

**ESTIMACIÓN DE LA PREVALENCIA DE BABESIOSIS BOVINA EN LA  
PROVINCIA DE SANTO DOMINGO DE LOS TSÁCHILAS MEDIANTE  
MICROSCOPIA DE FROTIS SANGUÍNEO Y REACCIÓN EN CADENA DE LA  
POLIMERASA (PCR).**

**Andrea J. Hernández S<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Laboratorio de Biotecnología Animal, Departamento Ciencias de la Vida, Carrera Ingeniería en Biotecnología, ESPE, PO Box: 171-5-231-B. Sangolquí – Ecuador. E-mail: andreajohanna23@hotmail.com

---

**RESUMEN**

Se realizó un estudio con la finalidad de determinar la prevalencia de Babesiosis bovina en el cantón Santo Domingo de los Tsáchilas. Para ello inicialmente se estandarizó la técnica de biología molecular PCR convencional de *B. bovis*, con una concentración de ADN de 20 [ng/μL].

La secuencia utilizada para el diseño de la PCR fue la proteína Bv60 de superficie merozoide mRNA de 60 [kDa] de *B. bovis*, los primers usados fueron BoF/BoR. Se probó la efectividad de la técnica con 10 muestras aleatorias de sangre de bovinos del camal Metropolitano de Quito, por ser un centro donde llegan la mayor cantidad de bovinos de descarte de todas las provincias del país y se determinó presencia hemoparásito en una de las muestras analizadas por medio de la técnica de biología molecular Reacción de Cadena de la Polimerasa (PCR). Posterior a la optimización de la PCR convencional de *B. bovis* se realizó un muestreo de 350 bovinos en 17 haciendas del cantón Santo Domingo de los Tsáchilas con el fin de determinar la prevalencia de la enfermedad en el cantón, las muestras fueron analizadas tanto para frotis como para PCR como prueba *gold standar*, del total de muestras ninguna fue positiva a las dos

técnicas posiblemente prevalezcan, en esta zona otras especies de *Babesia* que causan Babesiosis bovina.

La PCR de *B. bovis* optimizada, puede detectar y diferenciar animales infectados con *B. bovis*; con parasitemias muy bajas; con una sensibilidad de 1.25 [ng/μL], con lo que se recomienda ser implementada para un diagnóstico diferencial y cualitativo de Babesiosis bovina.

**Palabras clave.-** Babesiosis bovina, *B. bovis*, *B. bigemina*, PCR, Santo Domingo.

### ABSTRACT

This study was conducted in order to determine the prevalence of bovine babesiosis in Santo Domingo de los Tsáchilas province. Initially was standardized the technique of conventional PCR of *B. bovis*, with a DNA concentration of 20 [ng/uL].

The sequence used to design PCR was Bv60 surface protein mRNA merozoite 60 [kDa] of *B. bovis*, the primers used were BoF / BoR. We tested the effectiveness of the technique with 10 random samples of blood from cattle slaughterhouse of Quito, being a center reach as many cattle culling of all provinces and hemoparasite presence was determined in a sample analyzed by molecular biology technique Polymerase Chain Reaction (PCR).

Following the optimization of conventional PCR *B. bovis* were sampled from 350 cattle in 17 farms in the Santo Domingo de los Tsáchilas province to determine the prevalence of the disease in the province, the samples were analyzed for both smear and PCR as gold standard test, the total no samples were positive to both techniques may prevail in this area other species of *Babesia* that cause bovine babesiosis.

PCR *B. bovis* optimized, can detect and differentiate animals infected with *B. bovis*, with very low parasitemias, with a sensitivity of 1.25 [ng / uL], which is recommended to be implemented for differential and qualitative diagnosis of bovine babesiosis

## INTRODUCCIÓN

La babesiosis bovina es una enfermedad protozoaria del ganado bovino, transmitida por garrapatas y causada por *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. divergens*, afecta a una variedad de animales e incluso al ser humano, tiene mayor importancia económica en la ganadería debido a que disminuye el peso del ganado (Rodríguez & Solorio, 2002) y por ende se ve afectada la producción de carne y leche, pues se debe invertir en control y prevención tanto para contrarrestar los vectores, así como para el suministro de insumos veterinarios para el tratamiento (Rey, 2004).

En Ecuador se han realizado algunos estudios referentes a la determinación de la prevalencia de esta enfermedad en algunas zonas de la costa ecuatoriana, en un trabajo realizado en el Camal Metropolitano de Quito se determinó la presencia de Babesiosis bovina (Pazmiño, 2011), mediante la utilización de técnicas de diagnóstico microscópicas y serológicas, sin embargo los resultados obtenidos no demostraron la especie que afecta al ganado bovino.

Además, la falta de conocimiento de las instituciones encargadas de salud animal, ha hecho que esta enfermedad no tenga un control adecuado y siga causando estragos en el sector ganadero ecuatoriano, por lo cual el presente estudio tiene como objetivo principal estimar la prevalencia de Babesiosis bovina en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas mediante microscopía de frotis sanguíneo y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

## MÉTODOLÓGÍA

El presente estudio forma parte del proyecto de investigación científica: “*Estudio sero-epidemiológico de enfermedades hemoparasitarias en el ganado bovino y equino mediante técnicas inmunodiagnósticas en el cantón Santo Domingo de la Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas*”, el cual fue realizado con fondos de la Escuela Politécnica del Ejército.

**Área de estudio.-** El muestreo de campo fue realizado en 17 haciendas del cantón Santo Domingo de los Tsáchilas, por ser una zona de alta producción ganadera, se recolectaron 350 muestras de sangre de bovinos, en el cantón Santo Domingo de los Tsáchilas por ser uno de los principales centros ganaderos del país y presentar una variedad de especies bovinas, así como microclimas subtropicales.

**Recolección de muestras de sangre.-** Las muestras sanguíneas fueron extraídas de la vena caudal de la cola del animal, previa a una desinfección de esta zona (Figura 1). Las muestras de sangre fueron extraídas en tubos con anticoagulante (EDTA de 4[mL]) los cuales se utilizaron para realizar *in situ* el frotis sanguíneo de capa fina y lectura de hematocrito, para después ser enviadas a los laboratorios de Biotecnología Humana y Animal de la Escuela Politécnica del Ejército, y conservadas a -80°C para su posterior análisis.



Figura 1: Muestreo de bovinos en el cantón Santo Domingo

**Frotis sanguíneos (*Babesia spp.*)-** Se realizó frotis sanguíneo en capa fina con tinción con colorante Wright de la casa comercial MERCK.

**Hematocrito.-** Con el nivel de hematocrito se conoce el porcentaje de glóbulos rojos que tiene la sangre y se puede determinar el nivel de anemia del animal muestreado, para medir este nivel se usó el protocolo de microhematocrito (Figura 2).

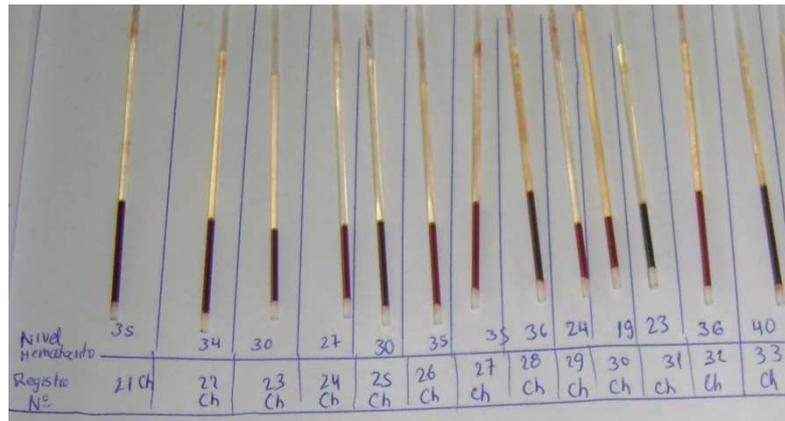


Figura 2: Lectura de nivel de hematocrito de bovinos muestreados.

**Optimización del Sistema de PCR.-** La optimización de PCR de *B. bovis* se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Humana de la Escuela Politécnica del Ejército ESPE. Para la optimización del sistema de PCR se basó en el protocolo establecido: “Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *B. bigemina*, *B. bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood” de Figueroa et al., (1993).

- El ADN control positivo de *B. bovis* fue proporcionado por la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia
- Secuencia de ADN previamente publicada, la cual codifica la proteína Bv60 presente en la superficie merozoide de *B. bovis* de 60 [kDa], Referencia en Gen Bank: M38218.1.
- Primers específicos para *B. bovis* para amplificar un fragmento de 360 [pb] a partir de ADN genómico de *B. bovis* de la casa comercial Invitrogen (Tabla 1).
- Termociclador Swift maxi modelo MX-BLC-4 (ESCO, Singapur).
- Reactivos para ensamblar PCR, los cuales son detallados en el Tabla 1 y 2

Tabla 1: Primers utilizados para la optimización de PCR de *B. bovis*

Primer	Secuencia 5´-3´	T°melting	%GC	Fragmento
BoF (Forward)	CACGAGGAAGGAACTACCGATGT TGA 26[pb]	68.32	50.00 %	360[pb]
BoR (Reverse)	CCAAGGAGCTTCAACGTACGAGGT CA 26[pb]	70.22	53.85 %	

Tabla 2: Reactivos para PCR y concentraciones

Reactivo	Concentración Inicial	Concentración Final	1X para una PCR
Primer forward BoF	100 [pmol/μL]	30 [pmol]	0.3 [μL]
Primer reverse BoR	100 [pmol/μL]	30 [pmol]	0.3 [μL]
dNTP´s	20 [mM]	1 [μL]	1 [μL]
MgCl <sub>2</sub>	50 [mM]	1.5 [Mm]	1.5 [μL]
Buffer	10 [X]	1 [X]	5 [μL]
Taq	50 [mM]	2.5 [U]	0.5 [μL]
Agua	5 [μ/μL]	-	36.4[μL]
ADN	20 [ng/μL]	-	5 [μL]
<b>Total</b>			<b>50 [μL] por cada reacción</b>

- Ensamble de PCR de *B. bovis*

Para el ensamble de PCR se usó el control positivo de *B. bovis* a una concentración de 20 ng/uL, se tomó 5[μL] por cada volumen de reacción de 50 [μL] con 2,5 [U] de Taq Polimerasa Invitrogen™, para el control negativo se usó 5[μL] de agua grado PCR el cual se realizó para controlar la contaminación de reactivos dentro del ensamble, y para la preparación de la “master mix” se uso las concentraciones y volúmenes que se detallan en el Tabla 3, donde se demuestran las concentraciones iniciales y finales de los reactivos usados en el ensamblaje de la PCR.

Tabla 3: Cantidades y concentraciones de reactivos para ensamblar PCR de *B. bovis*

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración inicial de reactivos</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Volumen por reacción, IX [μL]</b>
Primer BoF	100 [pmol/μl]	30 [pmol/50μl]	0.3
Primer BoR	100 [pmol/μl]	30 [pmol/50μl]	0.3
dNTPs	20 [mM]	0.4 [mM]	1
MgCl2	50 [mM]	1.5 [mM]	1.5
Buffer	10[X]	1[X]	5
<i>Taq</i> polimerasa	5.0 [U /μL]	2.5 [U]	0.5
H2O	-	-	36.4
ADN	-	20 [ng/mL]	5
<b>Volumen total de reacción</b>		<b>50 μL]</b>	

- Amplificación de productos de PCR de *B. bovis*

Luego del ensamblaje se colocó las muestras en el termociclador, para proceder a la amplificación del fragmento deseado bajo las temperaturas optimizadas y los ciclos de amplificación establecidos. El programa utilizado en el termociclador Swift maxi modelo MX-BLC-4 (ESCO, Singapur) constó de una denaturación inicial de 1 [min] a 95°C, alineamiento de 1 [min] a 58°C, extensión 1 [min] a 72°C, seguida de una extensión final de 10 [min] a 72°C y enfriamiento de 10 [min] a 4°C. En la tabla 4 se detallan las condiciones para la amplificación.

Tabla 4: Programa del termociclador para la amplificación de fragmento de 360pb de *B. bovis*.

<b>No. de ciclos</b>	<b>Proceso</b>	<b>Temperatura [°C]</b>	<b>Tiempo</b>
1	Denaturación Inicial	95	4 [min]
35	Denaturación	95	1 [min]
35	Alineamiento	58	1 [min]
35	Extensión	72	1 [min]
1	Extensión Final	72	10 [min]
1	Detener la reacción	4	10 [min]

- Ensayo de gradientes de temperaturas

Para determinar la temperatura optima a la cual el fragmento de *B. bovis* amplifica se realizó un ensayo de gradientes de temperaturas. La temperatura de alineamiento de los *primers* se calculó a partir de la temperatura de anealing usando la siguiente fórmula:

$$T_m = 4(C+G) + 2(A+T) + (\text{Regla de Wallace}) \quad \text{Ecuación 1}$$

$$T_a = T_m - 5 \quad \text{Ecuación 2}$$

Una vez encontrada la temperatura de alineamiento ( $T_a$ ) a la cual los *primers* hibridaran con el ADN, que generalmente es 5 °C debajo de la  $T_m$  (Hill, 1992), sin embargo para la estandarización de la técnica se utilizaron variaciones superiores a 5°C.

Finalmente se realizó una PCR convencional en un termociclador de gradiente de temperatura con las mismas condiciones de la PCR estandarizada como se indica en la tabla. Los resultados se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 %.

Tabla 5: Temperaturas de alineamiento y melting para amplificar fragmento de ADN de *B. bovis*

Primer	T <sub>m</sub> [°C]	Gradiente de temperatura [°C]
BoF	78	56
BoR	80	58
		61,6
		63,6
<b>Promedio de T<sub>m</sub> [°C]</b>	<b>79</b>	

- Ensayo de Adyuvantes

Una vez encontrada la temperatura de alineamiento de los *primers*, se realizó dos ensayos de adyuvantes con el ADN control de *B. bovis*, para el ensayo se utilizaron Glicerol 5% y Sulfato de Amonio 3[mM], se llevó a cabo con un volumen de reacción de 50 [µL] con 2,5 [U] de *Taq* Polimerasa Invitrogen™. Los resultados se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 %.

- Determinación de sensibilidad analítica

Para determinar y evaluar el límite de detección de la PCR de ADN de *B. bovis*, se realizaron diluciones seriadas del ADN control positivo de *B. bovis* usando como diluyente buffer TE, pues el ADN fue suspendido en esta buffer.

Se partió de una concentración de ADN de 20 [ng/μl]. Se realizó 5 diluciones con un factor de dilución 1:2, y se corrió el programa en el termociclador. Los resultados se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 %.

- Ensayo de Especificidad

Para evaluar la especificidad de los primers BoF y BoR para la amplificación de un fragmento de ADN de 360 [pb] de *B. bovis*, se realizó un ensayo de especificidad usando ADN de *Pseudomona spp*, *Acinetobacter spp.*, y *Babesia bigemina*, las cuales fueron diluidas hasta ser llevadas a una concentración de 20 [ng/mL], los ADNs fueron facilitados del cepario del Laboratorio de Biotecnología Humana de la ESPE, se corrió el programa en el termociclador. Los resultados se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 %.

## RESULTADOS

**Prevalencia de *B. bovis* en el cantón Santo Domingo de los Tsáchilas mediante frotis sanguíneo.**- Mediante la técnica de frotis sanguíneo se demostró que las 350 muestras observadas mediante microscopio LOMO PLC, con aumento 100X, ninguna presentó *B. bovis* es decir el 100% de las muestras no presentaron el parásito.

**Estandarización de PCR de *Babesia bovis*.**-

- Dilución de los Primers BoF/BoR: Los primers fueron diluidos con agua PCR grado biología molecular y se llevó a una concentración de 100 [pmol/μL], luego se corrió en gel para determinar su integridad y pureza como se muestra en la figura 3.

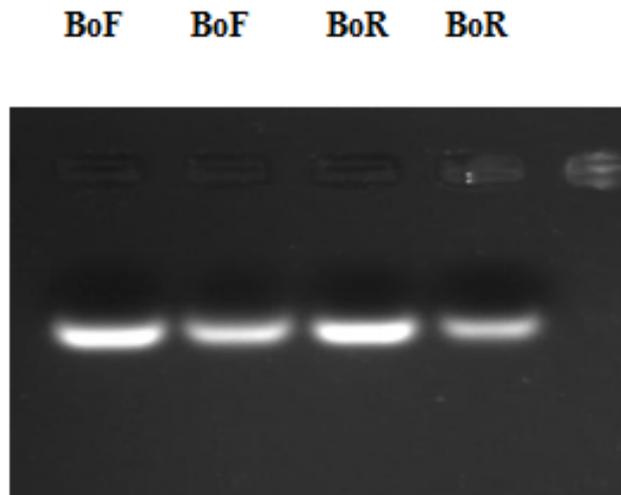


Figura 3: Primers BoF y BoR para PCR de *B. bovis*

- Ensayo de gradiente de temperatura

Para este ensayo se utilizó un volumen de reacción de 50 [μL] con 2,5 [U]. de *Taq* Polimerasa y concentración de ADN de 20 [ng/μL]. El gradiente de temperatura fue 56, 58, 61.6 y 63,6°C. Siendo la temperatura de 58°C, la óptima pues no se observan productos inespecíficos como en las otras temperaturas (Figura 4).

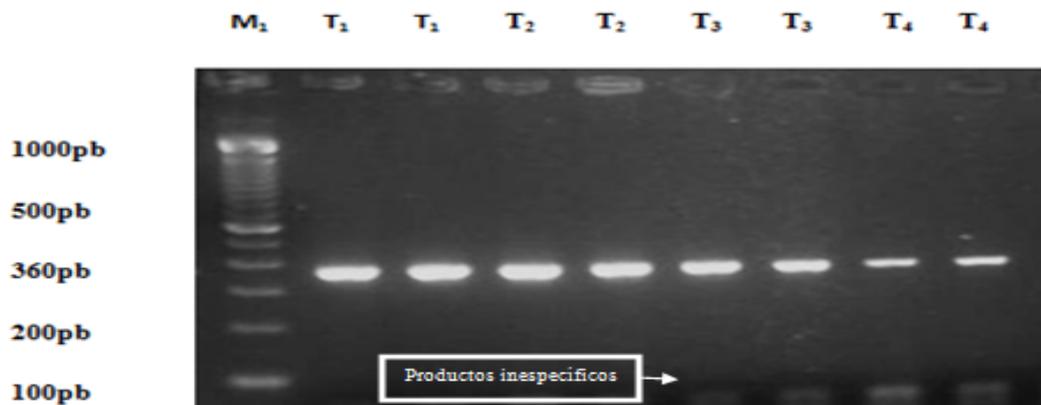


Figura 4.-Ensayo de optimización de temperaturas para PCR de *B. bovis*, Electroforesis en gel de agarosa al 2%, volumen de reacción 50[μL], donde se observan los productos de PCR de *B. bovis*. M<sub>1</sub>=Marcador molecular de 100pb; T<sub>1</sub>= 56°C; T<sub>2</sub>= 58°C; T<sub>3</sub>=61,6; T<sub>4</sub>=63.6.

#### - Ensayo de adyuvantes

En el ensayo de adyuvantes de la figura 3.4 se utilizó un volumen de reacción de 50[ $\mu\text{L}$ ] con 2.5 U de *Taq* Polimerasa y otro ensayo con volumen de reacción de 30[ $\mu\text{L}$ ] con 1.25U (Figura 5). Sin adyuvantes se amplificó el fragmento de 360 pb, con BSA 0,8 [ng/ $\mu\text{L}$ ] no hubo amplificación, mientras que con glicerol 5% se disminuye la amplificación del fragmento de PCR, por lo cual se concluye que los adyuvantes inhiben la amplificación de fragmentos de PCR para *B. bovis*.



Figura 5: Ensayo de adyuvantes para PCR de *B. bovis*, volumen de reacción 30 [ $\mu\text{L}$ ] donde se observan los productos de PCR de *B. bovis*. M<sub>1</sub>=Marcador molecular de 100pb; A<sub>1</sub>= Sin adyuvante; A<sub>2</sub>= BSA 0.8 [ug/ $\mu\text{L}$ ]; A<sub>3</sub>=Glicerol 5%.

#### - Ensayo de Sensibilidad Analítica

Se realizó una PCR, utilizando diluciones del control positivo de *B. bovis*, el cual inicialmente se encontró a una concentración inicial de 20 [ng/ $\mu\text{L}$ ], volumen de reacción fue de 50 [ $\mu\text{L}$ ] con 2,5 [U] de *Taq* Polimerasa como se observa en la Figura 6, se pudo detectar amplificación de fragmentos de ADN de *B. bovis*, hasta la dilución número 5, las diluciones fueron 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 (Proporción: [ $\mu\text{L}$  ADN/ $\mu\text{L}$  de TE], cada una de las cuales presentaban concentraciones de 10 [ng/ $\mu\text{L}$ ]; 5 [ng/ $\mu\text{L}$ ], 2.5 [ng/ $\mu\text{L}$ ], 1.25 [ng/ $\mu\text{L}$ ]. A diluciones más bajas que 1:16 con concentraciones de ADN menores a 1.25 [ng/ $\mu\text{L}$ ], no se vio amplificación de productos de PCR.

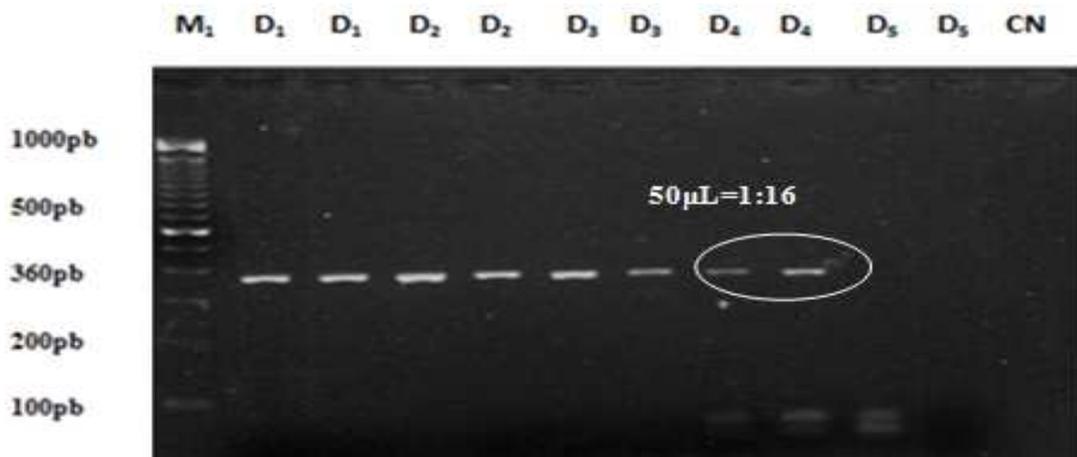


Figura 6: Ensayo de sensibilidad analítica de PCR de *B. bovis*, Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, donde se observan los productos de PCR de *B. bovis* con varias diluciones de ADN. M<sub>1</sub>=Marcador molecular de 100pb; D<sub>1</sub>= 10 [ng/µL]; D<sub>2</sub>=5 [ng/µL]; D<sub>3</sub>=2.5 [ng/µL]; D<sub>4</sub>=1.25 [ng/µL]; D<sub>5</sub>=0.625[ng/µL]; CN=Control Negativo.

#### - Parámetros de PCR de *B. bovis*

La concentración de ADN usada para la optimización de la PCR es de 20 [ng/µL] La secuencia utilizada para el diseño de la PCR fue de 60 [kDa], de la proteína de superficie merozoide mRNA de *B. bovis*, los primers usados son BoF/BoR, los cuales se llevó a una concentración de 30 [pmol], además se uso 20 [mM] de dNTP's, 1.5 [mM] de MgCl<sub>2</sub>, 1X Buffer, 2.5 [U] de Taq Polimerasa y 5 [µL] de ADN por cada reacción.

El programa dentro del termociclador utiliza 35 ciclos de denaturación del ADN molde, amplificando un fragmento específico para *B. bovis* de 360 pb. La denaturación es de 1 [min] a 95°C, alineamiento de 1 [min] a 58°C, extensión 1 [min] a 72°C, extensión final de 10 [min] a 72°C y un enfriamiento de 10 [min] a 4°C.

#### - Ensayo de especificidad de PCR de *B. bovis*

Mediante el ensayo de especificidad se determinó que los primers eran específicos para el género de *B. bovis* como se muestra en la figura 7, puesto que no amplificaron para ninguna de las especies que se probaron y fueron: *B. bigemina*, *Pseudomona spp.*, *Acinetobacter spp.*

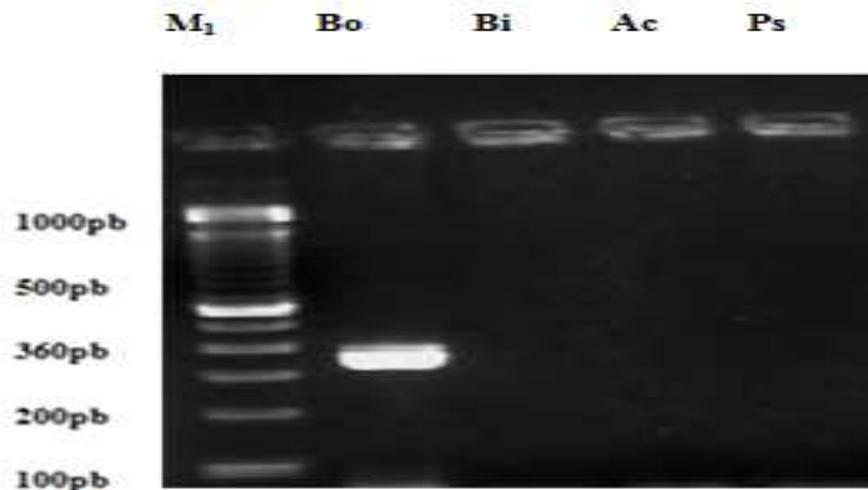


Figura 7: Ensayo de especificidad de PCR de *B. bovis*, volumen de reacción 50[ $\mu$ L], donde se observan los productos de PCR de 360pb de *B. bovis*. M<sub>1</sub>=Marcador molecular de 100pb; Bo= *B. bovis*; Bi= *B. bigemina*; Ac= *Acinetobacter spp*; Ps= *Pseudomona spp*.

- Análisis preliminar de PCR de *B. bovis*

Para evaluar la efectividad de la PCR se analizaron 10 muestras sanguíneas de bovinos recolectadas al azar en el camal metropolitano de Quito EMRQ, la muestra M1, dio positivo al diagnóstico determinando la presencia de *B. bovis* (Figura 8).

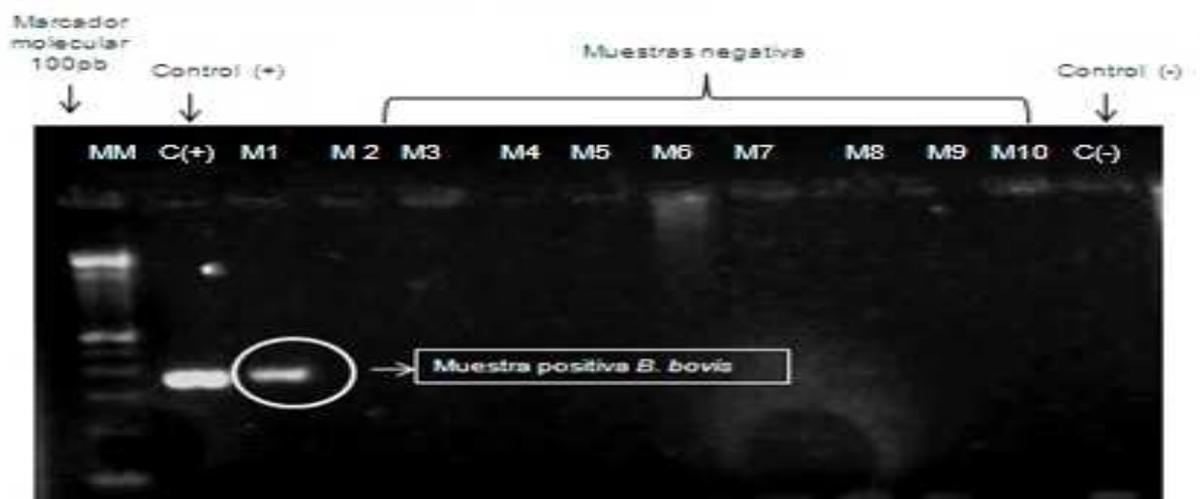


Figura 8: Electroforesis de productos de PCR Convencional de *B. bovis*, gel 2%, Muestras Camal Metropolitano de Quito, Hernández, 2012: C(+) = Control positivo *B. bovis*; M1= Muestra camal positiva; M2=Muestra camal 2; M3=Muestra camal 3; M4: Muestra camal 4; M5=Muestra camal 5; M6=Muestra camal 6; M7=Muestra camal 7; M8=Muestra camal 8; M9=Muestra camal 9; M20=Muestra camal 10; C(-) = Control negativo.

### Estimación de prevalencia de *B. bovis* en el cantón Santo Domingo de los Tsáchilas

**mediante PCR.-** La técnica de extracción de ADN y su cuantificación mediante gel y NanoVue™, permitió detectar un ADN integro y puro en las 350 muestras analizadas (figura 9). Todas las muestras fueron viables e inclusive la mayoría debieron ser diluidas por sus altas concentraciones de ADN.

Luego de comprobar la integridad del ADN con los geles, se hizo la lectura de la concentración de ADN de todas las muestras, en cada una de ellas los resultados de concentración y pureza, se obtuvieron mediante el equipo NanoVue™, todas las muestras tuvieron que ser diluidas con TE, hasta llegar a una concentración de 20ng/uL, que resulta óptimo para productos de PCR.

M1 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

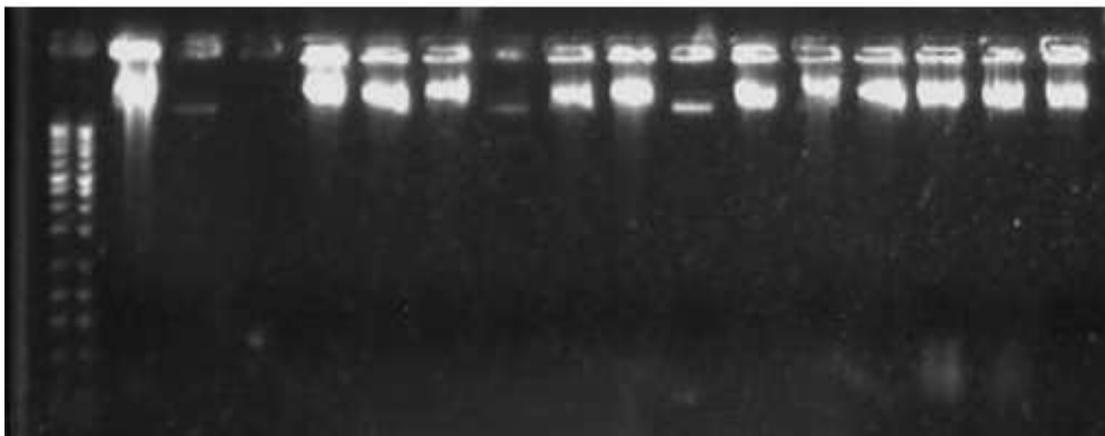


Figura 9: Electroforesis en geles de agarosa al 0.8% de ADN total de bovinos, M1=Marcador molecular de 100pb; 1 = Bovino 1; 2=Bovino 3; 3=Bovino 5; 4=Bovino 6; 5=Bovino 26; 6=Bovino 38; 7=Bovino 44; 8=Bovino 54; 9=Bovino 59; 10=Bovino 60; 11=Bovino 61; 12=Bovino 62; 13=Bovino 63; 14=Bovino 64;15=Bovino 69;16=Bovino 70.

De las 350 muestras analizadas por PCR, ninguna dio positivo a la prueba (Figura 10), en el cantón Santo Domingo de los Tsáchilas, pues al ser un diagnóstico seguro, específico, sensible y fiable, se determina que la prevalencia de *B. bovis* en el cantón es cero.



Figura 10: Electroforesis de productos de PCR Convencional de *B. bovis*, gel 2%: M1= Marcador molecular de 100pb; C(+)= Control positivo *B. bovis*; 1 = Bovino 1; 2=Bovino 3; 3=Bovino 5; 4=Bovino 6; 5=Bovino 26; 6=Bovino 38; 7=Bovino 44; 8=Bovino 54; 9=Bovino 59; 10=Bovino 60; 11=Bovino 61; 12=Bovino 62; 13=Bovino 63; 14=Bovino 64;15=Bovino 69;16=Bovino 70; 17= Bovino 71.

### Información zootécnica del ganado muestreado.-

- Distribución de animales muestreados en el cantón Santo Domingo según edad sexo y raza

Durante el periodo comprendido entre los meses de diciembre de 2011, enero y febrero del año 2012, se muestrearon 350 bovinos en 17 diferentes haciendas del cantón Santo Domingo de los Tsáchilas, de los cuales se tomó información mediante registros y una encuesta donde se recopilaron datos como: identificación del animal, edad, sexo, raza, presencia de otros ectoparásitos, presencia de abortos, color de mucosa, inapetencia, pérdida de peso, fiebre, orina con sangre.

El promedio de edad según el sexo de los animales muestreados es de 24.37 meses para machos, con una desviación standar de 2.5 meses y para hembras de 23.61 meses con una desviación de 3.30 meses como se muestra en la Tabla 6

Tabla 6: Distribución de bovinos muestreados según sexo y edad

Sexo	No. Bovinos	Media	Varianza	Desviación	Mínimo	Mediana	Máximo
Macho	8	24,375	6,2679	2,5036	22	23,5	30
Hembra	342	23,617	10,9291	3,3059	15	24	45

- Presencia de garrapatas

De las haciendas muestreadas únicamente en el 5.88% (1/17), no se encontró presencia de garrapatas, este porcentaje corresponde a la Hacienda La María, mientras que en el 94.12% (16/17) de haciendas se encontró garrapatas, para analizar el nivel de infestación se dividió a los animales muestreados en tres grupos: Grupo I con ausencia de garrapatas; Grupo II con nivel bajo de garrapatas (menor a 25 garrapatas), y el grupo III con nivel alto de garrapatas (25 y mayor a 25 garrapatas) (Tabla 7).

De los 350 animales muestreados el 30.6% (107/350) no presentan garrapatas, sin embargo el 69.4% (243/350) presentan garrapatas, de este porcentaje el 66.6% (233/243) tienen un nivel bajo de garrapatas, mientras que un 2.8% (10/243) de bovinos presentan una infestación alta del vector.

Tabla 7: Distribución de garrapatas en las haciendas muestreadas del cantón Santo Domingo

Hacienda	Ausencia de Garrapatas	Nivel Bajo	Nivel Alto	Total
Guadalupe	-	8	-	8
Lidia	24	3	-	27
Maralvin	10	13	-	23
La Carmita	-	6	10	16
La Floriana	-	16	-	16
La Fortuna	-	28	-	28
La María	23	-	-	23
Puerta del sol	-	18	-	18
R Hila	-	20	-	20
R Paraíso	8	13	-	21
San Antonio	29	8	-	37
San Luis	-	18	-	18
San Vicente	-	26	-	26
Santa Marianita	-	20	-	20
Soy la luz	13	8	-	21
Tres hermanos	-	8	-	8
Tres Marías	-	20	-	20
<b>Total bovinos</b>	<b>107</b>	<b>233</b>	<b>10</b>	<b>350</b>
	<b>30,60%</b>	<b>66,60%</b>	<b>2,80%</b>	<b>100%</b>

El número de garrapatas promedio que presentan los bovinos en cada una de las haciendas, se presenta en un rango de 15-25 garrapatas por zona afectada. El promedio de garrapatas por hacienda es de 12.46, el nivel más bajo de vectores presenta las haciendas Lidia y San Antonio donde el promedio de garrapatas es 2.63 y 3.78

respectivamente. Así mismo se analizó las haciendas con mayor presencia de garrapatas y se determinó que en la Hacienda La Fortuna existe el nivel más alto de garrapatas 23.68 como se muestra en la Tabla 8 y figura 11.

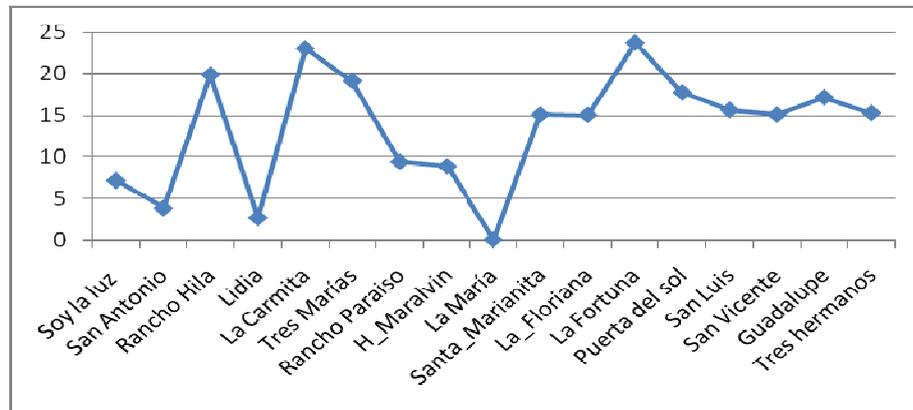


Figura 11: Número de garrapatas promedio por hacienda

Tabla 8: Distribución de garrapatas por haciendas muestreadas en el cantón Santo Domingo

Hacienda	Promedio de Garrapatas
Soy la luz	7,1
San Antonio	3,78
Rancho Hila	19,85
Lidia	2,63
La Carmita	23
Tres Marías	19,1
Rancho Paraíso	9,38
H. Maralvin	8,83
La María	0
Santa Marianita	15,05
La Floriana	15
La Fortuna	23,68
Puerta del sol	17,72
San Luis	15,61
San Vicente	15,04
Guadalupe	17,13
Tres hermanos	15,25
<b>Promedio Total</b>	<b>12,46</b>

La época del año en la que se presentan las garrapatas y ectoparásitos con más frecuencia son los meses de verano: Junio, Julio y Agosto. De acuerdo a las haciendas muestreadas en el mes de Agosto el 52.94% (9/17) de los encuestados coinciden en que

el mes de Agosto es uno de los más críticos en los que se refiere a ectoparásitos y garrapatas.

- Nivel de hematocrito de animales muestreados en el cantón Santo Domingo

El hematocrito indica el porcentaje del volumen de sangre total que es ocupado por células sanguíneas. El porcentaje de hematocrito indica las condiciones clínicas del animal, valores bajos de hematocrito son altamente dependientes de la disminución de la cantidad de hemoglobina y número de glóbulos rojos por unidad de volumen. Invariablemente la anemia se acompaña con un descenso del valor de hematocrito y casi siempre del número de hematíes, siendo una consecuencia de muchas enfermedades tales como las causadas por hemoparásitos. Se habla de anemia en bovinos cuando los glóbulos rojos se encuentran por debajo de 5 millones por [uL] de sangre, el valor hematocrito es inferior a 24% y la concentración de hemoglobina baja por debajo de 8 [g/dL].

El presente estudio reporta un valor promedio para el hematocrito de 30.34%, con una distribución de datos normales entre 25 y 40%, coincidiendo notablemente con el rango de datos empleado por a Lombardo (1993), quien considera valores normales entre 24% y 40%. Otros autores reportan valores entre 24 y 46% como normales (Terwaki, 2011) (Tabla 9 y Figura 12).

Tabla 9: Nivel de hematocrito en haciendas muestreadas del cantón Santo Domingo.

<b>Hacienda</b>	<b>Hematocrito</b>
Soy la luz	28,14
San Antonio	32
Rancho Hila	30,3
Lidia	30,3
La Carmita	30,88
Tres Marías	30,6
Rancho Paraíso	31,43
H Maralvin	29,26
La María	30,34
Santa Marianita	33,85
La Floriana	28,75
La Fortuna	31,29
Puerta del sol	28,22
San Luis	27,78
San Vicente	31,85
Guadalupe	27,13
Tres hermanos	27,25
<b>Promedio Total</b>	<b>30,34</b>

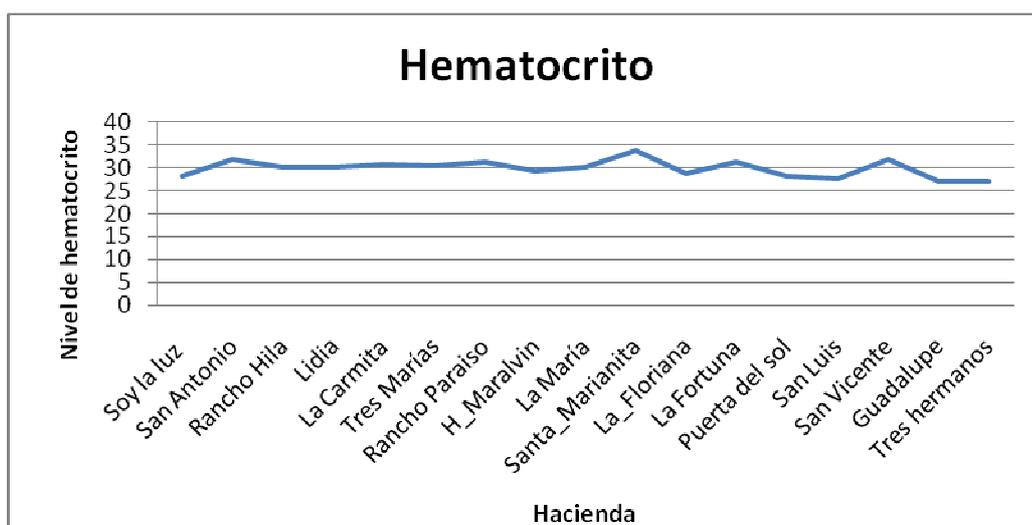


Figura 12: Promedio del nivel de hematocrito en haciendas del cantón Santo Domingo

## BIBLIOGRAFÍA

- Allred, D. (2003). Babesiosis: persistence in the face of adversity. *Parásitology Today* (19), 51-55.
- Allsopp, M. T, Cavalier-Smith, T, De Waal, D. T. & Allsopp, B. A. (1994). Phylogeny and evolution of the piroplasms. *Parásitology* (108), 147–152.
- Almeria, S. (2001). Bovine piroplasms in Minorca (Balearic Islands, Spain): a comparison of PCR-based and light microscopy detection. *Veterinary Parásitology* (99), 249-259.
- Álvarez, A. Cantó, G. (1991). Diagnóstico de la babesiosis bovina. División del sistema *Universidad abierta FMVZ-UNAM*, (15), 62-71.
- Angus, B. (1996). The history of the cattle tick *Boophilus microplus* in Australia and achievements in its control. *International Journal of Parásitology* (26), 1341–1355.

- Araujo, F. (1998). Comparison between enzyme-linked immunosorbent assay, indirect fluorescent antibody and rapid agglutination tests in detecting antibodies against *Babesia bovis*. *Veterinary Parasitology* (74), 101-108.
- Azambuja, C. Gayo, V. Solari, M. (1993). Biotecnología aplicada a la detección de agentes infecciosos en bovinos. Unidad de Biotecnología INIA. *División de Parasitología DILAVE* (12), 1-5.
- Barros, C. Figuera, R. (2008). Babesiosis. In: Foreign animal diseases. 7th edition. Boca Raton, United States Animal Health Association (15), 147-158.
- Beaver, P. Jung, R. Cupp E. (1984). Family Babesiidae. *Clinical parasitology* (9), 205-212.
- Benavides, MV. Sacco, AM. (2007). Differential *Bos taurus* cattle response to *Babesia bovis* infection. *Vet Parasito* (150), 54-64.
- Bishop, JP. Adams, LJ. (1974). *Babesia bigemina*: Immune response of cattle inoculated with irradiated parasite. *Exp Parasitol* (35), 35-43.
- Blood, D.C. Henderson, J.A. Radostits, O.M. (1986). *Medicina Veterinaria* (6), 1038 - 1067.
- Bock, R. Jackson, L. De Vos, A. Jorgensen W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology* (129), 247-69.
- Bock, R. Kingston, T. Devos, AJ. (1999) Effect of breed of cattle on transmission rate and innate resistance to infection with *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* transmitted by *Boophilus microplus*. *Austr Vet J* (77), 461-464.
- Bock, B. (2004). Babesiosis in cattle. *Parasitology* (129), 247-269.
- Boero, J. (1976). Parasitosis de Animales. Piroplasmosis, Anaplasmosis. *Parasitology* (4), 201 - 236.
- Brayton, K. Lau. (2007). Genome Sequence of *Babesia bovis* and comparative analysis of apicomplexa hemoprotozoa. *PLoS Pathog.* (10), 1401-141.

- Brown, CDG. Hunter, AG. Luckins, AG. (1990). Bovine babesiosis. In: Sewell MMH, Brocklesby DW (eds.). Handbook on Animal Diseases in the Tropics, Chapter: Diseases caused by protozoa. *Baillière Tindall*. (12), 161-170.
- Brown, W.C. (2001). Molecular approaches to elucidating innate and acquired immune responses to *Babesia bovis*, a protozoan parasite that causes persistent infection. *Vet. Parasitol* (101), 233-248.
- Brown, C.W. Logan, K.S. Wagner, G.G. Tetzlaff, L. (1991). Cell mediated immune response to *Babesia bovis* merozoite antigens in carrel following infection with tick-derived or cultured parasites. *Infect. Immun.* (59), 2418-2426.
- Brown, W.C. Palmer, G.H. (1999). Designing Blood-stage Vaccines against *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Parasitol. Today*. (15), 275-281.
- Brunhansen, H. Christensson, DA. Hardeng, F. Gronstol, H. (1997). Experimental infection with Ehrlichia and Babesia divergens in cattle. *J Vet Med*. (44), 235-243.
- Callow, LL. Tammemagi, L. (1967). Vaccination against bovine babesiosis: infectivity and virulence of blood from animals either recovered from or reacting to Babesia Argentina. *Aust Vet J*. (43), 249-256.
- Callow, LL. (1977). Vaccination against bovine babesiosis In: Immunity to blood parasites of animals and man. Ed. Miller, L.H., Pino A.J and Mckelvey J.J. *New York: Plenum Press*. (77), 121-149.
- Cant, A. Ortega, S. Mosqueda, J. Garcia-Vazquez, Z. Henke, SE. George, JE. (2007). Immunologic and molecular identification of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in free-ranging white-tailed deer in northern México. *J Wildl Dis*. (43), 504-7.
- Carrique, J. Ribera, H. (1999). Nuevas pruebas de laboratorio para el diagnóstico de babesiosis y anaplasmosis bovina. LIDIVET. Santa Cruz, Bolivia. (1), 1-13.
- Carrique, J. Ribera, H. (2000). Manual Práctico sobre Garrapatas y Enfermedades transmitidas por Garrapatas. LIDIVET. Santa Cruz, Bolivia. (2). 1 - 36.

- Cho, SH. Kim, TS. Lee, HW. Tsuji, M. Ishihara, C. Kim, JT. Wee, SH. Lee, CG. (2002). Identification of newly isolated Babesia parasites from cattle in Korea by using the Bo- RBC-SCID mice. *Korean J Parasitol.* (40), 33-40.
- Coldiby, R., Kindt, T., & Osborne, B. (2000). *Immunology New York.* (36), 105-108.
- Cordero del Campillo, M. (1999). Parasitología Veterinaria. In M. Cordero del Campillo, *Parásitología Veterinaria.* (2), 283-293.
- Corrier, DE. (1975). Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in the lowland tropics of Colombia. *Wells, A.E, ed. Workshop on haemoparasites.* (17), 23-48.
- Court, R.A. Jackson, L.A. Lee R.P. (2001). Elevated anti-parasitic activity in peripheral blood monocytes and neutrophils of cattle infected with *Babesia bovis*. *Int. Jour. for Parasitol.* (19), 2937.
- Criado-Fornelio, A. (2003). Molecular studies on Babesia, Theileria and Hepatozoon in Southern Europe. *Veterinary Parasitology.* (113), 189-201.
- Gray, J. Von Stedingk, L.V. Granstrom, M. (2002). Zoonotic babesiosis. *Int J Med Microbiol.* (291), 108-111.
- Gray, JS. (2006), Identity of the causal agents of human babesiosis in Europe. *Int J Med Microbiol.* (40), 131-136.
- Gunglielmone, A. (1995). Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Veterinary Parasitology.* (57), 109-119.
- Harkirat, S. (2007). Seroprevalence of babesiosis in cattle and buffaloes by indirect fluorescent antibody test. *Journal of Veterinary Parasitology.* (21), 1-4.
- Hernández, R. (1990). Estudio sobre el efecto de cuatro aislamientos de *Babesia bigemina* en bovinos y garrapatas. M. C. Tesis. UAEM.
- Hill, P. (1992). The Polymerase Chain Reaction in Molecular and Microbiology. *Biotechnology and Genetic Engineering Review.* (10).

- Homer, M. (2000). Babesiosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 13 (3), 451-469.
- Jacobson, R. Parrodi, F. Wright, I.G. (1993). Fitzgerald, C.J. and Dobsin C.: *Babesia bovis*: in vitro phagocytosis promoted by immune serum and by antibodies produced against protective antigens. *Parásitol.* (79), 221-226.
- Jongejan, F. Perry, BD. Moorhouse, PDS. Musisi, FL. Pegram, RG. Snacken, M. (1988). Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Zambia. *Trop Anim Health* (20), 234-242.
- Jorgensen, WK. Weilgama, DJ. Navaratne, N. Dalgliesh, RJ. (1992). Prevalence of *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* at selected localities in Sri Lanka. *Trop Anim Health Prod.* (24), 9-14.
- Jung-Yeo, K. (2007). First Case of Human Babesiosis in Korea: Detection and Characterization of a Novel Type of *Babesia* sp. (KO1) Similar to Ovine *Babesia*. *Clinical Microbiology.* (45), 2084–2087.
- Kanyari, PWN. Kagira, J. (2000). The role of parasitic diseases as causes of mortality in cattle in a high potential area of central Kenya: a quantitative analysis. *Onderstepoort J Vet* (67), 157 161.
- Kemp, DH. Willadsen, P. Cobon, GS. (1991). Development of a vaccine against the tropical cattle tick *Boophilus microplus*. En *Garrapatas y enfermedades que transmiten. Segundo Seminario Internacional de Parasitología Animal.* Oaxtepec, Morelos. 9-11.
- Kuttler, KL. Levy, MG. Ristic, M. (1994). Cell cultivo-derived *Babesia bovis* vaccine: Sequential challenge exposure of protective immunity during a 6 months post-vaccination period. *Amer J Vet Res.* (44), 1456.
- Lalama, L. (2004). Determinación de Piroplasmosis Bovina en el cantón General Antonio Elizalde (Bucay). Tesis de grado de la facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Agraria del Ecuador, 38.
- Levine, N. (1971). Taxonomy of the prioplasms. *Transactions fo the American Microcopolical Society*, 2-33.

- Hostis, M. Seegers, L. (2002). Tick-borne parasitic diseases in cattle: current knowledge and prospective risk analysis related to the ongoing evolution in French cattle farming systems. *Vet Res.* (33), 599-611.
- Liu, J. Yin, H. Liu, G. Guan, G. Ma, M. Li, A. Liu, Z. Li, Y. Ren, Q. Dang, Z. Gao, J. Bai, Q. Zhao, H. Luo, J. (2008). Discrimination of *Babesia major* and *Babesia ovata* based on ITS1 5.8S-ITS2 region sequences of rRNA gene. *Parásitol Res.* (13), 709-713.
- Lombardo, R. (1993). Técnicas para el Diagnóstico de Babesiosis y Anaplasmosis Bovinas. Primer Informe del Comité de expertos sobre hematozoarios del área Sur del IICA (Argentina, Chile, Paraguay y Uruguay), 25-29.
- Macleod, M. (2009). Cattle tick: Queensland Government. Retrieved Enero 28, 2011, from Primary industries and fisheries, Queensland Government: [http://www.dpi.qld.gov.au/4790\\_12815.htm](http://www.dpi.qld.gov.au/4790_12815.htm).
- Mahoney, DF. Ross, DR. (1972). Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. *Aust Vet J.* (48), 292-298.
- Mahoney, DF. (1967). Bovine babesiosis: The immunization of cattle with killed *Babesia argentina*. *Exp Parasitol.* (20), 125-129.
- McCosker, PJ. (1975). Control of piroplasmiasis and anaplasmosis in cattle. A practical
- Osorno, M. (1978). Babesiosis en México. *Vet Mex.* (9), 203-218.
- Otte, (1992). Anaplasmosis y Babesiosis Bovina de Colombia. Informe Técnico # 12. Instituto Colombiano de Agropecuaria. Santa Fe, Bogotá. (7), 23-25.
- Parrodi, F. Wright, IG. Goodger, BV. Gale, K. (2009). The development of and perspectives for the use of a recombinant *Babesia* vaccine. En: Garrapatas y enfermedades que transmiten. Segundo Seminario Internacional de Parasitología Animal. Oaxtepec, Morelos, México. (11), 209-215.

- Patorroyo, JH. Prates, A. Tavares, C. Mafra CL, Vargas MI. (1995). Exoantigens of an attenuated strain of *Babesia bovis* used as a vaccine against bovine babesiosis. *Vet Parasit.* (3), 189-199.
- Pazmiño, M. (2011). Determinación de la prevalencia de *Babesia bovis* en el ganado bovino faenado en la Empresa Metropolitana de Rastro de Quito, mediante la utilización de técnicas microscópicas y serológicas. Tesis de grado.
- Purnell, RE. (1980). Vaccines against piroplasms. En: Taylor ERA, Muller, Blackwell, ed. Symposia of the British Society for Parasitology. Vol. 18. Scientific Publications. Oxford, (17), 25-56.
- Purnell, RE. Brocklesby, DW. (1977). *Babesia divergens* in splenectomised calves: immunogenicity of lyophilised plasma from an infected animal. *Res Vet Sci.* (23), 255-256.
- Rey, C. (2004). Hemoparasitosis en América Latina: El caso Venezuela. Red Electrónica de Garrapatas y Enfermedades Transmitidas por Garrapatas para América Latina y el Caribe, *RedEctopar.* (5), 1-5.
- Reyes, C.P. (1987). Pruebas de concordancia en: Bioestadística Aplicada. Agronomía, Biología, Química. Ed Trillas, México. 181-185.
- Ristic, M, Levy, M. A. (1981). New era of research toward solution of bovine babesiosis. En Ristic, M Kreier, JP, ed. Babesiosis. New York: Academic Press, 509.
- Rodríguez, S.D. (1985). Immunochemical characterization of *Babesia bovis* clones. Ph. D. Dissertation. University of Missouri Columbia, 85-89.
- Rodríguez, V. Solorio, R. J. (2002). Epidemiología de la Babesiosis bovina. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad de Yucatán, Mérida. Yucatán, México ([www.agroparlamento.com](http://www.agroparlamento.com); [www.uady.mx/biomedic/rb97817.html](http://www.uady.mx/biomedic/rb97817.html)).
- Rogers, RJ. (1971). An evaluation of tick fever outbreaks in northern Queensland in recent years. *Aus Vet J*, (47), 415-417.

- Rojas, E. (2004). Prevalence and incidence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in a cattle herd in Axochiapan. Morelos. *Avances en investigación agropecuaria*, 1-9.
- Schettters, TP. Kleuskens, J. Scholtes, N. Gorenflot, A. (1998). Parasite localization and dissemination in the *Babesia*- infected host. *Ann Trop Med Parasitol.* (92), 513-519.
- Sevinc F, Sevinc M, Birdane FM, Altinoz F (2001) Prevalence of *Babesia bigemina* in cattle. *Rev Med Vet.* (152), 395-398.
- Surzycki S. (2000). Basic techniques in molecular biology. Springer Lab Manuals.
- Taylor, M. (2000). Protozoal disease in cattle and sheep. *In Practice* (22), 604-617.
- Taylor, SM. Kenny, J. Mallon, T. (1983). The effect of multiple rapid passage on strains of *Babesia divergens*: A comparison of the clinical effects on juvenile and adult cattle of passage and irradiated parasites. *J Comp Pathol.* (93), 391.
- Terkawi, M. (2011). Serological survey of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle in South Africa. *Veterinary Parasitology.*
- Tizard, I. (2002). *Inmunología Veterinaria*. México: McGraw Hill. *Brasileña de Parasitología Veterinaria.* (3), 169-173.
- Todorovic, RA. Lopez, LA. Lopez, A. González, EF. (1975). Bovine babesiosis and anaplasmosis: control by premonition and chemoprophylaxis. *Exp Parasitol.* (37), 92-104.
- Vial, HJ. Gorenflot, A. (2006). Chemotherapy against babesiosis. *Vet Parasitol.* (138), 147-160.
- Wagner, G. Holman, P. Cruz, D. Waghela, S. Sahagun, A. Medellín, J. Domínguez, J. Rodríguez, I. (1994). *Babesia* Vaccine Trials in México. *Eighth International Congress of Parasitology. Izmir-Turkey.* (10), 10-14.
- Wong, JYM. Opdebeck, JP. (1990). Larval membrane antigens protect Hereford cattle against infestation with *Boophilus microplus*. *Parasite Immunol.* (12), 75-83.