



Caracterización molecular y filogenia de aislados de *Babesia* spp. obtenidos de muestras de bovinos y garrapatas en el sector del volcán Ilaló en la provincia de Pichincha

Yugcha Díaz, Erika Michelle

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

Chávez Larrea, María Augusta M.Sc.

27 de enero de 2022



Tesis_Babesiosis_Ilaló_para_copyleaks. 2.docx

Scanned on: 13:38 January 28, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	49
Words with Minor Changes	11
Paraphrased Words	378
Ommited Words	0



Escaneó el resultado con el código QR:
MARIA AUGUSTA
CHAVEZ LARREA



Website | Education | Businesses



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, denominado **“Caracterización molecular y filogenia de aislados de *Babesia* spp. obtenidos de muestras de bovinos y garrapatas en el sector del volcán Ilaló en la provincia de Pichincha”** fue realizado por la señorita **Yugcha Díaz, Erika Michelle**, el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos 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, 27 de enero de 2022



Firmado electrónicamente por:
**MARIA AUGUSTA
CHAVEZ LARREA**

.....
Chávez Larrea, María Augusta Ph. D. (c)

C. C.: 0201274842



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

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

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Yugcha Díaz, Erika Michelle**, con cédula de ciudadanía n° 1722621883, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Caracterización molecular y filogenia de aislados de *Babesia* spp. obtenidos de muestras de bovinos y garrapatas en el sector del volcán Ilaló en la provincia de Pichincha”** 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, 27 de enero de 2022

Yugcha Díaz, Erika Michelle

C.C.: 1722621883



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

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo **Yugcha Díaz, Erika Michelle**, con cédula de ciudadanía n° 1722621883, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Caracterización molecular y filogenia de aislados de *Babesia* spp. obtenidos de muestras de bovinos y garrapatas en el sector del volcán Ilaló en la provincia de Pichincha”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 27 de enero de 2022

Yugcha Díaz, Erika Michelle

C.C.: 1722621883

Dedicatoria

¡GLORIA A DIOS!

Dios de promesas
tu palabra es fiel, tus dichos permanecerán
cuando abres tu boca
la vida y la ciencia, siempre tu voz seguirán.

A mi mamá, Ercelinda.

A mi papá, Julio.

A mis hermanos, Ximena, Viviana y Alex.

A mis sobrinos, Lia, Amy y Gael.

Michelle Yugcha Díaz

Agradecimientos

Quiero empezar agradeciendo a Dios, por cautivar mi espíritu y llenarme de vida, alegría y sabiduría, gracias Señor porque durante este largo camino me has confortado y me has dado fuerza para culminar con éxito mi carrera.

Gracias a la persona que más admiro en todo el mundo, mi mamá, gracias por todo lo que ha hecho y sacrificado para que yo esté cumpliendo esta meta, gracias por inculcar valores en mí, por cada palabra dulce que me ha brindado, su compañía, sus consejos y sus palabras de aliento durante toda mi vida. Recuerde que este y cada uno de los logros que obtenga son de las dos, porque gracias a ti me he convertido en la persona que soy, me has enseñado a ser fuerte, esforzada y valiente. Te amo como a nadie.

A mi papá, gracias por apoyarme durante toda la carrera, por confiar en mí y por hacerme saber lo orgulloso que estás de mí, porque eso me ha motivado para seguir adelante en este proceso y aunque un simple gracias no es suficiente, gracias por todo.

A mis compañeros de vida, Ximena, Viviana, Alex y Milagros, gracias por ser incondicionales en todo momento, por hacerme sentir segura y amada. Cada uno de ustedes me han dado lecciones genuinamente valiosas, de las que he podido aprender, pues con sus vidas han inspirado la mía.

A mis sobrinos, Lia, Amy y Gael, les agradezco por demostrarme su amor de la forma más pura posible, por cada sonrisa y por su compañía.

A mis amigos, a los que estuvieron desde el principio, Alejandro, Stefany, Camila, Alexis y Pablo, gracias por acompañarme durante este camino y por brindarme su amistad, y también a los que conocí después, Víctor, Jennifer, Paúl y Antonella, su amistad ha sido muy especial, gracias por su apoyo.

Al Proyecto de Investigación y Desarrollo por parte de la Academia de Investigación y Enseñanza Superior (ARES) de Bélgica, para el estudio de la Brucelosis y Tripanosomosis bovina (BruTryp) por permitirme realizar mi proyecto de titulación, por el apoyo y el financiamiento. A la Dra. María Augusta Chávez y al Dr. Jorge Ron, gracias por recibirme en el laboratorio, por confiar en mi trabajo y guiarme durante el proceso, admiro su pasión y dedicación en lo que hacen. A la Ing. Cris Cholota, gracias por todas las enseñanzas, por hacer que el tiempo en el laboratorio sea ameno y por su paciencia.

A los dueños de la finca ubicada en el sector del volcán Ilaló, por recibirme, permitir la recolección de las muestras y brindar la información necesaria.

Finalmente, gracias a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, por abrirme las puertas a la carrera de Ingeniería en Biotecnología donde pude aprender las bases para poder formarme como una excelente profesional.

Michelle Yugcha Díaz

Índice de Contenido

Certificación	3
Responsabilidad de autoría.....	4
Autorización.....	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos.....	7
Índice de Contenido.....	9
Lista de Tablas.....	11
Listado de Figuras	12
Listado de Abreviaturas	13
Resumen	14
Abstract.....	15
Capítulo I: Introducción	16
Formulación del Problema	16
Justificación del Problema	17
Objetivos.....	19
Objetivo General	19
Objetivos Específicos.....	19
Hipótesis	19
Capítulo II: Marco Teórico.....	20
Generalidades de Babesiosis Bovina	20
Definición.....	20
Origen	20
Signos y Sintomatología	20
Control y Tratamiento.....	21
<i>Babesia</i> spp.....	22
Clasificación Taxonómica	22
Cepas de Relevancia en Bovinos	23
Ciclo de Vida y Transmisión.....	23
Garrapatas	25
Ciclo de Vida de Garrapatas de un Hospedador.....	26
Garrapatas Vectoras de <i>Babesia</i>	26
Impacto de Garrapatas y Hemotrópicos en Producción Ganadera	26
Diagnóstico	28

	10
Entomología.....	28
Pruebas Parasitológicas	28
Pruebas Serológicas	29
Técnicas Moleculares.....	29
Análisis Filogenético.....	31
Capítulo III: Materiales y Métodos.....	33
Trabajo de Campo.....	33
Zona de Estudio	33
Obtención de Muestras Sanguíneas de Bovinos	33
Recolección de Garrapatas	33
Trabajo de Laboratorio	34
Procesamiento de Muestras Sanguíneas y Muestras de Garrapatas	34
Identificación de <i>Babesia</i> spp. Mediante PCR-RFLP	38
Identificación molecular del género de garrapatas.....	41
Análisis estadístico de las variables.....	42
Análisis Filogenético de <i>Babesia</i> spp.	43
Capítulo IV: Resultados	44
Identificación Morfológica y Molecular de Garrapatas.....	44
Análisis Molecular de <i>Babesia</i> en Bovinos	47
Distribución de variables: sexo, rango de edad, raza, temperatura, PT y PCV.	50
Filogenética de Aislados de <i>Babesia</i> spp.....	52
Capítulo V: Discusión	54
Capítulo VI: Conclusiones.....	58
Capítulo VII: Recomendaciones	59
Capítulo VIII: Bibliografía	60
Capítulo IX: Anexos	69

Lista de Tablas

Tabla 1.	Clasificación taxonómica de <i>Babesia</i>	23
Tabla 2.	Componentes de la mezcla de reacción de PCR para el género <i>Babesia</i>	38
Tabla 3.	Condiciones de amplificación por PCR para el género <i>Babesia</i>	39
Tabla 4.	Componentes de la mezcla de reacción de PCR para el género <i>Rhipicephalus</i>	41
Tabla 5.	Condiciones de amplificación por PCR para el género <i>Rhipicephalus</i>	42
Tabla 6.	Distribución de muestras según el sexo, rango de edad y raza.	50
Tabla 7.	Medidas de tendencia central de las variables: temperatura, PT y PCV.....	51

Listado de Figuras

Figura 1.	Representación esquemática del ciclo vital simplificado de los parásitos de <i>Babesia</i>	25
Figura 2.	Vista dorsal y ventral de garrapatas <i>Rhipicephalus microplus</i> adultas.	44
Figura 3.	Características morfológicas de garrapatas <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	46
Figura 4.	Amplificación del gen ITS2 del género de garrapata <i>Rhipicephalus</i>	46
Figura 5.	Representación de la presencia de <i>Babesia</i> en el sector del volcán Ilaló.	47
Figura 6.	Visualización de integridad de ADN obtenido de sangre bovina.	48
Figura 7.	Amplificación del gen 18S rRNA del género <i>Babesia</i>	48
Figura 8.	Digestión RFLP con enzimas de restricción HpaI y AluI.	49
Figura 9.	Árbol de máxima verosimilitud basado en los genes 18S rRNA de los aislados de <i>B. bigemina</i> y <i>B. bovis</i>	53

Listado de Abreviaturas

DA	Aceturato de diminazeno
dNTP	Desoxirribonucleótidos-trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzimas
G	Distribución Gamma
ICT	Prueba de inmocromatografía
IFAT	Prueba de inmunofluorescencia indirecta
LAMP	Amplificación isotérmica mediada por bucle
Pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PT	Proteínas totales
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
rRNA	ARN ribosomal
rtPCR	PCR en tiempo real
SD	Desviación estándar
T92	Modelo de 3 parámetros de Tamura
TA	Temperatura ambiente

Resumen

La babesiosis bovina es una enfermedad causada por parásitos del género *Babesia* y transmitida por garrapatas, se caracteriza por la lisis eritrocitaria que causa un gran impacto económico y social en la industria ganadera debido a la disminución de la producción de carne y leche, la muerte del animal, incremento de aborto y esterilidad, y costos de prevención y tratamiento. Esta enfermedad está causada principalmente por *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, sin embargo, en el año 2020 se realizó un muestreo en una finca ubicada en la estribación del volcán Ilaló a una altitud de 2469 m.s.n.m. debido a una sospecha de babesiosis bovina, para lo cual se realizó un análisis molecular de las muestras de sangre bovina y garrapatas (identificadas morfológicamente y molecularmente como *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) ejecutando la técnica PCR-RFLP. En sangre bovina se determinó *Babesia* spp. en 18.88 % (27/143) por PCR convencional del gen 18S rRNA y con las enzimas de restricción HpaII y AluI, se identificó dos especies, *B. bovis* (13.29%) y *B. bigemina* (5.59 %), respectivamente. Finalmente, se secuenció las muestras positivas a *Babesia* spp. y se construyó un árbol filogenético con el método de máxima verosimilitud en el que se determinó que *B. bigemina* el sector del volcán Ilaló se encontraba más emparentada con varios aislados de América y *B. bovis* con aislados de Brasil. Este estudio permitió identificar la presencia de *Babesia* spp. en la zona del Volcán Ilaló en la Sierra ecuatoriana y analizar su parentesco filogenético con secuencias de aislados de América y otros continentes.

Palabras clave:

- **BABESIOSIS BOVINA**
- **PCR-RFLP**
- **FILOGENIA**
- **VOLCÁN ILALÓ**

Abstract

Bovine babesiosis is a tick-borne disease caused by parasites of the genus *Babesia*, characterized by erythrocyte lysis that causes a great economic and social impact on the cattle industry due to animal death, increased abortion and sterility rates, decreased meat and milk production, and prevention and treatment costs. This disease is mainly caused by *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in tropical and subtropical regions around the world, however, in 2020 a sampling was performed in the farm located in the foothills of the Ilaló volcano at an altitude of 2469 m.a.s.l. due to a suspicion of bovine babesiosis, for this purpose, a molecular analysis of bovine blood samples and ticks (morphologically and molecularly identified as *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) was performed using the PCR-RFLP technique. In bovine blood, *Babesia* spp. were determined in 18.88 % (27/143) by conventional PCR of the 18S rRNA gene and with the restriction enzymes HpaII and AluI, two species were identified, *B. bovis* (13.29%) and *B. bigemina* (5.59 %), respectively. Finally, *Babesia* spp. positive samples were sequenced and a phylogenetic tree was constructed using the maximum likelihood method in which it was determined that *B. bigemina* in the Ilaló volcano sector was more closely related to several isolates from America and *B. bovis* to isolates from Brazil. This study made it possible to identify the presence of *Babesia* spp. in the area of the Ilaló Volcano in the Ecuadorian Sierra and to analyze its phylogenetic similarity with sequences of isolates from America and other continents.

Key words:

- **BOVINE BABESIOSIS**
- **RFLP-PCR**
- **PHYLOGENY**
- **ILALÓ VOLCANO**

Capítulo I: Introducción

Formulación del Problema

La babesiosis es una enfermedad causada por hemoparásitos protozoarios del género *Babesia* transmitidos por garrapatas a una gran variedad de huéspedes vertebrados, causando un considerable impacto económico, veterinario y médico en todo el mundo. Con la distribución mundial de la garrapata ixódida, la babesiosis se ha convertido en la segunda enfermedad más común transmitida por la sangre de los animales en libertad (Hunfeld et al., 2008; Schnittger et al., 2012).

En la literatura actual se describe a *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Babesia divergens* como las especies más representativas y comunes que infectan al ganado bovino. Tanto *B. bovis* como *B. bigemina* se transmiten con mayor frecuencia entre el ganado por las garrapatas vectoras *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y *Rhipicephalus annulatus* (*Rhipicephalus decoloratus* en el caso de *B. bigemina*) y se encuentran principalmente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, incluyendo Australia, África, Asia y América. Por otro lado, *B. divergens* se transmite casi exclusivamente por *Ixodes ricinus* y está localizada en el norte de Europa (Bock et al., 2004; Chauvin et al., 2009; Zintl et al., 2003).

A nivel regional, en los últimos años se ha reportado babesiosis bovina en países como Colombia con una prevalencia del 31,6 % (24,2 % para *B. bigemina* y 14,4 % para *B. bovis*) en bovinos y 4,3 % (3,5 % para *B. bigemina* y 1.0 % para *B. bovis*) en *R. microplus* (Jaimes-Dueñez et al., 2018); en Argentina se detectó *B. bovis* con 27,3 % y *B. bigemina* con 54,7 % de prevalencia (Morel et al., 2019) y en Brasil, Vieira y colaboradores (2019) reportaron una prevalencias *B. bigemina* del 16 % y *B. bovis* del 29 %.

En el Ecuador la prevalencia de *Babesia* en el ganado bovino varía entre regiones, Arboleda (2019) reportó la presencia de *Babesia* spp. en 64,35 % (12,50 % *B. bovis* y 87,50 % *B. bigemina*) en la provincia de Manabí ubicada en la región Costa. En la provincia de Pastaza situada en la

Amazonía, Medina y colaboradores (2017) reportaron 0 % de *Babesia* spp., mientras que, en la Isla Santa Cruz de la región Insular, Jumbo (2018) reportó 25,88 % de prevalencia para *Babesia* spp., todos mediante PCR.

En un estudio realizado para la identificación de *Babesia* spp. en garrapatas en el Ecuador, Maya-Delgado y colaboradores (2020) reportaron que todas las garrapatas analizadas en un estudio en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas resultaron negativas para el género *Babesia* mientras que, en la provincia del Carchi, se identificó una muestra positiva (0,9 %) para *Babesia* sp. en una muestra de *R. microplus*. Además, Vasco (2013), analizó garrapatas *R. microplus* procedentes de ocho provincias de Ecuador y encontró que 43 % presentaban infección por *Babesia* spp., identificando *B. bovis*, *B. bigemina* y coinfección por ambas especies.

Justificación del Problema

Después de más de un siglo desde el primer informe de babesiosis publicado por Babes (1888), las opciones de tratamiento y prevención para esta enfermedad siguen siendo limitadas. La raza, la edad del ganado, la distribución de las garrapatas y el concepto de estabilidad enzoótica son factores clave para controlar con éxito la babesiosis bovina en todo el mundo (Mosqueda et al., 2012; Suarez & Noh, 2011).

Esta enfermedad genera pérdidas económicas en el sector ganadero como consecuencia directa de la infección por *Babesia* spp. que puede provocar la muerte del animal, el aumento de la tasa de abortos y la esterilidad, la reducción de la producción de leche y carne y el costo de la prevención y los tratamientos (Bock et al., 2004).

La industria ganadera se ve especialmente afectada por este parásito, puesto que más de la mitad de los 1 200 millones de bovinos del mundo corren el riesgo de infectarse y enfermar, registrando pérdidas entre 2 000 a 3 000 millones de dólares a nivel mundial por babesiosis (Bock et al., 2004; Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2013).

Un estudio demostró que el 62 % de las pérdidas económicas ocasionadas por *Babesia* spp. están relacionadas con la muerte del ganado y el tratamiento de los animales enfermos, y que el 38 % restante de las pérdidas corresponde a los costes derivados del control de la enfermedad, incluida la contratación de veterinarios, la administración de medicamentos al ganado y las pruebas de diagnóstico auxiliares (Guglielmone et al., 1992). Además, dentro del estudio de babesiosis es importante localizar y controlar la distribución de las garrapatas vectoras de la enfermedad, ya que la presencia de estas ocasiona de igual forma gran impacto a nivel económico (Monteiro et al., 2014).

Sin embargo, es probable que una estimación económica local o global no sea acertada debido a que la información relacionada al coste de las pérdidas causadas por la disminución de la productividad o a la presencia de garrapatas del ganado no suele estar actualizada ni disponible.

En el país no existe suficiente información sobre las pérdidas económicas específicas por babesiosis bovina que permita conocer la situación real de esta enfermedad (Vasco, 2013). La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) ha clasificado a la babesiosis bovina como una enfermedad de declaración obligatoria y de vigilancia general, debido al impacto económico que causa a los productores de todo el mundo (Organización Mundial de Sanidad Animal [OIE], 2016).

Por lo tanto, es necesario implementar un programa para controlar la enfermedad en el país y este debería estar respaldado por un método más sensible que proporcione datos fiables para evitar pérdidas económicas a los productores locales.

En este estudio se pretende enriquecer la información sobre la distribución actual de la babesiosis bovina y la distribución del vector garrapata en la provincia de Pichincha en el Ecuador, con el uso de técnicas moleculares basadas en el ácido desoxirribonucleico (ADN), reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación, para determinar la presencia de *Babesia* spp. en el sector del volcán Ilaló y su parentesco con otros aislados.

Objetivos

Objetivo General

Caracterizar por técnicas moleculares y filogenia aislados de *Babesia* spp. obtenidos de muestras de bovinos y garrapatas en el sector del volcán Ilaló en la provincia de Pichincha.

Objetivos Específicos

- Identificar por medio de claves entomológicas la especie de garrapata presente en los bovinos del sector del volcán Ilaló.
- Determinar la presencia de *Babesia* spp. mediante la amplificación por PCR del gen 18S rRNA de los aislados de ADN de sangre bovina y de garrapatas.
- Analizar filogenéticamente los fragmentos genómicos de los aislados de *Babesia* spp. obtenidos de bovinos y garrapatas.

Hipótesis

El análisis molecular y filogenético de muestras de bovinos y garrapatas caracteriza las especies de *Babesia* circulantes en el sector del volcán Ilaló.

Capítulo II: Marco Teórico

Generalidades de Babesiosis Bovina

Definición

La babesiosis bovina es una enfermedad del ganado vacuno transmitida por garrapatas y causada por parásitos protozoarios del género *Babesia* que invaden y destruyen los eritrocitos del hospedero. Esta infección puede causar fiebre, anorexia, ictericia, hemoglobinuria y una elevada morbilidad que provoca graves pérdidas económicas (Bock et al., 2004).

Origen

A finales del siglo XIX el biólogo Victor Babes reportó por primera vez babesiosis al descubrir microorganismos en los eritrocitos del ganado vacuno en Rumanía y los asoció a la hemoglobinuria bovina o fiebre del agua roja (Babes, 1888). Años más tarde, Smith y Kilborne (1893) relacionaron al agente de la fiebre de Texas en el ganado vacuno de Estados Unidos con *Babesia*, y demostraron que lo transmitía una garrapata.

Signos y Sintomatología

Los distintos grados de gravedad en las infecciones por *Babesia* se pueden asociar a la edad del huésped, su estado inmunológico, las infecciones con otros patógenos y factores genéticos (Schnittger et al., 2012).

Durante las infecciones agudas los huéspedes pueden presentar fiebre, anemia, hemoglobinuria, ictericia, malestar, letargo y anorexia, mientras que el estado crónico suele ser asintomático (Schnittger et al., 2012).

Sin embargo, la etiología de la enfermedad varía según la especie infectante, por ejemplo, los casos clínicos de *B. bovis* producen signos como hipotensión, síntomas neurológicos y síndrome de estrés respiratorio, debido a la acumulación de eritrocitos infectados en los capilares pulmonares y cerebrales, en consecuencia, las infecciones por *B. bovis* suelen mostrar niveles bajos de

parasitemia. Mientras que, las infecciones por *B. bigemina* se asocia principalmente a la destrucción masiva de eritrocitos, lo que causa anemia grave (Bock et al., 2004).

Estos signos en bovinos causan mortalidad, aborto, disminución de la producción de carne y leche, que tienen como efecto pérdidas de producción potencial y restricciones al comercio de ganado (Schnittger et al., 2012).

Control y Tratamiento

La falta de comprensión general del complejo mecanismo por el que se produce la inmunidad a la infección por *Babesia* retarda el desarrollo de nuevas terapias. En la actualidad, el control y la prevención de la babesiosis bovina clínica se basa en el uso de fármacos antibabesia, vacunas o la combinación de ambos (Suarez & Noh, 2011).

Control del Vector. La vacunación del ganado con antígenos internos y "ocultos" de las garrapatas demostró hace tiempo la capacidad de reducir el número total, el peso y la capacidad reproductiva de las garrapatas. El desarrollo de estos antígenos dio lugar a la liberación de dos vacunas recombinantes, casi simultáneamente en la década de 1990, en Australia (TickGARD) y Cuba (Gavac™), dirigidas contra la garrapata del ganado, *R. microplus*. La eficacia de ambas vacunas disponibles en el mercado fue sustancialmente variable y solo Gavac™ sigue produciéndose para los ganaderos, principalmente en América (Gohil et al., 2013).

Agentes Quimioterapéuticos Contra *Babesia*. El éxito del tratamiento de babesiosis bovina depende del diagnóstico precoz, seguido de la rápida administración de fármacos quimioterapéuticos. Actualmente, los agentes antiprotozoarios, el aceturato de diminazeno (DA) y el dipropionato de imidocarb, son los únicos tratamientos disponibles para la babesiosis bovina, siendo el dipropionato de imidocarb el principal babesicida durante las últimas dos décadas (Mosqueda et al., 2012).

Sin embargo, el uso continuado o inadecuado de los fármacos puede provocar resistencia a estos y tienen el riesgo de generar residuos químicos en la carne y la leche con potenciales efectos tóxicos, por lo que los investigadores necesitan desarrollar nuevos fármacos alternativos eficaces y asequibles con baja toxicidad (Suarez et al., 2019).

Vacunación. La elaboración de vacunas contra la babesiosis bovina se consideran una prioridad de investigación y un reto, debido a la complejidad de la biología de *Babesia* y la naturaleza precisa de las respuestas inmunitarias en la infección (Gohil et al., 2013).

El único método disponible para prevenir la babesiosis bovina aguda es el uso de vacunas vivas atenuadas, estas consisten en cepas atenuadas del parásito que se derivan de cepas virulentas que han sido sometidas a una serie de pases rápidos en terneros (Gallego-López et al., 2019). Sin embargo, tienen una serie de limitaciones, como la corta vida útil, la necesidad de una cadena de frío, la posible contaminación con otros agentes infecciosos y la aparición de brotes de la enfermedad con cepas heterólogas que son genéticamente distintas de la cepa de la vacuna (Suarez et al., 2019).

***Babesia* spp.**

Clasificación Taxonómica

A continuación, en la Tabla 1, se describe la clasificación taxonómica del género *Babesia* (Bock, et al., 2004).

Tabla 1.*Clasificación taxonómica de Babesia*

Reino	Protista
Filo	Apicomplexa
Clase	Sporozasida
Orden	Eucoccidiorida
Suborden	Piroplasmorina
Familia	Babesiidae
Género	<i>Babesia</i>

Cepas de Relevancia en Bovinos

Las especies comunes de *Babesia* que infectan al ganado son *B. bovis*, *B. bigemina* y *B. divergens*. Las infecciones causadas por *B. bovis* están asociados con una enfermedad más grave y una mayor mortalidad, y se consideran el agente más virulento de la babesiosis bovina. La enfermedad causada por *B. bovis* y *B. bigemina* puede controlarse, al menos en parte, utilizando agentes terapéuticos o vacunas. Además, la babesiosis causada por *B. divergens* tiene un importante potencial zoonótico (Suarez et al., 2019).

Ciclo de Vida y Transmisión

Babesia spp. son parásitos intracelulares de gran éxito, que adquirieron mecanismos de supervivencia muy sofisticados, lo que los ha llevado a desarrollado un ciclo de vida complejo en el que participan garrapatas como huéspedes definitivos y vertebrados como huéspedes intermedios (Suarez et al., 2019).

Desarrollo en el Hospedero Vertebrado. Cuando la garrapata pica, inyecta esporozoitos de *Babesia* junto con su saliva, de esta forma es como se infectan los hospederos vertebrados. Estos esporozoitos penetran en los eritrocitos donde por fisión binaria producen dos merozoitos, luego

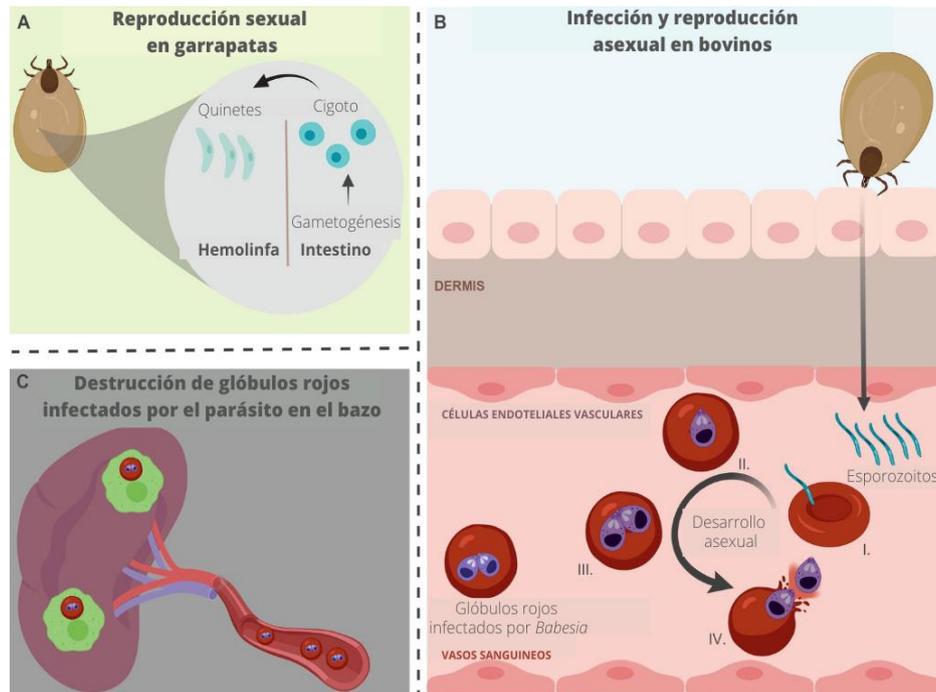
cada uno de estos invade un nuevo glóbulo rojo y se producen merogonias sucesivas (Figura 1, b). Además, se conoce que la multiplicación es asíncrona, es decir, se puede observar diferentes estadios del parásito al mismo tiempo en el torrente sanguíneo (Chauvin et al., 2009).

Desarrollo en el Vector. Las garrapatas al alimentarse pueden ingerir eritrocitos infectados por *Babesia*, los cuales son transmitidos a los siguientes estados de maduración (transmisión transestadial). Dentro de la garrapata solo sobreviven los parásitos en estadio pregametocito, los cuales se desarrollan a gametocitos y luego gamontes, estos en el lumen del tracto digestivo se fusionan para dar lugar a un cigoto alargado que es internalizado por el intestino medio donde se transforma en ooquineto (estadio móvil) (Chauvin et al., 2009; Polanco & Ríos, 2016).

El ooquineto abandona el epitelio del intestino medio y se distribuye en los tejidos del cuerpo de la garrapata, incluyendo los ovarios de las garrapatas hembra dando lugar a huevos infectados (transmisión transovarial). El desarrollo posterior de la *Babesia* incluye la multiplicación asexual, la esporogonia continua y el desarrollo de numerosos quinetes (Figura 1, a), algunos de estos también invaden las glándulas salivales de las garrapatas, donde un último ciclo de desarrollo produce los esporozoitos, que son la fase infecciosa del parásito (Chauvin et al., 2009).

Figura 1.

Representación esquemática del ciclo vital simplificado de los parásitos de *Babesia*



Nota. (A) Representación del ciclo vital de los parásitos de *Babesia* en una garrapata hembra adulta tras ingerir sangre de un animal infectado. (B) Representación de la infección por *Babesia* y la reproducción asexual en el huésped bovino. (C) Representación de la destrucción mediada por macrófagos de los glóbulos rojos infectados por *Babesia* en el torrente sanguíneo. Adaptado de Unravelling the cellular and molecular pathogenesis of bovine babesiosis: is the sky the limit? (p. 188), por Suarez et al., 2019, International Journal for Parasitology, 2(49).

Garrapatas

Las garrapatas duras de la Familia Ixodidae son ectoparásitos hematófagos, necesitan de sangre para alimentarse durante casi todo su ciclo de vida. Son artrópodos, por lo tanto, se caracterizan por la presencia de cuatro pares de patas en el estadio adulto y porque su cuerpo consta de la región cefalotorácica y la región abdominal (Guglielmone et al., 2003).

Son consideradas como unos de los factores sanitarios más importantes debido a que tanto en las zonas tropicales como subtropicales se encuentran limitando la ganadería, como resultado de esto el 80% de la población bovina mundial se ve afectada (Polanco & Ríos, 2016).

Ciclo de Vida de Garrapatas de un Hospedador

El ciclo de vida de las garrapatas comienza con la eclosión del huevo, del cual emerge la larva que tras una semana busca a un hospedador para alimentarse. Los siguientes estadios de desarrollo móvil (ninfa y adulto) se dan sobre el mismo hospedero, en el cual mudan y se alimentan, de modo que la garrapata no abandona al hospedero desde el estadio larva que es cuando se ancla a este hasta el estadio adulto donde la hembra grávida y repleta de sangre se desprender para regresar al suelo para la ovoposición (Polanco & Ríos, 2016).

Garrapatas Vectoras de Babesia

Pueden distinguirse dos grupos de garrapatas en relación con su preferencia de alimentación: la mayoría de las garrapatas, como *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, vector de *B. bigemina* y *B. bovis* (que se alimentan de bovinos y otros rumiantes) son específicas del hospedador. Mientras que una minoría, que incluye a *Ixodes ricinus*, vector de *B. divergens*, *B. venatorum* y probablemente *B. capreoli*, son parásitos oportunistas o generalistas, relativamente poco selectivos y utilizan una amplia gama de vertebrados como huéspedes (Chauvin et al., 2009).

Impacto de Garrapatas y Hemotrópicos en Producción Ganadera

Las garrapatas son el ectoparásito más económicamente importante del ganado en regiones tropicales y subtropicales del mundo, ya que aun, sin actuar como vectores de enfermedades, las garrapatas pueden ser perjudiciales para el ganado y de gran importancia económica en la producción ganadera simplemente por sus efectos directos, estos dependen mucho de las circunstancias, de las especies de garrapatas implicadas, de las condiciones climáticas locales y, especialmente de la susceptibilidad a la infestación por garrapatas del ganado de la región (Jongejan & Uilenberg, 2004).

Cuando las garrapatas actúan como vectoras eficientes de agentes patógenos de enfermedades el riesgo del ganado y las pérdidas económicas incrementan, el impacto económico

está estrechamente ligado a la epidemiología de la enfermedad y puede distribuirse en pérdidas directas e indirectas para los productores de ganado bovino (Abubakar & Perera, 2019).

Los hemotrópicos son microorganismos de interés veterinario en Latinoamérica, estos son anaplasmosis ocasionada por *Anaplasma marginale*, tripanosomosis por *Trypanosoma vivax* y babesiosis por *B. bovis* y *B. bigemina*. Estos hemotrópicos comparten características tanto desde el punto de vista biológico, todos muestran tropismo por la sangre de bovinos, como desde el punto de vista clínica, originan enfermedades caracterizadas por fiebre y descenso en los valores del hematocrito (Reyna-Bello, 2014).

Los signos y síntomas clínicos de las tres enfermedades son similares, causando fiebre, letargo, anorexia, anemia severa, incremento en la frecuencia respiratoria y cardiaca, y por lo tanto, una disminución evidente de la productividad, medida por la producción de leche y/o la tasa de aumento de peso (Gonzatti et al., 2014).

En cuanto a babesiosis bovina, según los datos reportados por la OIE (2016) esta se encontraba ausente en Ecuador, mientras que, todos los países vecinos presentaban la enfermedad. Sin embargo, en los últimos años en el país se han realizado varios estudios de prevalencia de la enfermedad obteniendo resultados muy variables y van desde el 0 al 71 % en diferentes provincias (Medina et al., 2017; León, 2017). Los métodos diagnósticos utilizados fueron frotis sanguíneo, tinción de Giemsa, ensayos ELISA y PCR, además el número de animales muestreados fue variable.

En el Ecuador, en la Resolución DAJ-2013461-0201.0214 de la Agencia de Control y Regulación Fito y Zoosanitario (AGROCALIDAD, 2013) si hay una sospecha de la presencia de babesiosis bovina en los animales debe notificar a la autoridad competente para que esta aplique las medidas sanitarias correspondientes.

Diagnóstico

Entomología

Como herramientas de diagnóstico, se puede emplear claves digitales, guías ilustradas, sitios web y software entomológicos que contienen información especializada de organismos. Las claves entomológicas están basadas en la morfología externa o la apariencia de insectos y artrópodos, como las garrapatas, se busca una característica dentro de un taxón para segregar a un individuo, de modo que si se amplía lo suficiente este proceso puede conducir a la determinación a nivel de especie. La mayoría de las claves para la identificación de garrapatas requieren de microscopía electrónica de barrido o bien de un estereomicroscopio, debido a que muchas características solo son visibles mediante estos equipos (Dubie et al., 2017).

Las garrapatas tienen un cuerpo redondeado y sin segmentación, su característica principal es la presencia de una gran placa esclerotizada en la superficie dorsal, el escudo, del que reciben su calificativo de “garrapatas duras”. Para la diferenciación entre especies se hace uso de claves entomológicas (Estrada, 2015).

Pruebas Parasitológicas

El examen microscópico de frotis de sangre es el método tradicional para la identificación del parásito *Babesia*, su sensibilidad es tal, que es capaz de detectar parasitemias tan bajas como un parásito por 10^6 glóbulos rojos. Esta técnica no se considera adecuada para la detección de portadores ya que las parasitemias son en su mayoría muy bajas (OIE, 2014).

Microscópicamente, la especie de *Babesia* involucrada puede determinarse morfológicamente, pero se requiere experiencia, especialmente en infecciones por *B. bovis* en las que hay pocos organismos presentes. *B. bovis* es pequeño ($\sim 1-1.5 \times 0.5-1 \mu\text{m}$), con los parásitos en forma de pares formando un ángulo obtuso entre sí, mientras que *B. bigemina* es más grande (3-3.5

× 1–1.5 µm), con parásitos pareados en un ángulo agudo entre sí, también se ven comúnmente formas únicas de ambos parásitos (Carter & Rolls, 2016).

Pruebas Serológicas

La prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFAT) se ha utilizado para detectar anticuerpos frente a *Babesia* spp., aunque presenta especificidad baja en *B. bigemina* cuando también está presente *B. bovis* debido a las reacciones cruzadas, además esta prueba tiene la desventaja del manejo de pocas muestras y la subjetividad. También, se utilizan pruebas como el ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), validada internacionalmente para el diagnóstico de infección por *B. bovis*, pero no existe aún un ensayo ELISA validado para *B. bigemina* (OIE, 2014).

La prueba de inmocromatografía (ICT) es un inmunoensayo basado en membranas de nitrocelulosa que no requiere ningún instrumento, es rápido y sensible. Se describió un ICT para detectar anticuerpos contra *B. bovis* y *B. bigemina* en muestras de suero de ganado infectado, las tasas de concordancia de esta prueba para detectar anticuerpos contra *B. bovis* fueron 92,3% y 90,3% en comparación con los ensayos ELISA e IFAT, respectivamente; mientras que las tasas de concordancia para detectar anticuerpos contra *B. bigemina* para ambos ensayos fue del 96,8% y 92,5%, respectivamente, y no se informó de detección de reactividad cruzada de anticuerpos (Guswanto et al., 2017).

Técnicas Moleculares

Las infecciones por *Babesia*, en ocasiones son difíciles de detectar por el bajo número de parásitos en la sangre periférica, por lo tanto, se han desarrollado métodos moleculares que presentan grandes ventajas como los altos índices de sensibilidad y especificidad analítica.

Una de estas técnicas moleculares más utilizada es la PCR, que amplificar millones de copias a partir de un único fragmento de ADN. Para la identificación de *Babesia* se ha utilizado diferentes tipos de PCR, uno de los primeros ensayos con PCR convencional fue el desarrollado para la

detección de *B. bigemina*, donde los ensayos de sensibilidad analítica mostraron una detección de 100 fg de ADN genómico del parásito, equivalente al 0,0000001% de los eritrocitos infectados. De igual forma, se demostró la detección de bovinos portadores infectados por *B. bovis* mediante amplificación por PCR convencional, donde la sensibilidad fue de un eritrocito infectado por cada 0,5 mL de sangre; ambos estudios sugieren que los ensayos de PCR específicos son aplicables para la detección de cepas de parásitos de diferentes regiones geográficas (Fahrimal et al., 1992; Figueroa et al., 1992).

Otro tipo de PCR utilizado fue una prueba multiplex para un análisis simultáneo, donde se encontró que la sensibilidad analítica fue de 0,00001%, 0,00001%, 0,0001%, para *B. bigemina*, *B. bovis* y *A. marginale*, respectivamente (Figueroa et al., 1993). También se ha utilizado la técnica PCR-RFLP para la detección *Babesia* sp. en garrapatas *Rhipicephalus microplus* y se ha logrado diferenciar *B. bovis* y *B. bigemina* con el uso de las enzimas de restricción MspI y BoxI, respectivamente, esta técnica presenta varias ventajas importantes como el bajo costo, la falta de necesidad de instrumentos avanzados y el diseño de los análisis de PCR-RFLP suele ser fácil, mientras que las desventajas incluyen el requerimiento de endonucleasas específicas, las dificultades para identificar la variación exacta en el caso de que varios polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) afecten al mismo sitio de reconocimiento de la enzima de restricción y requiere relativamente mucho tiempo ya que incluye un paso de separación electroforética (Berg, 2012; Figueroa et al., 2014).

Actualmente, también se ha utilizado ensayos de PCR anidado (PCRn) para la detección de *B. bovis* y *B. bigemina* no sólo en el ganado vacuno (*Bos taurus*), sino también en los búfalos de agua (*Bubalus bubalis*), donde ambos tipos de animales han sido detectados como portadores asintomáticos (Jaimes-Dueñez et al., 2018). Además, mediante PCR en tiempo real (rtPCR), se ha detectado la infección por *Babesia* en muestras de sangre a concentraciones 1000 veces menores en comparación con los ensayos PCR convencionales, frente al que presenta varias ventajas como son la visualización sin análisis de electroforesis en gel, el rendimiento rápido, la amplificación

automatizada cerrada, el bajo riesgo de contaminación cruzada y los resultados cuantitativos (Alvarez et al., 2019; Zhang et al., 2016).

Otra técnica molecular aplicable a *Babesia* es la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), este ensayo permite la detección y discrimina entre las especies de *B. bovis* y *B. bigemina*. Se ha podido detectar *B. bovis* y *B. bigemina* con una sensibilidad analítica de 0,1 pg de ADN para los ensayos de ambas especies (Liu et al., 2012). Además, se ha hallado simultáneamente dos especies mediante un ensayo multiplex (mLAMP), con una sensibilidad de 10^3 y 10^5 veces mayor para *B. bovis* y *B. bigemina*, respectivamente, en comparación con la PCR convencional (Iseki et al., 2007). Entre las mejoras incluidas en este método, cabe destacar que se ha evitado el proceso de electroforesis en gel para la visualización de los productos LAMP, ya que se ha aplicado el formato de prueba cromatográfica de flujo lateral (LAMP-LFP) para revelar los productos de una forma más sencilla y rápida. Este ensayo puede utilizarse para el cribado de un gran número de muestras en el campo, presentándose como una herramienta prometedora para el diagnóstico molecular de la babesiosis bovina (Yang et al., 2016).

Análisis Filogenético

El análisis filogenético se ha convertido en una herramienta importante en toda la biología para comparar información sobre genes, individuos, poblaciones y especies. En la región ha permitido la identificación de varias cepas, en Colombia se identificaron y analizaron un total de 10 (MH194385-MH194394) secuencias diferentes de *B. bigemina* procedentes de 4 bovinos, 5 búfalos y 1 grupo de garrapatas (*R. microplus*), y 13 (MH194395-MH194407) secuencias de *B. bovis* procedentes de 8 bovinos y 5 búfalos, la relación filogenética de los aislados se analizó utilizando el gen 18S rRNA donde se determinó que tanto en *B. bigemina* como en *B. bovis* hubo una alta proximidad de los aislados colombianos a los aislados mundiales derivados de diferentes hospederos (Jaimes-Dueñez et al., 2018).

En México, se hizo un estudio de identificación de las especies bovinas de *Babesia* y *Theileria* mediante la secuenciación de amplicones de 18S rRNA, donde se obtuvo información sobre la variación de las cepas de estos patógenos, se encontró que los grupos de especies de *B. bovis* y *B. bigemina* estaban claramente definidos, que existe cierta variación de la secuencia del gen 18S rRNA dentro de cada especie y que puede ser posible separar estos grupos de especies aún más en grupos de cepas mediante la secuenciación de genes diana adicionales o el uso de enfoques alternativos como AFLP o microsatélites (Scoles et al., 2021).

Las secuencias generadas en estos estudios se encuentran dentro de la base de datos GenBank para enriquecer la información mundial y regional relacionada al género *Babesia*.

El análisis filogenético es una herramienta moderna que junto con técnicas moléculas ha ayudado a reclasificar las especies de *Babesia* de una manera más completa y ha revelado grandes inconsistencias en la asignación de género de algunas variantes genéticas de *Babesia*, como *Babesia gibsoni* y *Babesia microti*, especies que no siempre encajan en el clado de *Babesia (sensu stricto)*, esto se debe a que la clasificación inicial se basó en observaciones morfológicas, ciclo de vida y ciertas características fenotípicas generales que llevaron a la asignación inexacta de muchos parásitos a un género en particular (Allsopp & Allsopp, 2006; Lack et al., 2012).

Capítulo III: Materiales y Métodos

Trabajo de Campo

Zona de Estudio

Una finca ganadera en el sector de Lumbisí en la estribación del volcán Ilaló ubicada a 2469 m, fue identificada para este estudio, debido a que tuvo como antecedente la presencia de bovinos con infestaciones de garrapatas y surgió la sospecha de un brote de *Babesia*. Por lo tanto, se procedió a la recolección y análisis de muestras para determinar la presencia de *Babesia* spp.

Obtención de Muestras Sanguíneas de Bovinos

La extracción de sangre periférica se realizó mediante el método de venopunción en la vena coccígea de bovinos de la finca, en un total de 143 animales. Se levantó la cola verticalmente, se insertó una aguja estéril (Precision Glide 0.8x25mm, BD Vacutainer®) con capuchón unos pocos milímetros previa desinfección y se recolectó la sangre en dos tubos al vacío, tubos tapa roja sin anticoagulante (Serum 16x100mm, BD Vacutainer®) y tubos tapa lila con anticoagulante (K2 EDTA 13x75mm, BD Vacutainer®). Las muestras fueron transportadas al laboratorio en una caja térmica con bolsas de gel refrigerante para mantener la integridad de las mismas.

Adicionalmente se registró la información de cada animal como: edad, sexo, raza y temperatura rectal medida con termómetro digital (C&F, MedicLife, China). La temperatura normal se encuentra entre 37.8° y 39.2°C (Rockett & Bosted, 2015).

Recolección de Garrapatas

Se identificaron las garrapatas en estadio ninfa y adulto adheridas a la piel de los bovinos y se procedió a la recolección de estas teniendo en cuenta extraerlas completamente, evitando que el hipostoma se desprenda. Ambos estadios fueron colectados en tubos estériles con etanol al 95% para la identificación molecular y con formol para la identificación entomológica.

Trabajo de Laboratorio

Procesamiento de Muestras Sanguíneas y Muestras de Garrapatas

Identificación Microscópica en Muestras de Sangre. De las muestras de sangre con anticoagulante se procedió a realizar frotis sanguíneo en un portaobjetos de vidrio tomando 30 μ L de sangre fresca. Estos se colocaron sobre una bandeja de coloración, se añadieron varias gotas de metanol al 100 % y se dejó actuar durante 2 minutos para fijar, transcurrido este tiempo se descartó el metanol y se dejó secar al aire durante 2 minutos. Luego, se procedió a colocar el colorante de Giemsa sobre las muestras hasta que las cubriera completamente, después de 15 minutos se retiró el colorante sobrante y se lavó el frotis con agua destilada. Finalmente, se realizó la observación microscópica en un microscopio vertical (CX31, OLYMPUS®, Japón) con el objetivo 100X para la identificación de *Babesia* en el interior de los glóbulos rojos.

Análisis de Hematocrito (PCV, Packed Cell Volume) en Muestras de Sangre. En un tubo capilar sin heparina (Blue Tip 80 mL, TECNAN®) se permitió el llenado con sangre completa hasta tres cuartas partes del mismo para luego sellarlo de un extremo con plastilina y centrifugar en una centrífuga (TG12M Madell Technology Corporation, USA), durante 5 min a 9 000 rpm. Luego se midió el nivel de PCV con una regleta para microhematocrito. Los valores menores o iguales al 24% se relacionan con anemia (Rockett & Bosted, 2015).

Medición de Proteínas Totales (PT) en Suero Sanguíneo. Las muestras de sangre sin anticoagulante fueron centrifugadas (Compact II Centrifuge, DB Clay Adams™, USA) a 4 000 rpm durante 10 minutos y se extrajo el suero en un nuevo tubo de 2 mL. Se tomó 30 μ L de suero y se colocó en el prisma del refractómetro digital de proteínas totales (RHC-300ATC, YHequipment, China) y se observó hacia una fuente de luz para distinguir el valor medido. El equipo viene en una escala de 2-14 g/100 mL, por lo tanto, para registrar el valor real se restó dos al valor observado. Los valores normales se encuentran entre 6-7.5 g/dL (Rockett & Bosted, 2015).

Identificación Entomológica de Garrapatas. Con pinzas entomológicas se tomó una garrapata contenida en formol, se lavó con etanol al 70% y se dejó evaporar el mismo, luego se colocó la garrapata en una base de vidrio para ubicarla sobre la platina del estereomicroscopio binocular (431, National, USA), el cual se ajustó hasta enfocar la garrapata completamente. Basándose en claves entomológicas descritas por Quiroz (1990) se fueron detectando las características morfológicas para la identificación de género y especie de la garrapata tanto machos como hembras, además, se confirmó los resultados obtenidos con una guía de identificación de especies (Walker et al., 2003) como se observa en el Anexo 1. Se identificó un total de 20 especímenes, de los cuales 4 eran machos y 16 hembras adultas.

Extracción de ADN de Sangre Total. La extracción de ADN se realizó mediante un kit comercial basado en tecnología de membranas de sílice en forma de columna (GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification, Thermo Fisher Scientific) en el cual se realizaron ciertas modificaciones.

En un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL se colocó 500 μ L de sangre completa del tubo tapa lila, se añadió 1 mL agua fría libre de nucleasas y se incubó en agitación durante 5 minutos a temperatura ambiente (TA), luego se centrifugó por 10 minutos a 10 000 rpm en una centrífuga (MIKRO 200, Hettich, Alemania) y se descartó el sobrenadante para resuspender el pellet en 200 μ L de tampón fosfato salino (PBS). Se añadió 20 μ L de Proteínasa K y 400 μ L de Solución de Lisis del kit, se mezcló por vórtex (ZVClassic, Velp Scientifica, Italia) y se incubó a 56°C por 10 minutos con agitación 200 rpm en el agitador térmico (Thermoshaker MSC-100, Thermo Fisher Scientific, USA), transcurridos 5 minutos se mezcló en vórtex y se puso a incubar nuevamente.

Se añadió 200 μ L de etanol al 100 % que se mezcló por pipeteo, esta mezcla se transfirió a la columna de centrifugado y se centrifugó por 1 minuto a 8 000 rpm, se descartó el tubo de colecta para colocar uno nuevo. Se procedió a la fase de lavados en la que se añadió 500 μ L del Buffer de Lavado 1 del kit, se centrifugó por 1 minuto a 10 000 rpm y se descartó el contenido del tubo de

colecta, luego se realizó un segundo lavado añadiendo 500 μ L del Buffer de Lavado 2 y se centrifugó durante 3 minutos a 14 000 rpm.

Se realizó la elución del ADN para la cual, se colocó la columna de centrifugado en un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 mL, se añadió 50 μ L del buffer de elución del kit en el centro de la membrana de la columna, se incubó a TA por 2 minutos y se centrifugó a 10 000 rpm durante 1 minuto, luego se repitió el mismo proceso en el mismo tubo, pero con 25 μ L del Buffer de Elución. Finalmente, se almacenó a -20°C hasta su uso.

Extracción de ADN de Garrapatas. Se utilizó el kit Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit de Promega, específicamente el protocolo para Aislamiento del ADN Genómico de Tejidos Animales, cola de ratón, el cual fue modificado.

Previo al proceso de extracción se preparó la muestra, se tomó con pinzas entomológicas la garrapata del tubo con etanol al 95 %, se lavó con agua destilada y se dejó secar al aire. Luego, la garrapata se colocó en una base de vidrio limpia y esta bajo el estereomicroscopio para observar claramente los cortes a realizar. Con un bisturí y pinzas se procedió a extraer la cabeza de la garrapata y colocar en el tubo de muestra (tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 mL), luego se retiró las patas y el exoesqueleto para desecharlos, mientras que la parte interna se colocó en el tubo de muestra.

La extracción de ADN comenzó con un proceso de lisis, para lo cual en un tubo de 1.5 mL se mezcló 120 μ L de EDTA 0.5 M con 500 μ L de Solución de Lisis Nuclear del kit y se enfrió en hielo. Al tubo de muestra se añadió 600 μ L de esta mezcla, 17,5 μ L de Proteínasa K 20 mg/mL y se incubó a 55°C durante 3 horas con agitación 200 rpm en el agitador térmico, cada hora se mezcló en vórtex y se volvió a incubar. Luego se añadió 3 μ L de solución RNasa, se mezcló por inversión 5 veces y se incubó a 37°C durante 20 minutos, luego se dejó enfriar la muestra a TA durante 5 minutos.

Para la precipitación de proteínas se añadió 200 μL de Solución de Precipitación de Proteínas del kit a la muestra, se agitó por vórtex durante 20 segundos y se enfrió en hielo por 5 minutos, luego se centrifugó 5 minutos a 14 000 rpm, se repitió el mismo procedimiento, pero con 130 μL de Solución de Precipitación de Proteínas.

Para la precipitación de ADN se transfirió el sobrenadante que contiene el ADN a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.5 mL con 600 μL de isopropanol a TA y se mezcló suavemente por inversión hasta ver pequeñas masas formadas de ADN. Centrifugar por 1 minuto a 14 000 rpm, el ADN formó un pellet así que se eliminó cuidadosamente todo el sobrenadante con micropipeta. Al pellet contenido en el tubo de muestra se añadió 600 μL etanol al 70 %, se mezcló por inversión suavemente para lavar el ADN y se centrifugó durante 1 minuto a 14 000 rpm, luego cuidadosamente se extrajo la mayor cantidad de etanol con micropipeta sin tocar el pellet, para eliminar el etanol sobrante se colocó el tubo abierto invertido sobre papel absorbente durante 15 minutos.

Finalmente, se añadió 30 μL de Solución de Rehidratación de ADN del kit y se incubó durante toda la noche a 4°C. Luego se almacenó el ADN a -20°C.

Determinación de la Integridad y Cuantificación de ADN. Después de la extracción de ADN tanto de sangre como de garrapatas, se determinó la integridad de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %, teñido con SYBR[®]Safe Invitrogen, se cargó 3 μL de muestra con buffer de carga 10X Blue Juice Invitrogen en cada pocillo y se corrió el gel a 120 V durante 1 hora en una cámara de electroforesis, luego se observó el gel en un fotodocumentador (ChemiDoc Imaging System, Bio Rad, USA).

Se cuantificó el ADN mediante espectrofotometría UV utilizando un espectrofotómetro (Miltiskan SkyHigh Microplate, Thermo Fisher Scientific, USA), en la microplaca se colocó 2 μL de ADN en cada pocillo de la placa, excepto en el primero, en el cual se colocó el blanco (Buffer de elución del kit de extracción de ADN para sangre y agua ultra pura libre de nucleasas para

garrapatas). Luego se colocó la microplaca en el portaplacas del equipo, se realizó la medición programando el equipo para ácidos nucleicos 260 nm y se registró los datos con ayuda del Software SkanIt™ de Thermo Scientific. Se obtuvo la concentración en unidades $\mu\text{g}/\text{mL}$ y la pureza en un radio de 260/230 que indica contaminantes químicos y radio 260/280 contaminación con proteínas.

Identificación de *Babesia* spp. Mediante PCR-RFLP

PCR del Gen 18S de *Babesia*. La reacción en cadena de la polimerasa se realizó utilizando los cebadores PIRO A (5'-AATACCCAATCCTGACACAGGG-3') y PIRO B (5'-TTAAATACGAATGCCCCAAC-3') que amplifican una porción de 408 pb de la subunidad pequeña 18S del ARN ribosomal de *Babesia* spp. (Olmeda et al., 1997).

Se usó los componentes de la mezcla de reacción establecidos por Medina-Naranjo y colaboradores (2017) para un volumen final de 25 μL por tubo (Tabla 2) usando una enzima Taq Polimerasa Recombinante Invitrogen. Además, las condiciones del proceso de amplificación del mismo autor se describen a continuación en la Tabla 3, con ciertas modificaciones establecidas para mejorar la sensibilidad.

Tabla 2.

Componentes de la mezcla de reacción de PCR para el género Babesia.

Componente	Concentración final	Unidad
H ₂ O	-	-
Buffer	1.00	10x
Piro A	0.25	μM
Piro B	0.25	μM
MgCl ₂	1.50	mM
dNTPs	0.80	μM
Taq	0.50	U/ μL

Componente	Concentración final	Unidad
ADN	100	ng

Tabla 3.

Condiciones de amplificación por PCR para el género Babesia.

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5	1
Desnaturalización	94	1	45
Hibridación	55	1	45
Extensión	72	0.5	45
Extensión final	72	5	1
Mantenimiento	4	∞	-

Visualización de los Productos de PCR por Electroforesis. Los productos de amplificación fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % teñido con SYBR®Safe, se cargó 10 µL de amplicón con buffer de carga 10X Blue Juice Invitrogen en cada pocillo y se corrió el gel a 120 V durante 1 hora en una cámara de electroforesis, luego se visualizó el gel en un fotodocumentador (ChemiDoc Imaging System, Bio Rad, USA). Se diferenciaron las muestras positivas de negativas y se registró en una base de datos.

Purificación de los Productos de PCR. Se realizó duplicados o triplicados de los productos de PCR para concentrar la muestra y se cargó todo en gel de agarosa al 1.5 % teñido con SYBR®Safe, se cargó 50 o 75 µL de amplicón (según las repeticiones que se haya realizado) con buffer de carga 10X Blue Juice Invitrogen en cada pocillo y se corrió el gel a 120 V durante 1 hora en una cámara de

electroforesis. Luego se colocó el gel en un transiluminador de luz azul (Safe Imager 2.0, Thermo Fisher Scientific, USA) para realizar los cortes de las bandas lo más finas posible, la porción de gel se colocó en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.

La purificación se llevó a cabo mediante kit (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega, USA). Para la disolución del gel se calculó el peso neto de la porción del gel y en base a eso se añadió 10 µL de Solución de Unión a la Membrana del kit por cada 10 mg de porción de gel de agarosa, se mezcló por vórtex y se incubó a 60°C a 200 rpm durante 10 minutos en un agitador térmico con una agitación en vórtex a los 5 minutos.

Para la unión de ADN a la membrana se transvasó en contenido del tubo a la columna SV contenida en un tubo de colección y se incubó 1 minuto a TA, luego se centrifugó a 14 000 rpm por 1 minuto, se removió la columna, se descartó el líquido del tubo de colección y se devolvió la columna al tubo. El proceso de lavado se llevó a cabo añadiendo 700 µL de Solución de Lavado de Membrana del kit, se centrifugó por 1 minuto a 14 000 rpm, se descartó el líquido como antes se indicó y se repitió el proceso con 500 µL de Solución de Lavado y se centrifugó a 14 000 rpm por 5 minutos. Finalmente, se realizó la elución colocando la columna SV en un tubo de microcentrífuga y añadiendo 20 µL de Agua Libre de Nucleasas del kit, se incubó 2 minutos a TA y se centrifugó durante 2 minutos a 14 000 rpm, se repitió el proceso, pero con 15 µL de Agua Libre de Nucleasas y se eluyó en el mismo tubo. Se almacenó a -20°C hasta su uso.

Diferenciación de *Babesia* sp. Mediante Enzimas de Restricción. Para el reconocimiento de especies de *Babesia* spp. se utilizó la técnica polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP). Primero se realizó una búsqueda de las secuencias teóricas de *B. bovis* y *B. bigemina* en la base de datos Blast para realizar un análisis bioinformático, corte con enzimas de restricción se determinó que teóricamente la enzima HpaI corta la secuencia de *B. bovis* en dos fragmentos, 226 y 151 pb, mientras que AluI corta la secuencia de *B. bigemina* en tres fragmentos, 210, 145 y 38 pb.

Cada producto de PCR positivo purificado a *Babesia* se sometió a digestión con las dos enzimas de restricción HpaI y AluI de Thermo Scientific para lo cual se adicionó 10 µL de producto de PCR, 17 µL de agua libre de nucleasas, 2 µL de 10X Tango buffer y 1 µL de enzima, en un volumen total de 30 µL. Se mezcló suavemente y se centrifugó brevemente, luego se incubó a 37°C por 3 horas sin agitación en un agitador térmico (Thermoshaker MSC-100, Thermo Fisher Scientific, USA).

Finalmente, se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa al 2 %, los 30 µL de muestra fueron cargados con buffer de carga 10X Blue Juice Invitrogen en cada pocillo y se corrió el gel a 100 V durante 2 hora en una cámara de electroforesis, luego se visualizó el gel en un fotodocumentador (ChemiDoc Imaging System, Bio Rad, USA).

Identificación molecular del género de garrapatas

Los resultados de la identificación morfológica de las garrapatas se constataron con un ensayo PCR del género *Rhipicephalus* que amplifica fragmentos entre 765 y 832 pb de la región ITS2 dependiendo de la especie, *R. (Boophilus) microplus* presenta un amplicón de 829 pb, *R. (Boophilus) geigy* de 765 pb, *R. (Boophilus) annulatus* de 832 pb y *R. (Boophilus) decoloratus* de 821 pb. Se usó los cebadores Boophits2 F (5'-GCC-GTC-GAC-TCG-TTT-TGA-3') y Boophits2 R (5'-TCCGAA-CAG-TTG-CGT-GAT-AAA-3'), las concentraciones de la mezcla de reacción y las condiciones establecidas por Lemperaur y colaboradores (2010).

Tabla 4.

Componentes de la mezcla de reacción de PCR para el género Rhipicephalus.

Componente	Concentración final	Unidad
H ₂ O	-	-
Buffer	1.00	10x
Boophits2 F	0.50	µM
Boophits2 R	0.50	µM

Componente	Concentración final	Unidad
MgCl ₂	1.65	mM
dNTPs	0.80	mM
Taq	1.00	U/ μ L
ADN	100	ng

Tabla 5.

Condiciones de amplificación por PCR para el género Rhipicephalus.

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	4	1
Desnaturalización	94	0.50	40
Hibridación	58	0.75	40
Extensión	72	1	40
Extensión final	72	8	1
Mantenimiento	4	∞	-

Análisis estadístico de las variables

En las variables sexo, raza y edad se aplicó la prueba chi-cuadrado a un nivel de $\alpha=0.05$ para determinar la dependencia de los casos positivos a *Babesia* spp. frente a las categorías de estas variables. Los valores chi-cuadrado se muestran en el Anexo 3.

Las medidas de tendencia central permiten resumir en un solo valor a un conjunto de datos, por lo tanto, se calculó los valores de media, mediana, moda, desviación estándar (SD), máximo y mínimo de las variables temperatura, PT y PCV.

Otra prueba aplicada fue t de Student, en las variables temperatura, PT y PCV para determinar las diferencias y distribución entre el total de las muestras y las positivas a *Babesia* con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$.

Análisis Filogenético de *Babesia* spp.

Secuenciación Sanger. Previo al proceso de secuenciación se realizó duplicados o triplicados de las muestras dependiendo de la intensidad de banda, para luego purificar y concentrar de gel de agarosa el amplicón según el proceso de purificación de productos de PCR, con tres eluciones, hasta obtener un volumen de 43 μL . Luego 3 μL se cargaron en gel de agarosa al 1.5 % para comprobar el proceso de purificación y en la placa de secuenciación se colocó 20 μL del producto de PCR purificado para el cebador forward (Piro A) en un pocillo y 20 μL para el cebador reverse (Piro B). Finalmente, la placa fue etiquetada y enviada a la empresa Macrogen, Inc. para el proceso de secuenciación Sanger, además se envió 5 μL de los cebadores PIROA y PIROB para cada muestra a una concentración de 5 μM .

Ensamblaje y Análisis de Secuencias Obtenidas. Las secuencias recibidas como resultado de la secuenciación, después del corte y control de calidad, fueron ensambladas (secuencia forward y reverse) para obtener una secuencia consenso, luego se alinearon con secuencias referencia de la base de datos GenBank "NCBI nonredundant nucleotide database". Se usó dos programas bioinformáticos de acceso libre, Bioedit (<https://bioedit.software.informer.com>) y "Molecular Evolutionary Genetics Analysis" MEGAX (<https://www.megasoftware.net/>) para los procesos de ensamblaje y alineamiento, respectivamente.

Análisis Filogenético. Con el alineamiento de secuencias obtenido se construyó un árbol filogenético en el programa bioinformático MEGAX analizando el mejor modelo previamente, se ajustó el valor de bootstraps a 1 000 y cuando se obtuvo el árbol se analizó los resultados de parentesco entre aislados.

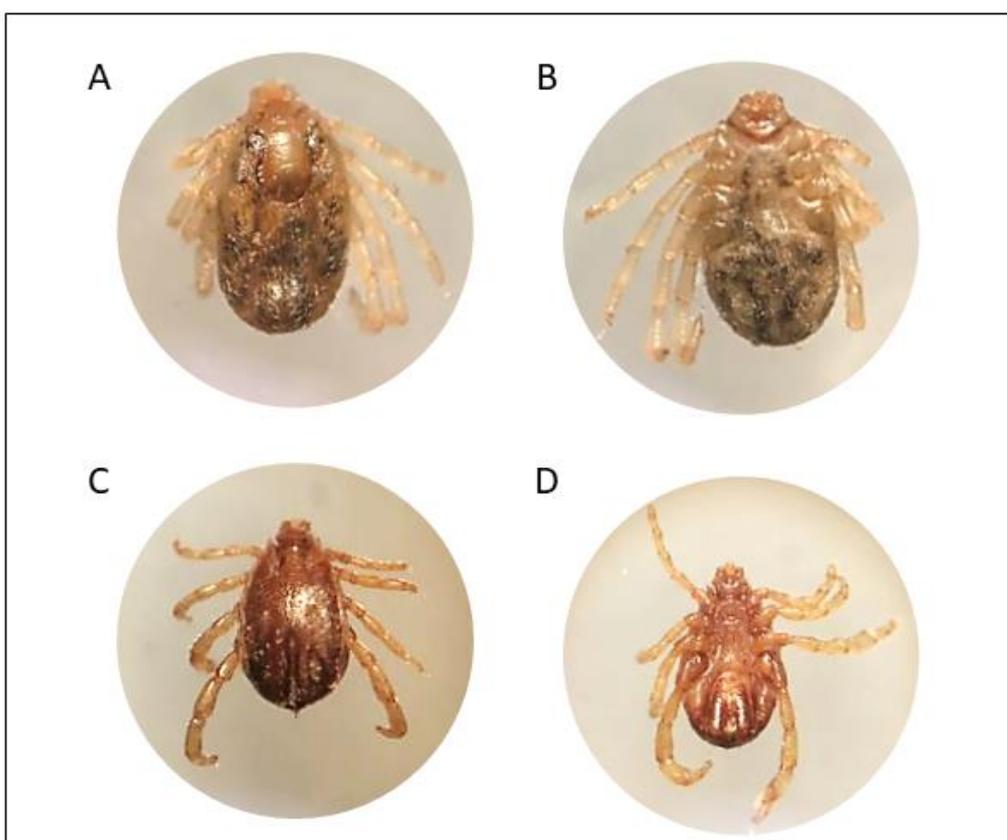
Capítulo IV: Resultados

Identificación Morfológica y Molecular de Garrapatas

Se identificó morfológicamente una única especie de garrapata, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en machos y hembras según las características descritas por (Walker et al., 2003), en la Figura 2 se muestra una vista general dorsal y ventral de ejemplares de ambos sexos.

Figura 2.

Vista dorsal y ventral de garrapatas Rhipicephalus microplus adultas.



Nota. (A) *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* hembra vista dorsal, el scutum está presente (B) *R. microplus* hembra vista ventral. (C) *R. microplus* macho vista dorsal. (D) *R. microplus* macho vista ventral, las placas ventrales están presentes.

La identificación de las garrapatas del género *Rhipicephalus*, subgénero (*Boophilus*) y especie *R. microplus* se basó en las siguientes características (Figura 3):

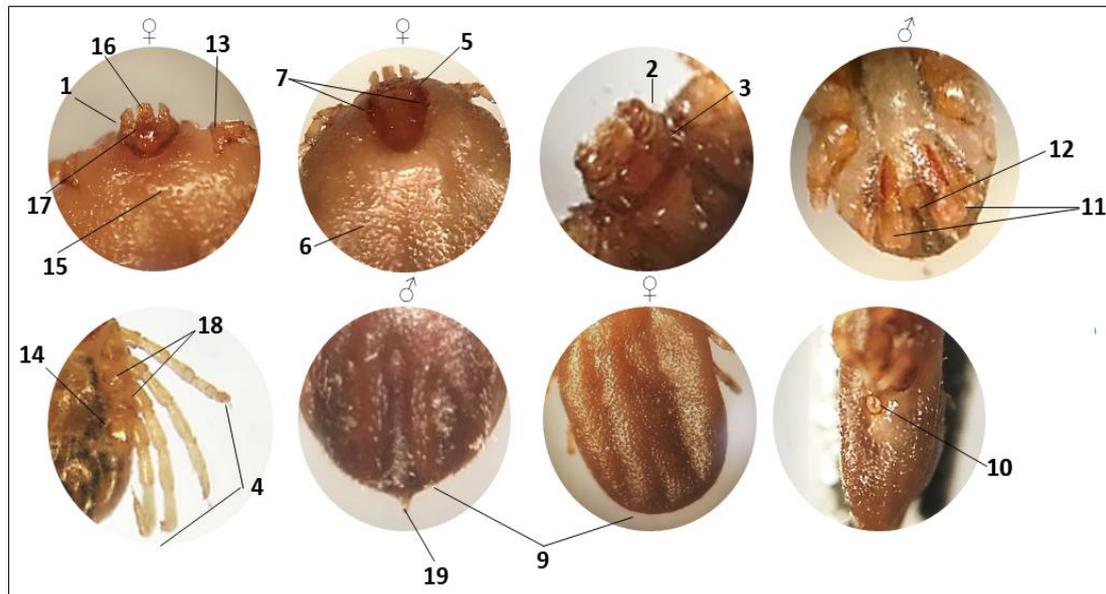
- (1) Las piezas bucales son anteriores y cortas en comparación con el género *Amblyomma*.

- (2) Los artículos del palpo son todos pequeños.
- (3) La base del capítulo tiene márgenes laterales angulosos (los cornetes son indistinguibles en el macho).
- (4) Las patas no tienen anillos, son delgadas y tiene pulvillos.
- (5) Las hembras presentan scutum y los machos conscutum (véase también en la Figura 2), no tienen ornamentación.
- (6) El tegumento tiene estrías.
- (7) Los ojos están presentes pero indistinguibles en hembras.
- (8) Los ojos están presentes pero indistinguibles en machos.
- (9) Los festones están ausentes.
- (10) Las placas espiraculares son grandes y posterior a la pata 4.
- (11) Los espolones de las placas ventrales son indistinguibles en los machos y no visibles dorsalmente, estas placas en el género *Margaropus* son largas y afiladas.
- (12) El surco anal es indistinguible.
- (13) Las coxas 1 tienen pequeños espolones emparejados (en el macho son más largas que en la hembra).
- (14) Las coxas 4 son de tamaño normal.
- (15) La apertura de genital de las hembras tiene forma de U.
- (16) En el hipostoma de la hembra los dientes están ubicados de forma 4+4 a diferencia de *R. (B.) decoloratus* que solo tiene 3+3.
- (17) En la hembra los artículos del palpo 1 no tiene protuberancia, son cortos y cóncavos.
- (18) Hay espolones en las coxas 2 y 3 de la hembra.
- (19) Los machos tienen un apéndice caudal estrecho a diferencia de *R. (B.) annulatus* que carece de este.

Además, el tamaño de las garrapatas no alimentadas adultas es de 2.5 mm incluidas las piezas bucales en ambos sexos como se observa en el Anexo 2.

Figura 3.

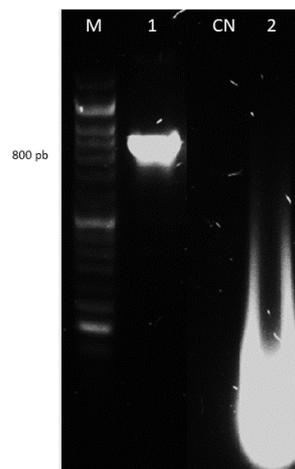
Características morfológicas de garrapatas Rhipicephalus (Boophilus) microplus.



Mediante PCR de una muestra de ADN de garrapata se determinó que esta pertenecía al género *Rhipicephalus* al amplificar un fragmento de aproximadamente 800 pb del gen ITS2 como se observa en la Figura 3, en la que además se puede notar la ausencia del producto de amplificación cuando la muestra de ADN no es pura.

Figura 4.

Amplificación del gen ITS2 del género de garrapata Rhipicephalus.



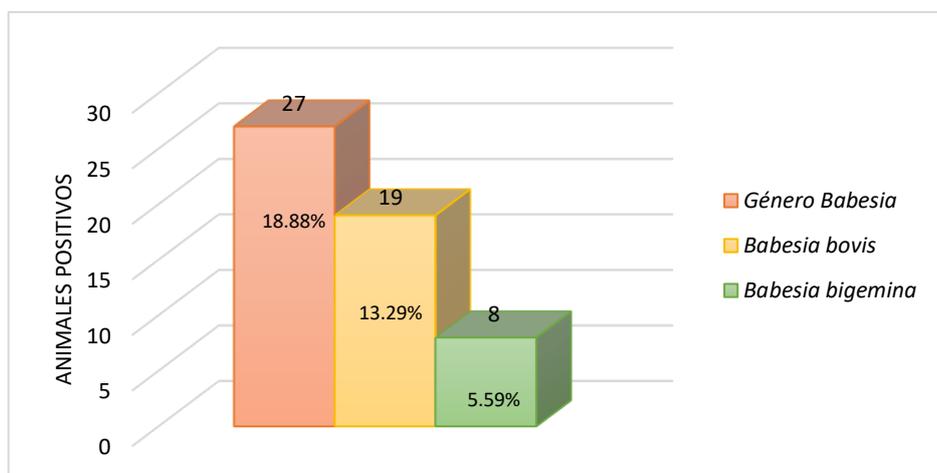
Nota: En el primer pocillo se encuentra el marcador de peso molecular de 1 kb (M), seguido de una muestra positiva a PCR del género *Rhipicephalus* de ADN puro (1), control negativo (CN) y muestra negativa a la misma PCR de ADN no puro (2).

Análisis Molecular de *Babesia* en Bovinos

Como resultado del análisis molecular mediante PCR-RFLP se determinó la presencia de *Babesia* en 18.88% (27/143) por PCR convencional, mientras que por RFLP se identificó dos especies: *B. bovis* en 13.29% (19/143) y *B. bigemina* en 5.59% (8/143), como se muestra en la Figura 7. No se determinó coinfecciones con ambas especies en ninguna de las muestras positivas a género.

Figura 5.

Representación de la presencia de *Babesia* en el sector del volcán Ilaló.

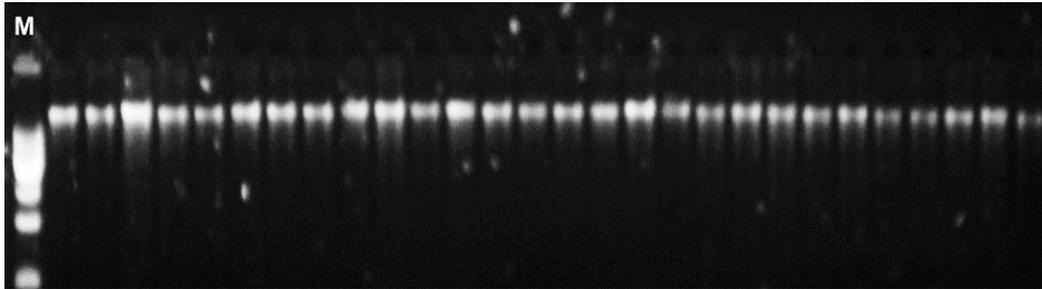


Para determinar la presencia de *Babesia* en bovinos se aplicó técnicas moleculares como: extracción y cuantificación de ADN, PCR específica para el género *Babesia* y RFLP con las enzimas de restricción HpaI y AluI.

En la cuantificación de ADN extraído de sangre bovina se determinó una media de 29.08 $\mu\text{g/mL}$, con valores distribuidos entre 88.37 y 2.86 $\mu\text{g/mL}$, en cuanto a la pureza, la densidad óptica (OD) del ratio de A260/280 (ratio aceptado ~ 1.8) de las 143 muestras tuvo un valor promedio de 1.959 y el ratio de A260/A230 (ratio aceptado 2.0–2.2) de 3.038. Sin embargo, al determinar la integridad del ADN por electroforesis se observó bandas definidas e intensas, sin rastro de degradación o contaminantes como se muestra en la Figura 4.

Figura 6.

Visualización de integridad de ADN obtenido de sangre bovina.

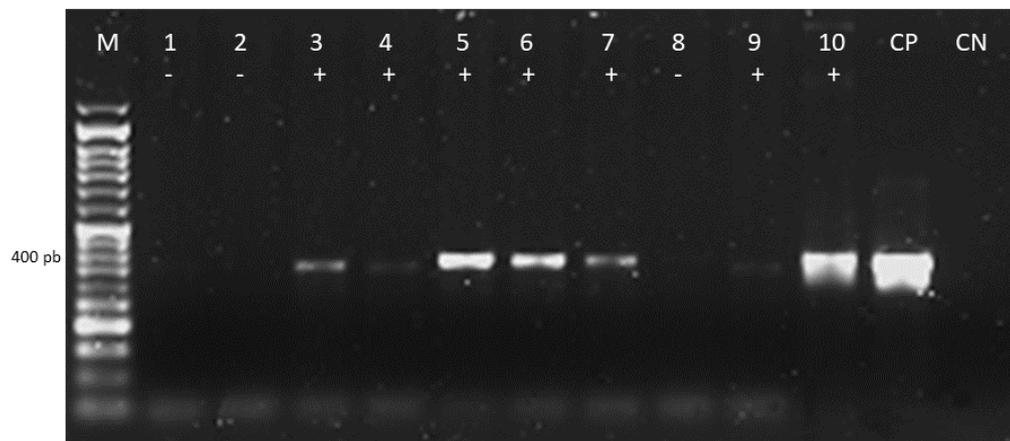


Nota: A partir del segundo pocillo se observa una porción del total de muestras de ADN cargadas en gel de agarosa al 0,8% para determinar la integridad de las mismas, en las muestras no hay degradación ni trazas de contaminantes. En el primer pocillo el marcador de peso molecular (M) de 1kb.

Como resultado de la PCR específica para el género *Babesia* que amplifica una región variable del gen de la subunidad 18S del ARNr con los cebadores PIRO A y PIRO B, se obtuvieron amplicones de aproximadamente 400 pb en 27 muestras, que al ser reveladas se puede observar diferentes intensidades de banda debido a la variedad de las concentraciones de ADN como se observa en la Figura 5.

Figura 7.

Amplificación del gen 18S rRNA del género Babesia.

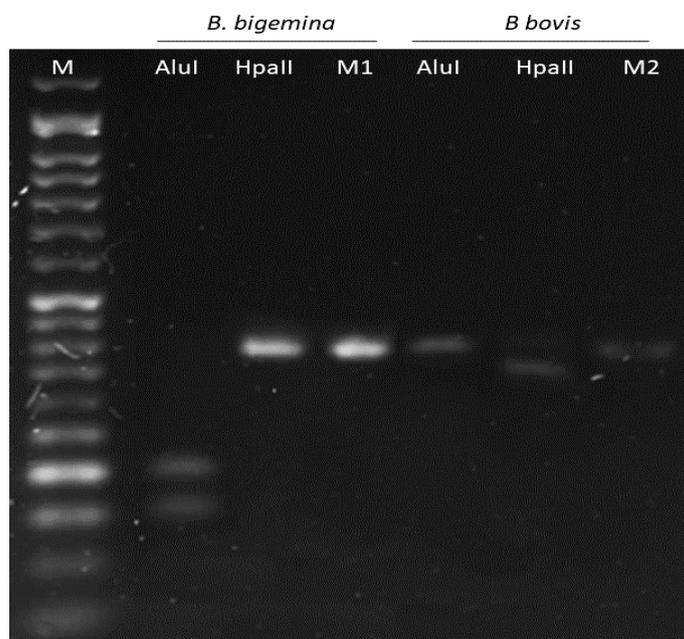


Nota: En el primer pocillo se encuentra el marcador de peso molecular de 1 kb (M), seguido de muestras positivas con diferentes intensidades de banda (3, 4, 5, 6, 7, 9 y 10), muestras negativas (1, 2 y 8), control positivo (CP) (plásmido del estudio de Medina-Naranjo, 2017) y finalmente el control negativo (CN).

Teóricamente la enzima de restricción HpaII realiza un corte en el amplicón de 377 pb correspondiente a *B. bovis*, dejando dos fragmentos de 227 y 150 pb, mientras que AluI realiza dos cortes en la secuencia de 393 pb de *B. bigemina*, dejando tres fragmentos de 209, 146 y 38 pb (Figura 6). En base a esto, se ejecutó el proceso de digestión de los productos de PCR de las muestras positivas con la enzima de restricción HpaII se determinó 19 muestras positivas a *B. bovis* y con la enzima AluI 8 positivas a *B. bigemina*.

Figura 8.

Digestión RFLP con enzimas de restricción HpaII y AluI.



Nota: Marcador de peso molecular de 1kb (M), la primera muestra identificada como *B. bigemina* se identifica cortes con la enzima AluI y no con HpaII, la segunda muestra identificada como *B. bovis* presenta cortes con HpaII y no con AluI; M1 y M2 corresponde a los productos de PCR completos sin digerir.

Mediante observación microscópica de frotis sanguíneo de las muestras no se evidenció la presencia del parásito *Babesia* dentro de los eritrocitos de los bovinos. Además, la única muestra de ADN puro de garrapatas se sometió al ensayo PCR del género *Babesia* y resultó negativa.

Distribución de variables: sexo, rango de edad, raza, temperatura, PT y PCV.

En la finca en el sector del volcán Ilaló a una altitud de 2469 m se muestreó bovinos (n=143) pertenecientes a siete categorías de producción: destetadas, fierro, vientre por servir, vientre servido, ordeño, toros, y enfermas, ordenadas de acuerdo a la edad de menor a mayor. Del total de bovinos 7 fueron machos (4.9 %), correspondientes a la cuenta Toros y 136 hembras (95.1 %) distribuidas en las demás cuentas. En cuanto a la raza, eran animales mestizos identificados como Holstein (70.6 %), Jersey (18.9 %) y Brown Swiss (10.5 %) como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 6.

Distribución de muestras según el sexo, rango de edad y raza.

Variable	Total		Positivos	
	Número	%	Número	%
Sexo				
Macho	7	4.9	0	0
Hembra	136	95.1	27	18.88
Rango de edad (meses)				
0-9	26	18.18	0	0
10-18	27	18.88	3	2.10
19-36	70	48.95	21	14.68
>36	20	13.99	3	2.10
Raza				
Holstein	101	70.6	20	13.98
Jersey	27	18.9	5	3.50
Brown Swiss	15	10.5	2	1.40

Se determinó que existe suficiente evidencia estadística para indicar que la edad (valor $p=0.005$) es dependiente ante la presencia de *Babesia* spp., mientras que la raza (valor $p=0.835$) y el

sexo (*valor p* = 0.191) son independientes de la misma, es decir, que la presencia de *Babesia* no guarda ninguna relación con estas dos variables, al contrario de lo que sucede con la variable edad.

Al analizar las variables, PT y PCV (Tabla 5), se determinó que la temperatura de los bovinos se encuentra entre el rango 36.30 - 41.00°C con una media de 38.82°C y PT entre 6.40–10.00 g/dL con una media de 7.60 g/dL, ambas variables, presentan una desviación estándar mínima, inferior a 1, es decir, no hay una amplia dispersión de los datos, contrario a la variable PCV, la cual presenta un valor de SD alta de 3.24%, una media de 32.33% en un rango entre 40.00 y 20.00%.

Tabla 7.

Medidas de tendencia central de las variables: temperatura, PT y PCV.

<i>Variable</i>	<i>Media</i>	<i>Mediana</i>	<i>Moda</i>	<i>Desviación estándar</i>	<i>Máximo</i>	<i>Mínimo</i>
<i>Temperatura (°C)</i>	38.82	38.80	38.80	0.54	41.00	36.30
<i>PT (g/dL)</i>	7.60	7.50	7.00	0.59	10.00	6.40
<i>PCV (%)</i>	32.33	32.00	32.00	3.24	40.00	20.00

Se determinó que no existe diferencia significativa en las variables temperatura (*valor p*=0.1823), PT (*valor p*=0.1586) y PCV (*valor p*= 0.1580) antes la presencia o ausencia de *Babesia*, en otras palabras, los datos se distribuyen de la misma forma en las muestras positivas y negativas. De los bovinos positivos a *Babesia* spp. cuatro presentaron temperatura fuera de lo normal pero solo uno excedía el rango (39.3°C) y en PT diez sobrepasaban el intervalo normal, mientras que en PCV ningún presentó valores menores o iguales a 29%.

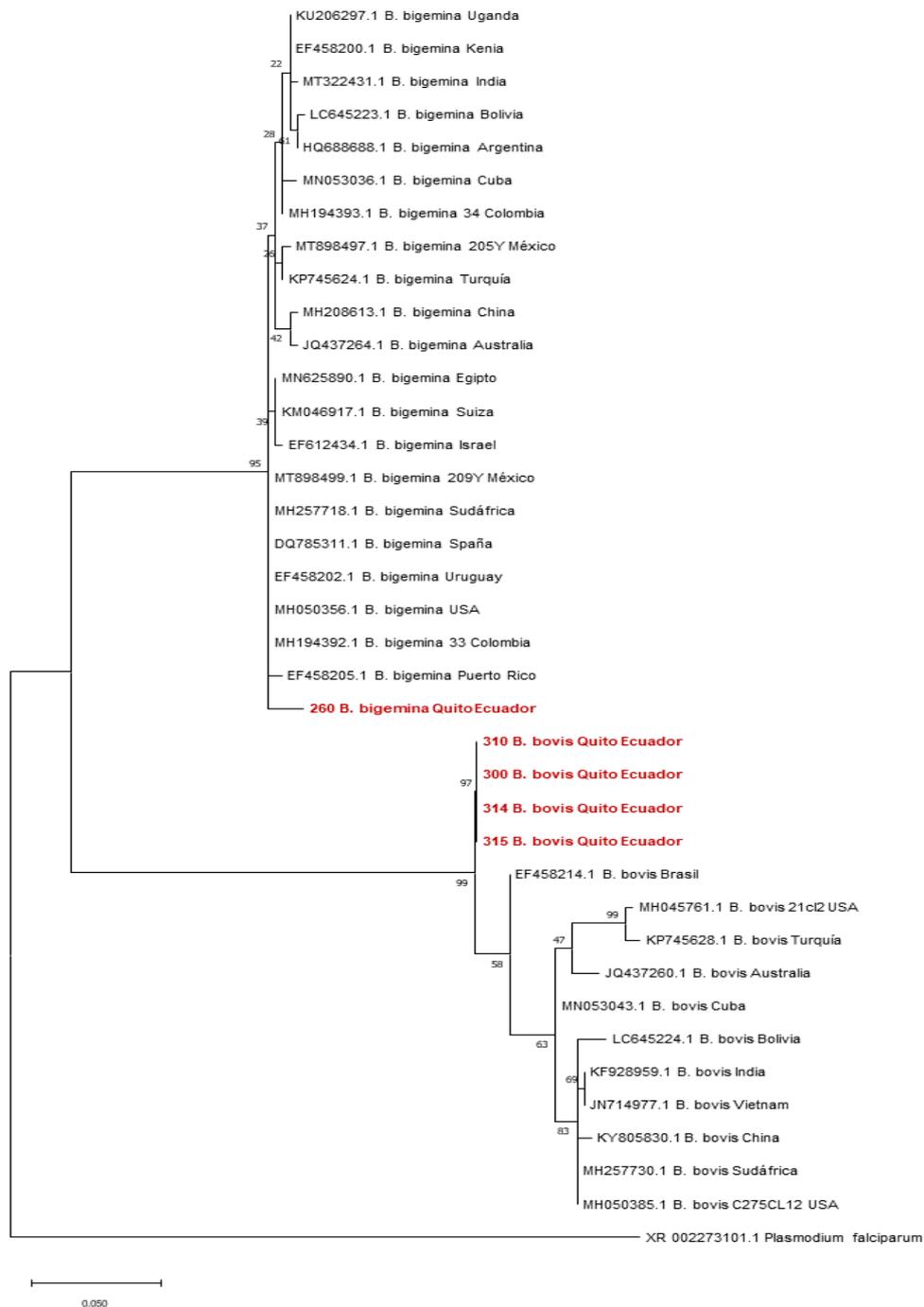
Filogenética de Aislados de *Babesia* spp.

Al realizar la búsqueda en la base de datos GenBank con la herramienta bioinformática Blast se seleccionó 21 secuencias de referencia de *B. bigemina* y 11 de *B. bovis* (Anexo 4) en base al porcentaje de cobertura de consulta (Query coverage) y porcentaje de identidad. Las secuencias de referencia seleccionadas junto con las obtenidas en este estudio fueron alineadas en el software Mega para la construcción del árbol filogenético.

El árbol filogenético (Figura 8) se construyó mediante el método de máxima verosimilitud y el modelo de 3 parámetros de Tamura (T92), seleccionado por la topología con mayor valor de verosimilitud logarítmica, además, se utilizó una distribución Gamma (G) discreta para modelar las diferencias de tasa evolutiva entre los sitios. Este análisis incluyó 38 secuencias de nucleótidos.

Figura 9.

Árbol de máxima verosimilitud basado en los genes 18S rRNA de los aislados de *B. bigemina* y *B. bovis*.



Nota: El árbol filogenético dibujado a escala que se muestra fue construido con la mayor probabilidad logarítmica y con longitudes de rama medidas en el número de sustituciones por sitio. El porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agrupan se muestra junto a las ramas.

Capítulo V: Discusión

En este estudio, se identificó a *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* como la única especie de garrapata que infesta al ganado bovino en el sector del volcán Ilaló, al igual que en un estudio realizado en 2 departamentos del Altiplano de Colombia, donde fue la única especie colectada e identificada en todos sus estadios de muestra obtenidas de bovinos y sus respectivos potreros de pastoreo, esto debido a que es la especie más común del ganado bovino (Vecino et al., 2010). Además, en Ecuador, en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, Maya-Delgado y colaboradores (2020) determinaron que *R. microplus* es la principal garrapata que infesta al ganado en la zona, registrada en 83% de las fincas muestreadas.

Esta especie de garrapata es la única con importancia económica para la industria ganadera, principalmente por su amplia distribución geográfica y su capacidad de transmitir babesiosis y anaplasmosis bovina (Venzal et al., 2003; Coetzer & Tustin, 2004).

Es necesario realizar la identificación del género y especie de la garrapata que esté infestando al ganado, ya sea por morfología, morfometría o técnicas moleculares, debido a que al implementar estrategias de control, es decir, el tratamiento y la frecuencia de aplicación, estas deben adaptarse a la ecología de la especie (Maya-Delgado et al., 2020).

El presente estudio muestra la presencia de *Babesia* en una finca en el sector del volcán Ilaló, los resultados del ensayo molecular mostraron que, de los animales muestreados, el 18,88% (27/143) fueron positivos para el género *Babesia* según el gen 18S rRNA, siendo *B. bovis* más prevalente (13.29%) que *B. bigemina* (5.59%), resultando contrario a lo reportado en zonas ganaderas de América del Sur, como Argentina (54.7 % *B. bigemina* y 27.3% *B. bovis*), Brasil (34% *B. bigemina* y 20.4% *B. bovis*) y Colombia (24.2% *B. bigemina* y 14.4% *B. bovis*) en las que la prevalencia molecular de *B. bigemina* es mayor a la de *B. bovis* (Amorim et al., 2014; Ganzinelli et al., 2020; Jaimes-Dueñez et al., 2018).

El porcentaje de animales positivos en este estudio fue cercano al 25,88 % registrado en la Isla Santa Cruz en la región Insular (Jumbo, 2018) y menor que el 64,35% reportado en la Provincia de Manabí en la región Costa (Arboleda, 2019), ambos basados en el gen 18S rRNA.

No fue posible determinar la presencia o ausencia de *Babesia* en garrapatas, debido a la falta de pureza del ADN obtenido, ya que la calidad del ADN necesaria para la PCR suele ser muy alta, con un ADN de alto peso molecular, libre de contaminación por proteínas, ARN o polisacáridos que puedan inhibir la reacción, y con una relación de absorbencia 260/280 nm de aproximadamente 1.8-2.0 (Abdel-Latif & Osman, 2017).

Estos resultados, indican que no se trata de una situación endémica estable, ya que, se dice que una situación endémica estable se produce cuando el 81 – 100% del rebaño está infectado por una especie de *Babesia* concreta (Norval et al., 1983).

Los resultados de este estudio se obtuvieron utilizando la prueba PCR-RFLP, la cual se considera una técnica precisa y fiable, cuando se compara con otras pruebas con la de microscopia óptica, además resulta ventajosa para la diferenciación de *B. bovis* y *B. bigemina* porque permite evaluar un mayor número de muestras en menos tiempo que posibilita una intervención médica oportuna para el tratamiento de babesiosis bovina (Figuerola et al., 2014).

La babesiosis bovina en esta hacienda ubicada a 2469 m de altitud fue causada por *B. bovis* y *B. bigemina*, parásitos transmitidos por garrapatas y distribuidos en regiones tropicales de todo el mundo, sin embargo, esta locación se encuentra en la región andina del Ecuador la cual se caracteriza en su mayoría por un clima templado, con temperaturas anuales de 11-17°C con lluvia abundante (Portilla, 2018). La presencia de *Babesia* spp. en el sector del volcán Ilaló se puede deber al cambio climático que puede haber llegado a modificar la distribución geográfica de las garrapatas (vector de *Babesia*), debido a que regiones que no eran propicias para la supervivencia de las fases no parasitarias en el suelo, pasan a ser parte de los requerimientos para ciertas especies de garrapatas por el cambio de temperatura y humedad; aunque estos cambios no se deben a un solo

factor, ya que la movilidad del ganado también podría ser causante de la presencia de garrapatas, y por ende la transmisión de *Babesia* (Benavides et al., 2016).

Otro factor que justifique la presencia de *Babesia* y garrapatas en esta zona podría ser la movilización de animales entre zonas endémicas y no endémicas, esta se encuentra asociada con la mayoría de brotes de la enfermedad, ya sea por la entrada de animales infestados a zonas sin garrapata, o por el traslado de animales susceptibles a zonas endémicas (Benavides et al., 2016).

Jaimes-Dueñez y colaboradores (2018) mostraron que tanto la prevalencia de *B. bigemina* como de *B. bovis* fue en animales con valores normales de PCV, al igual que este estudio en el cual ningún animal positivo a *Babesia* presentó PCV inferior al 29% que indicaría anemia, de igual forma la temperatura y el valor de PT no se mostraron como indicadores de casos clínicos al no haber variación significativa entre las muestras negativas y las positivas, indicando que se trata de una infección persistente. Los bovinos infectados de esta forma aparentemente están sanos y no muestran signos clínicos, a menos que el animal esté expuesto a estrés, coinfecciones con otros patógenos, o este inmunocomprometido, lo cual causaría el resurgimiento de la enfermedad aguda. Aunque no se sabe con exactitud cuales son los factores para que el bovino se mantenga aparentemente sano, es probable que en ese momento la respuesta inmune haya madurado lo suficiente como para formar anticuerpos de alta afinidad y una inmunidad celular robusta pueden controlar la capacidad de los parásitos de propagarse (Suarez et al., 2019).

Entre la edad, raza y sexo, la primera fue la única que se mostró estadísticamente dependiente a la presencia de *Babesia* spp., ya que los casos positivos se presentaron en los bovinos mayores a 9 meses, es decir no se presentó ningún caso en terneros, esto se puede deber a que la inmunidad innata es suficiente para prevenir la enfermedad grave en los terneros, en contraste con la de los animales adultos, ya que esta juega un papel crucial en el control de la expansión del parásito en las primeras etapas de la infección (Goff et al., 2001; Suarez et al., 2019).

El gen 18S rRNA ha sido utilizado con anterioridad para identificar grupos genéticos de *Babesia* spp. asociado a huéspedes específicos (Holman et al., 2011), esto sumado a la escasez de estudios filogenéticos de *Babesia* spp. en Sudamérica, llevó a aplicar en este estudio un enfoque filogenético a los aislados encontrados, hallándose clados definidos en cada especie.

Mediante filogenia se identificó que las secuencias de los aislados de *B. bovis* encontradas congregan en un grupo significativamente delimitado en una sola rama, distintos de las otras cepas de *B. bovis* publicadas, sugiriendo la presencia de micro-heterogeneidades entre las secuencias de gen 18S rRNA dentro de esta especie como lo reportó Mtshali y Mtshali (2003) entre las secuencias del gen rap-1 en la misma especie. Además, este clado se encuentra estrechamente relacionado a un aislado proveniente de Brasil.

La especie *B. bigemina*, se encontró estrechamente relacionadas a secuencias de aislados del continente americano en su mayoría, respaldados por una alta identidad con estas secuencias de referencia obtenidas del GenBank. Esta baja variabilidad genética entre los aislados encontrados en este estudio y los de América se debe a que el gen 18S rRNA, es un sitio altamente conservado por lo cual muestra un bajo nivel de diversidad en árboles filogenéticos (Simas et al., 2020), pero esto, los hace útiles tanto en la reconstrucción de la historia evolutiva de los organismos como en el análisis molecular, para reconocer los cambios de lugar y tiempo, gracias a que su ritmo evolutivo es lento (Adham et al., 2009). Esta cercanía con los aislados de América, principalmente Colombia, Uruguay y Brasil se debe al aumento del transporte del ganado que da lugar a la introducción de enfermedades como la babesiosis (Léger et al., 2013).

Capítulo VI: Conclusiones

En este estudio se identificó una única especie de garrapata, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, mediante caracterización morfológica y molecular, esta es la primera evidencia de la presencia de esta especie a 2 469 m.s.n.m. en el Ecuador.

Se determinó la presencia del género *Babesia* en 18.88% (27/143) de los bovinos mediante PCR al amplificar un fragmento de aproximadamente 400 pb del gen 18S rRNA, además, se pudo evidenciar la presencia de dos especies, *B. bovis* (13.29%) y *B. bigemina* (5.59%) al ser analizadas por la técnica RFLP con las enzimas de restricción HpaII y AluI, respectivamente.

Estadísticamente, se determinó que la edad es una variable dependiente en la presencia de *Babesia* spp., mientras que la raza y el sexo no guardan ninguna relación con la presencia de *Babesia*. Además, se definió que no existe diferencia significativa en la temperatura, PT y PCV, entre los animales positivos y negativos a *Babesia*.

El análisis filogenético mediante el método de máxima verosimilitud permitió la construcción de un árbol filogenético con el modelo T92 + G en el que se determinó que las secuencias de los aislados de *B. bovis* se encuentran estrechamente relacionados a un aislado de Brasil, mientras que *B. bigemina* estaba más emparentada con varios aislados de América.

Capítulo VII: Recomendaciones

Se recomienda que junto con la identificación morfológica se aplique estimaciones morfométricas de la estructura externa de las garrapatas para garantizar la identificación exacta de género y especie.

Para la identificación de especies de *Babesia* se recomienda diseñar primers y establecer protocolos de ensayos PCR específicos para reemplazar el uso de la técnica PCR-RFLP, ya que es un proceso extenso y requiere mayor gasto de recursos.

Se recomienda optimizar un protocolo de extracción de ADN de garrapatas que garantice la integridad de las muestras y la ausencia de contaminantes en las mismas, para obtener una mejor muestra de ADN útil para los ensayos PCR.

En la recolección de muestras de garrapatas obtenidas de los bovinos se recomienda extraer el espécimen completo sin desprender las piezas bucales ya que son necesarias para la identificación morfológica.

Dado el limitado número de secuencias genéticas específicas de *Babesia* disponibles en el GenBank, en particular, procedentes del ganado del Ecuador, se recomienda realizar más estudios que incorporen esta información a la base de datos mencionada.

Se recomienda realizar nuevos muestreos en los bovinos para determinar la prevalencia y factores de riesgo en otras fincas de la zona para conocer su situación epidemiológica y establecer mecanismos de tratamiento y control.

Capítulo VIII: Bibliografía

- Abdel-Latif, A., Osman, G. *Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. Plant Methods* 13, 1 (2017). <https://doi.org/10.1186/s13007-016-0152-4>
- Abubakar, M., & Perera, P. K. (2019). *Ticks and Tick-Borne Pathogens. BoD – Books on Demand.*
- Adham, F. K., Abd-El-Samie, E. M., Gabre, R. M. y Hussein, H. E. (2009). *Detection of tick blood parasites in Egypt using PCR assay I—Babesia bovis and Babesia bigemina. Parasitology Research*, 105(3), 721–730. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1443-8>
- Agencia de Control y Regulación Fito y Zoosanitario. (2013). *Resolución DAJ-2013461-0201.0214. Obtenido de Agrocalidad.*
- Allsopp, M. T. E. P., & Allsopp, B. A. (2006). *Molecular sequence evidence for the reclassification of some Babesia species. Annals of the New York Academy of Sciences*, 1081(1), 509–517. <https://doi.org/10.1196/annals.1373.076>
- Alvarez, J. A., Rojas, C., & Figueroa, J. V. (2019). *Diagnostic Tools for the Identification of Babesia sp. In Persistently Infected Cattle. Pathogens*, 8(3), 143. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030143>
- Amorim, L. S., Wenceslau, A. A., Carvalho, F. S., Carneiro, P. L. S. y Albuquerque, G. R. (2014). *Bovine babesiosis and anaplasmosis complex: Diagnosis and evaluation of the risk factors from Bahia, Brazil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 23(3), 328–336. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014064>
- Arboleda, M. (2019). *Diagnóstico molecular y prevalencia de Babesia spp. mediante PCR-RFLP en ganado bovino de la provincia de Manabí – Ecuador. [Tesis de pregrado, Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE].*
- Babes, V. (1888). *Sur l'hémoglobinurie bacterienne du boeuf. CR Acad. Sci*, 107, 692–694.
- Benavides, E., Romero, J. y Villamil, L. (2016). *Guía para el manejo de garrapatas y adaptación al cambio climático. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA).*

- Berg, H. (2012). *Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis—Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting*. En S. Magdeldin (Ed.), *Gel Electrophoresis—Principles and Basics*. InTech. <https://doi.org/10.5772/37724>
- Bock, R., Jackson, L., De Vos, A. y Jorgensen, W. (2004). *Babesiosis of cattle*. *Parasitology*, 129(S1), S247–S269. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005190>
- Carter, P. y Rolls, P. (2016). *Babesiosis*. *MSD Veterinary Manual*: <https://www.msdsvetmanual.com/circulatory-system/blood-parasites/babesiosis>
- Chauvin, A., Moreau, E., Bonnet, S., Plantard, O. y Malandrin, L. (2009). *Babesia and its hosts: Adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission*. *Veterinary Research*, 40(2), 37. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009020>
- Coetzer J.A.W., y Tustin R.C., Eds. (2004). *Infectious Diseases of Livestock, 2nd Edition*. Oxford University Press.
- Dubie, T. R., Grantham, R., Coburn, L. y Noden, B. H. (2017). *Pictorial Key for Identification of Immature Stages of Common Ixodid Ticks Found in Pastures in Oklahoma*. *Southwestern Entomologist*, 42(1), 1–14. <https://doi.org/10.3958/059.042.0101>
- Estrada, A. (2015). *Orden Ixodida: Las garrapatas*. *IDE@-SEA*, 13, 15.
- Fahrimal, Y., Goff, W. L., & Jasmer, D. P. (1992). *Detection of Babesia bovis carrier cattle by using polymerase chain reaction amplification of parasite DNA*. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(6), 1374–1379. <https://doi.org/10.1128/jcm.30.6.1374-1379.1992>
- Figuroa, J. V., Chieves, L. P., Johnson, G. S., & Buening, G. M. (1992). *Detection of Babesia bigemina-infected carriers by polymerase chain reaction amplification*. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(10), 2576–2582. <https://doi.org/10.1128/jcm.30.10.2576-2582.1992>
- 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)

Figueroa, J., Lira, J., Castañeda, R., Álvarez, J., Rojas, C. y Bautista, C. (2014). Optimización de una prueba de PCR-RFLP para detección y diferenciación de *Babesia* sp. en garrapatas *Rhipicephalus microplus*. *Entomología Mexicana* 1, 978-983.

Food and Agriculture Organization of the United Nation. (2013). *Unión Ganadera Regional de Jalisco*. Food & Agriculture Org.

Gallego-Lopez, G. M., Cooke, B. M. y Suarez, C. E. (2019). Interplay between Attenuation- and Virulence-Factors of *Babesia bovis* and Their Contribution to the Establishment of Persistent Infections in Cattle. *Pathogens*, 8(3), 97. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030097>

Ganzinelli, S., Benitez, D., Gantuya, S., Guswanto, A., Florin-Christensen, M., Schnittger, L. y Igarashi, I. (2020). Highly sensitive nested PCR and rapid immunochromatographic detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection in a cattle herd with acute clinical and fatal cases in Argentina. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(S2), 159–164.
<https://doi.org/10.1111/tbed.13435>

Goff, W. L., Johnson, W. C., Parish, S. M., Barrington, G. M., Tuo, W., & Valdez, R. A. (2001). The age-related immunity in cattle to *Babesia bovis* infection involves the rapid induction of interleukin-12, interferon- γ and inducible nitric oxide synthase mRNA expression in the spleen: Type-1 attributes of innate immunity in calves to *B. bovis*. *Parasite Immunology*, 23(9), 463–471. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2001.00402.x>

Gohil, S., Herrmann, S., Günther, S. y Cooke, B. M. (2013). Bovine babesiosis in the 21st century: Advances in biology and functional genomics. *International Journal for Parasitology*, 43(2), 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.09.008>

Gonzatti, M. I., González-Baradat, B., Aso, P. M. y Reyna-Bello, A. (2014). *Trypanosoma (Duttonella) vivax* and *Typanosomosis* in Latin America: Secadera/Huequera/Cacho Hueco. *En S. Magez &*

- M. Radwanska (Eds.), *Trypanosomes and Trypanosomiasis* (pp. 261–285). Springer Vienna.
https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1556-5_11
- Guglielmone, A. A., Aguirre, D. H., Späth, E. J. A., Gaido, A. B., Mangold, A. J. y de Ríos, L. G. (1992). Long-term study of incidence and financial loss due to cattle babesiosis in an Argentinian dairy farm. *Preventive Veterinary Medicine*, 12(3–4), 307–312.
[https://doi.org/10.1016/0167-5877\(92\)90058-N](https://doi.org/10.1016/0167-5877(92)90058-N)
- Guglielmone, A.A., Estrada-Peña, A., Keirans, J.E. y Robbins, R.G. (2003). Ticks (Acari: Ixodida) of the Neotropical Zoogeographic Region. *Universiteit Utrecht*.
- Guswanto, A., Allamanda, P., Mariamah, E. S., Munkjargal, T., Tuvshintulga, B., Takemae, H., Sivakumar, T., AbouLaila, M., Terkawi, M. A., Ichikawa-Seki, M., Nishikawa, Y., Yokoyama, N. y Igarashi, I. (2017). Evaluation of immunochromatographic test (ICT) strips for the serological detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection in cattle from Western Java, Indonesia. *Veterinary Parasitology*, 239, 76–79.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.04.010>
- Holman, P. J., Carroll, J. E., Pugh, R. y Davis, D. S. (2011). Molecular detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) from Tom Green County in central Texas. *Veterinary Parasitology*, 177(3–4), 298–304.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.11.052>
- Homer, M., Aguilar-Delfin, I., Telford III, S., Krause, P. y Persing, D. (2000). Babesiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 451–469.
- Hunfeld, K.-P., Hildebrandt, A. y Gray, J. S. (2008). Babesiosis: Recent insights into an ancient disease. *International Journal for Parasitology*, 38(11), 1219–1237.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.03.001>
- Iseki, H., Alhassan, A., Ohta, N., Thekisoe, O. M. M., Yokoyama, N., Inoue, N., Nambota, A., Yasuda, J., & Igarashi, I. (2007). Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification

- (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine *Babesia* parasites. *Journal of Microbiological Methods*, 71(3), 281–287. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.09.019>
- Jaimes-Dueñez, J., Triana-Chávez, O., Holguín-Rocha, A., Tobon-Castaño, A. y Mejía-Jaramillo, A. M. (2018). Molecular surveillance and phylogenetic traits of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* in cattle (*Bos taurus*) and water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Colombia. *Parasites & Vectors*, 11(1), 510. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3091-2>
- Jongejan, F. y Uilenberg, G. (2004). The global importance of ticks. *Parasitology*, 129(S1), S3–S14. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005967>
- Jumbo, J. (2018). Diagnóstico de *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma* spp. y *Babesia* spp. en 19 fincas ganaderas bovinas de la Isla Santa Cruz de la provincia de Galápagos, mediante las técnicas de ELISA y PCR. [Tesis de pregrado, Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE].
- Lack, J. B., Reichard, M. V., & Van Den Bussche, R. A. (2012). Phylogeny and evolution of the *Piroplasmida* as inferred from 18S rRNA sequences. *International Journal for Parasitology*, 42(4), 353–363. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.02.005>
- Léger, E., Vourc'h, G., Vial, L., Chevillon, C., & McCoy, K. D. (2013). Changing distributions of ticks: Causes and consequences. *Experimental and Applied Acarology*, 59(1–2), 219–244. <https://doi.org/10.1007/s10493-012-9615-0>
- Lempereur, L., Geysen, D., & Madder, M. (2010). Development and validation of a PCR–RFLP test to identify African (*Boophilus*) ticks. *Acta Tropica*, 114(1), 55–58. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.01.004>
- León, D. (2017). Prevalencia molecular de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en explotaciones ganaderas del sector sur de la provincia de Zamora Chinchipe, Ecuador. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Loja].
- Liu, A., Guan, G., Du, P., Gou, H., Liu, Z., Liu, J., Ma, M., Yang, J., Li, Y., Niu, Q., Ren, Q., Bai, Q., Yin, H. y Luo, J. (2012). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method based on two

species-specific primer sets for the rapid identification of Chinese Babesia bovis and B. bigemina. Parasitology International, 61(4), 658–663.

<https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.07.004>

Maya-Delgado, A., Madder, M., Benítez-Ortiz, W., Saegerman, C., Berkvens, D. y Ron-Garrido, L. (2020). *Molecular screening of cattle ticks, tick-borne pathogens and amitraz resistance in ticks of Santo Domingo de los Tsáchilas province in Ecuador. Ticks and Tick-Borne Diseases, 11(5), 101492.* <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101492>

Medina, V., Reyna, A., Tavares, L., Campos, A., Ron, J., Moyano, J., Jarrín, E., Sandoval, E. y Chávez, M. (2017). *Diagnóstico de los hemotrópicos Anaplasma marginale, Trypanosoma spp. Y Babesia spp. mediante las técnicas de ELISAi y PCR en tres fincas ganaderas de la provincia de Pastaza, Ecuador. Revista Científica, XXVII (3), 162-171.*

Monteiro, C. M. O., Araújo, L. X., Gomes, G. A., Senra, T. O. S., Calmon, F., Daemon, E., de Carvalho, M. G., Bittencourt, V. R. E. P., Furlong, J. y Prata, M. C. de A. (2014). *Entomopathogenic nematodes associated with essential oil of Lippia sidoides for control of Rhipicephalus microplus (Acari: Ixodidae). Parasitology Research, 113(1), 189–195.*

<https://doi.org/10.1007/s00436-013-3643-5>

Morel, N., Mastropaolo, M., de Echaide, S. T., Signorini, M. L., & Mangold, A. J. (2019). *Risks of cattle babesiosis (Babesia bovis) outbreaks in a semi-arid region of Argentina. Preventive Veterinary Medicine, 170, 104747.* <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104747>

Mosqueda, Olvera-Ramirez, Aguilar-Tipacamu y Canto. (2012). *Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis. Current Medicinal Chemistry, 19(10), 1504–1518.*

<https://doi.org/10.2174/092986712799828355>

Mtshali, M. y Mtshali, P. (2013). *Molecular diagnosis and phylogenetic analysis of Babesia bigemina and Babesia bovis hemoparasites from cattle in South Africa. BMC Veterinary Research, 9(1), 154.* <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-154>

- Norval, R. A. I., Fivaz, B. H., Lawrence, J. A. y Daillecourt, T. (1983). *Epidemiology of tick-borne diseases of cattle in Zimbabwe. I. Babesiosis. Tropical Animal Health and Production*, 15(2), 87–94. <https://doi.org/10.1007/BF02239802>
- Olmeda, A. S., Armstrong, P. M., Rosenthal, B. M., Valladares, B., del Castillo, A., de Armas, F., Miguelez, M., González, A., Rodríguez Rodríguez, J. A., Spielman, A. y Telford III, S. R. (1997). *A subtropical case of human babesiosis. Acta Tropica*, 67(3), 229–234. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(97\)00045-4](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(97)00045-4)
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2014). OIE. *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2014*: https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.04.02_Babesiosis%20bovina.pdf
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2016). *Situación zoonositaria: Ecuador*. https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Countryinformation/Animalsituation
- Polanco, D. N. y Ríos, L. A. (2016). *Aspectos biológicos y ecológicos de las garrapatas duras. Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 17(1), 81–95. https://doi.org/10.21930/rcta.vol17_num1_art:463
- Portilla, F. (2018). *Agroclimatología del Ecuador*. Editorial Universitaria Abya-Yala.
- Quiroz, H. (1990). *Parasitología*. Limusa S.A.
- Reyna-Bello, A. (2014). *Anaplasmosis bovina: logros y retos inmediatos*. En González, C., Madrid, N., Soto, E. *Logros & Desafíos de la Ganadería Doble Propósito (388-395)*. Fundación GIRARZ.
- Ríos Osorio, L. A., Zapata Salas, R., Reyes, J., Mejía, J. y Baena, A. (2010). *Estabilidad enzoótica de babesiosis bovina en la región de Puerto Berrío, Colombia. Revista Científica*, 20(5), 485–492.
- Rockett, J., Bosted, S. (2015). *Veterinary clinical procedures in large animal practice*. Cengage.
- Schnittger, L., Rodriguez, A. E., Florin-Christensen, M. y Morrison, D. A. (2012). *Babesia: A world emerging. Infection, Genetics and Evolution*, 12(8), 1788–1809. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.07.004>

- Scoles, G. A., Lohmeyer, K. H., Ueti, M. W., Bonilla, D., Lahmers, K. K., Piccione, J., & Rogovskyy, A. S. (2021). *Stray Mexico origin cattle captured crossing into Southern Texas carry Babesia bovis and other tick-borne pathogens. Ticks and Tick-Borne Diseases, 12(5), 101708.*
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101708>
- Simas, P. V. M., Bassetto, C. C., Giglioti, R., Okino, C. H., de Oliveira, H. N. y de Sena Oliveira, M. C. (2020). *Use of molecular markers can help to understand the genetic diversity of Babesia bovis. Infection, Genetics and Evolution, 79, 104161.*
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104161>
- Smith, T. & Kilborne, F. (1893). *Investigations into thpts. e nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever. Anim. Industr.U.S. Dept. Agric, 177-304.*
- Suarez, C. E., Alzan, H. F., Silva, M. G., Rathinasamy, V., Poole, W. A. y Cooke, B. M. (2019). *Unravelling the cellular and molecular pathogenesis of bovine babesiosis: Is the sky the limit? International Journal for Parasitology, 49(2), 183–197.*
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.11.002>
- Suarez, C. E. y 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>
- Vasco, K. (2013). *Estandarización de la técnica de análisis de fusión de alta resolución para la detección de Babesia en garrapatas utilizando polimorfismos de nucleótidos. Universidad Central del Ecuador.*
- Vecino, J. A. C., Echeverri, J. A. B., Cárdenas, J. A., & Herrera, L. A. P. (2010). *Distribución de garrapatas Rhipicephalus (Boophilus) microplus en bovinos y fincas del Altiplano cundiboyacense (Colombia). Ciencia & Tecnología Agropecuaria, 11(1), 73–84.*
https://doi.org/10.21930/rcta.vol11_num1_art:197

- Venzal, J. M., Castro, O., Cabrera, P. A., Souza, C. G. de., & Guglielmone, A. A. (2003). *Las garrapatas de Uruguay: especies, hospedadores, distribución e importancia sanitaria. Veterinaria (Montevideo)*, 38(150 - 151), 17–28.
- Vieira, L. L., Canever, M. F., Cardozo, L. L., Cardoso, C. P., Herkenhoff, M. E., Neto, A. T., Vogel, C. I. G. y Miletti, L. C. (2019). *Prevalence of Anaplasma marginale, Babesia bovis, and Babesia bigemina in cattle in the Campos de Lages region, Santa Catarina state, Brazil, estimated by multiplex-PCR. Parasite Epidemiology and Control*, 6, e00114.
<https://doi.org/10.1016/j.parepi.2019.e00114>
- Walker, A., Bouattour, A., Camicas, J., Estada-Peña, A., Horak, G., Latif, A., Pegram, R. y Preston, P. (2003). *Ticks of Domestic Animals in Africa: A Guide to Identification of Species. Bioscience Reports*.
- Yang, Y., Li, Q., Wang, S., Chen, X., & Du, A. (2016). *Rapid and sensitive detection of Babesia bovis and Babesia bigemina by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. Veterinary Parasitology*, 219, 71–76.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.02.004>
- Zhang, B., Sambono, J., Morgan, J., Venus, B., Rolls, P., & Lew-Tabor, A. (2016). *An Evaluation of Quantitative PCR Assays (TaqMan® and SYBR Green) for the Detection of Babesia bigemina and Babesia bovis, and a Novel Fluorescent-ITS1-PCR Capillary Electrophoresis Method for Genotyping B. bovis Isolates. Veterinary Sciences*, 3(3), 23.
<https://doi.org/10.3390/vetsci3030023>
- Zintl, A., Mulcahy, G., Skerrett, H. E., Taylor, S. M. y Gray, J. S. (2003). *Babesia divergens, a Bovine Blood Parasite of Veterinary and Zoonotic Importance. Clinical Microbiology Reviews*, 16(4), 622–636. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.4.622-636.2003>

Capítulo IX: Anexos