tres de las 29 muestras de ADNc (Ct 9.73, 22.42 y 32.54) (Tabla 7); el control positivo y control negativo presentaron un valor de 21.49, >40 respectivamente y el control NTC presentó un valor de 38.49 (Figura 11). La curva estándar realizada presentó un coeficiente de correlación  $R^2 = 0.96935$ , pendiente

de -3.78 y eficiencia de la reacción de 0.84 (Figura 12), lo que indica una respuesta lineal confiable para la detección y cuantificación de *A. marginale*. En términos de copias bacterianas/ $\mu\text{l}$  la curva estándar cubre un rango de  $2.50\text{E}+12$  a  $6.09\text{E}+08$  y las muestras positivas de  $3.74\text{E}+12$ ,  $1.64\text{E}+09$  y  $3.47\text{E}+06$  copias/ $\mu\text{l}$  (Tabla 8).

**Figura 11.**

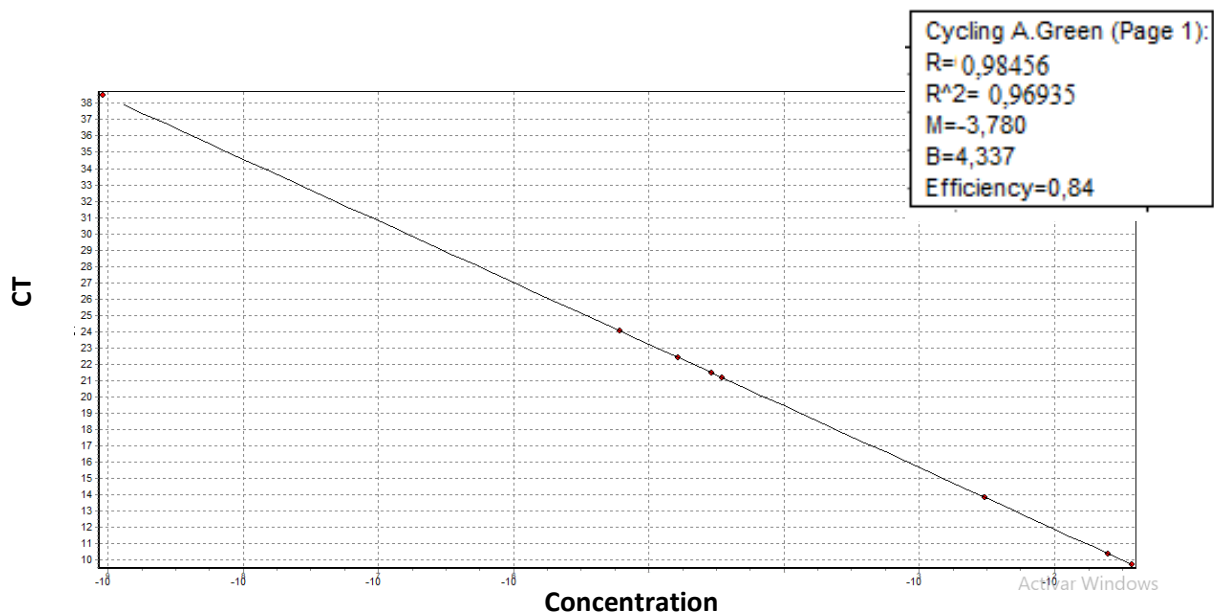
*Gráfica de amplificación por PCR en tiempo real en escala logarítmica de Anaplasma marginale.*



*Nota 7.* Curva de amplificación de detección de *Anaplasma marginale* en muestras de cDNA de garrapatas mediante RT qPCR. En donde ST2, ST3, ST4, ST5 indican la curva estándar de una muestra control, GA1.3, GA4.3 Y GA4.6 indican muestras de cDNA de garrapatas teleoginas, CONTROL POSITIVO (muestra control), CONTROL NEGATIVO (agua) y NTC (Control NO TEMPLATE). Las muestras de cDNA son positivas cuando atraviesan el umbral de fluorescencia o threshold y cuando alcanzan el umbral antes del ciclo 40

Figura 12.

*Curva de calibración estándar de Anaplasma marginale*



Ecuación de la curva estándar de *A. marginale*, obtenida en el programa de

*Rotor Gene qPCR*:

$$CT = -3,780 \log(\text{conc}) + 4,337$$

**Tabla 8.**

*Detección y cuantificación absoluta del número de copias de Anaplasma marginale en muestras de garrapatas teleoginas.*

<b>N°</b>	<b>Name</b>	<b>Type</b>	<b>Ct*</b>	<b>#CP(copias/ul)**</b>
<b>1</b>	ST2	Standard	10.39	2.50E+12
<b>2</b>	ST3	Standard	13.86	3.03E+10
<b>3</b>	ST4	Standard	21.19	3.49E+09
<b>4</b>	ST5	Standard	24.05	6.09E+08
<b>5</b>	GA1.1	Unknown	>40	-
<b>6</b>	GA1.2	Unknown	NEG (Multi Ct)	-
<b>7</b>	GA1.3	Unknown	32.54	3.47E+06
<b>8</b>	GA1.4	Unknown	NEG (Multi Ct)	-
<b>9</b>	GA1.6	Unknown	NEG (Multi Ct)	-
<b>10</b>	GA2.4	Unknown	NEG (Multi Ct)	-
<b>11</b>	GA4.3	Unknown	22.42	1.64E+09
<b>12</b>	GA4.4	Unknown	NEG (Multi Ct)	-
<b>13</b>	GA4.6	Unknown	9.73	3.74E+12
<b>14</b>	GZ7.2	Unknown	-	-
<b>15</b>	GM1.2	Unknown	-	-
<b>16</b>	GM1.4	Unknown	-	-
<b>17</b>	GM1.5	Unknown	-	-
<b>18</b>	GM2.2	Unknown	-	-
<b>19</b>	GM2.3	Unknown	-	-

N°	Name	Type	Ct*	#CP(copias/ul)**
20	GM3.4	Unknown	>40	-
21	GM4.1	Unknown	-	-
22	GM4.2	Unknown	-	-
23	GM4.3	Unknown	-	-
24	GD1.1	Unknown	-	-
25	GD1.2	Unknown	-	-
26	GD1.3	Unknown	-	-
27	GD1.4	Unknown	-	-
28	GD2.5	Unknown	-	-
29	GD2.7	Unknown	-	-
30	GD5.6	Unknown	-	-
31	GD11.5	Unknown	-	-
32	GD11.6	Unknown	-	-
33	GE5.2	Unknown	>40	-
34	CONTROL POSITIVO	Positive Control	21.49	2.90E+09
35	CONTROL NEGATIVO	Negative Control	>40	-
36	CONTROL NO TEMPLATE	NTC	38,49	-

*Nota 8.* \*Ct: Ciclo umbral. \*\*CP: Carga parasitarias. \*\*\*Valores 38.49 (sospechoso), Ct>40, Multi Ct. - indican resultados negativos.

La extracción de ARNm en nuestro estudio se realizó aproximadamente a los 20 días a partir de que la garrapata teleogina estaba fuera del anfitrión, esto nos sugiere que la viabilidad de *A. marginale* dura al menos 20 días en la garrapata teleogina.

Otros estudios en donde se ha estudiado la viabilidad de *A. marginale* es el de Aguirre et al., (1994), ellos demostraron que la rickettsia fue viable durante 72 h en garrapatas *B. microplus*, al confirmar que una ninfa tomada de un ternero infectado y al esperar 72 horas en la incubadora para que mude a adulta, ésta garrapata fue capaz de infectar a un nuevo ternero. Otro estudio como el de Mazzola & Kuttler, (1980), demostraron que *A. marginale* en cultivos experimentales eran viables y patógenos mediante la inoculación de terneros hasta por 16 días. Otro estudio similar como es el de Kessler, Ristic, Sells, & Carson, (1979), verificaron la viabilidad del organismo a partir de cultivos *in vitro*, mediante la inoculación en terneros susceptibles, utilizando cultivos de 13 y 33 días de replicación.

#### ***Viabilidad de Babesia spp. en muestras de garrapatas teleoginas y pool de larvas***

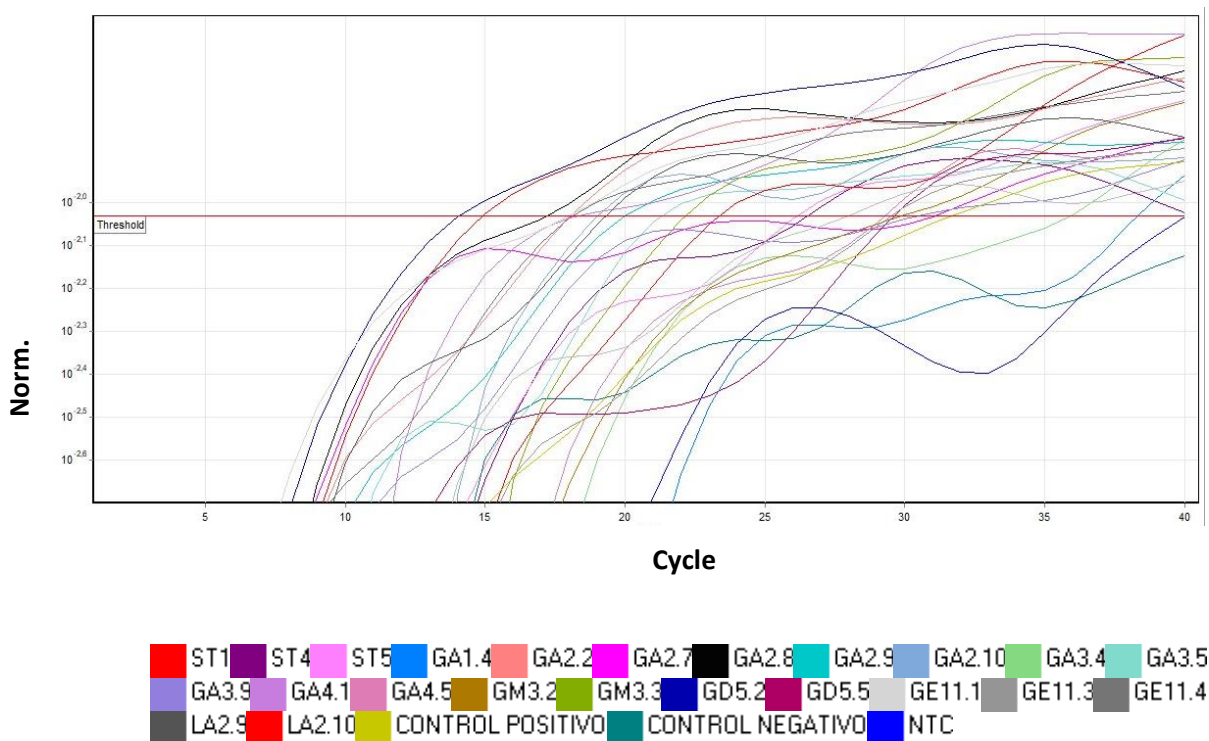
Para la cuantificación de la carga parasitaria de *Babesia* spp. se realizó de la misma manera que *A. marginale*, se partió de las muestras positivas demostradas en la PCR convencional tanto de garrapatas hembras (Gnb=32) como de pool de larvas (Lnb=2), el nivel de expresión del gen 18S-rRNA se evaluó mediante el método anteriormente descrito.

El genero *Babesia* spp. se detectó el protozoario en 18 de las 32 muestras de ADNc total de garraptas (Ct entre 17.23 a 38.31) y 2 de las 2 muestras de ADNc del pool de larvas (Ct: 19.30 y 23.34) (Tabla 8.); el control positivo presentó un valor de Ct de 31.70, el control negativo y el control NTC no cruzaron el umbral de amplificación (Figura 13.). La curva estándar realizada presentó un coeficiente de correlación  $R^2 = 0.92739$ , pendiente de -3.057 y eficiencia de la reacción de 1.12 (Figura 14.), lo que

indica una respuesta lineal altamente confiable para la detección y cuantificación de *Babesia* spp. En términos de copias parasitarias/ $\mu$ l la curva estándar cubre un rango de  $2.90E+13$  a  $6.43E+08$  y las muestras positivas de garrapatas de  $5.40E+14$  a  $6.43E+8$  copias/ $\mu$ l y de larvas  $1.06E+14$  y  $5.06E+11$  (Tabla 9).

**Figura 13.**

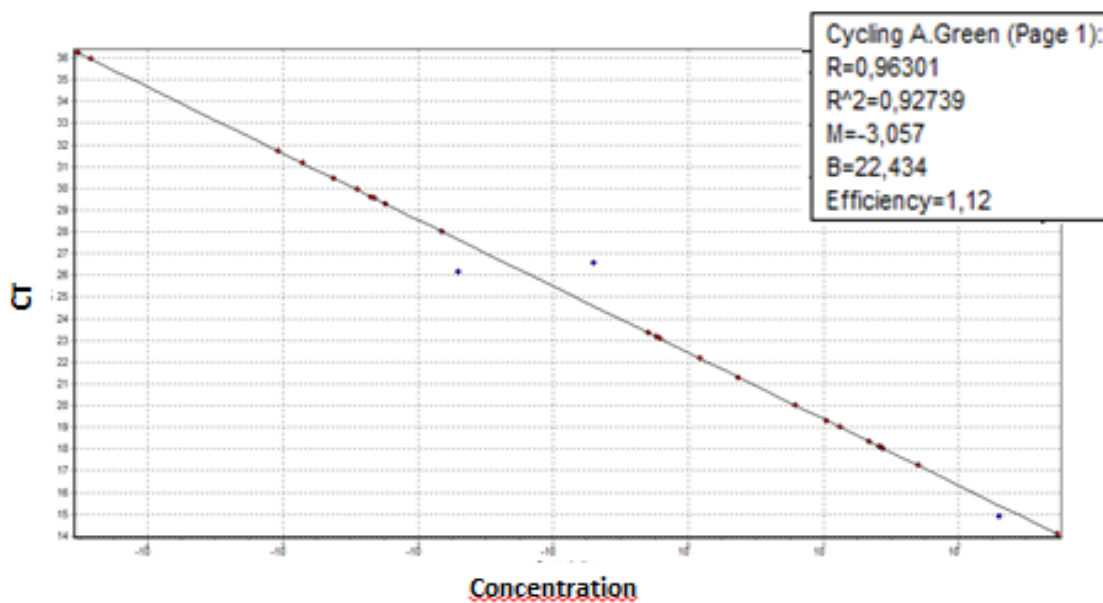
*Gráfica de amplificación por PCR a tiempo real en escala logarítmica de Babesia spp.*



**Nota 9:** Curva de amplificación de detección de *Babesia* spp. en muestras de cDNA de garrapatas mediante RT qPCR. En donde ST1, ST4, ST5 indican la curva estándar de una muestra control, GA1.4, GA2.2, GA2.7, GA2.8, GA2.9, GA2.10, GA3.4, GA3.5, GA3.9, GA4.1, GA4.5, GM3.2, GM3.3, GD5.2, GD5.5, GE11.1, GE11.3 y GE11.4, indican muestras de cDNA de garrapatas teleoginas, LA2.9 y LA2.10 indican muestras de cDNA de pool de larvas. CONTROL POSITIVO (muestra control), CONTROL NEGATIVO (agua) y NTC (Control NO TEMPLATE). Las muestras de cDNA son positivas cuando atraviesan el umbral de fluorescencia o threshold y cuando alcanzan el umbral antes del ciclo 40.

Figura 14.

Curva de calibración estándar de *Babesia* spp.



Ecuación de la curva estándar de *Babesia* spp. obtenida en el programa de Rotor

Gene qPCR:

$$CT = -3,057 \log(\text{conc}) + 22,434$$

Tabla 9.

Detección y cuantificación absoluta del número de copias de *Babesia* spp. en muestras de garrapatas teleoginas.

N°	Name	Type	Ct*	CP(copias/ul)**
1	ST1	Standard	14.91	2.90E+13
2	ST2	Standard	22.99	1.48E+13



<b>N°</b>	<b>Name</b>	<b>Type</b>	<b>Ct*</b>	<b>CP(copias/ul)**</b>
<b>3</b>	ST4	Standard	26.55	2.90E+12
<b>4</b>	ST5	Standard	26.15	6.11E+12
<b>5</b>	GA1.4	Unknown	38.31	6.43E+08
<b>6</b>	GA2.1	Unknown	-	-
<b>7</b>	GA2.2	Unknown	18.05	2.72E+14
<b>8</b>	GA2.4	Unknown	-	-
<b>9</b>	GA2.7	Unknown	31.15	1.41E+11
<b>10</b>	GA2.8	Unknown	17.23	5.02E+14
<b>11</b>	GA2.9	Unknown	20.00	6.28E+14
<b>12</b>	GA2.10	Unknown	19.01	1.32E+13
<b>13</b>	GA3.4	Unknown	35.94	3.81E+09
<b>14</b>	GA3.5	Unknown	21.29	2.37E+14
<b>15</b>	GA3.6	Unknown	-	-
<b>16</b>	GA3.9	Unknown	30.46	2.37E+10
<b>17</b>	GA4.1	Unknown	18.35	2.17E+14
<b>18</b>	GA4.5	Unknown	29.29	5.73E+11
<b>19</b>	GA4.6	Unknown	-	-
<b>20</b>	GZ7.3	Unknown	-	-
<b>21</b>	GZ7.5	Unknown	-	-
<b>22</b>	GZ7.7	Unknown	-	-
<b>23</b>	GM3.2	Unknown	29.93	3.54E+11
<b>24</b>	GM3.3	Unknown	22.16	1.23E+13

N°	Name	Type	Ct*	CP(copias/ul)**
25	GM3.4	Unknown	NEG (Multi Ct)	-
26	GD5.1	Unknown	NEG (Multi Ct)	-
27	GD5.2	Unknown	14.08	5.40E+14
28	GD5.3	Unknown	-	-
29	GD5.5	Unknown	29.60	4.52E+11
30	GD5.7	Unknown	-	-
31	GD10.1	Unknown	-	-
32	GD10.2	Unknown	-	-
33	GE11.1	Unknown	18.03	2.75E+14
34	GE11.2	Unknown	-	-
35	GE11.3	Unknown	29.53	4.79E+11
36	GE11.4	Unknown	18.11	2.60E+14
37	LA2.9	Unknown	19.30	1.06E+14
38	LA2.10	Unknown	23.34	5.06E+11
39	CONTROL POSITIVO	Positive Control	31.70	9.33E+08
40	CONTROL NEGATIVO	Negative Control	-	-
41	CONTROL NO TEMPLATE	NTC	-	-

*Nota 10:* \*Ct: Ciclo umbral. \*\*CP: Carga parasitarias. \*\*\* Valores Ct>40, Multi Ct. - indican resultados negativos.

Del total de las garrapatas teleoginas evaluadas se obtuvo un 10.34% (3/29) de individuos que contenían la rickettsia viable, un 56.25% (18/32) de individuos que contenían el protozooario viable, ninguna de las garrapatas presentó doble infección por

qPCR, de la misma manera los 2 pools de larvas evaluados resultaron tener *Babesia* spp. viable 100% (2/2) (Tabla 10).

**Tabla 10.**

*Detección de la viabilidad de los hemotrópicos en las garrapatas teleoginas y en pool de larvas.*

Prueba	N° garrapatas teleoginas	N° de pool de larvas
	viabiles	viabiles
RT-qPCR- <i>A. marginale</i>	10.34% (3/29)	-
RT-qPCR- <i>Babesia</i> spp.	56.25% (18/32)	100% (2/2)

La viabilidad de *Babesia* spp. en garrapatas teleoginas y en el pool de larvas se determinó 20 días después de que la garrapata estuviera fuera de su anfitrión, de la misma manera como en el caso de *A. marginale*.

Al igual que *A. marginale* no existen muchos o ningún estudio sobre la viabilidad de *Babesia* spp. pero trabajos como el de Hodgson, (1992) nos dice que el tiempo en que las larvas permanecen sin comer (no parasitarias) puede influir en la viabilidad del protozoario. Aunque algunas especies de *Babesia* puede permanecer viables durante mucho tiempo dentro de las garrapatas no alimentadas. Por ejemplo, *B. bovis* sigue siendo viable en larvas *R. microplus* almacenadas a 14 ° C y 95% de humedad durante 65 días, *B. bigemina* se observó lo mismo al ser almacenadas las larvas a 15 ° C se han observado después de 120 días viables.

Todos estos trabajos previos donde se han evaluado la viabilidad de estos hemotrópicos en garrapatas, han requerido realizar infecciones experimentales en animales, en nuestro caso, se desarrolló como estrategia la determinación del ARNm como método para determinar la viabilidad, lo cual es mucho más simple, económico y no se requirió el desarrollo de infecciones experimentales.

### Capítulo V: Conclusiones

En este estudio se pudo demostrar que la tasa de transmisión de *A. marginale* varía del (0 al 100)% en garrapatas teleoginas y de 0% a sus respectivas larvas, en cuanto al protozooario *Babesia* spp. se detectó una tasa de transmisión del (14.28 al 100)% y en sus larvas del (0 al 28.57)% , esto nos permite concluir que la transmisión transovarica de *A. marginale* no ocurrió, en nuestras condiciones, mientras que en *Babesia* spp si, demostrando que la garrapata *R. microplus* es un vector importante para la transmisión del protozooario en los bovinos de Ecuador.

En cuanto a las especies *B. bigemina* y *B. bovis* se determinó la tasa de transmisión del (0 al 100)% para las dos especies de Babesia, sin embargo en más de un bovino la tasa de transmisión de *B. bigemina* fue del 100%, esto demuestra que *B. bigemina* se transmite de manera más eficiente por la garrapata, sin embargo el pool de larvas positivo para Babesia presento doble infección de *B. bovis* y *B. bigemina*.

La RTq-PCR permitió determinar la viabilidad de los dos hemotrópicos, obteniendo un 10.34% (3/29) de garrapatas que contenían la rickettsia viables y un 56.25% (18/32) de garrapatas viables para *Babesia* spp. además los dos pool de larvas

resultaron viables para el protozoario. Esto demuestra que *A. marginale* si esta viable en las garrapatas teleoginas, pero no existe una transmisión transovarica de la misma, mientras que *Babesia* spp. se mantiene viable en la garrapata teleogina y en su descendencia, siendo un vector potencial de la enfermedad de babesiosis bovina.

Este es el primer reporte en el que se usó como herramienta de diagnóstico RT qPCR, para determinar la viabilidad de los hemotrópicos en las garrapatas y en sus larvas, en contraste con otros estudios en los que se realizaron infecciones experimentales en bovinos para demostrar la viabilidad, éste estudio se lo realizó de manera más simple, económico y se lo realizó en un periodo de tiempo corto.

En este estudio se usó por primera vez como estrategia para determinar la viabilidad de los hemotrópicos a la molécula ARNm, porque esta molécula participa en la traducción de proteínas en un organismo vivo, por lo tanto su ausencia en las muestras nos indica que no está viable.

Esta investigación se considera el primer reporte de Ecuador en demostrar que no existe la transmisión transovarica de *A. marginale* pero si de *Babesia* spp. en *R. microplus*, por lo que se debe considerar otras especies de artrópodos hematófagos u otra forma de transmisión como la iatrogénica, que estén involucrados en la transmisión de la rickettsia.

## Capítulo VI: Recomendaciones

Realizar este mismo estudio en otras zonas tropicales y subtropicales del Ecuador, para demostrar si existe o no la transmisión transovarica de *A. marginale* mediante la garrapata *R. microplus*.

Realizar una nueva investigación basado en el nivel de rickettsiemia del ganado en el que las garrapatas se alimentan previamente, ya que hay reportes en el que se ha demostrado que no todas las garrapatas adquieren la infección, porque dependen de la carga de la rickettsia, por consecuencia la transmisión a las larvas sería muy poco probable.

Al no existir la transmisión transovarica de *A. marginale* se debe tomar en cuenta otros métodos de transmisión, como la transmisión interestadial y transestadial, en el que éste tipo de transmisión en el campo dependerá de la tasa de migración de las garrapatas entre los huéspedes susceptibles.

Realizar esta investigación en otras especies de artrópodos hematófagos por ejemplo el Tábano (*Tabanus* sp.), para comprobar nuevos vectores de *A. marginale* y de esta manera poder controlar la propagación de las enfermedades en los bovinos.

Se recomienda en futuros estudios llevar a cabo este ensayo con otro par de primers de los genes MSP1a y MSP1b que demuestren la presencia de proteínas adhesinas que interactúan entre *A. marginale* y la garrapata, de esta forma se podrá determinar si la o las cepas que circulan en el Ecuador son transmisibles por garrapatas hembras.

Establecer medidas de control de garrapatas, que son los vectores principales en la Babesiosis bovina, ya que se pudo demostrar la viabilidad del protozooario en las garrapatas y en sus respectivas larvas.

### Capítulo VII: Bibliografía

ABM. (2019a). *One-Step BrightGreen qRT-PCR Kit*.

ABM. (2019b). *UltrRNA Column Purification Kit*. 30.

AbouLaila, M., Yokoyama, N., & Igarashi, I. (2010). Development and evaluation of two nested PCR assays for the detection of *Babesia bovis* from cattle blood. *Veterinary Parasitology*, 172(1–2), 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.04.011>

Aguirre, D. H., Gaido, A. B., Vinabal, A. E., De Echaide, S. T., & Guglielmone, A. A. (1994). Transmission of *Anaplasma marginale* with adult *Boophilus microplus* ticks fed as nymphs on calves with different levels of rickettsaemia. *Parasite*, 1(4), 405–407. <https://doi.org/10.1051/parasite/1994014405>

Alvarez, A., Rojas, C., & Figueroa, J. (2019). *Diagnostic Tools for the Identification of Babesia sp. in Persistently Infected Cattle*.

Amasino, C. (2017). Enfermedades infecciosas de los animales y zoonosis. In *Eduip* (Vol. 1, p. 220). Retrieved from <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/63694>

Aubry, P., & Geale, D. W. (2011). A review of Bovine anaplasmosis. *Transboundary and Emerging Diseases*, 58(1), 1–30. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01173.x>

- Baldacchino, F., Muenworn, V., Desquesnes, M., Desoli, F., Charoenviriyaphap, T., & Duvallet, G. (2013). Transmission of pathogens by *Stomoxys* flies (Diptera, Muscidae): A review. *Parasite*, 20(1). <https://doi.org/10.1051/parasite/2013026>
- Benavides, E., Romero, J., & Villamil, C. (2016). *Las garrapatas del ganado bovino y los agentes de enfermedad que transmiten en escenarios epidemiológicos de cambio climático*. Retrieved from <http://repiica.iica.int/docs/B4212e/B4212e.pdf>
- Bioneer, C. (2015). *AccuPower® Babesia PCR kit*. 8777, 11–12.
- Brayton, K. A. (2012). Transmisión de *Anaplasma marginale* por garrapatas Tick Transmission of *Anaplasma marginale*. *Rev Mex Cienc Pecu*, 3(Supl 1), 41–50. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmcp/v3s1/v13s1a6.pdf>
- Corona, B., & Martínez, S. (2011). Detección de *Anaplasma marginale* en Bovinos mediante la amplificación por PCR del gen msp5. *Revista de Salud Animal*, 33(1), 24–31.
- Coronado, A. (2001). Is *Boophilus microplus* the main vector of *Anaplasma marginale*? Technical note. *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad Del Zulia*, 11(5), 408–411.
- De la Fuente, J., Garcia-Garcia, J. C., Blouin, E. F., & Kocan, K. M. (2001). Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen *Anaplasma marginale* to bovine erythrocytes and tick cells. *International Journal for Parasitology*, 31(2), 145–153. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00162-4](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00162-4)
- de la Fuente, José, Garcia-Garcia, J. C., Blouin, E. F., & Kocan, K. M. (2003). Characterization of



the functional domain of major surface protein 1a involved in adhesion of the rickettsia *Anaplasma marginale* to host cells. *Veterinary Microbiology*, 91(2–3), 265–283. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12458174>

de la Fuente, José, Ruybal, P., Mtshali, M. S., Naranjo, V., Shuqing, L., Mangold, A. J., ... Kocan, K. M. (2007). Analysis of world strains of *Anaplasma marginale* using major surface protein 1a repeat sequences. *Veterinary Microbiology*, 119(2–4), 382–390. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.09.015>

Domínguez, D., Rodrigu-Cruz, R., Almazan-García, C., Saltijeral, J., Fuente, D. la, & Jose. (2010). ASPECTOS BIOLÓGICOS Y MOLECULARES DE LA RESISTENCIA A LOS ACARICIDAS Y SU IMPACTO EN LA SALUD ANIMAL. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12(2), 181–192. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/939/93913070001.pdf>

Eleizalde, M. C., & Reyna-Bello, A. (2014). *Anaplasma marginale* Mechanisms of Antigenic Variation in *Anaplasma marginale*. 55(2).

Escobar, A., Cevallos, O., Villarreal, P., Carranza, M., Carranza, H., & Pinargote, E. (2015). Prevalencia y detección por PCR anidada de *Anaplasma marginale* en bovinos y garrapatas en la zona central del Litoral ecuatoriano. *Ciencia y Tecnología*, 8(1), 11–17.

Esteves, E., Pohl, P. C., Klafke, G. M., Reck, J., Fogaça, A. C., Martins, J. R., & Daffre, S. (2015). Low temperature affects cattle tick reproduction but does not lead to transovarial transmission of *Anaplasma marginale*. *Veterinary Parasitology*, 214(3–4), 322–326. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.07.010>

- Estrada-Peña, A., Walker, A. ., Bouattour, A., Camicas, J. ., Horak, I. ., Latif, A. ., ... Preston, P. . (2003). Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species. In *The University of Edinburgh*. Retrieved from [http://www.researchgate.net/publication/259641898\\_Ticks\\_of\\_domestic\\_animals\\_in\\_Africa\\_a\\_guide\\_to\\_identification\\_of\\_species/file/5046352d0429878d7f.pdf](http://www.researchgate.net/publication/259641898_Ticks_of_domestic_animals_in_Africa_a_guide_to_identification_of_species/file/5046352d0429878d7f.pdf)
- Estrada, I. A., & Hernandez-ortiz, R. (2020). *Transmission of Anaplasma marginale by unfed Rhipicephalus microplus tick larvae under experimental conditions*. (February). <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i1.5018>
- Estrada, I. A., Ortiz, M. Á., Preciado, J. F., Rojas, E. E., Mendoza, F. A., Hernández, Ru., ... Rodríguez, S. D. (2014). *Transmisión De La Anaplasmosis Bovina*.
- Figuroa, J. V., Chieves, L. P., Johnson, G. S., & Buening, G. M. (1993). Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of Babesia bigemina, Babesia bovis and Anaplasma marginale DNA in bovine blood. *Veterinary Parasitology*, 50(1–2), 69–81. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(93\)90008-B](https://doi.org/10.1016/0304-4017(93)90008-B)
- Guglielmone, A. A. (1995). Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Veterinary Parasitology*, 57(1–3), 109–119. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(94\)03115-D](https://doi.org/10.1016/0304-4017(94)03115-D)
- Guillén, N., & Muñoz, L. (2015). “Estudio taxonómico a nivel de genero de garrapatas en ganado bovino de la parroquia Alluriquín - Santo Domingo de los Tsáchilas.” 60. Retrieved from <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/7264/1/T-ESPE-002686.pdf>

- Hernandez, R., Fernandez, C., & Baptista, M. del P. (2010). Metodología de la investigación. In *Metodología de la investigación*. Retrieved from <http://www.casadellibro.com/libro-metodologia-de-la-investigacion-5-ed-incluye-cd-rom/9786071502919/1960006>
- Hodgson, J. (1992). Biology and Transmission of Babesia bigemina in Boophilus microplus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 653(1), 42–51. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb19628.x>
- Howell, J. M., Ueti, M. W., Palmer, G. H., Scoles, G. A., & Knowles, D. P. (2007a). Persistently infected calves as reservoirs for acquisition and transovarial transmission of Babesia bovis by Rhipicephalus (Boophilus) microplus. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(10), 3155–3159. <https://doi.org/10.1128/JCM.00766-07>
- Howell, J. M., Ueti, M. W., Palmer, G. H., Scoles, G. A., & Knowles, D. P. (2007b). Transovarial transmission efficiency of Babesia bovis tick stages acquired by Rhipicephalus (Boophilus) microplus during acute infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(2), 426–431. <https://doi.org/10.1128/JCM.01757-06>
- INAMHI. (2020). *El clima promedio en Santo Domingo de los Colorados Ecuador*. 1–9.
- Jaimes-Dueñez, J., Triana-Chávez, O., & Mejía-Jaramillo, A. M. (2018). Genetic, host and environmental factors associated with a high prevalence of Anaplasma marginale. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 9(5), 1286–1295. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.05.009>
- Jorgensen, J., Carroll, K., Funke, G., Landry, M., & Warnock, D. (2011). *Manual of Clinical Microbiology*.

- Jumbo, J. (2018). *TEMA : 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*. 93.
- Kessler, R. H., Ristic, M., Sells, D. M., & Carson, C. A. (1979). In vitro cultivation of *Anaplasma marginale*: growth pattern and morphologic appearance. *American Journal of Veterinary Research*, 40(12), 1767—1773. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/230766>
- Khamesipour, F., Dida, G. O., Anyona, D. N., Razavi, M., & Rakhshandehroo, E. (2018). Tick-borne zoonoses in the Order Rickettsiales and Legionellales in Iran: A systematic review. In *PLoS Neglected Tropical Diseases* (Vol. 12). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006722>
- Kocan, K. M., de la Fuente, J., Blouin, E. F., Coetzee, J. F., & Ewing, S. A. (2010). The natural history of *Anaplasma marginale*. *Veterinary Parasitology*, 167(2–4), 95–107. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.012>
- Kocan, K. M., Guglielmono, A. A., & Mele, R. D. (2003). Antigens and Alternatives for Control of *Anaplasma marginale* Infection in Cattle. *Society*, 16(4), 698–712. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.4.698>
- Mazzola, V., & Kuttler, K. L. (1980). *Anaplasma marginale* in bovine erythrocyte cultures. *American Journal of Veterinary Research*, 41(12), 2087—2088. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/7212442>
- McGarey, D. J., Barbet, A. F., Palmer, G. H., McGuire, T. C., & Allred, D. R. (1994). Putative

adhesins of *Anaplasma marginale*: Major surface polypeptides 1a and 1b. *Infection and Immunity*, 62(10), 4594–4601. <https://doi.org/10.1128/iai.62.10.4594-4601.1994>

Medina-Naranjo, V., Chávez-Larrea, M. A., Ron-Román, J., Gonzatti, I., Gelacio, G., & Reyna-Bello, A. (2020). *Primer reporte molecular y análisis filogenético del 18s rna ribosomal de Babesia spp en el ganado bovino del Ecuador.*

Medina-Naranjo, V. L., Ron-Román, J. W., Jarrín-Porras, E. C., Sandoval-Morejón, E. D., Chávez-Larrea, M. A., Reyna-Bello, A., ... Moyano, J. C. (2017). Diagnosis of hemotropic *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma* spp. and *Babesia* spp. by elisa and PCR techniques in three livestock farms of Pastaza Province, Ecuador. *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad Del Zulia*, 27(3), 162–171.

Mosqueda, J., Olvera-Ramirez, A., Aguilar-Tipacamu, A., & Canto, G. (2012). Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis. *Current Medicinal Chemistry*, 19(10), 1504–1518. <https://doi.org/10.2174/092986712799828355>

Mtshali, P. S., Tsoetsi, A. M., Thekiso, M. M. O., & Mtshali, M. S. (2014). Nested PCR detection and phylogenetic analysis of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle from peri-urban localities in Gauteng province, South Africa. *Journal of Veterinary Medical Science*, 76(1), 145–150. <https://doi.org/10.1292/jvms.13-0197>

Muñoz, T. (2016). Babesiosis bovina (*Babesia bovis* y *Babesia bigemina*), una enfermedad hematozoárica de importancia económica en el mundo. *Centro de Biotecnología*, 5(1), 21–30.

- Muñoz, T., Obregón, D., Díaz-Sánchez, A., Cabezas-cruz, A., Zamora, L., Martínez, S., & Corona-gonzález, B. (2020). *Epidemiology and genetic diversity of Anaplasma marginale in Zamora-Chinchipe, Ecuador*. (xxxx).
- Muñoz, T. R., Ayora, P., & Jiménez, V. J. (2014). Prevalencia de Anaplasma Marginalis mediante frotis sanguíneos en el cantón Zamora de la provincia de Zamora Chimchipe. *Centro de Biotecnología*, 3(1), 46–53. Retrieved from [https://unl.edu.ec/sites/default/files/investigacion/revistas/2014-12-1/bio\\_art5.pdf](https://unl.edu.ec/sites/default/files/investigacion/revistas/2014-12-1/bio_art5.pdf)
- Nava, S., Mangold, A., Simonato, G., Puntin, E., & Sproat, M. (2019). Guía para la identificación de las principales especies de garrapatas que parasitan a los bovinos en la provincia de Entre Ríos, Argentina. In *INTA EDICIONES* (p. 32).
- Navarrete-Arroyo, K. (2016). *OPTIMIZACIÓN DE UN ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO INDIRECTO (ELISA) PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IGG CONTRA Anaplasma marginale EN EL GANADO BOVINO*.
- Oliveira-sequeira, T. C. G., Oliveira, M. C. S., Jr, J. P. A., & Amarante, A. F. T. (2005). *PCR-based detection of Babesia bovis and Babesia bigemina in their natural host Boophilus microplus and cattle*. 35, 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.09.002>
- Omega Bio-Tek. (2019). *EZNA Tissue DNA Kit Quick Guide*. (March), 1–32.
- Paoletta, M. S., López Arias, L., de la Fournière, S., Guillemi, E. C., Luciani, C., Sarmiento, N. F., ... Wilkowsky, S. E. (2018). Epidemiology of Babesia, Anaplasma and Trypanosoma species using a new expanded reverse line blot hybridization assay. *Ticks and Tick-Borne Diseases*,

9(2), 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.08.011>

Polanco-Echeverry, D., & Ríos-Osorio, L. (2017). *Aspectos Biológicos y ecológicos de las garrapatas duras*. 17(2016), 21930. <https://doi.org/10.21930/rcta.vol17>

Polanco, D., & Rios, L. (2016). Aspectos biológicos y ecológicos de las garrapatas duras Biological and ecological aspects of hard ticks Aspectos biológicos e ecológicos dos carrapatas duras. *Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria, Mosquera (Colombia)*, 17(1), 81–95. [https://doi.org/10.21930/rcta.vol17\\_num1\\_art:463](https://doi.org/10.21930/rcta.vol17_num1_art:463)

Pulido-Herrera, L. A., Rudas-Ll, A., Betancourt, J. J. A. J. J. A., Grant, W. E., Vilchez, S. J., Rudas-Ll., A., ... Vilchez, S. J. (2015). Distribución inusual y potencial de la garrapata común del ganado, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, en zonas tropicales de alta montaña de los Andes colombianos. *Biota Colombiana*, 16(2), 75–95. <https://doi.org/10.21068/BC.V16I2.376>

Quiroz-Castañeda, R. E., Amaro-Estrada, I., & Rodríguez-Camarillo, S. D. (2016). *Anaplasma marginale*: Diversity, Virulence, and Vaccine Landscape through a Genomics Approach. *BioMed Research International*, 2016, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2016/9032085>

Ramiro Muñoz-Guarnizo, T., Ayora-Fernández, P., Luzuriaga-Neira, A., Corona-González, B., & Martínez-Marrero, S. (2017). Prevalence of *Anaplasma marginale* in cattle from Zamora Chinchipe province, Ecuador. *Rev. Salud Anim*, 39(1), 2224–4697. Retrieved from <http://scielo.sld.cu/pdf/ras/v39n1/ras09117.pdf>

Reyna-bello, A. (2014). *Anaplasma marginale*: Logros y Retos. In C. González-Stagnaro, N.

Madrid-Bury, & E. Soto (Eds.), *Logros & Desafíos de la Ganadería Doble Propósito* (Fundación, p. 13). Venezuela.

Reyna-Bello, A., Cloeckert, A., Vizcaino, N., Gonzatti, M. I., Aso, P. M., Dubray, G., & Zygmunt, M. S. (1998). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5 for serological diagnosis of bovine anaplasmosis in Venezuela. *Clin Diagn Lab Immunol*, 5(2), 259–262.

Riera, M., Rojas, M., & Zapata, P. (2010). Protocolo de extracción de DNA por salting-out para pequeños volúmenes de sangre. *Revista de Ciencia y Tecnología*, 14(December), 12–15.

Rodríguez-Vivas, R., Rosado-Aguilar, A., Ojeda-Chi, M. M., Carlos Pérez-Cogollo, L., Trinidad-Martínez, I., & Bolio-González, M. E. (2014). CONTROL INTEGRADO DE GARRAPATAS EN LA GANADERÍA BOVINA. *Ecosistemas y Recursos Pecuarios*, 1(3), 295–308.  
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Rutledge, R. G. (2003). Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Research*, 31(16), 93e – 93. <https://doi.org/10.1093/nar/gng093>

Salazar, A., Sandoval, A., & Armendáriz, J. (2013). Fundamentos y Aplicaciones en las ciencias de la salud. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53).  
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Silva, M. G., Henriques, G., Sánchez, C., Marques, P. X., Suarez, C. E., & Oliva, A. (2009). First survey for *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection in cattle from Central and Southern regions of Portugal using serological and DNA detection methods. *Veterinary*



*Parasitology*, 166(1–2), 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.07.031>

Smith, R. (1978). Ciclo biológico de Babesia en la Garrapata. In *CIENCIA VETERINARIA* (p. 32).

Soto, K. (2010). *DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE ANAPLASMOSIS EN EL GANADO BOVINO FAENADO EN LA EMPRESA METROPOLITANA DE RASTRO DE QUITO (EMRQ) MEDIANTE LA APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO: MICROSCOPIA DE FROTIS SANGUÍNEOS, REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA* .

Strickland, R. K., Gerrish, R. R., Hourrigan, J. L., & Schubert, G. . O. (1978). Ticks of Veterinary Importance. *U.S. Department of Agriculture Handbook*, 485(48), 122 pp.

Suarez, C. E., & Noh, S. (2011). Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. *Veterinary Parasitology*, 180(1–2), 109–125. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.032>

Tana-Hernández, L., Navarrete-Arroyo, K., Ron-Román, J., Reyna-Bello, A., & Chávez-Larrea, M. A. (2017). PCR-diagnosis of *Anaplasma marginale* in cattle populations of Ecuador and its molecular identification through sequencing of ribosomal 16S fragments. *BMC Veterinary Research*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1311-1>

Tavares, L. M., & Reyna-Bello, A. (2006). Estandarización De La Técnica De Pcr Para El Diagnóstico De La Anaplasmosis Bovina Y Ovina. *Agronomía Tropical*, 56(4), 501–512.

Theiler, A. (1910). Gall-sickness of South Africa. (*Anaplasmosis of Cattle.*). *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, 23, 98–115. [https://doi.org/10.1016/s0368-1742\(10\)80028-1](https://doi.org/10.1016/s0368-1742(10)80028-1)

Uilenberg, G. (2006). Babesia-A historical overview. *Veterinary Parasitology*, 138(1–2), 3–10.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.035>

## **Capítulo VIII: Anexos**