



**ESPE**

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

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

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

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

**TEMA:**

**Diagnóstico 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.**

**AUTOR: JUMBO MOREIRA, JIMMY RAPHAEL**

**DIRECTOR: PROAÑO PEREZ, FREDDY Ph.D.**

**SANGOLQUÍ**

**2018**



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

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

**CERTIFICACIÓN**

Certifico que el trabajo de titulación, “**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**” realizado por el señor **JIMMY RAPHAEL JUMBO MOREIRA**, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar al señor **JIMMY RAPHAEL JUMBO MOREIRA** para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 15 de febrero del 2018

Una firma manuscrita en tinta azul que parece leer 'Freddy Proaño Pérez'.

---

FREDDY PROAÑO PEREZ, Ph.D.  
**DIRECTOR**



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

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

### **AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD**

Yo, **JIMMY RAPHAEL JUMBO MOREIRA**, con cédula de identidad N° 1723777460, declaro que este trabajo de titulación “**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**” ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas.

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

Sangolquí, 15 de febrero del 2018

Una firma manuscrita en tinta azul que dice "Jimmy Jumbo".

-----  
**JIMMY RAPHAEL JUMBO MOREIRA**  
C.C: 1723777460



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

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

### **AUTORIZACIÓN**

Yo, **JIMMY RAPHAEL JUMBO MOREIRA**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación **“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”** cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, 15 de febrero del 2018

---

JIMMY RAPHAEL JUMBO MOREIRA  
C.C: 1723777460

## **DEDICATORIA**

A Dios porque con su infinita bondad y sabiduría guío y cuidó mis pasos durante todo el proceso de formación profesional.

A mis padres, Carmen y Jimmy porque son seres incomparables a los cuales admiro y respeto, con su apoyo incondicional, gran ejemplo de trabajo y constancia me inspiraron cada día a seguir adelante.

A mis hermanos Silvia y Angel porque son una de las razones mas importantes para anhelar la superación y a Lisset porque más que una hermana es una amiga que sabe brindar ayuda y palabras idóneas en situaciones difíciles.

A mi novia Brigitte porque siempre estuvo a mi lado en los momentos más difíciles y aunque no lo sabe, la admiro por el gran cúmulo de virtudes que posee.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE por brindarme la oportunidad de un desarrollo profesional integral, por los recursos otorgados para la realización de este trabajo, por la calidad humana con la que me relacioné y sobre todo por el sin número de experiencias que recopilé durante mi enriquecedora estadía en ella.

A Freddy Proaño Ph.D. por ser director y parte activa en el desarrollo de este trabajo, por sus consejos y colaboración en cada una de las etapas de este proyecto.

A Armando Reyna Ph.D. por las enseñanzas y la guía brindada durante todo el proceso.

A la Dra. María Augusta Chavez por sus consejos y su valiosa ayuda durante todo el tiempo que duró este trabajo.

A Jorge Ron Ph.D. por compartir su destacada experiencia y así contribuir con mi formación profesional.

A la Ing. Alicia Maya y los técnicos del Ministerio de Agricultura y Ganadería – Galápagos por su crucial colaboración en el inicio de este proyecto.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Biotecnología Animal que fueron parte de este trabajo, en especial a Cristina Cholota, Estefany Jarrin y Dayana Sandoval por ser una gran fuente de apoyo, personas inteligentes y trabajadoras a las cuales respeto y admiro.

Al Laboratorio de Inmunología y Virología por contribuir con recurso técnico a la realización de este trabajo.

## TABLA DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN .....	ii
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD .....	iii
AUTORIZACIÓN.....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTOS .....	vi
TABLA DE CONTENIDOS.....	vii
LISTADO DE TABLAS .....	xi
LISTADO DE FIGURAS .....	xii
LISTADO DE ANEXOS .....	xiii
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMEN.....	xvii
ABSTRACT .....	xviii
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Formulación del Problema.....	1
1.2. Justificación .....	2
1.3. Objetivos.....	4
1.1.1.....	4
1.3.1. Objetivo General del Proyecto .....	4
1.3.2. Objetivos Específicos.....	4
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO .....	5
2.1. Anaplasmosis.....	5
2.1.1. Generalidades .....	5
2.1.2. Distribución de <i>Anaplasma marginale</i> .....	5
2.1.3. Clínica .....	6
2.1.4. Respuesta inmunitaria .....	6
2.1.5. <i>Anaplasma marginale</i> .....	7
2.1.5.1. Taxonomía .....	7
2.1.5.2. Morfología .....	8
2.1.5.3. Características Moleculares .....	8
2.1.5.4. Ciclo biológico y transmisión .....	9
2.1.5.5. Proteínas principales de Superficie (MSP) .....	10
2.1.5.6. Control y tratamiento .....	11

2.2.	Trypanosomosis.....	11
2.2.1.	Generalidades .....	11
2.2.2.	Distribución.....	12
2.2.3.	Clínica .....	13
2.2.4.	Respuesta inmunitaria .....	14
2.2.5.	Control y tratamiento .....	14
2.2.6.	<i>Trypanosoma evansi</i> .....	15
2.2.6.1.	Taxonomía .....	15
2.2.6.2.	Morfología .....	16
2.2.6.3.	Características Moleculares .....	17
2.2.6.4.	Transmisión.....	17
2.2.7.	<i>Trypanosoma vivax</i> .....	18
2.2.7.1.	Taxonomía .....	18
2.2.7.2.	Morfología .....	18
2.2.7.3.	Características Moleculares .....	19
2.2.7.4.	Ciclo biológico y transmisión .....	20
2.3.	Babesiosis .....	20
2.3.1.	Generalidades .....	20
2.3.2.	Distribución.....	21
2.3.3.	Clínica .....	21
2.3.4.	Respuesta inmunitaria .....	22
2.3.5.	Ciclo biológico y transmisión .....	23
2.3.6.	Tratamiento .....	26
2.3.7.	<i>Babesia bovis</i> .....	27
2.3.7.1.	Taxonomía .....	27
2.3.7.2.	Morfología .....	27
2.3.7.3.	Características Moleculares .....	28
2.3.8.	<i>Babesia bigemina</i> .....	28
2.3.8.1.	Taxonomía .....	28
2.3.8.2.	Morfología .....	29
2.3.8.3.	Características Moleculares .....	29
2.4.	Métodos de Diagnóstico .....	29
2.4.1.	Métodos directos .....	29
2.4.1.1.	Frotis de sangre .....	29
2.4.1.2.	Prueba WOO.....	30

2.4.1.3.	Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) .....	30
2.4.2.	Métodos Indirectos .....	31
2.4.2.1.	ELISA .....	31
2.4.2.1.1.	ELISA competitivo .....	31
2.4.2.1.2.	Elisa Indirecto .....	32
2.4.2.2.	Prueba de aglutinación en placa.....	32
2.4.2.3.	Inmunofluorescencia indirecta .....	33
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS .....		35
3.1.	Tamaño de la muestra.....	35
3.2.	Selección de predios .....	36
3.3.	Selección de animales.....	36
3.4.	Toma de muestra de sangre .....	37
3.5.	Procedimiento de extracción de sangre periférica .....	37
3.6.	Obtención de suero. ....	37
3.7.	ELISA indirecto para <i>Trypanosoma</i> spp. ....	38
3.8.	Determinación de punto de corte .....	39
3.9.	Extracción de ADN total .....	39
3.10.	Cuantificación de ADN.....	39
3.11.	Determinación de Calidad de ADN .....	39
3.12.	PCR para detección de <i>Anaplasma marginale</i> .....	40
3.13.	PCR para detección de <i>Babesia</i> spp.....	41
3.14.	Análisis Estadístico .....	42
3.14.1.	Diseño no experimental.....	42
3.14.2.	Variable de respuesta .....	42
3.14.3.	Error aleatorio .....	43
3.14.4.	Análisis.....	43
3.14.5.	Estadística descriptiva .....	43
3.14.6.	Datos de prevalencia .....	43
3.14.7.	Datos de ELISA indirecto .....	44
3.14.8.	Datos de PCR .....	44
3.14.9.	Estadística inferencial .....	44
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....		45
4.1.	ELISA indirecto para <i>Trypanosoma</i> spp. ....	46
4.2.	Gradiente de temperatura de alineamiento de PCR <i>Anaplasma marginale</i> . ....	48
4.3.	Amplificación de fragmentos mediante PCR .....	49

4.4.	Prevalencia de Hemoparásitos en la Isla Santa Cruz.....	51
4.5.	Prevalencias por UPA.....	54
4.6.	Prevalencia por sectores. ....	56
4.7.	Diferencias de Temperatura.....	56
4.8.	Prevalencia por Sexo .....	59
4.9.	Prevalencia por Raza .....	60
4.10.	Prevalencia por edades.....	61
4.11.	Presencia de Vectores. ....	64
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		66
5.1.	Conclusiones.....	66
5.2.	Recomendaciones .....	67
REFERENCIAS .....		68

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> <i>Cálculo del tamaño muestral</i> .....	35
<b>Tabla 2</b> <i>Resumen de muestreo por UPA</i> .....	36
<b>Tabla 3</b> <i>Protocolo de la técnica ELISA indirecta para la detección de IgG de Trypanosoma spp.</i> .....	38
<b>Tabla 4</b> <i>Componentes de PCR para detección de Anaplasma marginale</i> .....	40
<b>Tabla 5</b> <i>Condiciones de amplificación por PCR para la detección de Anaplasma marginale</i> .....	40
<b>Tabla 6</b> <i>Componentes de PCR para detección de Babesia spp</i> .....	41
<b>Tabla 7</b> <i>Condiciones de amplificación por PCR para la detección de Babesia spp</i> .....	41
<b>Tabla 8</b> <i>Utilización de Go taq flexi (Promega) y Taq Platinum (Invitrogen).</i> .....	47
<b>Tabla 9</b> <i>Prevalencia de Hemoparásitos en la isla Santa Cruz</i> .....	51
<b>Tabla 10</b> <i>Infecciones por animal</i> .....	54
<b>Tabla 11</b> <i>Prevalencia de Anaplasma marginale y Babesia spp. por UPA</i> .....	55
<b>Tabla 12</b> <i>Prevalencia por sectores</i> .....	56
<b>Tabla 13</b> <i>Temperatura media de individuos positivos y negativos para A. marginale y Babesia spp.</i> .....	57
<b>Tabla 14</b> <i>Prevalencia de A. marginale y Babesia spp. por sexo.</i> .....	59
<b>Tabla 15</b> <i>Prevalencia de A. marginale y Babesia spp. por raza</i> .....	60

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Eritrocitos infectados con <i>A. marginale</i> . .....	8
<b>Figura 2</b> Transmisión y Ciclo biológico de <i>A. marginale</i> . .....	10
<b>Figura 3</b> Forma kinetoplastica de <i>Trypanosoma evansi</i> .....	16
<b>Figura 4</b> Forma akinetoplastica de <i>Trypanosa evansi</i> .....	17
<b>Figura 5</b> Forma adulta de <i>Trypanosoma vivax</i> durante división. ....	19
<b>Figura 6</b> Ciclo de vida de <i>Babesia bigemina</i> , en el ganado y en la garrapata <i>Rhipicephalus</i> <i>microplus</i> . .....	25
<b>Figura 7</b> Distribución de absorbancias en ensayo de ELISA indirecto para <i>Trypanosoma</i> spp. .....	46
<b>Figura 8</b> Gradiente de temperatura de PCR del gen <i>msp5</i> de <i>A. marginale</i> .....	48
<b>Figura 9</b> Amplificación del fragmento del gen <i>msp5</i> de las muestras 57, 62, 70, 75, 98, 150, 160.....	49
<b>Figura 10</b> Amplificación del fragmento del gen 18Ss-rRNA de las muestras 9, 74, 144.....	50
<b>Figura 11</b> Amplificación del fragmento del gen 18Ss-rRNA de las muestras positivas.....	51
<b>Figura 12</b> Prevalencia por incremento de temperatura. ....	57
<b>Figura 13</b> Prevalencia por edades. ....	61
<b>Figura 14</b> Prevalencia y Media de Edad por Sectores.....	63

## **LISTADO DE ANEXOS**

**ANEXO A: ABSORBANCIAS DE ELISAi *Trypanosoma spp.***

**ANEXO B: CUANTIFICACIÓN DE ADN**

**ANEXO C: REVELADOS DE BANDAS DE PCR**

**ANEXO D: RESULTADOS PCR Y ELISA**

**ANEXO E: TABULACIÓN ENCUESTA**

**ANEXO F: REGISTRO DE TOMA DE MUESTRAS SANGUINEAS**

## LISTADO DE ABREVIATURAS

**(CN)** = Control positivo

**(CP)** = Control negativo

**ABTS**= 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, 2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate (6)], AzBTS-(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, Diammonium 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate), azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate (6)], 2,2' (Cromógeno)

**ADN**= Ácido desoxiribonucleico

**Ana19A**= Cebador directo para *Anaplasma*

**Ana19B**= Cebador reverso para *Anaplasma*

**ARNr**= ARN ribosomal

**bp**= Pares de bases

**Ct**= Positivos totales

**dNTPs**= Desoxiribonucleótidos trifosfato

**EDTA**= Ácido etilendiaminotetraacético

**ELISA**= Ensayo de Inmunoabsorción ligado a enzima

**ELISAc**= Ensayo de Inmunoabsorción ligado a enzima competitivo

**HCl**= Ácido clorhidrico

**HRP**= Enzima peroxidasa de rabano

**IgG**= Inmunoglobulina G

**Kbp**= Kilo pares de base

**KDNA**= ADN mitocondrial

**Kg**= Kilogramo

**mg**= miligramo

**mL**= mililitros

**MSP**= Proteína principal de superficie

**N**= tamaño de la población

**n**= tamaño muestra

**NaCl**= cloruro de sodio

**ng**= nanogramos

**nm**= nanómetro

**Nt**= Total de animales muestreados

**OIE**= Organización mundial para la Salud Animal

**p**= prevalencia esperada del parámetro a evaluar, en caso de desconocerse ( $p = 0.5$ ), que hace mayor el tamaño de la muestra

**PBS**= Buffer fosfato salino

**PBS-T**= Buffer fosfato salino mas Tween

**PCR**= Reacción de cadena de polimerasa

**pH**= Concentración de iones  $H^+$ , medida de acides o basicidad de una disolución

**PIRO A**= cebador directo para apicomplexas

**PIRO B**= cebador reverso para apicomplexas

**q**=  $1 - p$  (si  $p = 70\%$ ,  $q = 30\%$ )

**rpm**= revoluciones por minuto

**Se<sup>2</sup>**= Error estándar

**Spp.**= especie

**Taq**= *Thermus aquaticus*

**UV**= Luz ultra violeta

**z**= valor correspondiente a la distribución de gauss,  $z_{\alpha=0.05} = 1.96$  y  $z_{\alpha=0.01} = 2$ .

**$\mu\text{L}$** = microlitros

**$\mu\text{m}$** = micrometro

**$\mu\text{M}$** = microMolaridad

## RESUMEN

La infección causada por los hemoparasitos *Anaplasma marginale*, *Babesia* spp. y *Trypanosoma* spp. provocan anemia severa, bajas en la producción e incluso la muerte de los bovinos; además su presencia podría poner en riesgo especies endémicas de las Islas Galápagos. El objetivo de este estudio fue identificar, *Anaplasma marginale*, *Babesia* spp. y *Trypanosoma* spp. en bovinos de la Isla Santa Cruz de la Provincia de Galápagos, mediante las técnicas de ELISA y PCR. En total se recolectaron 170 muestras procedentes de 19 fincas ganaderas, las cuales fueron analizadas mediante ELISA indirecto para identificar anticuerpos anti *Trypanosoma*, se aplicó PCR para amplificar fragmentos del gen *msp 5* de *Anaplasma marginale* y del gen *18Ss-rRNA* de *Babesia* spp. Los resultados del ELISA no detectaron casos de Trypanosomosis; sin embargo, la PCR detectó una prevalencia del 67,06% para *A. marginale* y 25,88% para *Babesia* spp. relacionada en gran medida a infecciones persistentes. El 18.82% de los bovinos presentó doble infección y el 54,71% tenía al menos una infección. La aplicación de una encuesta permitió constatar presencia de garrapatas en el 100% de las fincas. En conclusión, este estudio revela una alta prevalencia de *Anaplasma marginale* y *Babesia* spp. La positividad de ambas infecciones tiende a decrecer a medida que aumenta la edad del animal, la raza no fue un factor que eleva la susceptibilidad a las infecciones. Es necesario implementar medidas de control de estas enfermedades en las fincas de la Isla Santa Cruz.

### Palabras clave:

- **PREVALENCIA**
- **PCR**
- **ELISAI**

## **ABSTRACT**

Infection caused by the parasites, *Anaplasma marginale*, *Babesia* spp. and *Trypanosoma* spp. cause severe anemia, low production and even death of cattle; In addition, its presence could endanger endemic species in the Galapagos Islands. The objective of this study was to identify, *Anaplasma marginale*, *Babesia* spp. and *Trypanosoma* spp. in bovines of the Santa Cruz Island, province of Galápagos, using ELISA and PCR techniques. In total, 170 samples were collected from 19 cattle ranches, which were analyzed by indirect ELISA to identify anti-*Trypanosoma* antibodies, PCR was applied to amplify fragments of *msp 5* gene of *Anaplasma Marginale* and 18Ss-rRNA gene of *Babesia* spp. The ELISA results did not detect cases of Trypanosomosis; however, PCR detected a prevalence of 67.06% for *A. marginale* and 25.88% for *Babesia* spp. related to persistent infections. 18.82% of bovines showed double infection and 54.71% had at least one infection. The application of a survey allowed to verify the presence of ticks in 100% of the farms. In conclusión, this study reveals a high prevalence of *Anaplasma marginale* and *Babesia* spp. The positivity of both infections tends to decrease as the age of the animal increases, race was not a factor that raises the susceptibility to infections. It is necessary to implement measures to control these diseases in the farms of Santa Cruz Island.

### **Key words:**

- **PREVALENCE**
- **PCR**
- **ELISAI**

## CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

### 1.1. Formulación del Problema

Las islas Galápagos es uno de los pocos archipiélagos del mundo que aún conserva la mayoría de sus especies naturales, sin embargo, su biodiversidad está claramente amenazado por diferentes factores, entre ellos el alto incremento de especies invasivas como los bovinos e incluso los humanos, además de los insectos y enfermedades no nativas que se han instaurado en este diverso ecosistema y que amenazan su mantenimiento, una de las actividades de presión sobre los ecosistemas es el desarrollo de la población humana, el Gobierno Ecuatoriano ha tomado medidas para fomentar un desarrollo sostenible de la población humana en las islas (Tye, Snell, Peck, & Adsersen, 2002).

El desarrollo de una ganadería sostenible está ligado al mejoramiento de la calidad de vida y el desarrollo humano, por tanto tomar medidas para mejorar la sanidad de los hatos ganaderos del archipiélago resulta indispensable para contribuir al incremento de la sostenibilidad de la ganadería. Según las directrices de control de enfermedades en animales de la OIE (2014) para realizar un plan de manejo de una enfermedad se debe conocer la situación de dicha enfermedad en la zona de implementación.

Las enfermedades producidas por los hemoparasitos, *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Trypanosoma vivax* y *Trypanosma evansi* afectan directamente al ganadero porque causan pérdidas económicas ya sea en producciones de carne, leche o doble propósito (Radostits et al., 2006), en la Isla Santa Cruz no se conoce el estatus sanitario en bovinos de ninguna de las enfermedades producidas por los patógenos ya mencionados.

## 1.2. Justificación

*Anaplasma marginale*, *Trypanosoma vivax*, *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* son los parásitos hemotrópicos de interés en Latinoamérica, las características clínicas comunes de estos parásitos es fiebre y anemia en el hospedero bovino y biológicamente tienen un tropismo por la sangre, son de relevancia porque causan importantes pérdidas económicas y a pesar de ello están subestimadas y a su vez sobrevalorados probablemente por la falta de conocimiento de las personas al frente de los hatos ganaderos (Reyna-Bello, 2014). Solo para el caso de *Anaplasma marginale* las pérdidas en la industria bovina vienen dadas por bajas de producción ya sea de leche o carne, abortos, medidas preventivas como el control de vectores y gastos en quimioterapias, una estimación realizada en 1977 indicó que el gasto a causa de este patógeno fue de 875 millones de dólares sólo en Latinoamérica (Radostits et al., 2006).

Los problemas causados por parásitos del género *Trypanosoma* spp. en el ámbito ganadero son bastante considerables, en el caso de *Trypanosoma vivax* no solo causa disminución de la producción de leche y carne si no que en casos clínicos severos puede ocasionar la muerte, se estima que en África el manejo y control de este patógeno cuesta alrededor de 1340 millones de dólares cada año y en Sur América se gastan 160 millones de dólares anualmente a causa de esta enfermedad (Radostits et al., 2006).

La babesiosis bovina es de relevancia económica porque ocasiona pérdidas de producción muy marcada en la industria ganadera, además es una enfermedad que provoca largos periodos de convalecencia en los animales infectados (Radostits et al., 2006). *Babesia* spp. no solo tiene

importancia por las afectaciones que ocasiona en animales domésticos y salvajes sino también por las posibles zoonosis que se pueden dar (Homer et al., 2000).

Tener una base de información de los organismos patógenos es una herramienta para el control de estos y consecuentemente para la mejora de la productividad de una industria pecuaria, pero dado que el lugar en donde se desarrolla la actividad ganadera se trata de las Islas Galápagos, el tema se torna más delicado por ser un ecosistema frágil y de gran importancia ecológica, es por ello que el control de patógenos introducidos toma gran importancia ya que conocerlos implica que se puede dar un manejo eficiente y por ende evitar posibles problemas que involucren a la fauna silvestre.

## 1.3. Objetivos

### 1.3.1. Objetivo General del Proyecto

- Diagnosticar *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma* spp. y *Babesia* spp. en 19 fincas ganaderas bovinas de la Isla Santa Cruz, Provincia de Galápagos, mediante las técnicas de ELISA y PCR.

### 1.3.2. Objetivos Específicos

- Evaluar la presencia de *Anaplasma marginale* en muestras de sangre de ganado bovino mediante PCR.
- Detectar anticuerpos IgG contra *Trypanosoma* spp. en suero de ganado bovino mediante ELISA indirecto.
- Estimar la presencia de *Babesia* spp. en muestras de sangre de ganado bovino mediante PCR.
- Estimar la prevalencia de *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma* spp. y *Babesia* spp. en la población de ganado bovino de la isla Santa Cruz, Provincia de Galápagos.

## CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

### 2.1. Anaplasmosis

#### 2.1.1. Generalidades

El término “Anaplasma marginal” fue acuñado por Sir Arnold Theiler en 1910, encontró puntos junto a la membrana de eritrocitos de ganado enfermo en Sudáfrica y los reportó como un protozooario (Kocan et al., 2010). Fue en 1972 que Kreier & Ristic mediante tinción Gram reportaron al microorganismo como una bacteria (Reyna-Bello, 2014). *Anaplasma marginale* es una bacteria patógena intracelular que parasita a los eritrocitos tanto en animales domésticos como en animales salvajes, la infección de esta bacteria en bovinos causa anaplasmosis bovina, esta enfermedad se presenta con efectos clínicos que van desde leves a severos causando hemolisis y por ende disminución de los glóbulos rojos (anemia)(Kocan et al., 2010).

#### 2.1.2. Distribución de *Anaplasma marginale*.

Este patógeno tiene una distribución mundial, hay presencia de *Anaplasma marginale* desde Estados Unidos, Sur América, África, Europa, Asia y Australia, y es endémica en las zonas tropicales y subtropicales donde también lo es su vector (garrapata) (Radostits et al., 2006)

No hay estudios de prevalencia de la Rickettsia que abarque todo el país, en la provincia de Zamora Chinchipe Muñoz y col. (2014) reportaron una prevalencia del 49.5% mediante observación de frotis sanguíneos con microscopia de luz, en la región Costa hay reportes de la zona central del Litoral que indican prevalencias en bovinos del 85.48% mediante PCR anidada

(Escobar et al., 2015), por otra parte Navarrete (2016) reportó un 67% de seroprevalencia en los bovinos faenados en el Camal Metropolitano de Rastro de Quito. En la region Insular Se realizó un estudio de la seroprevalencia de *Anaplasma marginale* en las tres islas principales donde hay presencia de bovinos en la Provincia de Galápagos, la Isla Isabela, la Isla Santa Cruz y la Isla San Cristobal donde las prevalencias fueron de 67.4%, 64.1% y 60.9% respectivamente (Monroy, 2015).

### **2.1.3. Clínica**

La única célula que infecta *Anaplasma marginale* son los eritrocitos, en una infección aguda hasta el 70% de los eritrocitos pueden estar invadidos, el periodo de incubación de la anaplasmosis oscila entre los 7 y 60 días con promedio de 28 días dependiendo del número de organismos en la dosis infectiva, los síntomas clínicos pueden incluir fiebre, pérdida de peso, abortos, letargia, ictericia y en animales mayores a los dos años puede ocasionar la muerte (Kocan et al., 2003). La anemia se presenta por que los eritrocitos infectados son fagocitados y esto resulta en ictericia pero no se presenta hemoglobinemia ni hemoglobinuria (Kocan, Blouin, & Barbet, 2000). Los animales que se recuperan de una infección aguda se mantienen persistentemente infectados con ciclos repetidos de rickettsemias bajos (Radostits et al., 2006).

### **2.1.4. Respuesta inmunitaria**

Los animales que superan una infección aguda adquieren una inmunidad a largo plazo, la revisión realizada por Kocan et al., (2010) explica un modelo de inmunización en donde la

presentación del patógeno es realizada por anticuerpos que reconocen epitopes de superficie en combinación con activación de macrófagos que mejoran la fagocitosis de eritrocitos infectados, el eje principal de este modelo se centra en la expresión del INF- $\gamma$  por los linfocitos T CD<sup>4</sup> lo cual mejora la síntesis de opsoninas bovinas que no son otra cosa que IgG de la sub clase IgG2, y a la par la activación de macrófagos incrementa la expresión de receptores, la fagocitosis, la fusión fagolisosomal y la liberación de óxido nítrico. por otro lado, el fenómeno de infección – exclusión también forma parte de la batería de defensa ante reinfecciones, esto se basa en que una única cepa de *A. marginale* puede estar en un individuo, aunque Kocan et al., (2010) menciona que estudios recientes indican que este fenómeno no ocurre con cepas filogenéticamente muy lejanas.

### ***2.1.5. Anaplasma marginale***

#### **2.1.5.1. Taxonomía**

La clasificación taxonómica de *Anaplasma marginale* se presenta a continuación (Kocan et al., 2003):

**Super Reino:** Bacteria

**Clase:** Proteobacteria

**Subclase:** Alfa

**Orden:** Rickettsiales

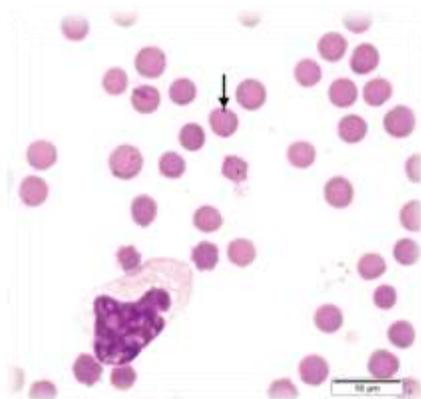
**Familia:** Anaplasmataceae

**Género:** *Anaplasma*

**Especie:** *Anaplasma marginale*

### 2.1.5.2. Morfología

*Anaplasma marginale* es una bacteria Gram negativa intracelular obligada que se une a la membrana celular dentro del citoplasma del eritrocito formando cuerpos de inclusión de entre 4 y 8 rickettsias (Kocan et al., 2010; McVey, Kennedy, & Chengappa, 2013).



**Figura 1.** Eritrocitos infectados con *A. marginale*.

Fuente: McVey et al., 2013

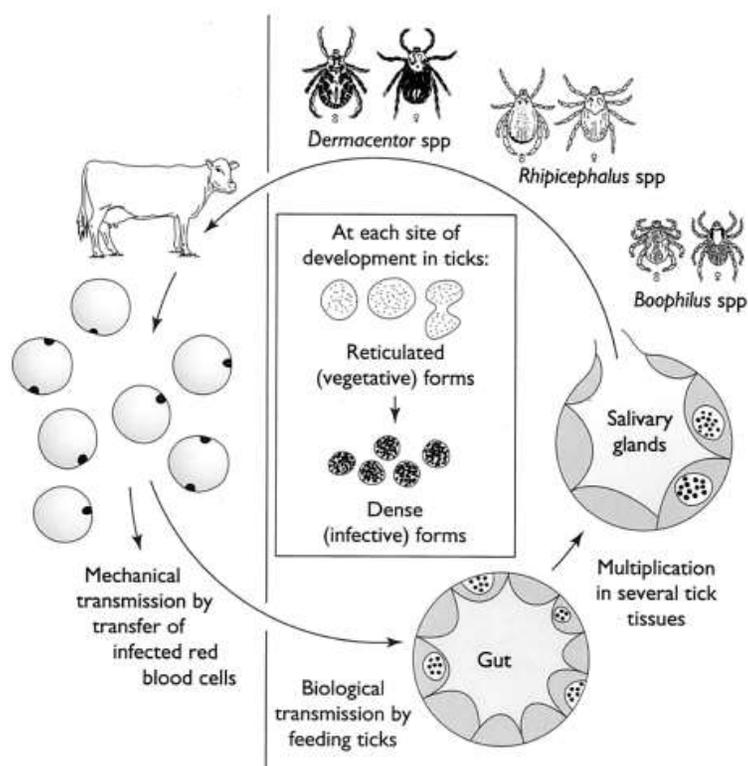
### 2.1.5.3. Características Moleculares

Kocan et al., (2010) menciona que la cepa St. Maries de *Anaplasma marginale* fue secuenciada y se conoce que tiene en total de 1,197,687 pares de base en su genoma con 949 secuencias codificantes, se predice que 62 de ellas codifican para proteínas de membrana y que 49 pertenecen a las super familia de genes *msh1* y *msh2*.

#### 2.1.5.4. Ciclo biológico y transmisión

El ciclo biológico de *Anaplasma marginale* es muy complejo y está coordinado con el ciclo de alimentación del vector garrapata, se conoce que los eritrocitos infectados tomados en la succión de sangre son la fuente de infección de las células intestinales de las garrapatas en donde se divide por fisión binaria e invade otros tejidos entre ellos las glándulas salivales, de donde vuelve a infectar al hospedero en la próxima alimentación, *A. marginale* muestra dos formas, reticulada o vegetativa en la cual se divide y la forma densa o infectiva, en esta última, la bacteria es capaz de sobrevivir fuera de la célula hospedero por un periodo limitado de tiempo (Kocan et al., 2010).

La infección biológica de esta Rickettsia se da mediante garrapatas la cual forma parte de su ciclo de desarrollo donde se ha demostrado que existe una transmisión intraestadial (dentro del estadio) y tranestadial (de estadio a estadio) mas no parece ocurrir una transmisión transovarica, pero además la transmisión en el hospedero bovino se puede dar mecánicamente por medio de fómites contaminados como agujas, instrumentos de descorne, pinzas de nariz, instrumentos de tatuaje, herramientas de castración entre otros y tambien por moscas hematófagas del género *Tabanus* y *Stomoxys* además puede ocurrir transmisión transplacentaria (Kocan et al., 2003). En América Central y del Sur la ruta de diseminación no se da mediante el vector garrapata ya que la garrapata del ganado del trópico (*Boophilos microplus*) no parece ser el vector biológico de *Anaplasma marginale* (Kocan et al., 2010).



**Figura 2** Transmisión y Ciclo biológico de *A. marginale*.

Fuente: Kocan et al., 2003

#### 2.1.5.5. Proteínas principales de Superficie (MSP)

Las proteínas de superficie mayor MSP por sus siglas en inglés (Major surface protein) son de importancia porque interactúan con la célula huésped, entre ellas hay proteínas de adhesión y MSPs de familias multigénicas. En estas proteínas se dan cambios antigénicos que contribuyen a mantener la persistencia del patógeno, por ser de naturaleza antigénica los genes que codifican para estas proteínas están sometidos a una fuerte presión evolutiva por lo que se sabe que no son un buen marcador para estudios biogeográficos sin embargo pueden proveer información para comparación de cepas en regiones específicas y para estimar relación evolutiva entre patógeno – hospedero y patógeno - vector (Kocan et al., 2010).

### **2.1.5.6. Control y tratamiento**

La droga más efectiva para contrarrestar la infección en el ganado bovino es el antibiótico Tetraciclina, además se emplea la vacunación y el control de los vectores para reducir el contagio (McVey et al., 2013), la tetraciclina es un antibiótico que actúa como bacteriostático uniéndose a los ribosomas y al mRNA inhibiendo la síntesis de proteína (Kocan et al., 2010), las infecciones agudas son tratadas con oxitetraciclina a una dosis de 6 a 10 mg por Kg de peso vivo durante tres días o una dosis de 20 mg por kg de peso vivo de oxitetraciclina de larga acción vía intramuscular, otra droga utilizada para el tratamiento de la fase aguda de *A. marginale* es dipropionato de imidocard a una dosis de 2 a 3 mg por kg de peso vivo por vía intramuscular (Kocan et al., 2010; Radostits et al., 2006).

Existen vacunas vivas y muertas, pero la más ampliamente usada es la vacunación con *Anaplasma centrale* que es una cepa que no presenta patogenicidad en bovinos, (OIE, 2004), la vacunación contra *A. marginale* ya sea con vacuna viva o muerta genera inmunidad protectora y previene los casos clínicos mas no impide que los animales lleguen a estar persistentemente infectados (Kocan et al., 2010).

## **2.2. Trypanosomosis**

### **2.2.1. Generalidades**

La trypanosomosis en bovinos es causada por parásitos protozoarios de género *Trypanosoma*, estos fueron reportados por primera vez en el continente Africano y llegó a América con la introducción de ganado bovino y equino proveniente de dicho continente (Desquesnes, 2004). La

trypanosomosis causada por *T. evansi* es conocida como zurra en África, mal de caderas en Brasil, murrina en América Central y como Derrenguera en Venezuela su principal hospederos mamíferos son los camélidos y los caballos, aunque también infecta bovinos pero su patogenicidad es menor (Desquesnes, 2004). La Trypanosomosis causada por *T. vivax* es conocida como Nagana en África y como Secadera, Huequera o Cacho hueco en América del Sur (Gonzatti et al., 2014).

### **2.2.2. Distribución**

*T. vivax* está presente en gran parte de África y fue introducido en Sur América pero no se sabe con exactitud el lugar y hace que tiempo, se sabe por estudios morfométricos y de ADN que la el origen de *T. vivax* está en el Oeste de África, ya que está más relacionada con esas cepas que con las del Este, el primer reporte de *T. vivax* fue en las Guayanas Francesas y posteriormente se reportaron en otros países como Venezuela, Colombia, Brasil, Bolivia entre otros (Jones & Dávila, 2001). *T. evansi* por otra parte, tiene una distribución más extendida, este se encuentra en África, América Latina y Asia e incluso en Europa y Australia pero en los últimos casos se logró su erradicación (Desquesnes et al., 2013).

La presencia de *Trypanosoma* en Colombia data del siglo XVI, en Brasil se lo reportó en la Isla Maranjo en 1827 posteriormente en el mismo país en el año 1850 fue reportado en el área Pantanal, después de ello hubo brotes en Bolivia, Venezuela, Guayanas y Colombia (Desquesnes, 2004). No existe datos exactos de la prevalencia de *Trypanosoma* spp. a nivel de país, pero un estudio realizado a nivel de hatos indican que la seroprevalencia promedio de un muestreo realizado en dos predios de Santo Domingo de los Tsachilas y en el Camal Metropolitano de Quito es de 58% en

promedio (González, 2016). Un reporte realizado por Parker, Whiteman, & Miller (2006) indica que se recolectó muestras de halcón en la Isla Santiago en la provincia de Galápagos y se las analizó mediante secuenciación del gen RNA ribosomal de la subunidad pequeña 18S del protozoario y se encontró que no era ninguna especie antes reportada.

### 2.2.3. Clínica

Los síntomas causados por una infección de *Trypanosoma* son anemia, lagrimeo, hipertrofia de los nódulos linfáticos y edema seguido de pérdida de peso y debilidad, en casos agudos severos puede causar la muerte, la especie de mayor trascendencia para el ganado bovino en Sur América es *Trypanosoma vivax* y para caballos es *Trypanosoma evansi* (Desquesnes, 2004).

La patogénesis descrita para *T. vivax* indica que los principales signos clínicos son anemia progresiva acompañado de pérdida de peso, edema sublingual y en la papada y lagrimeo, en los casos más severos ocasiona paresia de los cuartos traseros, los signos hemorrágicos observados en el Este y Oeste de África no han sido reportados en América (Desquesnes, 2004). Por otra parte *T. evansi* presenta menor patogenicidad en animales de granja y está menos documentado, en Latinoamérica los más afectados son los caballos, el impacto en los bovinos varía mucho dependiendo la cepa con la que se infecta, las cepas aisladas en Sur América no parecen ser infectivas al menos durante los primeros 5 meses de infección (Desquesnes, 2004).

#### **2.2.4. Respuesta inmunitaria**

Los animales que se recuperan de una infección con una cepa de *T. vivax* no son inmunes a una nueva infección con otra cepa, esto se debe a la habilidad del parásito para cambiar fácilmente la capa de antígenos en la superficie en un proceso llamado variación antigénica, la capa de glicoproteínas de superficie es continuamente reemplazada en un mecanismo aun poco entendido pero que probablemente es inducido por anticuerpos. Durante un pico de parasitemia una mezcla antigénica está presente pero el antígeno dominante es el que determina la respuesta de anticuerpos específicos, estos anticuerpos acaban con la población dominante dejando otros antígenos dominantes, estos se multiplican continuando así el ciclo hasta que el animal muere o hasta que el sistema inmune del animal se equilibra con el parásito y se recupera (Radostits et al., 2006). En el caso de *T. evansi* ocurre también el mismo mecanismo para burlar el sistema inmune, también se da una variación antigénica en las glicoproteínas de superficie al igual que *T. vivax* pero además ocurre un fenómeno de inmunosupresión en el hospedero, este mecanismo no genera un efecto clínico muy fuerte pero le permite multiplicarse y pasar desapercibido ante el sistema inmune (Desquesnes et al., 2013).

#### **2.2.5. Control y tratamiento**

La mitigación de los vectores mediante baños insecticidas es una medida ampliamente utilizada para controlar la enfermedad (Radostits et al., 2006), además existen drogas trypanocidas, entre las más utilizadas se encuentra Diminaceno acetura y cloruro de isomethamidium, el tratamiento con Diminazene aceturate 4,40 (azoamino) dibenzamidine se lo aplica intramuscularmente a una dosis

de 3.3 a 7 mg por kg de peso vivo, el mecanismo de acción no está totalmente claro pero parece bloquear la replicación de DNA mitocondrial y la síntesis de poliaminas, cloruro de isomethamidium es utilizado como tratamiento esterilizante y profiláctico a una dosis de 1mg por kg de peso vivo y normalmente confiere 5 meses de protección, el kinetoplasto es el principal organelo donde la droga es acumulada y su mecanismo de acción envuelve el anclaje al complejo topoisomerasa-K-DNA, requerido para su replicación, esta droga es preferida en áreas enzooticas donde la prevalencia es alta (Gonzatti et al., 2014). Las drogas utilizadas contra *T. vivax* son utilizadas para el tratamiento de *T. evansi* en bovinos (Radostits et al., 2006), en el caso de cloruro de Isomethamidium Desquesnes, et al., (2013) mencionan que no es recomendable utilizarlo en campo por su comprobada capacidad mutagénica al ser un agente intercalante de ADN.

### ***2.2.6. Trypanosoma evansi***

#### **2.2.6.1. Taxonomía**

La siguiente clasificación taxonómica fue tomada de (Desquesnes, 2004).

**Phylum:** Sarcomastigophora

**Subphylum:** Mastigophora

**Clase:** Zoomastigophorea

**Orden:** Kinetoplastida

**Familia:** Trypanosomatidae

**Género:** *Trypanosoma*

**Subgénero:** *Trypanozoom*

**Especie:** *Trypanosoma evansi*

### 2.2.6.2. Morfología

*T. evansi* es un parásito de pequeña envergadura con una longitud mínima de 15  $\mu\text{m}$  y máxima de 33 $\mu\text{m}$ , sin una relación sustancial entre el origen geográfico, hospedero o cepa, tiene una extremidad posterior delgada, flagelo libre, si se observan al microscopio presentan un movimiento activo pero con poco desplazamiento en el campo óptico ( Desquesnes et al., 2013).



**Figura 3** Forma kinetoplastica de  
*Trypanosoma evansi*  
Fuente: Desquesnes, 2004



**Figura 4** Forma akinetoplastica de  
*Trypanosa evansi*

Fuente: Desquesnes, 2004

### **2.2.6.3. Características Moleculares**

Una característica significativa de *T. evansi* es que a lo largo de su evolución aparentemente perdió totalmente los maxicirulos del ADN mitocondrial del kinetoplasto (Desquesnes et al., 2013).

### **2.2.6.4. Transmisión**

*T. evansi* es transmitido de forma mecánica principalmente por insectos hematófagos del género *Stomoxys* y *Tabanus*, pero también hay reportes de transmisión mecánica por mamíferos hematófagos como murciélagos vampiros (Desquesnes, 2004).

### 2.2.7. *Trypanosoma vivax*

#### 2.2.7.1. Taxonomía

La siguiente clasificación taxonómica fue tomada de (Desquesnes, 2004)

**Phylum:** Sarcomastigophora

**Subphylum:** Mastigophora

**Clase:** Zoomastigophorea

**Orden:** Kinetoplastida

**Familia:** Trypanosomatidae

**Género:** *Trypanosoma*

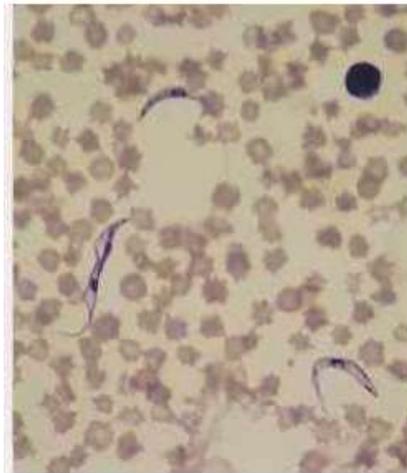
**Subgénero:** *Duttonella*

**Especie:** *Trypanosoma vivax*

#### 2.2.7.2. Morfología

Uno de de los rasgos morfológicos característico de *T. vivax* es su prominente kinetoplasto ubicado en el extremo posterior ( $d=1.1\mu\text{m}$ ) (Gonzatti et al., 2014), además tienen un flagelo libre terminal que facilita su movilidad dentro del torrente sanguíneo y está unido a una membrana ondulante que es menos desarrollada que en *T. brucei* y *T. evansi*, su longitud está en un rango de

18 $\mu$ m a 31 $\mu$ m (Osório et al., 2008). El núcleo es usualmente redondeado o elongado y está ubicado en la porción media del parásito (Gonzatti et al., 2014).



**Figura 5** Forma adulta de *Trypanosoma vivax* durante división.

Fuente: Desquesnes, 2004

### 2.2.7.3. Características Moleculares

El tamaño del genoma de *T. vivax* es de aproximadamente 41775 kbp con 11870 genes que codifican proteínas (Gonzatti et al., 2014).

El kinetoplasto contiene ADN mitocondrial (K-ADN) y está ubicado en la matriz mitocondrial cercano al cuerpo basal del flagelo, el K-ADN contiene dos tipos de estructuras circulares concatenadas, conocidas como minicírculos y maxicírculos, el K-DNA de *T. vivax* tiene los maxicírculos más grandes (40Kbp) y los minicírculos más pequeños (465 bp) ya caracterizados (Gonzatti et al., 2014).

#### **2.2.7.4. Ciclo biológico y transmisión**

*T. vivax* tiene dos modos de transmisión, en África sub-Sahariana la transmisión es biológica por la mosca TSE-TSE y en América del Sur, Central y otras partes de África la transmisión es mecánica por medio de insectos hematófagos, en África la transmisión cíclica se da por la presencia de moscas del género *Glossina*, durante este tipo de transmisión el parásito se transforma del estadio trypomastigote a epimastigote en el que se multiplica en la probóscide, faringe y esófago de insecto y finalmente entra en el meta ciclo infeccioso, en el caso de la transmisión mecánica, el proceso de diferenciación y multiplicación ocurre en el hospedero vertebrado (Gonzatti et al., 2014).

### **2.3. Babesiosis**

#### **2.3.1. Generalidades**

En 1888, en Rumania fue reportado por primera vez cuerpos intraeritrocitarios en ganado, este sería el primer reporte del agente causal de la babesiosis bovina, este trabajo fue hecho por Viktor Babes, posteriormente en 1893 en Estados Unidos, Smirh y Kilbone realizaron un estudio en donde determinaron que las garrapatas (*Rhipicephalus annulatus*) es el vector de la enfermedad conocida como fiebre de garrapatas, *Babesia* spp. es un grupo de parásitos intra-eritrocitarios obligados que son transmitidos por garrapatas, infectan una gran variedad de organismos (Mosqueda, et al., 2012). Las especies de importancia en Sur América son *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* principalmente, estos protozoarios provocan la babesiosis bovina, una enfermedad conocida como fiebre de garrapatas, fiebre de Texas, fiebre de agua roja y piroplasmosis equina (Mosqueda et al., 2012, ).

### **2.3.2. Distribución**

Está presente en la mayoría de países tropicales y subtropicales del mundo y su distribución es dependiente de la de su vector, que en el caso de América del Sur es *Rhipicephalus microplus* y es una parte importante de su ciclo de desarrollo (Radostits et al., 2006).

Estudios seroepidemiológicos de Babesiosis bovina se han llevados a cabo en diferentes países de América del Sur y Central como Argentina, Brasil, Paraguay, Colombia, Venezuela, Guyanas, El Salvador y Costa Rica encontrándose diferentes grados de estabilidad enzootica (Guglielmone, 1995). Los estudios de *Babesia* spp. en el país no son muy extensos, se hizo un análisis en ganado bovino mediante serología y microscopia en el Camal Metropolitano de Rastro de Quito el cual es proveniente de distintas zonas tropicales del país y se determinó una prevalencia del 0.71% (Pazmiño et al., 2016a). No existe un reporte de *Babesia* spp. en las islas Galápagos, en un estudio realizado en perros y gatos de las islas se hicieron pruebas serológicas pero no se encontró evidencia de la presencia del protozoario (Levy et al., 2008).

### **2.3.3. Clínica**

Entre los síntomas que se generan por babesiosis bovina se encuentra anemia, fiebre, ictericia, debilidad muscular, falta de apetito, depresión, incremento de la tasa respiratoria, renuencia al movimiento, usualmente hemoglobinuria y en casos severos puede causar la muerte del animal (Mosqueda et al., 2012). La patogénesis de *B. bovis* se caracteriza por presentar vasodilatación, hipotensión, incremento de la permeabilidad capilar, edema, colapso vascular, desordenes de coagulación, daños endoteliales y estasis circulatorio, la agregación de eritrocitos infectados en

vasos capilares más comúnmente en el cerebro y los pulmones ocasiona síndrome de estrés respiratorio y babesiosis cerebral (Bock, Jackson, De Vos, & Jorgensen, 2004). *B. bigemina* se caracteriza por generar una rápida y muy comúnmente masiva hemolisis intravascular, por esta razón la hemoglobinuria se presenta más temprano y más constantemente que en una infección con *B. bovis*; a diferencia de *B. bovis*, *B. bigemina* no presenta desordenes de coagulación, citoadherencia y estado de hipotensión (Bock et al., 2004). La infección con *B. bigemina* se presenta más temprano que en la infección con *B. bovis*, esto está relacionado con las diferencias en el desarrollo del esporozoito en su ciclo de vida (forma infectiva) (Radostits et al., 2006).

#### **2.3.4. Respuesta inmunitaria**

La respuesta inmune del ganado bovino ante una infección con *B. bovis* y *B. bigemina* envuelve mecanismos de inmunidad innata e inmunidad adquirida y a su vez esta respuesta encierra mecanismos de inmunidad humoral y celular media por células T, además de una inmunidad relacionada a la edad ante primera infección con *B. bovis* bien establecida caracterizada por una fuerte inmunidad innata en terneros hasta los 6 meses de edad (Radostits et al., 2006).

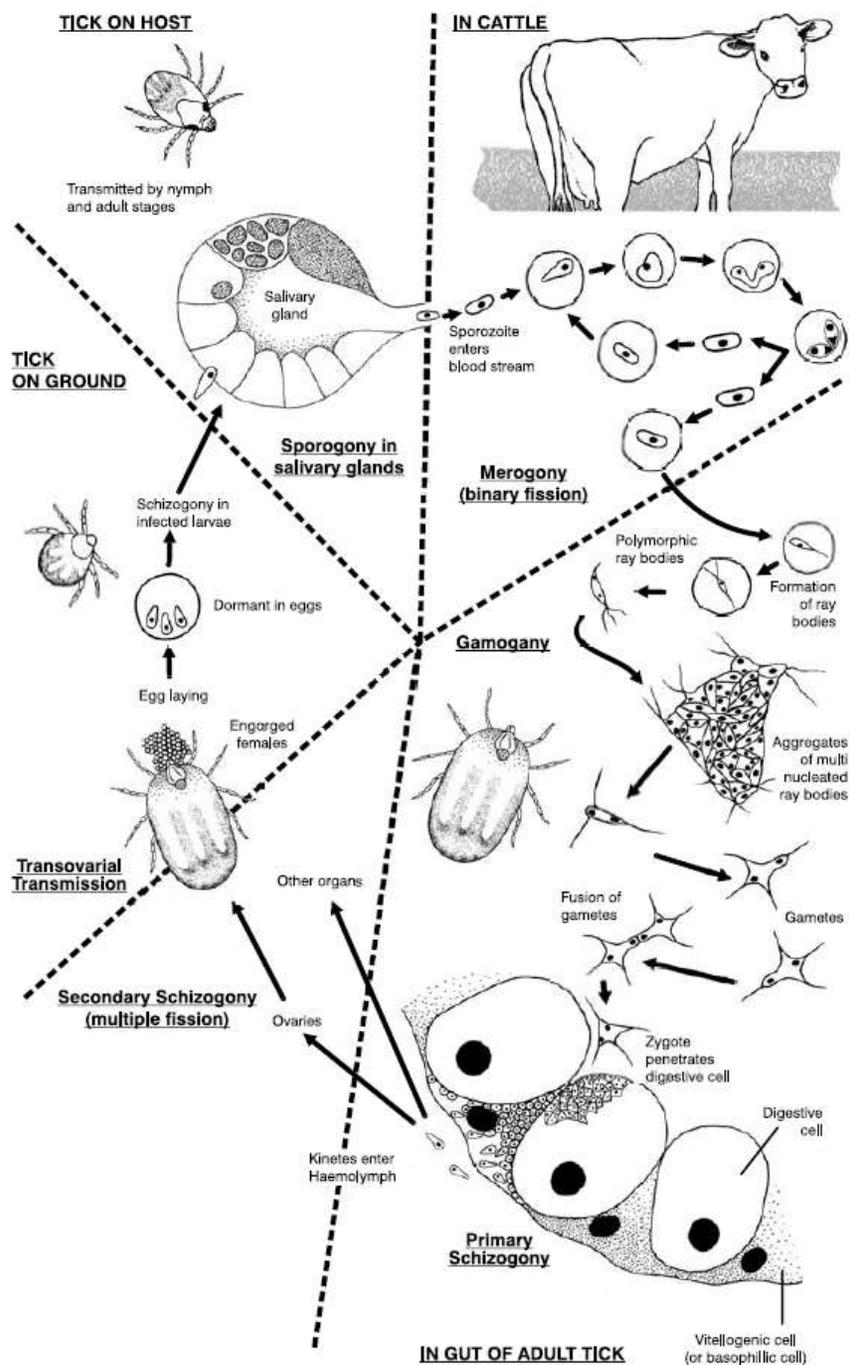
En el mecanismo de inmunidad innata, las citoquinas inmunoreguladores IL-10 e IL-12 son de gran importancia porque se conoce que en la infección de terneros con *B. bovis* aparecen inicialmente interferones e IL-12, esto es seguido de un breve periodo de expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa, se sabe que el parásito es muy susceptible al compuesto generado por esta enzima (Radostits et al., 2006).

Una fuerte inmunidad se produce después de una infección con la mayoría de *Babesia* spp., los mecanismos de inmunidad adquirida producen anticuerpos contra antígenos protectores y no protectores del parásito y del hospedero principalmente del tipo IgG1 e IgG2, a pesar de la potencial severidad de una infección aguda, los individuos que sobreviven generalmente desarrollan inmunidad contra la enfermedad mas no contra la infección y el animal podría estar persistentemente infectado (Radostits et al., 2006). El parásito presenta al menos 5 diferentes fenómenos que contribuyen a su sobrevivencia: rápida variación antigénica, anclaje de las proteínas del hospedero a la superficie de los glóbulos rojos infectados, citoadhesión y secuestro, expresión mono alélica de diferentes miembros de familias multigénicas y establecimiento de inmunosupresión transitoria (Radostits et al., 2006).

### **2.3.5. Ciclo biológico y transmisión**

El desarrollo de *B. bovis* y *B. bigemina* sigue un patrón similar en el vector adulto *Boophilus* spp., *Babesia* spp. únicamente parasita eritrocitos, cada esporozoito (también conocido como merozoito) penetra la membrana celular con la ayuda de un complejo apical especializado, una vez dentro se transforma en trofozoito del cual se generan dos merozoitos por un proceso de merogonia o fisión binaria; en *B. bigemina* se a identificado un tipo esquivo de merozoito precursor gamético, el cual diferente a otros piroplasmas estudiados, presenta diploidía a nivel de ADN, estos precursores gaméticos no se desarrollan hasta que son tomados por garrapatas, el cambio experimentado en el paso de la sangre del hospederos al intestino medio de la garrapata estimula el desarrollo de dos poblaciones de “cuerpos radiados” a partir de los precursores gaméticos, los “cuerpos radiados” además se someten a multiplicación dentro de los eritrocitos en los que

continúan y después emergen. Grandes agregaciones de “cuerpos radiados” se forman, pero una vez que la división se completa, los “cuerpos radiados” mono nucleados ahora son haploides y se asume que son gametos, ellos emergen de los agregados y se fusionan en pares (proceso llamado singamia) para formar células esféricas (zigotos). El cigoto infecta selectivamente las células digestivas del intestino de la garrapata donde probablemente se multiplican además de las células basófilas donde también se multiplican y se forman kinetos que escapan en el hemolinfa de la garrapata. En las células intestinales ocurren esquizogonia y se forma kinetos poliploides que llegan al hemolinfa he infectan una variedad de tipos celulares y tejidos, incluyendo ovocitos donde toman lugar ciclos sucesivos de esquizogonia secundaria, así ocurre la transmisión transovarica con la que el desarrollo continua en el estadio larvario. Los kinetos entran a las glándulas salivales y se transforma en el estadio multinucleado (esporogonia) y entonces se separan a su forma de esporozoito (la forma infectiva) y vuelven al hospedero vertebrado mediante la alimentación de la garrapata (Bock et al., 2004).



**Figura 6** Ciclo de vida de *Babesia bigemina*, en el ganado y en la garrapata *Rhipicephalus microplus*.

Fuente: Bock et al., 2004

### 2.3.6. Tratamiento

Las drogas comúnmente utilizadas para contrarrestar infecciones de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* son Imidocarb y Diminazeno aceturato, el imidocarb es efectivo a una dosis de 1-3 mg/Kg de peso vivo ya sea por vía intramuscular o subcutánea, el modo de acción no está totalmente claro, pero hay dos mecanismos propuestos, el uno indica que interfiere con el uso de poliaminas por parte del parásito y el otro indica que la droga evita la entrada de inositol al eritrocito infectado y el parásito muere por inanición; por otra parte Diminaceno aceturato es efectivo a una dosis de 3 a 5 mg/Kg de peso vivo por vía intramuscular, su modo de acción fue previamente explicado ya que es utilizado también como tripanocida (Mosqueda et al., 2012).

### 2.3.7. *Babesia bovis*

#### 2.3.7.1. Taxonomía

Taxonomía tomada de (Jorgensen et al., 2015)

**Phylum:** Apicomplexa

**Clase:** Sporozoa

**Orden:** Piroplasmorida

**Familia:** Babesiidae

**Género:** *Babesia*

**Especie:** *Babesia bovis*

#### 2.3.7.2. Morfología

*Babesia bovis* es reconocida porque es de menor tamaño que *B. bigemina*, su diámetro oscila los 2µm, presenta diferentes formas debido a que su ciclo de vida presenta diferentes estadios (BOCK et al., 2004).

### 2.3.7.3. Características Moleculares

En 2007 se realizó secuenciación de ADN total de la cepa T2Bo de *Babesia bovis*, esta es una cepa virulenta y trasmisible por garrapatas, se encontró que tiene componentes similares a otros paracitos del Phylum Apicomplexa, aproximadamente: 8.2 Mbp de ADN nuclear distribuido en 4 cromosomas y 33 kbp de ADN de aplicoplasto circular. Se predice que tiene aproximadamente 3700 genes codificantes de proteínas, muchos de los cuales forman grandes familias de genes (Gohil et al., 2013).

### 2.3.8. *Babesia bigemina*

#### 2.3.8.1. Taxonomía

Taxonomía tomada de (Jorgensen et al., 2015)

**Phylum:** Apicomplexa

**Clase:** Sporozoasida

**Orden:** Piroplasmorida

**Familia:** Babesiidae

**Género:** *Babesia*

**Especie:** *Babesia bigemina*

### **2.3.8.2. Morfología**

*Babesia bigemina* tiene un mayor tamaño que *B. bovis*, su diámetro puede alcanzar la totalidad del eritrocito, presenta diferentes formas debido a que su ciclo de vida presenta diferentes estadios (BOCK et al., 2004).

### **2.3.8.3. Características Moleculares**

Según Gohil et al., (2013) el genoma de *B. bigemina* está aún en proceso de ser secuenciado pero se estima que sea ligeramente mayor (10Mbp) que el de *B. bovis* (Gohil et al., 2013).

## **2.4. Métodos de Diagnóstico**

### **2.4.1. Métodos directos**

#### **2.4.1.1. Frotis de sangre**

Se puede ver al corpúsculo formado por *Anaplasma marginale* a un extremo del eritrocito mediante un frotis fino de sangre con anticoagulante, el frotis se lo fija con metanol durante un minuto y se tiñe con colorante Giemsa al 10% durante 30 minutos, utilizando un microscopio con un aumento de 700 a 1000 x se logran ver puntos marginales dentro del glóbulo rojo (OIE, 2004).

La técnica de frotis fino es empleada también para la detección de *Babesia* spp. y se realiza de la misma manera que para *Anaplasma marignale*, esta prueba es útil para la detección de Babesiosis en fase aguda pero en fase crónica su sensibilidad disminuye sustancialmente (OIE, 2004).

#### **2.4.1.2. Prueba WOO**

La prueba Woo es un método de concentración de sangre mediante centrifugado, y es utilizado para examinar la presencia de *Trypanosoma*, es mucho más sensible que los métodos de extendido o frotis de sangre, su especificidad es cercana al 100% cuando la parasitemia es mayor a 700 parasitos/ml pero se reduce a menos del 50% cuando la parasitemia está entre 60 y 300 parasitos/mL de sangre. El método consiste en tomar 70 $\mu$ L de sangre periférica en un capilar y centrifugar durante 5 minutos a 9000g, de este modo se concentraran en la interface plasma-leucositos y se realiza una observación al microscopio con un aumento de 40x (OIE, 2004).

#### **2.4.1.3. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)**

Esta técnica consiste en reproducir un segmento específico de ADN con la ayuda de iniciadores o cebadores que delimitan al segmento, dicha amplificación se da por medio de una enzima polimerasa termoestable, este procedimiento permite obtener millones de copias de un segmento de ADN en un par de horas (Rodríguez & Barrera, 2004).

La PCR para detección de *Trypanosoma* consiste en la amplificación de los espaciadores transcritos internos de gen del RNA ribosomal, este método es de dos fases y permite obtener fragmentos de 600 a 1200 pb con lo que se puede discriminar entre una especie y otra (Cox et al., 2005).

La PCR para detección de *Babesia* spp. se basa en la amplificación de un fragmento variable del gen que codifica rRNA 18S, los segmentos esperados son de 400pb y los cebadores específicos

para esta prueba son PIRO A (5'-AATACCCAATCCTGACACAGGG-3') y PIRO B (3'-TTAAATACGAATGCCCCCAAC-5') (Figuerola et al., 2014).

## **2.4.2. Métodos Indirectos**

### **2.4.2.1. ELISA**

Los ensayos por inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA) se basan en la capacidad que tiene un anticuerpo ligado a una enzima para reconocer a un antígeno fijado a una superficie sólida, las enzimas más comúnmente usadas son las fosfatasa o peroxidasas alcalinas, los productos de catálisis de la enzima reaccionan con un cromógeno resultando en viraje de color (Lin, 2015).

#### **2.4.2.1.1. ELISA competitivo**

En este tipo de ELISA se fija al soporte sólido un anticuerpo específico del antígeno marcado con la enzima, posteriormente se coloca una mezcla de antígeno anclado a la enzima con el antígeno en estudio y a la par pero en otro pocillo se coloca sólo el complejo antígeno enzima, cuando se coloca el cromógeno y se cuantifica los OD, una diferencia entre los dos pocillos va a implicar la presencia del patógeno (Cultek, 2006).

Este tipo de ELISA se ha utilizado para el diagnóstico de Anaplasmosis, se basa en el reconocimiento del anticuerpo monoclonal ANAF16C1 sobre la proteína antigénica MSP5 de *Anaplasma marginale*, *A. centrale* y *A. bovis*. Existen kits comerciales de este tipo de ELISA que utilizan MSP5 recombinante (Kocan et al., 2010).

#### **2.4.2.1.2. Elisa Indirecto**

La variación en este tipo de ELISA es que el antígeno fijado es reconocido por los anticuerpos del suero en estudio y el complejo anticuerpo-enzima se fija al anticuerpo del suero (Thermo Scientific, 2010).

Kocan et al., (2010) indica que se desarrolló un ELISA indirecto con la proteína MSP5 pero no se evaluó la reactividad cruzada con otras especies de *Anaplasma*.

Para el ensayo de inmunoabsorción indirecto para *Trypanosoma* se utiliza un extracto antigénico obtenido de un ratón inoculado con *T. evansi*, dicho extracto es purificado y concentrado para ser utilizado como antígeno. En este ensayo se utiliza un complejo anti-bovino conjugado a una peroxidasa alcalina y el cromógeno ABTS. El objetivo de este procedimiento es detectar anticuerpos IgG contra *Trypanosoma* spp. (González, 2016).

#### **2.4.2.2. Prueba de aglutinación en placa**

Esta prueba se basa en la reacción producida por una solución de antígeno de *A. marginale* con el suero en estudio, tiene ciertas ventajas por el hecho de ser sencilla y poderse llevar a cabo en campo, pero puede tener reacciones inespecíficas. El antígeno se obtiene infectando un ternero esplenectomizado con *A. marginale* y una vez alcanza un 50% de parasitemia se extrae la sangre se la procesa para obtener un extracto del antígeno a partir de los eritrocitos lisados (OIE, 2004).

### 2.4.2.3. Inmunofluorescencia indirecta

El ensayo de inmunofluorescencia indirecta para *Trypanosoma* comienza por la fijación de sangre con alta parasitemia, posteriormente se coloca laca de uñas en círculos de 5mm y sobre ellos se ubica el suero problema diluido 1/40, se incuba a 37°C durante una hora, luego se realiza un lavado con PBS, seguido a ello se pone el complejo anti-bovino conjugado con disocianato de fluorescencia, se incuba y se vuelve a lavar. Por último se lava los porta objetos en PBS o glicerol tamponado y se examina la fluorescencia (OIE, 2004).

En el ensayo de inmunofluorescencia indirecta para *Babesia* spp. se precisa de sangre con una parasitemia del 2% al 5%, debe ser recogida con un anticoagulante (EDTA), se debe realizar al menos dos lavados con PBS para eliminar proteínas interferentes, el concentrado de glóbulos rojos previamente lavado se lo resuspende en dos volúmenes de PBS al 1% de seroalbumina bovina posteriormente se realiza frotis de la forma convencional y se lo seca al ambiente y se lo fija a una temperatura de 80°C. Se los puede almacenar a -70°C. La prueba propiamente dicha se inicia con la división de la placa portaobjetos en 8 partes con un lápiz graso, se diluyen los sueros a una proporción 1/30 y se añade 5 a 10µL sobre la placa, se incuba a 37°C por 30 minutos en cámara húmeda, posteriormente se lava la placa en PBS durante 10 minutos por dos ocasiones y luego con agua para luego colocar el conjugado (anticuerpo con isocianato de fluorescencia), se incuba a las mismas condiciones que anteriormente, se realiza un último lavado y se observa por microscopia de fluorescencia (OIE, 2004).

El ensayo de inmunofluorescencia indirecta para *Anaplasma marginale* se realiza de la misma forma que el de *Babesia* spp. con la diferencia que en el frotis se utiliza sangre de bovino con Anaplasmosis (OIE, 2004).

## CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Tamaño de la muestra

Dado que la población de bovinos en estudio se encuentra distribuidos en núcleos ganaderos se realizó un muestreo probabilístico por racimos, a este tipo de muestreos Hernandez, Fernandez & Baptista Lucio (2010) lo describe como “subgrupo en el que las unidades de análisis se encuentran encapsuladas en determinados lugares físicos” por tanto la cantidad de núcleos ganaderos existentes en la zona será la población total N y se utilizaró la siguiente fórmula para estimar el número de predios y bovinos a muestrear.

$$n = \frac{Z^2 \times \frac{p \times (1 - p)}{se^2}}{1 + Z^2 \times \frac{p \times (1 - p)}{se^2 \times N}}$$

Donde:

n es el número de núcleos o bovinos muestreados

N es la muestra poblacional o número total de predios.

p es la probabilidad de ocurrencia del fenómeno (0.5 porque no se conoce la prevalencia).

Z es la puntuación determinada por el nivel de confianza deseado

se<sup>2</sup> es el error estándar (0,05).

**Tabla 1**

*Cálculo del tamaño muestral*

	Nivel de confianza	Valor Z	Error estandar	Numero total	Muestra
<b>Predio</b>	95%	1.96	10%	99	45
<b>Bovinos</b>	95%	1.96	10%	7660	188

### 3.2. Selección de predios

Para seleccionar los núcleos ganaderos se les asignó un número a cada predio mediante un ordenador se generó una selección aleatoria.

### 3.3. Selección de animales

Se tomó muestra de animales adultos, y si no se disponía se lo hizo de los que facilitó el dueño del predio. Se tomó un número mayor al 10% del total de bovinos en cada predio muestreado.

**Tabla 2**

*Resumen de muestreo por UPA*

UPA	N° de muestras	Total de bovinos	% de animales muestreados
1	2	76	2,63
2	4	96	4,17
3	6	65	9,23
4	3	29	10,34
5	10	97	10,31
6	5	15	33,33
7	15	20	75,00
8	4	11	36,36
9	21	208	10,10
10	10	128	7,81
11	10	60	16,67
12	15	32	46,88
13	10	87	11,49
14	6	30	20,00
15	9	93	9,68
16	4	55	7,27
17	10	10	100,00
18	16	132	12,12
19	10	27	37,04

### **3.4. Toma de muestra de sangre**

Se tomó muestras de sangre venosa de bovinos de 19 predios de la Isla Santa Cruz en la Provincia de Galápagos, y se llenó un registro con información de cada animal. En cada lugar se fijó un punto de referencia mediante un dispositivo GPS y se completó un formato de encuesta con la ayuda del dueño o un responsable de la finca. Posteriormente las muestras fueron transportadas hasta el Laboratorio Fabricio Valverde del Parque Nacional Galápagos para su procesamiento y preparación para el traslado hasta los laboratorios de Biotecnología Animal de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE.

### **3.5. Procedimiento de extracción de sangre periférica**

La extracción de sangre periférica se realizó mediante el método de venopunción coccígea que consiste en hacer una incisión entre dos vértebras coccígeas ubicadas en la cola del animal. Para este procedimiento se utilizó agujas Vacutainer de calibre 21, soporte para agujas, dos tubos al vacío (BD Vacutainer), uno sin anticoagulante y el otro con anticoagulante EDTA. El procedimiento inicia con la inmovilización del animal, posteriormente se sujeta la cola y se la coloca casi verticalmente, se limpia la zona de punción (vertebra coccígea 6-7) para evitar contaminación, se realiza una punción en la línea media entre las vértebras 6 y 7 y se introduce el sistema Vacutainer (aguja y soporte) entre 8-12mm de profundidad, seguidamente se coloca el tubo y se retira ligeramente hasta que comience a fluir sangre (Weaver, St. Jean, & Steiner, 2007).

### **3.6. Obtención de suero.**

Mediante centrifugación y utilizando el tubo con sangre periférica sin anticoagulante de 10mL se obtuvo suero. El procedimiento comienza con una centrifugación de las muestras a 2500 rpm

durante 10 minutos, esto permitió que se formen dos fases, la fase superior (suero) se colectó en tubos Eppendorf® de 2ml tapa rosca con ayuda de una pipeta Pasteur y se etiquetó con un código de laboratorio.

### 3.7. ELISA indirecto para *Trypanosoma* spp.

El diagnóstico de *Trypanosoma* spp. se lo hizo según el protocolo establecido por González, (2016).

**Tabla 3**

*Protocolo de la técnica ELISA indirecta para la detección de IgG de Trypanosoma spp.*

Pasos	Procedimiento	Concentración	Cantidad (μL)/pocillo	Protocolo
1	Colocar antígeno	1μg/mL diluido en PBS	100	24 horas 4°C en cámara húmeda.
2	Lavado Solución de Lavado: NaCl 150 mM + 0.1% Tween 20, diluidos en agua destilada			
3	Bloqueo con leche de soya en polvo	Leche de soya en polvo al 5% diluido en PBS	200	1hora 37°C en cámara húmeda.
4	Lavado Solución de Lavado: NaCl 150 mM + 0.1% Tween 20, diluidos en agua destilada			
5	Suero	1/100 diluido en PBS-T	100	1hora 37°C en cámara húmeda.
6	Lavado Solución de Lavado: NaCl 150 mM + 0.1% Tween 20, diluidos en agua destilada.			
7	Conjugado HRP <sup>4</sup> antibovine IgG. BETHYL®	1/15000 diluido en PBS-T	100	1hora 37°C en cámara húmeda.
8	Lavado Solución de Lavado: NaCl 150 mM + 0.1% Tween 20, diluidos en agua destilada.			
9	Sustrato ABTS Sigma®	10mL de Tampón citrato 0.05M pH 4, 100μL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0.5% y 500μL de ABTS 2%.	50	20 minutos a temperatura ambiente

Fuente: González, 2016

Los resultados de absorbancia se obtuvieron en un lector de ELISA BioTek ELx800 a 405nm (ANEXO A).

### **3.8. Determinación de punto de corte**

La determinación del punto de corte del ELISA indirecto para la detección de anticuerpo IgG contra *Trypanosoma* spp. se lo realizó mediante la fórmula  $X+3D$  como indica (González, 2016) donde X y D son la media y la desviación estándar respectivamente de muestras de sueros negativas mediante PCR.

### **3.9. Extracción de ADN total**

Se realizó la extracción de ADN total de la sangre del tubo con anticoagulante EDTA y para ello se utilizó el kit “Wizard® Genomic DNA Purification Kit” (Promega), tomando en cuenta las consideraciones del inserto.

### **3.10. Cuantificación de ADN**

La cuantificación del ADN extraído se efectuó mediante el equipo Nanodrop 2000 (Thermo® SCIENTIFIC). El procedimiento comenzó configurando el equipo con el programa para cuantificación de ácidos nucleicos, posteriormente se hizo una limpieza del lente con HCl 1N y se colocó la solución blanco para consecuentemente colocar la muestra y hacer la medida de la concentración de ADN (ANEXO B).

### **3.11. Determinación de Calidad de ADN**

Se determinó el estado del ADN extraído realizando una corrida electroforética, para ello se cargó un gel de agarosa al 1% con una mezcla de blue juice (1µL) y 5 µL de ADN en cada pocillo, además se colocó 5µL de marcador de 1Kb en uno de los pocillos y se dejó correr la electroforesis

a 100 voltios y 300mA durante una hora, finalmente se reveló el gel mediante radiación UV y se verificó si existe degradación en el ADN.

### 3.12. PCR para detección de *Anaplasma marginale*.

Para la detección de *Anaplasma marginale* se amplificó el gen de la proteína MSP5 utilizando los primers Ana19A (5' – GTGTCCTGGGGTACTCCTA - 3') y Ana19B (5' – TGATCTGGTCAGCCCCAGCT – 3') señalados por (Tavares & Reyna, 2006) mediante la reacción en cadena de la polimerasa en condiciones previamente establecidas (Tabla 4 y Tabla 5) con un volumen final de 25µL(Tana, 2015).

**Tabla 4**

*Componentes de PCR para detección de Anaplasma marginale*

Componentes	Concentración Final	Volumen Final (µL)
Buffer	1,00	5,00
MgCl <sub>2</sub>	2,5mM	2,5
dNTP's	0,8mM	0,5
Ana19A	0,5µM	1,25
Ana19B	0,5 µM	1,25
Taq	0,75U/ µL	0,15
ADN	100 ng/ µL	1
H <sub>2</sub> O (libre nucleasa)		-
<b>Volumen Total</b>		<b>25</b>

**Tabla 5**

*Condiciones de amplificación por PCR para la detección de Anaplasma marginale*

Proceso	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5'	1
Desnaturalización	94	45''	30
Hibridación	64	30''	30
Extensión	72	1'	30
Extensión final	72	10'	1
Mantenimiento	4	∞	

Los productos de PCR fueron identificados por electroforesis en gel de agarosa al 2% con condiciones de corrida de 100 voltios durante 1 hora y 20 minutos y utilizando un marcado molecular de 100bp.

### 3.13. PCR para detección de *Babesia* spp.

Para la detección de *Babesia* spp. se amplificó una región variable del gen 18S rRNA utilizando los primers Piro A (5'-AATACCCAATCCTGACACAGGG-3') y Piro B (5'-TTAAATACGAATGCCCCCAAC-3') mediante la reacción en cadena de la polimerasa en condiciones previamente establecidas (Tabla 6 y Tabla 7) con un volumen final de 25µL (Figuroa et al., 2014).

**Tabla 6**

*Componentes de PCR para detección de Babesia spp.*

Componentes	Concentración Final	Volumen Final (µL)
Buffer	1X	5
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	1,5
dNTP's	0.8 mM/u	0,5
PiroA	0,25 µM	0,625
PiroB	0,25 µM	0,625
Taq	0,6 U	0,12
ADN	100 ng/ µL	1
H <sub>2</sub> O (libre nucleasa)		-
<b>Volumen Total</b>		<b>25</b>

**Tabla 7**

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

Proceso	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5'	1
Desnaturalización	94	1'	30
Hibridación	55	1'	30
Extensión	72	1'	30
Extensión final	72	5'	1
Mantenimiento	4	∞	

Los productos de PCR fueron identificados por electroforesis en gel de agarosa al 2% con condiciones de corrida de 100 voltios durante 1 hora y 20 minutos y utilizando un marcado molecular de 100bp.

### **3.14. Análisis Estadístico**

#### **3.14.1. Diseño no experimental**

Se buscó la presencia de *Trypanosoma* spp. mediante la detección de anticuerpos IgG contra dicho patógenos utilizando un ELISA indirecto en donde fueron positivos las muestras que generaron absorbancia mayor al punto de corte, la presencia de *Anaplasma marginale* verificando amplificación del gen de la proteína MSP5 y la presencia de *Babesia* spp. evidenciando amplificación de fragmentos del gen rRNA de la subunidad pequeña ribosomal 18S mediante PCR.

Este tipo de diseño se establece o identifica variables y se las evalúa en un determinado tiempo (Hernandez et al., 2010).

#### **3.14.2. Variable de respuesta**

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

### **3.14.3. Error aleatorio**

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

### **3.14.4. Análisis**

El análisis de este estudio se lo realizó con ayuda el software estadístico Excel e INFOSTAT.

### **3.14.5. Estadística descriptiva**

Para el análisis con este tipo de estadística se tomaron los datos generados en los registros de muestreos y las encuestas además de los datos obtenidos por los análisis de laboratorio (PCR y ELISA indirecto) con lo que obtendrá distribuciones de frecuencias y medidas de tendencia central.

### **3.14.6. Datos de prevalencia**

La prevalencia es una variable que está definida por la relación entre el número de casos positivos a un determinado agente y el número total de muestras. Se estableció la prevalencia de los patógenos en estudio utilizando los resultados de ELISA indirecto y PCR. Esta variable viene dada por la siguiente formula:

$$\text{Prevalencia puntual} = Ct/Nt$$

Dónde:

**Ct:** número de casos positivos para *Anaplasma margina*, *Trypanosoma* spp. o *Babesia* spp. (prevalentes).

**Nt:** número total de animales muestreados en la población.

### **3.14.7. Datos de ELISA indirecto**

Las absorbancias obtenidas en el ELISA indirecto de *Trypanosoma* spp. se organizaron de menor a mayor y se tomaron como positivos las que fueron mayor al punto de corte y como negativo las que fueron menor al punto de corte (ANEXO A Y D).

### **3.14.8. Datos de PCR**

En el análisis de PCR se discriminaron los positivos para *Anaplasma marginale* y *Babesia* spp. mediante la presencia de bandas de los fragmentos de genes que se buscaban amplificar y los negativos por la ausencia de bandas (ANEXO C Y D).

### **3.14.9. Estadística inferencial**

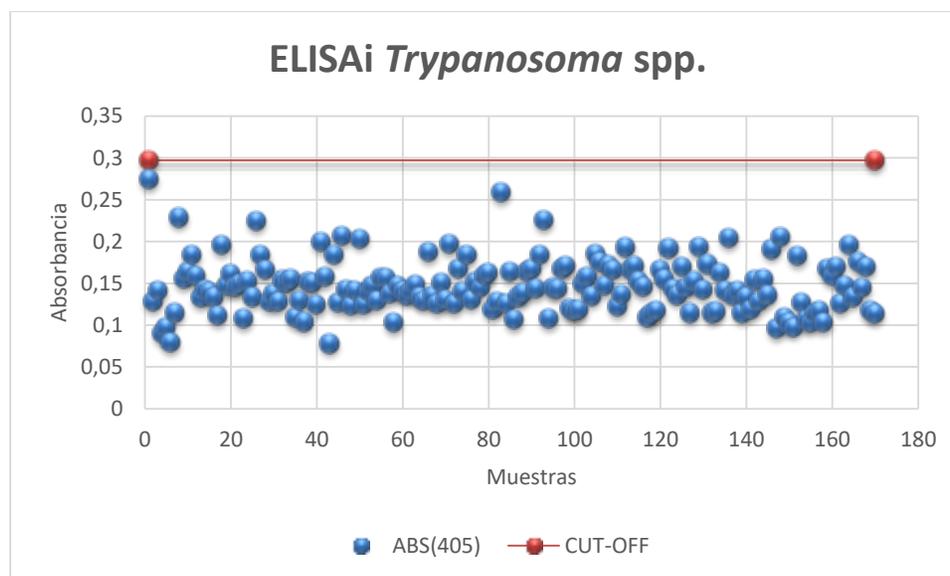
Utilizando los datos obtenidos con la estadística descriptiva se llevaron a cabo pruebas T Student para las variables continuas o paramétricas y Pruebas Chi cuadrado para variables no paramétricas con lo cual se buscó argumentación técnica para rechazar o aceptar las hipótesis planteadas para este estudio.

## CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados obtenidos del análisis de las 170 sanguíneas de bovinos procedentes de 19 predios de la isla Santa cruz.

Las muestras obtenidas en tubos sin anticoagulante fueron procesadas para obtener suero sanguíneo con el que se realizó un ELISAi para detectar anticuerpos IgG anti *Trypanosoma* spp. (Figura 7). Por otro lado, se realizó la extracción de ADN de las muestras de sangre obtenidas en tubos con anticoagulante EDTA, los cuales fueron utilizados para diagnosticar *Anaplasma marginale* y *Babesia* spp. mediante amplificación de fragmentos de los genes de la proteína mayor de superficie 5 (*mSP5*) y del gen del RNAr de la sub unidad pequeña ribosomal 18S (18ss-rRNA) respectivamente, dado que no se contaba con suficiente enzima Taq polimerasa de la marca Invitrogen® con la cual ambas pruebas de PCR fueron estandarizadas, fue necesario comparar cualitativamente las pruebas utilizando una enzima de la marca Promega Go Taq como se muestra en la Tabla 8.

#### 4.1.ELISA indirecto para *Trypanosoma* spp.



**Figura 7** Distribución de absorbancias en ensayo de ELISA indirecto para *Trypanosoma* spp.

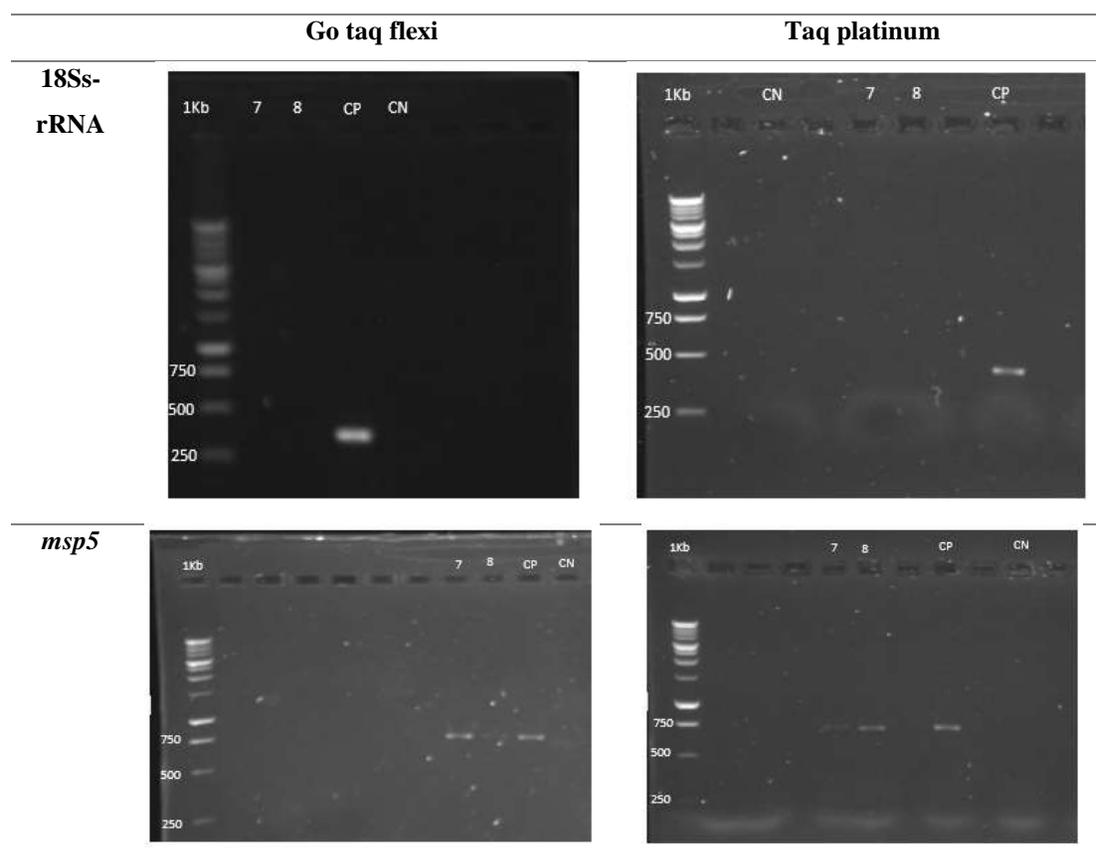
La Figura 7 muestra la distribución de las absorbancias de cada muestra con respecto al punto de corte (0,29), lo que indica que no hay muestras positivas para el ensayo de ELISA indirecto de *Trypanosoma* spp. Para el punto de corte en este ensayo se utilizaron 43 muestras de suero de bovinos negativos, previamente analizados por PCR en otro estudio, y fue similar al obtenido por González, (2016)(0.33).

Este ensayo se lo utiliza para el diagnóstico de *Trypanosoma* spp. a pesar que se utilizó como antígeno un extracto crudo de *T. evansi*, la razón de es esta generalización es la reactividad cruzada

que este genera con anticuerpos anti *T. vivax* (A. Reyna-Bello et al., 1998) además se conoce que también genera reacción cruzada con anticuerpos generados por otras especies como *Trypanosoma cruzi* (Desquesnes et al. 2007). Estudios revelan que existe más de un componente antigénico responsable de la reacción cruzada entre *T. evansi* y *T. vivax*, por ejemplo, la forma soluble de la glicoproteína variable de superficie (64kDa) aislada de *T. evansi* presenta reacción cruzada con anticuerpos anti *T. vivax* (Uzcanga et al., 2002), también otros dos antígenos de la fracción citosólica aislados de *T. evansi* (51 y 68 kDa) han demostrado reacción cruzada con anticuerpos anti *T. vivax* (Camargo et al., 2004).

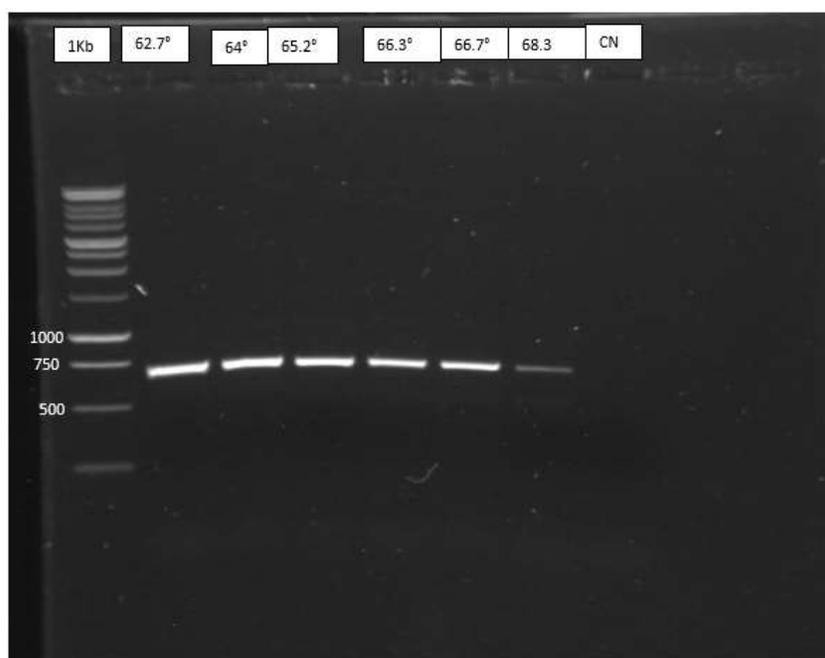
**Tabla 8**

*Utilización de Go taq flexi (Promega) y Taq Platinum (Invitrogen).*



#### 4.2. Gradiente de temperatura de alineamiento de PCR *Anaplasma marginale*.

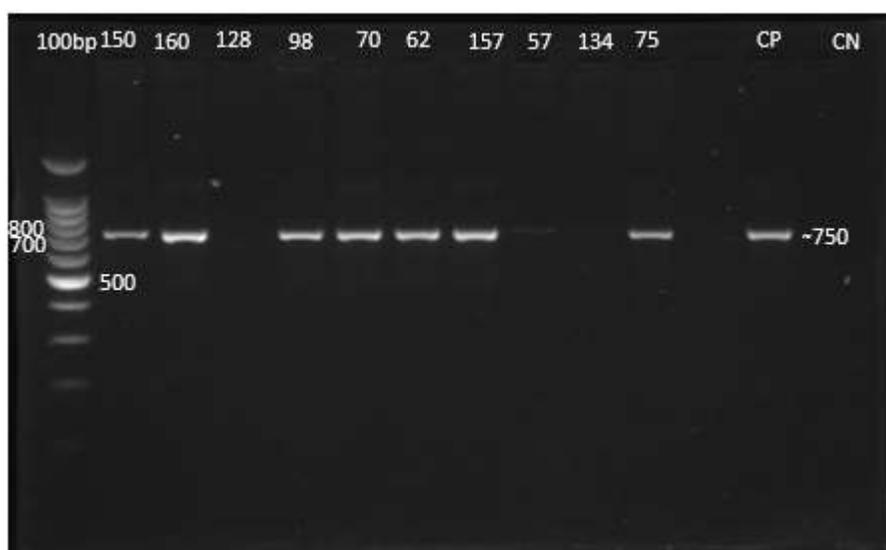
Durante la optimización y para evitar al máximo la presencia de productos inespecíficos se realizó un ensayo de gradiente de temperaturas de alineamiento, (Figura 8). En el rango de temperatura de 62,7 y 65,3 se obtuvieron bandas de buena calidad y sin producto inespecíficos, se decidió trabajar a una temperatura de alineamiento de 64°C como se indica en los estudios de Tana *et.al*, (2017) y Tavares & Reyna, (2006).



**Figura 8** Gradiente de temperatura de PCR del gen *msp5* de *A. marginale*.

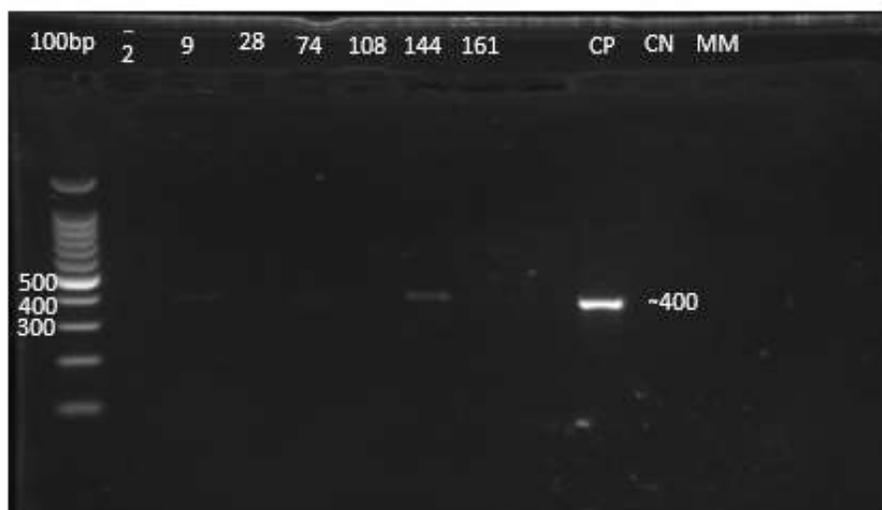
### 4.3. Amplificación de fragmentos mediante PCR

Los cebadores 19 A y 19 B para el gen *msh5* generan amplificación de fragmentos de aproximadamente 750 pares de base como se indica en la figura 9, lo que contrasta con el trabajo realizado por Tavares & Reyna (2006) donde obtiene una banda de 806 pb , y el trabajo realizado por Reyna-Bello et al., (1998) donde obtiene una banda de 714 pb.



**Figura 9** Amplificación del fragmento del gen *msh5* de las muestras 57, 62, 70, 75, 98, 150, 160.

Los cebadores Piro A y Piro B para el gen 18 S rRNA generan amplificación de fragmentos de aproximadamente 400 pares de base como se indica en la Figura 10, y se contrasta con el estudio de Carret et al., (1999) y Figueroa et al., (2014).



**Figura 10** Amplificación del fragmento del gen 18Ss-rRNA de las muestras 9, 74, 144.

Se utilizó los cebadores Bec-UF1 (GTTGATCCTGCCAGTAGTCA) y Bec-UR (CGGTATCTGATCGTCTTCGA) para amplificar un fragmento de 800 pares de base del gen 18Ss-rRNA y confirmar 6 muestras positivas obtenidas en este estudio como se muestra en la figura 11, las condiciones de amplificación fueron las mismas que para los primers Piro A y Piro B pero varió la temperatura de alineamiento (60°C). Este ensayo de confirmación se lo llevó a cabo gracias a la colaboración del Instituto de Salud Pública y Zoonosis, de la Universidad Central del Ecuador.



**Figura 11** Amplificación del fragmento del gen 18Ss-rRNA de las muestras positivas.

#### 4.4. Prevalencia de Hemoparásitos en la Isla Santa Cruz.

En un total de 170 muestras obtenidas de 19 predios de la Isla Santa Cruz, no se detectó anticuerpos IgG anti *Trypanosoma*, sin embargo, mediante la técnica de PCR se obtuvo una prevalencia de 25,88% para *Babesia* spp. y de 67,06% para *A. marginale* (Tabla 9).

**Tabla 9**

*Prevalencia de Hemoparásitos en la isla Santa Cruz*

Prueba	N° animales positivos	Prevalencia (%)
ELISA- <i>Trypanosoma</i>	0/170	0
PCR- <i>Babesia</i> spp.	44/170	25,88
PCR- <i>Anaplasma marginale</i>	114/170	67,06

Este estudio representa el primer reporte de *A. marginale* en Galápagos utilizando diagnóstico molecular por PCR, aunque ya se había reportado una seroprevalencia de 64,1% en la Isla Santa Cruz mediante serología utilizando ELISAc para identificar anticuerpos IgG anti *A. marginale* (Monroy, 2015). *A. marginale* ya ha sido previamente reportada, Tana-Hernández et al., (2017) reportaron una prevalencia de 86,1% mediante PCR “punto final” en la parroquia Luz de América en la Provincia Santo Domingo de los Tsáchilas, en otro estudio Soto (2010) obtuvo una prevalencia del 91,71% mediante PCR en un muestreo realizado en la Empresa Metropolitana de Rastro de Quito, y utilizando una PCR anidad (nPCR) Escobar et al., (2015) encontraron una prevalencia del 85,48% de un total de 85 muestras de bovinos y del 13,46% de un total 108 garrapatas *Rhipicephalus microplus* en la zona del Litoral del Ecuador comprendida entre las provincias de Guayas y Los Ríos.

La alta prevalencia encontrada en este estudio confirma el estado endémico de esta infección en las zonas tropicales y subtropicales de Sur América (Kocan et al., 2010).

La técnica utilizada en el diagnóstico de *A. marginale* en este estudio es altamente sensible, capaz de detectar un estado tan bajo como el 0,0001% de eritrocitos infectados (Aubry & Geale, 2011) por tanto la prevaecía reportada en el presente estudio está influenciada en gran parte por animales portadores, Kocan et al., (2003) menciona que los animales portadores o persistentemente infectados son aquellos que sobreviven a una infección aguda o aquellos terneros que se infectaron entre los 6 y 9 meses, edad en la cual son menos susceptibles a la enfermedad clínica, estos sirven como reservorios porque son una fuente de sangre infectiva ya sea por transmisión mecánica o biológica.

Este es el primer reporte de *Babesia* spp. en bovinos de las Islas Galápagos, Vasco, (2013) realizó una estandarización de PCR “end point” y PCR en tiempo real para identificar *Babesia* spp. en garrapatas en donde analizó muestras de *Rhipicephalus microplus* de Galápagos pero no encontró casos positivos, probablemente por el bajo número de muestras que procesó (4) o a su vez porque entre las muestras procesados habían garrapatas machos los cuales tuvieron un bajo rendimiento de extracción de ADN lo cual afecta la sensibilidad de la técnica como lo indica en su estudio.

No existen muchos estudios de Babesiosis en el país, se reportó una prevalencia de *Babesia bovis* de 0.71% por microscopía de luz y 29,29% por identificación de anticuerpos anti *Babesia* mediante la técnica IFAT en un muestreo de 140 animales realizado en el Camal Metropolitano de Quito donde llegan animales de distintas partes del país (Pazmiño et al., 2016b).

El diagnóstico molecular de *Babesia* spp. realizado a través de una PCR anidada o la PCR simple son técnicas de alta sensibilidad y por tanto son capaz de detectar animales persistentemente infectados (Mosqueda et al., 2012), por tal razón la prevalencia reportada en este estudio (25,88%) está ligada tanto a animales con infecciones agudas como animales portadores.

El diagnóstico serológico de *Trypanosoma* spp. no identificó anticuerpos anti *Trypanosoma* en el suero sanguíneo de bovinos de la Isla Santa Cruz, probablemente *Trypanosoma evansi* y *Trypanosoma vivax* no estén presentes en la Isla, sin embargo se lo debe descartar utilizando otros métodos de diagnóstico o un muestreo más extenso, ya que en Ecuador continental si existen reportes de seroprevalencias como el indicado por González, (2016), que indica un 58% de seroprevalencia en un estudio realizado en la Empresa Metropolitana de Rastro de Quito, o el

estudio de Medina-Naranjo et al., (2017) realizado en la Provincia de Pastaza donde reportó una seroprevalencia del 31,03%.

En el análisis de posibles infecciones mixtas, no se encontró ninguna triple infección, sin embargo se observó un 18,82% de animales que estaban infectados con *A. marginale* y *Babesia* spp. y un 54,71% de animales que tenían al menos uno de los dos patógenos ya mencionados.

**Tabla 10**

*Infecciones por animal*

<b>Infección</b>	<b>N° animales</b>	<b>Frecuencia Relativa</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>Ninguna</b>	45	0,26	26,47
<b>Una</b>	93	0,55	54,71
<b>Doble</b>	32	0,19	18,82

#### **4.5.Prevalencias por UPA**

Los resultados del presente estudio indican que en el 100% de las UPAs hay casos positivos de *A. marginale* y en el 94.73% hay casos positivos de *Babesia* spp.

**Tabla 11**

*Prevalencia de Anaplasma marginale y Babesia spp. por UPA.*

<b>UPA</b>	<b>Animales Muestreados</b>	<b>Prevalencia <i>Anaplasma marginales</i></b>	<b>Prevalencia <i>Babesia</i> spp.</b>
<b>1</b>	5	80	20
<b>2</b>	10	40	10
<b>3</b>	6	66,67	33,33
<b>4</b>	10	80	60
<b>5</b>	15	66,67	33,33
<b>6</b>	2	100	0
<b>7</b>	9	66,67	22,22
<b>8</b>	21	76,19	33,33
<b>9</b>	10	60	10
<b>10</b>	15	46,67	6,67
<b>11</b>	4	100	25
<b>12</b>	10	80	20
<b>13</b>	4	25	25
<b>14</b>	3	100	33,33
<b>15</b>	6	100	50
<b>16</b>	10	50	20
<b>17</b>	10	30	30
<b>18</b>	16	87,5	25
<b>19</b>	4	20	25

#### 4.6. Prevalencia por sectores.

**Tabla 12**

*Prevalencia por sectores*

Sector	N° UPAS	Prevalencia <i>Anaplasma</i> <i>marginale</i>	Prevalencia <i>Babesia</i> spp.
Bella Vista	1	50	20
Camote	1	87,5	25
El Cascajo	1	30	30
Media Luna	1	25	25
Occidente	2	73,33	21,11
Salazaca	8	66,19	21,25
Santa Rosa	5	81,33	34

Se realizó una comparación de medias de prevalencia en los sectores con más de una UPA (T-Student) y se encontró que no hay diferencia significativa de prevalencia de *Anaplasma marginale* y *Babesia* spp. entre los sectores Occidente, Salazaca y Santa Rosa ( $P > 0.05$ ).

#### 4.7. Diferencias de Temperatura

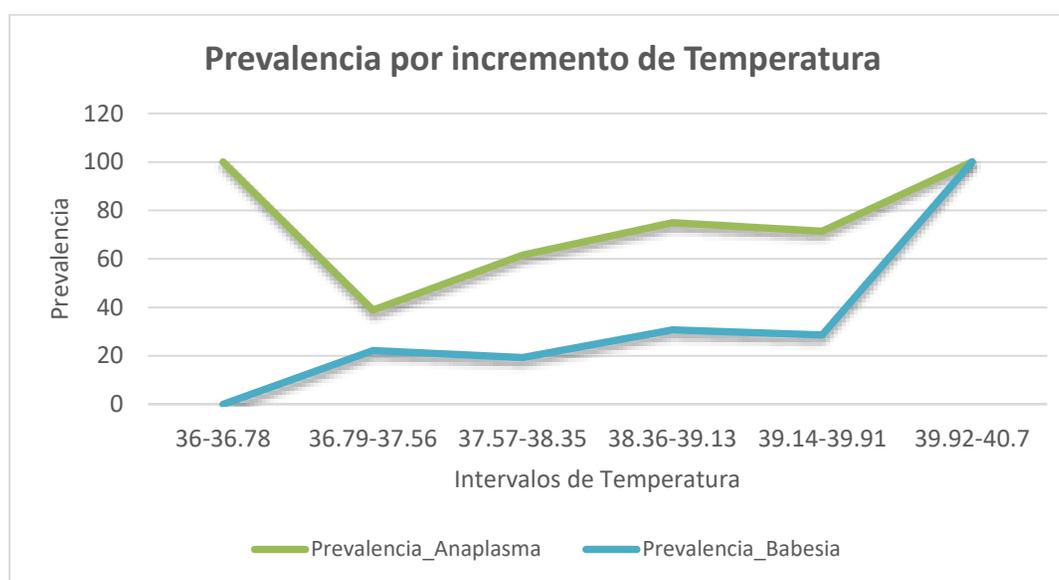
La Tabla 13 muestra que los animales positivos a *Anaplasma marginale* y *Babesia* spp. tienen una temperatura significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) que los animales negativos ( $\alpha = 0,05$ ).

Los animales con doble infección tienen una temperatura significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) a los animales con una y ninguna infección ( $\alpha = 0,05$ ).

**Tabla 13**

*Temperatura media de individuos positivos y negativos para A. marginale y Babesia spp.*

	Media de Temperatura °C	
	Positivos	Negativos
<i>Anaplasma marginale</i>	38.41	38.19
<i>Babesia spp.</i>	38.52	38.27



**Figura 12** Prevalencia por incremento de temperatura.

La positividad para *A. marginale* y *Babesia spp.* muestra una tendencia a aumentar a medida que se incrementa la temperatura (Figura 12). La fiebre es un síntoma común en bovinos infectados tanto con *A. marginale* como con *Babesia spp.* (Radostits et al., 2006), los animales que sobreviven a una infección aguda de *A. marginale* quedan persistentemente infectados caracterizado por ciclos bajos de rickettsemia, así como los terneros que se infectan durante los 6 a 9 meses de edad (Kocan et al., 2003). La reacción en cadena de la polimerasa como diagnóstico molecular de *A. marginale*

es una técnica que identifica animales persistentemente infectados (Kocan et al., 2010), esta detecta niveles muy bajos de reckettsemia (0,0001%) en animales portadores (Aubry & Geale, 2011) pero también identifica animales con una infección aguda, en esta fase los eritrocitos parasitados son fagocitados liberándose reactantes inflamatorios que consecuentemente producen fiebre (Radostits et al., 2006), son los animales en esta fase los que aportan mayoritariamente a la diferencia significativa de temperatura entre animales negativos y positivos a *A. marginale* por PCR y es por tal razón que la media de temperatura de los animales positivos es ligeramente mayor a los animales negativos pero no refleja el síntoma (Temperatura mayor a 40°C).

La fiebre es un síntoma del estado agudo de la infección con *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* (Florin-Christensen et al., 2014), pero dado que la PCR no solo detecta infecciones agudas si no también animales persistentemente infectados (Mosqueda et al., 2012) y los animales persistentemente infectados son aquellos que se infectaron en su primer año de vida o aquellos que sobreviven a una infección aguda, no presentan síntomas clínicos (Bock et al., 2004) por tanto la diferencia de temperatura entre animales positivos y negativos a *Babesia* spp. en este estudio es pequeña aunque significativa y la media de temperatura no implica un estado febril (>40°), este fenómeno es semejante al ocurrido en la infección con *Anaplasma marginale*.

#### 4.8. Prevalencia por Sexo

**Tabla 14**

*Prevalencia de A. marginale y Babesia spp. por sexo.*

Sexo	Positivos a <i>A. marginale</i>	%	Positivos a <i>Babesia spp.</i>	%
<b>Hembra</b>	105/158	66	36/158	22,78
<b>Macho</b>	9/12	75	8/12	66,67
<b>Total</b>	114/170	67,05	44/170	25,88

Se observó que un 66% de las hembras y un 75% de los machos estaban infectados y no se demostró diferencia significativa en la cantidad de machos y hembras positivos a *A. marginales* ( $P > 0.05$ , Chi cuadrado de Pearson). Muñoz, Fernández, & Jiménez, (2014) obtuvo una prevalencia de 68% en hembras y 67% en macho en la provincia de Zamora Chinchipe, utilizando frotis sanguíneo como método de diagnóstico. Tana-Hernández et al., (2017) amplificó el gen *msp5* como método de diagnóstico y no encontró diferencia significativa entre macho (77%) y hembras (87.2%), estos resultados demuestran que el sexo no es un factor de riesgo de infección con *A. marginale*.

Se observó que un 22.78% de las hembras y un 66.67% de los machos estaban infectados y una diferencia significativa en la cantidad de machos y hembras positivos a *Babesia spp.* ( $P < 0.05$ , Chi cuadrado de Pearson), este resultado no concuerda con la reciente evaluación de factores de riesgo realizada por Abdela et al., (2018) en Etiopia en donde compara 198 bovinos machos (12.1) y 210 hembras (11.4) utilizando la técnica directa de observación en frotis mediante microscopía y no encontró diferencia significativa entre sexos. Este resultado se debería confirmar con un número mayor de muestras de machos.

#### 4.9. Prevalencia por Raza

La raza Simmental fue la más predominante, seguida por el ganado mestizo que se refiere a cruces entre razas y la de menor proporción fue la raza Holstein. Es importante mencionar que se trata de ganado taurino (*Bos taurus*) y no de ganado cebuino (*Bos indicus*).

**Tabla 15**  
*Prevalencia de A. marginale y Babesia spp. por raza*

Raza	Positivos a <i>A. marginale</i>	%	Positivos a <i>Babesia spp.</i>	%
Holstein	14/26	54	4/26	15
Mestiza	45/60	75	18/60	30
Simmental	50/78	64	21/78	27

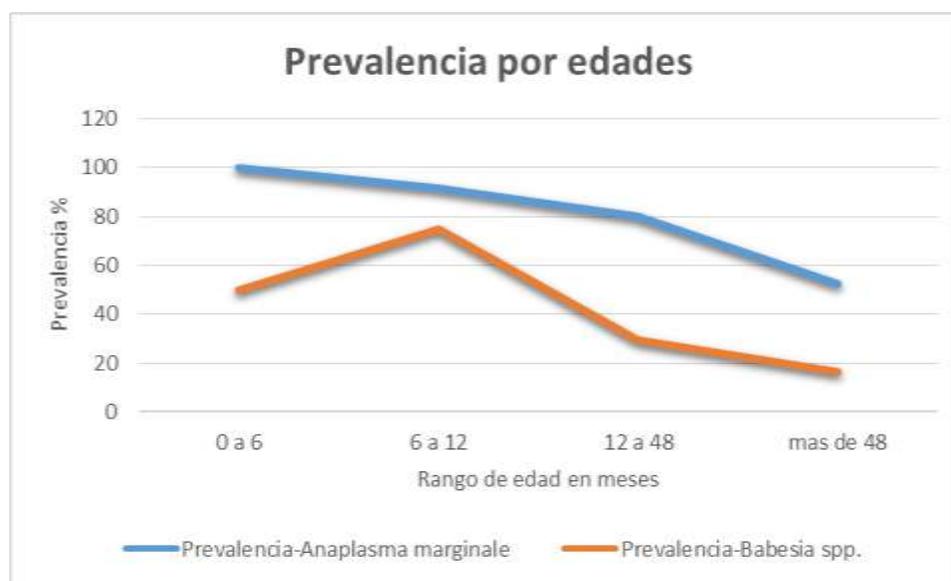
Se observó una prevalencia de *A. marginale* de 54% en la raza Holstein, 75% en los mestizos y 64% en la raza Simmental y no se evidenció una diferencia significativa ( $P > 0.05$ , Chi cuadrado de Pearson). Muñoz et al., (2014) realizó una comparación entre razas de ganado taurino y no encontró una diferencia significativa en la prevalencia de *A. marginale*. Todas las razas de ganado bovino son susceptibles a la infección, sin embargo en *Bos Taurus* el riesgo es mayor (BOCK et al., 1997; da Silva & da Fonseca, 2014).

Se observó una prevalencia de *Babesia spp.* de 54% en la raza Holstein, 75% en los mestizos y 64% en la raza Simmental y no se evidenció una diferencia significativa ( $P > 0.05$ , Chi cuadrado de Pearson). La raza es un factor de riesgo cuando se trata de *Bos Taurus* y *Bos indicus*, esta última muestra una mayor resistencia a la infección con *Babesia spp.* y se la atribuye a la relación evolutiva entre *Bos indicus*, *Boophilus spp.* y *Babesia spp.* (BOCK et al., 2004; Florin-Christensen et al., 2014).

#### 4.10. Prevalencia por edades

La prevalencia de *A. marginale* en el rango de edad de 0 a 6 meses es del 100% (4/4), de 6 a 12 meses es del 91,67% (11/12), de 12 a 48 meses es del 80% (52/65) y en los animales de más de 48 meses la prevalencia fue de 52,33% (45/86). Muñoz et al., (2014) en su estudio realizado en la provincia de Zamora Chinchipe mediante extendidos de sangre obtuvo no encontró una diferencia entre la prevalencia de los 4 grupos etarios.

La prevalencia de *Babesia* spp. en el rango de edad de 0 a 6 meses es del 50% (2/4), de 6 a 12 meses es del 75% (9/12), de 12 a 48 meses es del 29,23% (19/65) y en los animales de más de 48 meses la prevalencia fue de 16,28% (14/86).



**Figura 13** Prevalencia por edades.

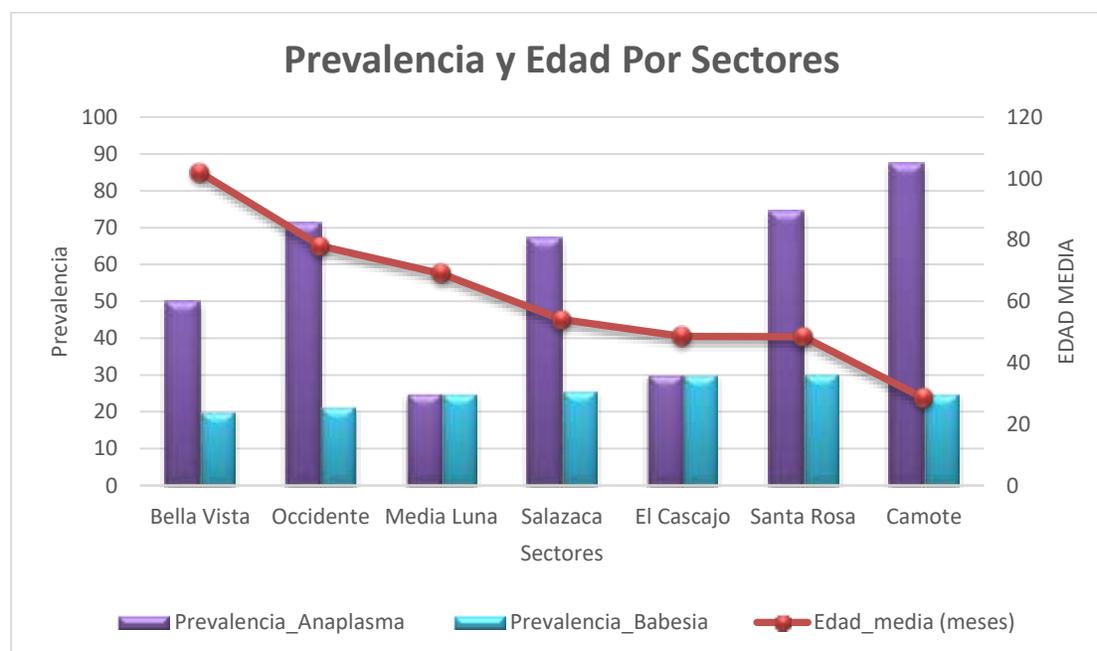
La Figura 13 muestra una tendencia del porcentaje de bovinos positivos a *A. marginale* y *Babesia* spp. a decrecer a medida que aumenta la edad. El riesgo de infección con *A. marginale* es

el mismo a cualquier edad, pero la severidad de la enfermedad si es dependiente de la edad, los terneros son menos susceptibles a la enfermedad, en aquellos menores a 6 meses raramente se ve la enfermedad, en terneros de entre 6 y 12 meses la enfermedad es leve, en animales infectados entre 1 y 2 años se desarrolla la fase aguda pero muy pocas veces es fatal mientras que en ganado mayor a dos años la enfermedad es aguda con un riesgo de mortalidad entre el 29 y el 49% (Aubry & Geale, 2011). La tendencia en la curva de *A. marginale* podría estar sesgada por la distribución de los individuos con mayor edad en cierto sectores como lo indica la figura 14, donde la menor prevalencia de *A. marginale* y la edad media más alta se encuentra en el sector Bella Vista y la mayor prevalencia con la menor edad media se encuentra en el sector Camote.

Estudios realizados por Flores, (2016) muestran una alta demanda del antibiótico tetraciclina para uso pecuario en el cantón Santa Rosa, provincia de El Oro, y confirma su significativa utilización por el diagnóstico del mismo en la carne de bovinos faenados en el Camal Municipal de dicho cantón, encontrándose presencia del antibiótico en el 32,4% de las muestras de un total de 74 reses faenadas, por otra parte (Noroña, 2017) encontró residuos de tetraciclinas en 5 muestras de carne de bovino en un total de 27 muestras, estos estudios junto a observaciones realizadas en campo, hacen suponer un uso indiscriminado de este antibiótico, utilizado para contrarrestar los efectos clínicos de la infección de *A. marginale* (Kocan et al., 2000), esta práctica podría influenciando la disminución de la prevalencia de *A. marginale* como muestra la Figura 13 ya que hay reportes que aplicaciones de oxitetraciclina a una dosis de 20 mg por kg de peso vivo por vía intramuscular en 2 a 4 ocasiones en intervalos de tiempo de 3 a 7 días puede eliminar el estado de portador de un animal, aunque sobre este argumento aún existe mucha controversia (Kocan et al., 2010).

La prevalencia de *Babesia* spp. es homogénea en todos los sectores a pesar de la marcada diferencia de edad media entre ellos (Figura 14). La tendencia de la curva de prevalencia por edades de *Babesia* spp. (Figura 13) se debe a que la susceptibilidad a la infección con *Babesia* spp. decrece con la edad pero la severidad de la enfermedad clínica se incrementa (Radostits et al., 2006).

En el rango de edad de 0 a 9 meses hay un 60% de infección con *Babesia* spp. (3/5), tomando en cuenta el argumento de la revisión de (Florin-Christensen et al., 2014) en una zona con estabilidad enzootica el 75% de los terneros deben estar infectados hasta los 9 meses de edad, por tanto la zona pecuaria de la Isla Santa Cruz no estaría en dicha estabilidad, sin embargo es necesario confirmarlo con un número mayor de muestras de individuos en esta edad, se menciona esto porque en una zona con estabilidad enzootica las medidas de control del patógeno no son necesarias (Florin-Christensen et al., 2014).



**Figura 14** Prevalencia y Media de Edad por Sectores.

#### 4.11. Presencia de Vectores.

La encuesta realizada (ANEXO E) evidenció que en el 100% de las UPAs existe presencia de garrapatas y en un 15% de las UPAs manifestaron presencia de moscas indicando que son notables durante los 2 meses más húmedos del año. En el archipiélago de Galápagos ya existen reportes de garrapatas, Coello, (2015) en su estudio llevado a cabo en 33 fincas de tres islas de archipiélago, entre ellas Santa Cruz, reportó que en el 93,94% de las UPAs se encontraron garrapatas de la especie *Rhipicephalus microplus* infectando a bovinos; también Guerrero, (2017) realizó un estudio en la Isla Santa Cruz, tomó muestras de garrapatas de 107 equinos de 54 fincas agropecuarias y encontró una prevalencia del 3,7% para el género *Rhipicephalus* y una prevalencia del 35,2% para el género *Dermacentor*.

La transmisión de *A. marginale* puede ser biológica o mecánica, la transmisión biológica está ligada al vector garrapata y es la más eficiente, sin embargo se conoce que la garrapata del trópico *Rhipicephalus microplus* en Sur América no parece ser el vector biológico (Aubry & Geale, 2011; Kocan et al., 2010). La alimentación de moscas hematófagas es una forma de transmisión mecánica de *A. marginale* y se sabe que los tábanos son un vector considerable (Kocan et al., 2000) sería apropiado realizar un estudio para conocer si existe este vector y si es significativo en la epidemiología de la enfermedad; pero dado que la presencia de moscas hematófagas en la isla no está totalmente dilucidada vale mencionar que la transmisión iatrogénica puede ser un factor de dispersión de la enfermedad ya que los fómites contaminados son una fuente importante para la diseminación de la bacteria dentro de la manada aunque no entre manadas (Aubry & Geale, 2011).

*Babesia* spp. tiene una prevalencia relativamente alta, ello está influenciado directamente por la presencia de garrapatas dado que estas son parte del ciclo de vida y son un vector muy eficiente de la enfermedad porque en ellas ocurre transmisión intra e inter estadial además de transmisión transovarica (Bock et al., 2004). El control de este vector en la zona de estudio contribuiría mucho en la disminución de la diseminación de la enfermedad.

## CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. Conclusiones

La técnica de PCR permitió detectar una alta prevalencia de *A. marginale* (67,06%) y una prevalencia moderada de *Babesia* spp. (25.88%) en bovinos de la Isla Santa Cruz, Provincia de Galápagos relacionada en mayor proporción a animales persistentemente infectados.

La presencia de *A. marginale* y de *Babesia* spp. en bovinos de la Isla Santa Cruz decrece con la edad del animal y podría estar ligada a un factor no identificado.

No se detectó presencia de anticuerpos IgG anti *Trypanosoma* en bovinos de la Isla Santa Cruz, sin embargo, al no haber realizado el muestreo en todas las fincas no podemos concluir que la Isla se encuentre libre de esta enfermedad.

Los resultados obtenidos en este estudio servirán como base para el desarrollo de programas de control de hemoparasitos en bovinos.

## 5.2. Recomendaciones

Se recomienda que en futuros estudios se pruebe el gen *msp1 $\alpha$*  o *msp4* como marcadores moleculares para identificar el origen geográfico de la cepa de *Anaplasma marginale* que circula en la isla Santa Cruz, de esta forma se podría verificar si la o las cepas que circulan son transmisibles por garrapatas.

Desarrollar estudios para determinar si *Rhipicaphalus microplus* es el vector biológico de *A. marginale* o su vez confirmar si existe otro género de garrapatas circulando entre los bovinos de la Isla.

Realizar un muestreo representativo en bovinos menores de un año con el fin de determinar si la zona pecuaria de la isla Santa Cruz está en un equilibrio enzootico de *Babesia* spp.

Secuenciar el fragmento amplificado de *Babesia* spp. con el objetivo de identificar la especie que está circulando en los bovinos de la Isla Santa Cruz.

Establecer medidas de control de garrapata, que son los vectores principales en bovinos adultos para minimizar y evitar los casos clínicos ocasionados por *A. marginale* y *Babesia* spp.

Confirmar los resultados de ELISAi para detectar *Trypanosoma* spp. mediante la utilización del diagnóstico molecular.

## REFERENCIAS

- Abdela, N., Ibrahim, N., & Begna, F. (2018). Prevalence, risk factors and vectors identification of bovine anaplasmosis and babesiosis in and around Jimma town, Southwestern Ethiopia. *Acta Tropica*, 177, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.010>
- Aubry, P., & Geale, D. W. (2011). A review of Bovine anaplasmosis. *Transboundary and Emerging Diseases*, 58(1), 1–30. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01173.x>
- Bock, R., Jackson, L., de Vos, a., & Jorgensen, W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology*, 129(7), S247–S269. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005190>
- Bock, R., Vos, A., Kingston, t., & McLellan, D. (1997). Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with &i>Babesia bovis, B bigemina and Anaplasma marginale. *Australian Veterinary Journal*, 75(5), 337–340. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1997.tb15706.x>
- Camargo, R. E., Uzcanga, G. L., & Bubis, J. (2004). Isolation of two antigens from Trypanosoma evansi that are partially responsible for its cross-reactivity with Trypanosoma vivax. *Veterinary Parasitology*, 123(1–2), 67–81. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.01.022>
- Carret, C., Walas, F., Carcy, B., Grande, N., Piu-igout, E., Moubri, K., ... Gorenflota, A. (1999). Babesia canis canis, Babesia canis voaeli, Babesia canis rossi: Differentiation of the Three Subspecies by a Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis on Amplified Small Subunit Ribosomal RNA Genes. *J. Eukrrpor. Microbid*, 46(3), 298–303. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb05128.x>
- Coello, M. (2015). *Caracterización e identificación de garrapatas en bovinos de 3 islas en la provincia de Galápagos*. Universidad San Fracisco de Quito.

- Cox, A., Tilley, A., McOdimba, F., Fyfe, J., Eisler, M., Hide, G., & Welburn, S. (2005). A PCR based assay for detection and differentiation of African trypanosome species in blood. *Experimental Parasitology*, *111*(1), 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2005.03.014>
- Cultek. (2006). Fundamentos y Tipos de ELISAs.
- da Silva, J. B., & da Fonseca, A. H. (2014). Risk factors for anaplasmosis in dairy cows during the peripartum. *Tropical Animal Health and Production*, *46*(2), 461–465. <https://doi.org/10.1007/s11250-013-0514-0>
- Desquesnes, M. (2004). *Livestock Trypanosomoses and their Vectors in Latin America. Tropical Medicine*. Paris: CIRAD-EMVT Publication. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.04.005>
- Desquesnes, M., Bosseno, M. F., & Brenière, S. F. (2007). Detection of Chagas infections using *Trypanosoma evansi* crude antigen demonstrates high cross-reactions with *Trypanosoma cruzi*. *Infection, Genetics and Evolution*, *7*(4), 457–462. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2007.01.007>
- Desquesnes, M., Dargantes, A., Lai, D. H., Lun, Z. R., Holzmuller, P., & Jittapalpong, S. (2013). *Trypanosoma evansi* and surra: A review and perspectives on transmission, epidemiology and control, impact, and zoonotic aspects. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2013/321237>
- Desquesnes, M., Holzmuller, P., Lai, D. H., Dargantes, A., Lun, Z. R., & Jittapalpong, S. (2013). *Trypanosoma evansi* and surra: A review and perspectives on origin, history, distribution, taxonomy, morphology, hosts, and pathogenic effects. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2013/194176>
- Escobar, A., Cevallos, O., Villarreal, P., Carranza, M., Carranza, H., & Pinargote, E. (2015).

- Prevalencia y detección por PCR anidada de *Anaplasma marginale* en bovinos y garrapatas en la zona central del Litoral ecuatoriano. *Ciencia Y Tecnologia*, 8(1), 11–17.
- Figuroa, J., Lira, J., Castañeda, R., Alvarez, J., Rojas, C., & Bautista, C. (2014). Pptimización de una prueba de PCR-RFLP para detección y diferenciación de *Babesia* sp. en garrapatas *Rhipicephalus microplus*. *Entomología Veterinaria*, 983, 978–983.
- Flores, M. (2016). Determinación de residuos de tetraciclinas en la carne bovina del camal del cantón Santa Rosa, Provincia de El Oro. Universidad Técnica de Machala.
- Florin-Christensen, M., Suarez, C. E., Rodriguez, A. E., Flores, D. A., & Schnittger, L. (2014). Vaccines against bovine babesiosis: Where we are now and possible roads ahead. *Parasitology*. <https://doi.org/10.1017/S0031182014000961>
- Gohil, S., Herrmann, S., Günther, S., & Cooke, B. M. (2013). Bovine babesiosis in the 21st century: Advances in biology and functional genomics. *International Journal for Parasitology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.09.008>
- González, Z. (2016). Optimización de la técnica inmunoenzimática elisa para la detección de anticuerpos igg contra *Trypanosoma* sp. en el ganado bovino. Universidad de Las Fuerzas Armadas-ESPE.
- Gonzatti, M. I., González-Baradat, B., Aso, P. M., & Reyna-Bello, A. (2014). *Trypanosoma* (duttonella) *vivax* and typanosomosis in latin America: Secadera/Huequera/Cacho Hueco. In *Trypanosomes and Trypanosomiasis* (pp. 261–285). [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1556-5\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1556-5_11)
- Guerrero, E. (2017). Identificación y distribución de garrapatas en equinos del sector pecuario de la isla santa cruz, galápagos. Universidad Central del Ecuador sede Galápagos.

- Guglielmone, A. A. (1995). Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Veterinary Parasitology*, 57(1–3), 109–119. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(94\)03115-D](https://doi.org/10.1016/0304-4017(94)03115-D)
- Hernandez Sampieri, R., Fernandez Collado, C., & Baptista Lucio, M. del P. (2010). Metodología de la investigación. Metodología de la investigación. <https://doi.org/>- ISBN 978-92-75-32913-9
- Homer, M. J., Aguilar-Delfin, I., Telford, S. R., Krause, P. J., & Persing, D. H. (2000). Babesiosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(3), 451–469. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.3.451-469.2000>
- Jones, T. W., & Dávila, A. M. R. (2001). Trypanosoma vivax - Out of Africa. *Trends in Parasitology*. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(00\)01777-3](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(00)01777-3)
- Jorgensen, J. H., Pfaller, M. A., Carroll, K. C., Landry, M. L., Funke, G., Richter, S. S., & Warnock, D. W. (2015). *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555816728>
- Kocan, K. M., Blouin, E. F., & Barbet, A. F. (2000). Anaplasmosis control. Past, present, and future. *Ann NY Acad Sci.*, 916, 501–509. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05329.x>
- Kocan, K. M., de la Fuente, J., Blouin, E. F., Coetzee, J. F., & Ewing, S. A. (2010). The natural history of *Anaplasma marginale*. *Veterinary Parasitology*. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.012>
- Kocan, K. M., Fuente, J. De, Alberto, A., Meléndez, R. D., Fuente, D., Guglielmone, A. a, & Mele, R. D. (2003). Antigens and Alternatives for Control of *Anaplasma marginale* Infection in Cattle. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(4), 698–712.

<https://doi.org/10.1128/CMR.16.4.698>

Levy, J. K., Crawford, P. C., Lappin, M. R., Dubovi, E. J., Levy, M. G., Alleman, R., ... Clifford, E. L. (2008). Infectious diseases of dogs and cats on Isabela Island, Galapagos. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(1), 60–65. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2007.0034.x>

Lin, A. V. (2015). Direct ELISA. *Methods in Molecular Biology*, 1318, 61–67. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2742-5\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2742-5_6)

McVey, D. S., Kennedy, M., & Chengappa, M. M. (2013). *Veterinary Microbiology*. *Veterinary Microbiology* (Vol. 70). <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.019>

Medina-Naranjo, V. L., Reyna-Bello, A., Tavares-Marques, L. M., Campos, A. M., Ron-Román, J. W., Moyano, J. C., ... Chávez-Larrea, M. A. (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 de La Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad Del Zulia*, 27(3), 162–171. <https://doi.org/0798-2259>

Monroy, M. F. (2015). Determinación de la seroprevalencia de *Anaplasma marginale*, a través del Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) en la población Bovina de la provincia de Galápagos-Ecuador. Universidad San Francisco de Quito.

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

Muñoz, T., Fernández, P., & Jiménez, V. (2014). Prevalencia de *Anaplasma marginale* mediante extendidos sanguíneos en el cantón Zamora, provincia de Zamora Chinchipe. *Centro de*

- Biotecnología*, 3(1), 44–51. Retrieved from [http://unl.edu.ec/sites/default/files/investigacion/revistas/2014-12-1/bio\\_art5.pdf](http://unl.edu.ec/sites/default/files/investigacion/revistas/2014-12-1/bio_art5.pdf)
- Navarrete, K. (2016). Optimización de un ensayo inmunoenzimático indirecto (ELISAI) para la detección de anticuerpos IgG contra *Anaplasma marginale* en el ganado bovino. Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE.
- Noroña, G. (2017). Determinación de residuos de antibióticos en carne y vísceras de origen bovino que se expenden en la ciudad de Quito. Universidad Politecnica Salesiana Sede Quito.
- OIE. (2004). Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres (mamíferos, aves y abejas). Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres.
- OIE. (2014). Directrices para el control de las enfermedades animales.
- Osório, A. L. A. R., Madruga, C. R., Desquesnes, M., Soares, C. O., Ribeiro, L. R. R., & Costa, S. C. G. Da. (2008). *Trypanosoma* (Duttonella) *vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World--a review. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(1), 1–13. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008000100001>
- Parker, P. G., Whiteman, N. K., & Miller, R. E. (2006). Conservation medicine on the Galápagos islands: partnerships among behavioral, population, and veterinary scientists. *The Auk*, 123(3), 625–638. [https://doi.org/10.1642/0004-8038\(2006\)123\[625:CMOTGI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1642/0004-8038(2006)123[625:CMOTGI]2.0.CO;2)
- Pazmiño, M., Soto, K., Romero, P., & Chavez, M. A. (2016b). Babesia Bovis En El Ganado Bovino Faenado En La Empresa Pública de Rastro de Quito. *ResearchGate*, (July). <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3495.8323>
- Radostits, O., Gay, C., Hinchcliff, K., & Constable, P. (2006). *VETERINARY MEDICINE A*

*textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats* (10th ed.). Saunders Ltd.

Retrieved from <https://www.elsevier.com/books/veterinary-medicine/radostits/978-0-7020-2777-2>

Reyna-bello, A. (2014). *Anaplasma marginale* : Logros y Retos. In C. Gonzales, N. Madrid, & E. Soto (Eds.), *Logros & Desafíos de la Ganadería Doble Propósito*.

Reyna-Bello, A., García, F. A., Rivera, M., Sansó, B., & Aso, P. M. (1998). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of anti-Trypanosoma evansi equine antibodies. *Veterinary Parasitology*, 80(2), 149–157. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(98\)00199-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(98)00199-X)

Reyna-Bello, a, Cloeckert, a, Vizcaíno, N., Gonzatti, M. I., Aso, P. M., Dubray, G., & Zygmunt, M. S. (1998). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5 for serological diagnosis of bovine anaplasmosis in Venezuela. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 5(2), 259–262.

Rodríguez, I. P., & Barrera, H. A. (2004). La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*, VII, 323–335. Retrieved from <http://eprints.uanl.mx/1584/>

Soto Ramirez, K. K. (2010). Determinación De La Prevalencia De Anaplasmosis En El Ganado Bovino Faenado En La Empresa Metropolitana De Rastro De Quito (EMRQ) Mediante La Aplicación De Las Técnicas De Diagnóstico: Microscopía De Frotis Sanguíneos, Reacción En Cadena De La Polimerasa , 145.

Tana-Hernández, L., Navarrete-Arroyo, K., Ron-Román, J. W., Reyna-Bello, A., & Chávez-Larrea, M. A. (2017). PCR-diagnosis of *Anaplasma marginale* in cattle populations of Ecuador and its molecular identification through sequencing of ribosomal 16S fragments, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1311-1>

- Tana, L. (2015). Identificación de *Anaplasma marginale* y su caracterización molecular por análisis de secuencia ribosomal 16S en una población bovina de Santo Domingo de los Tsachilas. Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE.
- Tavares, L., & Reyna, A. (2006). Estandarización De La Técnica De Pcr Para El Diagnóstico De La Anaplasmosis Bovina Y Ovina. *Agronomía Tropical*, 56(4), 501–512.
- Thermo Scientific. (2010). ELISA technical guide and protocols. *Thermo Scientific*, 65(815), 1–14.
- Tye, A., Snell, H. L., Peck, S. B., & Adersen, H. (2002). Outstanding terrestrial features of the Galapagos archipelago. *A Biodiversity Vision for the Galapagos Islands*, (May), 12–23.
- Uzcanga, G., Mendoza, M., Aso, P. M., & Bubis, J. (2002). Purification of a 64 kDa antigen from *Trypanosoma evansi* that exhibits cross-reactivity with *Trypanosoma vivax*. *Parasitology*, 124(3), 287–299. <https://doi.org/10.1017/S0031182001001214>
- 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.
- Weaver, A. D., St. Jean, G., & Steiner, A. (2007). *Bovine Surgery and Lameness. Bovine Surgery and Lameness*. <https://doi.org/10.1002/9780470751138>