



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS
NATURALES RENOVABLES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“PREVALENCIA DE *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* EN EXPLOTACIONES GANADERAS DEL SECTOR ESTE DE LA PROVINCIA ZAMORA CHINCHIPE, ECUADOR”

*Tesis de Grado previa a la
obtención del título de
Médico Veterinario
Zootecnista*

AUTOR:

Diego Enrique Espinoza Espinoza

DIRECTOR:

Dr. Tito Muñoz Guarnizo

1859
LOJA- ECUADOR

2017

CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

Dr. Tito Muñoz Guarnizo

DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICA:

Que he revisado la presente tesis titulada “**PREVALENCIA DE *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* EN EXPLOTACIONES GANADERAS DEL SECTOR ESTE DE LA PROVINCIA ZAMORA CHINCHIPE, ECUADOR**”, realizada por el egresado Diego Enrique Espinoza Espinoza. La misma que cumple con todos los lineamientos establecidos para su respectiva presentación normada por la Universidad Nacional de Loja, por lo cual, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.

Loja, 26 de Octubre del 2016

Atentamente



Dr. Tito Muñoz Guarnizo

DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

“PREVALENCIA DE *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* EN EXPLOTACIONES GANADERAS DEL SECTOR ESTE DE LA PROVINCIA ZAMORA CHINCHIPE, ECUADOR”

Tesis presentada al tribunal de Grado como requisito previo a la obtención del título de:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADA

Loja, 26 de Octubre del 2016

Dra. Laura de Jesús Peña Merino

PRESIDENTA DEL TRIBUNAL

Dr. Segundo German Barragán Fierro Mg. Sc.

VOCAL

Dr. Julio Ignacio Gómez Orbes

VOCAL

AUTORÍA

Yo, Diego Enrique Espinoza Espinoza, declaro ser autor del presente trabajo de tesis y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos o acciones legales, por el contenido de la misma.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi tesis en el Repositorio Institucional-Biblioteca Virtual.

Autor: Diego Enrique Espinoza Espinoza

Firma: _____



Cédula: 0705655827

Fecha: Loja, 03 de enero de 2017

CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS POR PARTE DEL AUTOR PARA LA CONSULTA, REPRODUCCION PARCIAL O TOTAL Y PUBLICACION ELECTRONICA DEL TEXTO COMPLETO.

Yo, **Diego Enrique Espinoza Espinoza**, declaro ser autor de la tesis titulada: **“PREVALENCIA DE *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* EN EXPLOTACIONES GANADERAS DEL SECTOR ESTE DE LA PROVINCIA ZAMORA CHINCHIPE, ECUADOR”**, como requisito para optar al grado de: Médico Veterinario Zootecnista; autorizo al sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional (RDI):

Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los 03 días del mes de enero de dos mil diecisiete firma el autor.

Firma:



Autor: Diego Enrique Espinoza Espinoza

Número de cédula: 0705655827

Dirección de domicilio: Loja, Av. Pio Jaramillo y Argentina

Correo Electrónico: diegoee1108@gmail.com

Teléfono: 2972660 **celular:** 0982765162

DATOS COMPLEMENTARIOS

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Tito Ramiro Muñoz Guarnizo Mg. Sc.

TRIBUNAL DE GRADO: Dra. Laura de Jesús Peña Merino

Dr. Segundo German Barragán Fierro Mg. Sc.

Dr. Julio Ignacio Gómez Orbes

AGRADECIMIENTO

Al culminar el presente trabajo investigativo, mi infinito agradecimiento a Dios por ser mi guía espiritual, a la Universidad Nacional de Loja, al Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables y a la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por acogerme en su seno y propiciar mi formación profesional; así mismo a los docentes de la prestigiosa carrera, que me brindaron lo mejor de sus conocimientos y experiencias.

Además mi agradecimiento especial para el Dr. Tito Muñoz Guarnizo Director de la tesis, quien con su gran conocimiento, paciencia, responsabilidad aportaron para el desarrollo de la investigación.

A mi familia, amigos y todas las personas que han sido parte primordial de esta etapa formativa, por brindarme su amistad y por sus buenos consejos en momentos difíciles, por llenarme de esperanza dicha y amor.

Diego Enrique

DEDICATORIA

Este trabajo va dirigido de manera muy especial a Dios ser supremo por sus múltiples bendiciones; a mis padres Manuel Espinoza y Mireya Espinosa por sus desvelos, su incondicional sacrificio, apoyo, amor, amistad y confianza en todo momento para finalizar mis estudios. A mis hermanos Alberto, Alexander y Ángel Polivio, por todo su apoyo y comprensión en todo momento.

También quiero dedicar a mis amigos y compañeros que de una u otra forma ayudaron a plasmar este objetivo tan importante en mi vida.

Diego Enrique

ÍNDICE DE GENERAL

CONTENIDO	PÁG.
CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS	ii
CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	iii
AUTORÍA	iv
CARTA DE AUTORIZACIÓN	v
AGRADECIMIENTO	vi
DEDICATORIA	vii
ÍNDICE DE GENERAL	viii
ÍNDICE DE CUADROS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
RESUMEN	xiv
SUMMARY	xvii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. BABESIOSIS BOVINA	3
2.1.1. Definición.....	3
2.1.2. Sinonimias.....	3
2.1.3. Historia de la Enfermedad	3
2.1.4. Biología del Parásito.....	4
2.1.4.1. Características fisiológicas y estructurales.....	4
2.1.5. Características moleculares de babesia.....	10
2.1.6. Distribución geográfica	12
2.1.7. Período de incubación.....	12
2.1.8. Patogenia	13
2.1.9. Signos clínicos	13
2.1.10. Lesiones Anatomopatológicas.....	14
2.1.11. Lesiones Post mortem.....	15
2.1.12. Transmisión.....	16
2.1.13. Epidemiología	17
2.1.14. Diagnóstico.....	17
2.1.14.1. Diagnóstico Clínico.....	17
2.1.14.2. Diagnóstico diferencial	17
2.1.15. Técnicas de diagnóstico	18
2.1.16. Tratamiento de la babesiosis.....	24
2.1.17. Prevención y Control	26

2.2. GÉNEROS DE GARRAPATAS	26
2.2.1. Subfamilia Ixodidae	28
2.2.2. Géneros.....	29
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
3.1. MATERIALES.....	34
3.1.1. Materiales de Campo	34
3.1.2. Materiales de Laboratorio.....	34
3.1.3. Materiales de Oficina.....	36
3.2. MÉTODOS	37
3.2.1. Ubicación.....	37
3.2.2. Tamaño de la Población.....	37
3.2.3. Tamaño de la Muestra.....	38
a. Número de animales	38
b. Número de Fincas	39
3.2.4. Variables a Evaluar	40
3.2.5. Análisis Estadístico.....	40
3.2.6. Técnica de Recolección de las Muestras de sangre	40
3.2.7. Recolección de Garrapatas	41
3.2.8. Realización de Frotis Sanguíneos	41
3.2.9. Coloración de Giemsa	41
3.2.10. Técnica de extracción de ADN (Pure link® genomic).....	42
3.2.11. Verificación de calidad del ADN	43
3.2.12. Técnica de PCR y nPCR	44
3.2.13. Preparación de primers	44
3.2.14. Electroforesis.....	48
3.2.15. Análisis estadístico	49
4. RESULTADOS.....	50
4.1. PREVALENCIA DE <i>Babesia spp.</i>.....	50
4.1.1. Prevalencia Total.....	50
4.1.2. Prevalencia de <i>Babesia spp.</i> , en Bovinos de Acuerdo a los Cantones del Sector Este de la Provincia Zamora Chinchipe (%).....	51
4.1.3. Prevalencia de <i>Babesia spp.</i> , por Edad en Bovinos del Sector Este de la Provincia Zamora Chinchipe (%).....	52

4.1.4. Prevalencia de <i>Babesia spp.</i> , por Raza Bovina en el Sector Este de la Provincia Zamora Chinchipe (%)	54
4.1.5. Prevalencia de <i>Babesia spp.</i> , con Respecto al Sexo en Bovinos del Sector Este de la Provincia Zamora Chinchipe (%)	55
4.1.6. Comparación de las Pruebas Diagnósticas	56
4.2. GÉNEROS DE GARRAPATAS EXISTENTES	57
4.3. ANÁLISIS EPIDEMIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD	57
4.3.1. Composición de la Muestra de Acuerdo a la Edad	57
4.3.2. Composición de la Muestra de Acuerdo a la Raza	58
4.3.3. Composición de la Muestra de Acuerdo al Sexo	58
4.3.4. Tipo de Explotación Ganadera	59
4.3.5. Procedencia del Ganado	59
4.3.6. Práctica de Cuarentena	60
4.3.7. Presencia de la Enfermedad	60
4.4. DIAGNÓSTICO Y CONTROL DE LA ENFERMEDAD	63
4.5. CONTROL DE GARRAPATAS	66
4.6. SALUBRIDAD	68
5. DISCUSIÓN	69
6. CONCLUSIONES	80
7. RECOMENDACIONES	81
8. BIBLIOGRAFIA	82
9. ANEXOS.....	92

ÍNDICE DE CUADROS

CONTENIDO	PÁG.
Cuadro 1. Principales marcadores moleculares utilizados en la identificación de babesia.....	11
Cuadro 2. Fármacos utilizados en el tratamiento de la Babesiosis bovina.	25
Cuadro 3. Características individuales de los géneros de garrapata.	33
Cuadro 4. Características agrometeorológicas de los cantones nangaritza y paquisha.....	37
Cuadro 5. Cálculo de tamaño muestral de bovinos.....	39
Cuadro 6. Cálculo del número de fincas para la encuesta.....	40
Cuadro 7. Esquema de mezclado de componentes para el mix PCR de <i>Babesia bovis</i>	44
Cuadro 8. Esquema de mezclado de componentes para el mix nPCR de <i>Babesia bovis</i>	45
Cuadro 9. Temperaturas y ciclos PCR y nPCR <i>B. bovis</i>	46
Cuadro 10. Esquema de mezclado de componentes para el mix PCR de <i>Babesia bigemina</i>	46
Cuadro 11. Esquema de mezclado de componentes para el mix nPCR de <i>Babesia bigemina</i>	47
Cuadro 12. Temperaturas y ciclos PCR y nPCR <i>b. Bigemina</i>	47
Cuadro 13. Porcentaje de prevalencia total de <i>babesia spp.</i> , del sector este de la provincia de zamora chinchipe.....	50
Cuadro 14. Porcentaje de prevalencia de <i>babesia spp.</i> , por cantones del sector este de la provincia zamora chinchipe.	51
Cuadro 15. Prevalencia de <i>Babesia spp.</i> , por edad en bovinos del sector este de la provincia de zamora chinchipe (%).	52
Cuadro 16. Prevalencia de <i>Babesia spp.</i> Por raza en el sector este de la provincia de zamora chinchipe (%).	54
Cuadro 17. Prevalencia de <i>Babesia spp.</i> , por sexo en el sector este de la provincia de zamora chinchipe (%).	55
Cuadro 18. Comparación de las pruebas diagnósticas giemsa y nPCR (%).	57

ÍNDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	PÁG.
Figura 1. Diagrama de un zoito de <i>babesia spp.</i> , mostrando el conoide, roptrias y microenemas (Cordero del Campillo M., 1999).	4
Figura 2. <i>B. bigemina</i> en el interior de un eritrocito (Álvarez, 1999)	5
Figura 3. <i>B. bovis</i> en el interior de un eritrocito (Pazmiño, 2011)	5
Figura 4. eritrocito infectado con un merozoíto de <i>B. bigemina</i> (Ribeiro y Patarollo, 1998)..	6
Figura 5. El desarrollo del ciclo de vida de <i>B. bigemina</i> en el bovino y en el vector <i>R.(Boophilus) microplus</i> (Bock, 2004).	9
Figura 6. Mapa cromosómico de <i>Babesia bovis</i> cepa Tejas T2Bo. (Washington State University, 2012).	10
Figura 7. Bazo de bovino con esplenomegalia (Brayton, 2007)	15
Figura 8. Vejiga de bovino conteniendo orina de coloración rojiza (Brayton, 2007)	15
Figura 9. Especies del parásito en el huésped y tejidos. (Mosqueda et. al, 2012).	19
Figura 10. Ciclo de amplificación de la PCR (Padro E., 2010).	22
Figura 11. Esquema de amplificación de ADN por PCR (Grothusen H., 2008).	23
Figura 12. Visualización de un producto de PCR convencional (de Padro E., 2010).	24
Figura 13. Ejemplar adulto de garrapata Dermacentor.	29
Figura 14. Fase de la garrapata del genero Amblyoma	30
Figura 15. Hembra adulta de garrapata de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	31
Figura 16. Garrapata adulta del género Ixodes	32
Figura 17. Porcentaje de prevalencia total de <i>Babesia spp.</i> , en el sector Este de la provincia de Zamora Chinchipe.	50
Figura 18. Porcentaje de prevalencia de <i>Babesia spp.</i> , por cantones del sector Este de la provincia de Zamora Chinchipe.	51
Figura 19. Porcentaje de prevalencia de <i>B. bovis</i> y <i>B. bigemina</i> por cantones del sector Este de la provincia de Zamora Chinchipe.	52
Figura 20. Prevalencia de <i>Babesia spp.</i> , por edad en el sector Este de la Provincia de Zamora Chinchipe (%).	53
Figura 21. Prevalencia de <i>B. bovis</i> y <i>B. bigemina</i> por edad en el sector Este de la Provincia de Zamora Chinchipe (%).	53
Figura 22. Prevalencia de <i>Babesia spp.</i> , por raza en el sector Este de la Provincia de Zamora Chinchipe (%).	54
Figura 23. Prevalencia de <i>B. bovis</i> y <i>B. bigemina</i> por raza en el sector Este de la Provincia de Zamora Chinchipe.	55

Figura 24. Prevalencia de <i>Babesia spp.</i> , por Sexo en bovinos del sector Este de la Provincia de Zamora Chichipe (%).....	56
Figura 25. Prevalencia de <i>B. bovis</i> y <i>B. bigemina</i> por Sexo en bovinos del sector Este de la Provincia de Zamora Chichipe (%).....	56
Figura 26. Composición de la muestra de acuerdo a la edad (%).....	58
Figura 27. Composición de la muestra de acuerdo a la Raza.....	58
Figura 28. Composición de la muestra de acuerdo al sexo.....	59
Figura 29. Tipo de explotaciones ganaderas existentes en el sector Este de la provincia de Zamora Chichipe.....	59
Figura 30. Procedencia del ganado bovino en el sector Este de la Provincia de Zamora Chichipe (%).....	60
Figura 31. Ganaderos que conocen la Babesiosis bovina (%).....	60
Figura 32. Presencia de la enfermedad en las fincas del Sector Este de la Provincia de Zamora Chichipe (%).....	61
Figura 33. Épocas del año en que aparece la enfermedad en el sector Este de la provincia de Zamora Chichipe (%).....	61
Figura 34. Existencia de Babesiosis en las fincas del sector Este de la Provincia de Zamora Chichipe (%).....	62
Figura 35. Síntomas que presentan los animales con la enfermedad (%).....	62
Figura 36. Ganaderos que usan servicios veterinarios para diagnosticar la enfermedad (%).....	63
Figura 37. Edades más frecuentes en que enferman los animales (%).....	64
Figura 39. Morbilidad anual de Babesiosis en el sector Este de la Provincia de Zamora Chichipe (%).....	64
Figura 39. Mortalidad anual por Babesiosis en las fincas del sector Este de la Provincia de Zamora Chichipe(%).....	65
Figura 40. Reporte de la enfermedad en las fincas del sector Este de la Provincia de Zamora Chichipe (%).....	65
Figura 41. Fármacos más comunes utilizados en el tratamiento de la Babesiosis en el sector Este de la provincia de Zamora Chichipe (%).....	66
Figura 42. Grado de infestación con garrapatas en las fincas del sector Este de la provincia de Zamora Chichipe(%).....	66
Figura 43. Fármacos utilizados en el control de las garrapatas (%).....	67
Figura 44. Frecuencia de control de las garrapatas en las ganaderías del sector Este de la provincia de Zamora Chichipe (%).....	67
Figura 45. Alternabilidad de productos en el control de garrapatas (%).....	68
Figura 46. Retiro de la leche en las fincas del sector Este de la provincia de Zamora Chichipe (%).....	68
Figura 47. Consumo de carne de animales tratados y muertos con Babesiosis (%).....	68

**“PREVALENCIA DE *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* EN
EXPLOTACIONES GANADERAS DEL SECTOR ESTE DE LA PROVINCIA
ZAMORA CHINCHIPE, ECUADOR”**

RESUMEN

Se analizaron 95 y 70 muestras de sangre bovina, tomadas de animales asintomáticos en el sector Este de la provincia de Zamora Chinchipe, mediante las técnicas de Giemsa y nPCR respectivamente, con la finalidad de realizar un diagnóstico de prevalencia de *Babesia spp.* Mediante la técnica de Giemsa se reportó una prevalencia general de 29 % y mediante la técnica de nPCR una prevalencia general de 87 %; encontrándose un 74 % de *B. bovis* y un 57 % de *B. bigemina*. En lo que respecta a la edad y de acuerdo a las dos técnicas, los animales menores a un año resultaron positivos en un 67 y un 75 % respectivamente; el grupo comprendido entre uno y dos años, resultó positivo en un 23 y un 94 %; los animales situados entre tres y cuatro años, en un 25 y un 86 %; mientras que el grupo de animales mayores a cuatro años resultó positivo en un 24 y 88 %. En cuanto a las razas, la raza Holstein tuvo una prevalencia de 36 y 75 % respectivamente; la raza mestiza 30 y 92 %; mientras que la raza charoláis 17 y 78 %. En lo que respecta al sexo, en los machos se encontró una prevalencia de 46 y 100 %, mientras que en las hembras la prevalencia fue de 24 y 82 % respectivamente. Se concluye que la técnica de nPCR por su sensibilidad y especificidad es mucho más efectiva que la técnica de Giemsa en el diagnóstico de animales asintomáticos; con lo cual podemos aseverar que la prevalencia de *Babesia spp.*, en la provincia de Zamora Chinchipe es elevada, con mayor presencia de *B. bovis*.

PALABRAS CLAVE: Diagnóstico, Prevalencia, nPCR, Giemsa, Babesia.

SUMMARY

A total of 95 and 70 samples of bovine blood taken from asymptomatic animals in the eastern sector of the province of Zamora Chinchipe were analyzed using the Giemsa and nPCR techniques, respectively, in order to make a diagnosis of *Babesia spp.* through the Giemsa technique, it was reported a general prevalence of 29 % and by the nPCR technique an overall prevalence of 87 %; Being found 74 % of *B. bovis* and 57 % of *B. bigemina*. In terms of age and according to the two techniques, the animals who were less than one year reported positive results in 67 % and 75 % respectively; The group between one and two years old was positive in a 23 % and 94 %; Animals aged between three and four years, in a 25 % and 86 %; While the group of animals older than four years tested positive in 24 % and 88 %. In relation to the cow breeds, the Holstein breed had a prevalence of 36 and 75 % respectively, the crossbred cow 30 and 92 %; while the 17 and 78 % Charolais breed. Regarding to the gender, a prevalence of 46 and 100 % was found in males, where as in females the prevalence was 24 and 82 %, respectively. It is concluded that the technique of nPCR for its sensitivity and specificity is much more effective than the Giemsa technique in the diagnosis of asymptomatic animals; it can be asserted that there is a high prevalence of *Babesia spp.* in the province of Zamora Chinchipe, with a greater presence of *B. bovis*.

KEYWORDS: Diagnosis, Prevalence, nPCR, Giemsa, Babesia.

1. INTRODUCCIÓN

La babesiosis bovina es una enfermedad protozoárica del ganado, transmitida por garrapatas y causada por *B. Bovis*, *B bigemina*, *B. divergens*, las cuales se distribuyen en regiones tropicales y subtropicales donde habita su principal vector, la garrapata del género *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CFSPH, 2008). 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, 2001) y por ende se ve afectada la producción de carne y leche, pues se debe invertir en prevención y control tanto para contrarrestar los vectores, así como para el suministro de insumos veterinarios en el tratamiento (Rey, 2004).

Las regiones de la Costa y Amazonía producen principalmente ganado de carne, mientras que el ganado lechero se encuentra sobre todo en la Sierra. En la costa dentro de la producción pecuaria nacional, la mayor proporción corresponde a la ganadería bovina de doble propósito, es decir para la producción de carne y leche. El territorio amazónico constituye un tercio del territorio nacional en donde se practica una actividad ganadera relevante. En la provincia de Zamora Chinchipe se considera que la base del crecimiento económico se debe fundamentalmente a la producción de ganado bovino para leche y carne, constituyéndose en una fuente importante de ingresos para la Provincia.

De acuerdo al III Censo Nacional Agropecuario en Zamora Chinchipe existen alrededor de 130677 bovinos en 6724 Unidades Productivas Agropecuarias (Upas); El sector Este representa el 5,08% que constituye 6651 cabezas de ganado, (351 Upas). Al tener esta provincia las condiciones climáticas adecuadas para la presencia de vectores de enfermedades hematozoáricas, tales como la garrapata del género *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, se hace necesario investigar la prevalencia de enfermedades como la babesiosis que incide gravemente en la economía de los ganaderos.

En Ecuador se ha realizado algunos estudios referentes a la determinación de la prevalencia de esta enfermedad en algunas provincias del país; es así que en un trabajo realizado en el camal Metropolitano de Quito se determinó la prevalencia de Babesiosis bovina en un 29,29 % (Pazmiño, 2011); en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas se estimó la prevalencia de Babesiosis bovina en un 0 % (Hernández, 2012), mediante la utilización de técnicas de diagnóstico microscópicas y moleculares.

El conocimiento de la prevalencia real de estos hemoparásitos (*B. bovis* y *B. bigemina*) con el uso de herramientas moleculares, permite entregar importantes aportes para el mejoramiento de programas de prevención y control alternativos a los que se vienen desarrollando, favoreciendo a futuro así el desuso de sustancias tóxicas que hoy son utilizadas en el control de vectores.

El presente trabajo de investigación ha permitido que mediante la técnica nPCR, determinar la prevalencia de una de las enfermedades más comunes en la región, así como realizar un análisis epidemiológico de la misma, que oriente de manera más efectiva su control y ayude a reducir las pérdidas económicas.

Por lo antedicho, en la propuesta del presente trabajo de investigación se plantearon los siguientes objetivos:

- ❖ Establecer la prevalencia de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* a través de técnicas moleculares en el sector Este de la Provincia de Zamora Chinchipe.
- ❖ Diferenciar la sensibilidad del diagnóstico de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* por los métodos de Giemsa y nPCR.
- ❖ Estudiar los factores asociados a la prevalencia de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en el sector Este de la provincia de Zamora Chinchipe.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. BABESIOSIS BOVINA

2.1.1. Definición

La Babesiosis bovina es una patología febril causada por un parásito protozoario del género *Babesia* y es transmitida por garrapatas del género *Boophilus*, recientemente clasificados como *Rhipicephalus* (Longzheng *et al*, 2013). Hay muchas especies de *Babesia* que infectan a animales domésticos, silvestres y al hombre. Sin embargo, causan más problemas en la industria ganadera y las especies de mayor incidencia en los bovinos son *Babesia bovis*, *B. bigemina* y *B. divergens* (Mosqueda *et al*, 2012).

2.1.2. Sinonimias

La babesiosis, también se conoce como: Piroplasmosis, Ranilla Roja, Tristeza bovina, Fiebre de Texas, Fiebre hematórica, Malaria bovina, Red Water en EUA, Fiebre Bovina transmitida por garrapatas (Cordero del campillo, M.; *et al*, 1999).

2.1.3. Historia de la Enfermedad

Tras analizar muestras sanguíneas de bovinos con signos de anemia hemolítica y hemoglobinuria en 1888 Viktor Babes en Rumania identificó por primera vez al parásito. En 1893 Theobald Smith y Frederick Kilborne demostraron que la garrapata *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *annulatus* transmitía la enfermedad en los bovinos (Smith & Kilborne, 1977). Con esta investigación se crearon las bases para la elaboración del programa de erradicación de la babesiosis, a través de la eliminación de las garrapatas del ganado en los Estados Unidos, que culminó en 1943 (Graham & Hourrigan, 1977).

2.1.4. Biología del Parásito

2.1.4.1. Características fisiológicas y estructurales

El género *Babesia* pertenece al Phylum Apicomplexa, tiene reproducción alternante (sexual-asexual) y complejo apical, aunque incompleto (sin conoide, pero con roptrias, anillo polar y, a veces, con microtúbulos subpeculares y micronemas) (Fig 1).

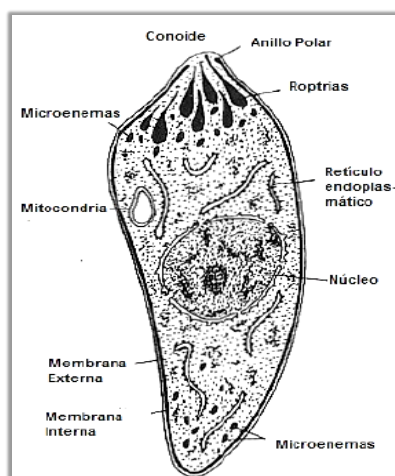


Figura 1. Diagrama de un zoito de *Babesia spp.*, mostrando el conoide, roptrias y micronemas (Cordero del Campillo M., 1999).

Los gametos no tienen flagelos y en el hospedador vertebrado (hospedador intermedio) se producen divisiones asexuales binarias o merogónicas. Se nutren por pinocitosis, a partir de los glóbulos rojos, cuya hemoglobina hidrolizan, sin dejar pigmentos, al contrario de lo que ocurre con *Plasmodium*. Metabolizan la glucosa dando lugar a la formación de ácido láctico, así como la manosa, el inositol y las proteínas. En los glóbulos rojos, aparecen en forma oval, ameboide, redondeada y más frecuentemente piriforme (de aquí el nombre de piroplasmas). El movimiento de estos zoítos se realiza por deslizamiento y contracciones corporales (Cordero del Campillo, 1999).

Las especies de *Babesia* son de diferente tamaño según la especie. Anteriormente, estos parásitos se habían agrupado como babesias pequeñas (de 1 a 2.5 μm), como *Babesia bovis*, y babesias grandes (de 2,5 a 5 μm),

como *Babesia bigemina* que puede abarcar el diámetro total del eritrocito (Coetzer, 2004). Sin embargo, hoy la identificación se basa especialmente en patrones isoenzimáticos, diferencias antigénicas y ADN propio de cada especie (Coetzer, 2004).

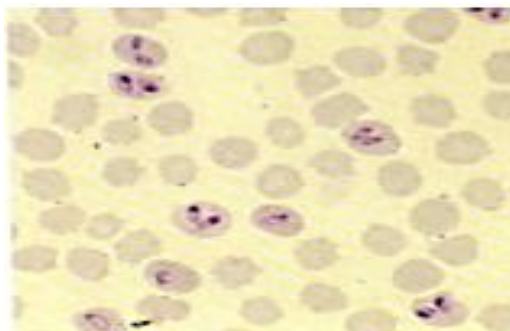


Figura 2. *B. bigemina* en el interior de un eritrocito (Álvarez, 1999)

Babesia bigemina es grande, pleomórfica, pero característicamente se observa y se identifica por un par de corpúsculos en forma de pera, unidos en ángulo agudo dentro del eritrocito maduro, miden entre 4 y 5 μm de longitud, por 2 a 3 μm de diámetro. Pueden aparecer formas redondeadas, ovaladas o irregulares, según la fase de desarrollo del parásito en los hematíes (Fig. 2) (Soulsby, 1987; www.iicasaninet.net, 2002).

Babesia bovis, es un parásito pequeño, son piriformes, redondos o ameboideos, algunos aparecen con una vacuola, dando el aspecto de anillos, miden 2,4 μm por 1,5 μm (Fig. 3) (Quiroz, 2000).



Figura 3. *B. bovis* en el interior de un eritrocito (Pazmiño, 2011)

2.1.4.1. Estructura del merozoíto de *Babesia* spp.

El cuerpo del merozoíto tiene una forma ovalada de 1 a 5 μm y está cubierto por una membrana plasmática simple y una doble membrana discontinua debajo de ella. En la región anterior del merozoíto se encuentran varias organelas que componen el denominado “complejo apical” (Figura 4). Este incluye los anillos polares, cuerpos esféricos, micronemas y roptrias. El anillo polar está formado por una doble membrana debajo de la membrana plasmática del extremo anterior. Los cuerpos esféricos son organelas que fueron encontradas en *Babesia* y *Theileria*, consideradas análogas de los gránulos densos encontrados en otros apicomplejos. Las proteínas de estas organelas son secretadas en el momento de la invasión (Potgieter *et al*, 1979).

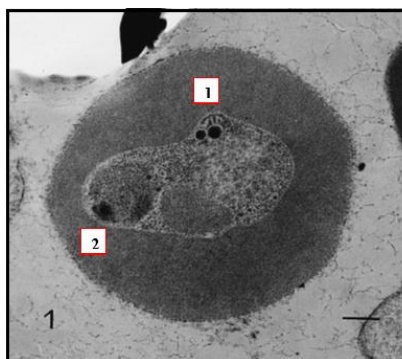


Figura 4. Eritrocito infectado con un merozoíto de *B. bigemina* luego de 24 horas de incubación. Se observa el complejo apical (1) y el núcleo (2). Barra, 0.4 μm (Ribeiro y Patarrollo, 1998). Imagen tomada de Microscopio de transmisión electrónica.

Las roptrias son estructuras electro-densas en forma de gota ubicadas en el extremo anterior de la célula. Los micronemas son pequeñas estructuras que se presentan alrededor de las roptrias en la región anterior del merozoíto. Las roptrias y los micronemas poseen enzimas proteolíticas que juegan un rol importante en la invasión del merozoíto al eritrocito (Fitzpatrick *et al*, 1968). Otra. El núcleo está localizado generalmente en el punto medio del merozoíto y está rodeado por dos membranas. El contenido del núcleo es homogéneo y de baja densidad (Ristic, 1988). Una de las organelas características de los integrantes del phylum Apicomplexa es apicoplasto. Esta es una característica ancestral del phylum adquirida por un proceso de endosimbiosis. Esta

organela multi-membranas es homóloga a los cloroplastos de las plantas y como tal poseen una cierta autonomía por poseer su propio genoma circular y su propia maquinaria de expresión. El rol exacto de esta organela no se conoce completamente pero se cree que está involucrada en la síntesis de lípidos e isoprenoides (Waller & McFadden, 2005).

2.1.4.2. Clasificación Taxonómica

El género *Babesia* pertenece al phylum Apicomplexa, un linaje eucariota a principios de la ramificación, que se caracteriza por la presencia de un complejo apical y un citoesqueleto único distinto de la de otros eucariotas (Gordon, 2005).

Dominio: Eucaryota

Reino: Protista

Subreino: sin clasif. (Alveolata, Biciliata, Neozoa o Protozoo)

Filo: Apicomplexa

Clase: Aconoidasida

Subclase: Piroplasmea

Orden: Piroplasmida

Superfamilia: Babesioidea

Familia: Babesiidae

Género: *Babesia*

Especie: *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. divergens*, etc.

2.1.4.3. Ciclo de vida

El desarrollo de *B. bovis* y *B. bigemina* presenta un patrón similar en los adultos de *Rhipicephalus(Boophilus) microplus*. (Potgieter & Els, 1976; Potgieter, 1977; Mehlhorn & Shein, 1984; Friedhoff, 1988). El desarrollo del ciclo de vida se esquematiza en la Figura 5 (Bock, 2004). *Babesia* spp., solo parasita los eritrocitos del hospedador vertebrado (Friedhoff, 1988). Cada esporozoíto penetra en la célula ayudado por el complejo apical, una vez adentro se transforma en trofozoíto a partir del cual se forman dos merozoítos por fisión binaria (proceso de merogonia). En *B. bigemina* se ha identificado un tipo de merozoíto de forma ovoide denominado precursor gamonte. Estos se desarrollan cuando la garrapata los absorbe durante su alimentación con la sangre del bovino. Los cambios experimentados como consecuencia del pasaje de la sangre del hospedador al intestino medio de la garrapata (vector), estimulan el desarrollo de dos poblaciones de cuerpos radiados (strahlenkörper) a partir de los gamontes (gametocitos). Estos cuerpos radiados experimentan una multiplicación dentro del eritrocito que continúa después de haber emergido. Como consecuencia se forman grandes agregados de cuerpos radiados multinucleados, pero una vez que se completó la división celular, se forman cuerpos radiados con un solo núcleo haploide. Se asume que estas son las gametas (Mackenstedt y col. 1995). Estas emergen de los agregados y se fusionan de a pares (singamia) para formar una célula esférica (cigoto). Los cigotos infectan selectivamente a las células digestivas del intestino de la garrapata y probablemente allí, se multiplican y ocurre una nueva multiplicación en células basófilas (células que sintetizan vitelogenina) con el desarrollo de kinetos (vermiculos) que migran hacia la hemolinfa de la garrapata. En *B. bigemina* ocurre en algún momento del desarrollo un solo paso de meiosis en el intestino de la garrapata para formar el cigoto haploide. En las células intestinales ocurre fisión múltiple (esquizogonia o esporogonia) formando kinetos poliploides (vermiculos, esporokinetos). Estos se mueven a través de la hemolinfa e infectan una variedad de tipos celulares y tejidos incluyendo oocitos (de la garrapata) donde ocurren sucesivos ciclos de esquizogonia secundaria. Entonces, ocurre la transmisión transovarial y el desarrollo tiene lugar en el estadio larval de la garrapata.

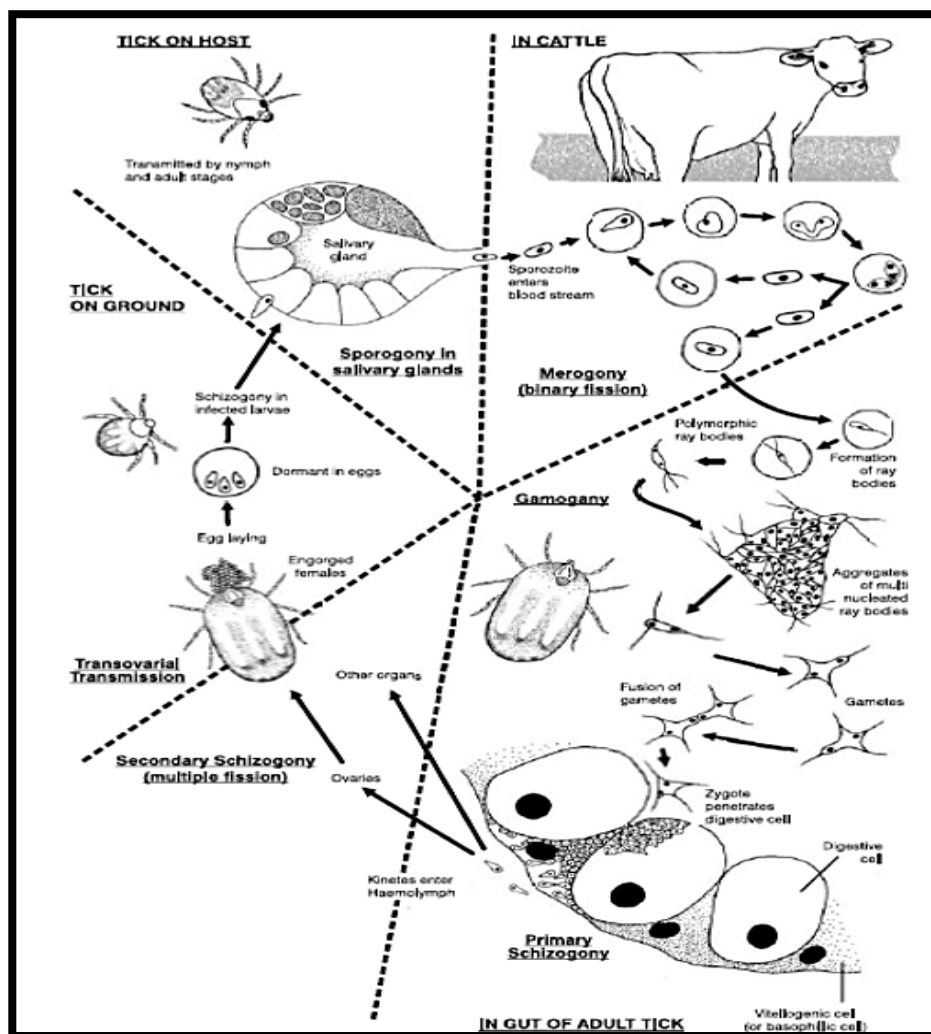


Figura 5. El desarrollo del ciclo de vida de *B. bigemina* en el bovino y en el vector *R. microplus* (Bock, 2004).

Este es un paso importante en la adaptación del ciclo de vida del parásito que cumple una parte del ciclo en garrapatas de un solo hospedador como es el caso de *Rhipicephalus(Boophilus) microplus*. En *B. bovis* el esporozoíto se desarrolla usualmente solo cuando la larva se adhiere al bovino. En el caso de *B. bigemina*, el desarrollo se produce en la larva que se está alimentando, pero los esporozoítos se convierten en infectivos a los 9 días, por lo que esto solo ocurre en el estadio ninfal y adulto de la garrapata (Hoyte, 1961; Potgieter & Els, 1977b). Asimismo, la transmisión puede ocurrir a través de ninfas, hembras y machos adultos. En el caso de *B. bovis*, la formación de esporozoítos infectivos ocurre usualmente entre los 2 y 3 días de la adhesión de la larva al bovino (Riek, 1966).

2.1.5. Características moleculares de babesia

2.1.5.1. Secuencia genómica

En la actualidad la Universidad Estatal de Washington está llevando a cabo los proyectos del genoma de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*. Hasta el momento se ha estudiado el genoma de *Babesia bovis* cepa Tejas T2Bo, el cual está constituido por cuatro cromosomas (Fig. 6) (Brayton K. et. al, 2007).

El cromosoma 1, el más pequeño, contiene un gran espacio físico, flanqueado por dos grandes cóntigos de 821.816 pares de bases (pb) y 285.379 pb de longitud. Los cromosomas 2 y 3 están conformados por 1.729.419 y 2.593.321 pb de longitud, respectivamente y el cromosoma 4 que contiene un espacio que no se ha resuelto y un cóntigo de 1.149 pb que separa dos cóntigos de 827.912 pb y 1.794.700 (Brayton K. et. al, 2007).

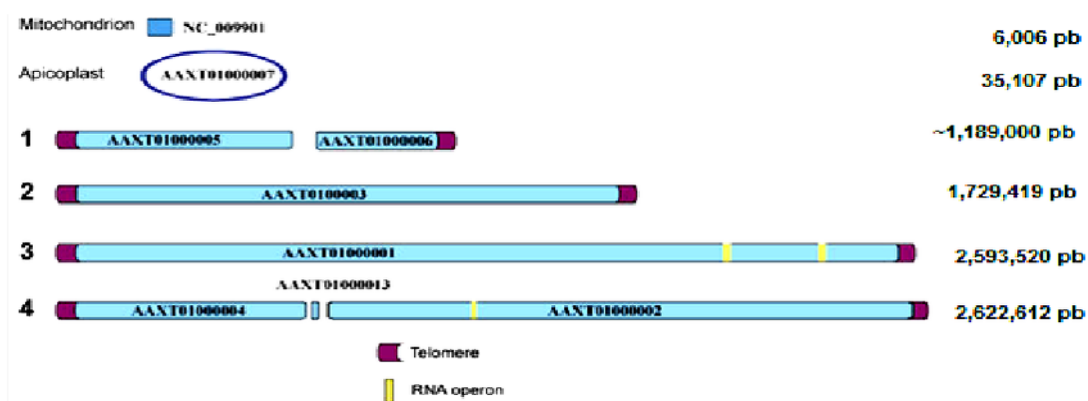


Figura 6. Mapa cromosómico de *Babesia bovis* cepa Tejas T2Bo. (Washington State University, 2012).

2.1.5.2. Marcadores Moleculares

Los principales marcadores moleculares utilizados en la identificación de *B. bovis* y *B. bigemina* son: el gen BNMK, Bv80, BvVA1, Citocromo b, Factor de elongación 1 α , msa-1, msa-2, RAP-1, CT-SPR, rARN y SBP 1, 2, 3 (Cuadro 1). Su utilización en la detección de las *babesias* bovinas varía dependiendo de la región geográfica de estudio, el grado de conservación del gen y los resultados de estudios previos que concluyen su utilidad diagnóstica (Ríos et. al, 2011).

Cuadro 1. Principales marcadores moleculares utilizados en la identificación de Babesia.

Gen	Descripción	Marcador Molecular	Autor, año	Ubicación geográfica
Gen de la beta-tubulina	Subunidad esencial de los microtubulos. Los fragmentos N-terminales de las tubulinas α y β están muy concentrados. Sus porcentajes de indentificación son del 99.99%.	Beta - tubulin	Caccio et, al. 2000	Italia
Gen BNMK L35 (b/35)	Region del genoma nuclear de B. Bovis que codifica una proteína ribosomal homóloga L35 (B35) y un nucleósido monofosfato quinasa (BNMK).	BNMK	Silins et al, 1996	Austria
Familia génica Bv	Corresponden a proteínas de las roptrias del merozoíto. Se han utilizado para demostrar la heterogeneidad entre aislamientos de Babesia bovis fenotípicamente diferentes y que por procesis de atenuación puede revertir a un fenotipo virulento.	Bv 80 Bv 80 y Bv VA1	Lew et al, 1997 Figueroa et al, 1998 Quintao-Silva et al, 2007 Bock et al, 2000	Australia Mexico Brasil Australia
Gen del citocromo b	Gen de la proteína mitocondrial. Gen conservado con mayor número de copias que los genes ribosomales, lo que sugiere mayor sensibilidad. Se reportó 100% de identidad.	Citocromo b	Buling et al, 2007 Salem et al, 2006	España USA
Gen del factor de elongación alfa (EF-1 α)	Codifica una proteína expresada de manera abundante, clave en la traducción de proteínas eucariotas. En Babesia bovis el EF-1 α contiene dos genes EF-1 α idénticos(A y E) y se ha confirmado que ambos genes EF-1 α son transcritos en los merozoitos y son muy conservados en esta especie.	Factor de elongación 1 α	Suares et al, 2006	Australia
Gen msa-1 y msa-2c	Genes presentes en Babesia bovis que codifican para las proteínas antigénicas presentes en la superficie del merozoito(msa) involucradas en la invasión del parasito a los eritrocitos de la especie bovina. Sus porcentajes de identidad son del 22%-99,7%.	Msa-1 y msa 2c Msa2	Borgonio et al, 2008 Pérez Llana et al, 2010	México Argentina
Gen RAP	Proteinas asociadas a roptrias. Alto grado de conservación entre cepas de B. bovis pero no para B. bigemina	RAP-1/CT-STR	Silva et al, 2009	Portugal
Subunidad pequeña ARNr	Componente pequeño de los ribosomas. Os datos del 18s ARN son ampliamente utilizados en análisis moleculares y filogénicos. Su ritmo evolutivo es lento siendo un gen altamente conservado. Tiene un alto nivel de sensibilidad y reportes de identidad cercanos al 100%.	rARN	Luo et al, 2005 Salih et al, 2007 Mghirbi et al, 2008 Adham et al 2009	China Sudán Túnes Egipto Pakistán
Gen de la proteína del cuerpo esférico (SBP) 1-2-3	La proteína está en los órganos del complejo apical de Babesia. Contiene una región conservada en las cepas de B. bovis de Texs, Mexico y Australia.	SBP 1 2 3 SBP2-RAP	Ruef et al, 2000 Australia et al, 2009	México Ghana Mongolia

Fuente: (Ríos et. al, 2011).

2.1.6. Distribución geográfica

La Babesiosis bovina se puede encontrar donde quiera que existan los vectores que la transmiten, pero es más común en áreas tropicales y subtropicales. *B. bovis* y *B. bigemina* son particularmente importantes en Asia, África, América Central y del Sur, partes del sur de Europa y Australia (Blood, et al., 1986).

Aunque *B. bovis* se encuentra por lo general en la misma área geográfica general que *B. bigemina*, ligeramente diferentes grupos de garrapatas diseminan estas dos especies y algunas diferencias en su distribución pueden ser vistos. Por ejemplo, *B. bigemina* está más ampliamente distribuida de *B. bovis* en África. *B. bigemina* y *B. bovis* y sus vectores eran antes enzoótica en gran parte del sur de Estados Unidos, pero ahora sólo se encuentran en una zona de amortiguamiento de cuarentena a lo largo de la frontera con México. *B. divergens* es un parásito importante en algunas partes de Europa, incluyendo el Reino Unido, España y el norte de Europa. Las encuestas han encontrado pruebas de esta especie en toda Europa, y también puede ocurrir en el norte de África. Su vector, *I. ricinus*, puede sobrevivir desde el norte de Escandinavia hasta el Mediterráneo. Sin embargo, debido a esta garrapata requiere 80% de humedad, se puede encontrar sólo en algunos microambientes como en la base de la vegetación en los bosques, matorrales colina áspera, y tierras bajas húmedas. *B. importantis* se puede encontrar en algunas partes de Europa, el noroeste de África y Asia, así como de China. *B. ovata* se ha descrito en Japón, China y otras partes de Asia oriental. *B. occultans* se ha registrado en África, y *B. jakimovi* ocurre en Siberia (Blood, et al., 1986).

2.1.7. Período de incubación

Los síntomas de las infecciones de *B. bigemina* y *B. bovis* generalmente aparecen 2 a 3 semanas después de la infestación con garrapatas. Después de la inoculación directa en sangre, el período de incubación puede ser de tan sólo 4 a 5 días para *B. bigemina* y de 10 a 12 días para *B. bovis* (CFSPH, 2008).

2.1.8. Patogenia

El principal mecanismo patogénico de los hemoparásitos es la producción de anemia hemolítica, al romperse los glóbulos rojos y liberarse la hemoglobina. Esto origina la producción de la bilirrubina que tiñe las mucosas de color amarillo (Carrique et. al, 2000).

La infección se produce por la picadura de las garrapatas o por inoculación parenteral de sangre, tejidos infectados. Esta *Babesia* ejerce acción traumática al liberarse del eritrocito, acción expoliatriz al alimentarse principalmente de hemoglobina, acción mecánica al formar acumulo de parásitos a nivel capilar y finalmente una acción tóxica con sus productos metabólicos (Quiroz, 2000).

La *Babesia bovis* es mucho más patógena que la *Babesia bigemina* al inducir un fenómeno de coagulación intravascular diseminada, lo que origina un cuadro de tipo hemorrágico en diversos órganos y posibles alteraciones en el sistema nervioso, al bloquearse el riego sanguíneo al cerebro (Carrique et. al, 2000). La babesiosis causa la destrucción de los eritrocitos parasitados (hemólisis) por las fases asexuales, la hemoglobina queda en libertad y es convertida en pigmentos biliares, donde el exceso puede depositarse en los tejidos, ocasionando ictericia. Aparece en la orina el exceso de la hemoglobina, que el hígado no pueda transformar, de modo que la orina se colorea de rojo (Lapage, 1975).

2.1.9. Signos clínicos

La destrucción de glóbulos rojos y la liberación de hemoglobina y sustancias tóxicas provocan fiebre, hemoglobinuria, anemia e ictericia, la cuenta de eritrocitos puede descender a 1 ó 2 millones de eritrocitos por mm^3 de sangre. La hemoglobinuria y la ictericia se presentan por la destrucción de eritrocitos. Se ha considerado que los signos clínicos de anemia no son los responsables de la muerte, sino que probablemente sea que metabolitos del parásito provoquen la activación de mecanismos fisiológicos que reducen a una inflamación generalizada, shock y muerte del animal (Quiroz, 2000).

Tras la infección o la exposición a garrapatas infestadas, el periodo de incubación es de una a dos semanas, evidenciándose la enfermedad por una subida de la temperatura corporal, que llega a 41 - 42 °C. La fiebre dura de 2 a 7 días o más, y está acompañada de depresión, pérdida del apetito, aumento del pulso y hemoglobinuria. Inicialmente existe una diarrea profusa que va seguida de marcada constipación intestinal. Durante las fases febriles, puede destruirse hasta el 75% de los glóbulos rojos. La mortalidad puede ser alta en casos graves, produciéndose la muerte pasados los 4 a 8 días de la aparición de los signos clínicos (Soulsby, 1987).

Los animales que sobreviven a la fase aguda desarrollan un síndrome crónico que puede durar varias semanas y sigue un curso irregular, con elevaciones intermitentes de la temperatura que a veces alcanzan de 40 a 40,6 °C; hay adelgazamiento y emaciación, aunque en esta fase la hemoglobinuria no es marcada y finalmente los animales se recuperan. En animales jóvenes la infección suele ser asintomática, va asociada a una carga parasitaria baja (Soulsby, 1987).

El síndrome de la infección por *Babesia bovis* es similar al de la *B. bigemina*, salvo que además se registra espasmo del esfínter anal, dando lugar a la expulsión de heces en “boquilla de fumar” que son evacuados con gran esfuerzo en forma de una cinta larga y delgada, incluso en ausencia de diarrea (Blood et. al, 1986).

2.1.10. Lesiones Anatomopatológicas

Los cambios están asociados con la destrucción de eritrocitos. La piel y mucosas visibles están pálidas y en ocasiones ictericas, al igual que los órganos enfermos, la sangre es de menor densidad y el bazo en los casos agudos está congestionado; en los crónicos está aumentado de dos a cuatro veces su tamaño normal (Fig. 7) y el parénquima varía de consistencia, el color va de café rojizo a café amarillento. El hígado en los casos agudos aparece congestionado, friable, con la grasa y el parénquima ictericos; en casos crónicos hay hepatomegalia, dando una coloración moteada al hígado.

La vesícula biliar aumenta de tamaño y la bilis está espesa y con coágulos (Quiroz, 2000).



Figura 7. Bazo de bovino con esplenomegalia (Brayton, 2007)

Presencia de edemas subcutáneos e intramusculares con ictericia, la grasa corporal está amarillenta y gelatinosa. La orina presente en la vejiga aparece frecuentemente de color rojizo o marrón oscuro (Fig. 8).



Figura 8. Vejiga de bovino conteniendo orina de coloración rojiza (Brayton, 2007)

Se ha encontrado una forma cerebral producida por *B. bovis*, en la necropsia se observa congestión de la materia gris y blanca del cerebro y vasodilatación generalizada de los capilares, donde la mayoría de los glóbulos rojos están parasitados. Además existe edema perivascular, perineural e intersticial en el encéfalo y la médula espinal (Soulsby, 1987).

2.1.11. Lesiones Post mortem

Las lesiones se relacionan con hemólisis intravascular, anemia e ictericia. Las mucosas generalmente están pálidas o ictericas; la sangre puede parecer diluida y acuosa; también puede aparecer ictericia en el omento, grasa

abdominal y tejidos subcutáneos. El bazo se agranda notoriamente con una consistencia pulposa y friable y una coloración oscura. El hígado puede estar agrandado con una coloración oscura o icterica y la vesícula biliar distendida con bilis espesa y granular. Los riñones generalmente tienen un color rojo oscuro o negro y la vejiga generalmente contiene orina rojiza amarronada; sin embargo, en algunos casos, la orina puede ser normal. Ocasionalmente, los pulmones presentan signos de edema pulmonar. Otros órganos, incluido el corazón y el cerebro, pueden presentar petequias o equimosis, o estar congestionados y la superficie del cerebro puede tener un aspecto rosado (CFSPH, 2008; OIE, 2009).

2.1.12. Transmisión

La *Babesia* se transmite mediante garrapatas que se infectan al ingerir parásitos que se encuentran en la sangre del bovino infectado. Los principales vectores de *B. bigemina* son *Rhipicephalus microplus* (anteriormente *Boophilus microplus*) y *Rhipicephalus annulatus* (anteriormente *Boophilus annulatus*). *Rhipicephalus decoloratus*, *Rhipicephalus geigy* y *Rhipicephalus evertsi* también transmiten esta especie. Los principales vectores de *B. bovis* son *R. microplus* y *R. annulatus*, pero *R. geigy* también puede ser un vector.

B. divergens se transmite principalmente a través de *Ixodes ricinus*. *B. jakimovi* también se puede transmitir a través de una especie de *Ixodes*.

Haemaphysalis punctata transmite *Babesia major*, *Haemaphysalis longicornis* transmite *Babesia ovata* y *Hyalomma marginatum* transmite *Babesia occultans* (CFSPH, 2008).

La babesiosis también se puede transmitir entre animales por inoculación directa, mientras que moscas y fómites contaminados por sangre infectada no tienen gran importancia en la transmisión (CFSPH, 2008).

2.1.13. Epidemiología

La babesiosis es transmitida a los bovinos por la picadura de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, en forma casi exclusiva y específica, por cuanto la vehiculización de la babesiosis con agujas de inyección, pinzas de descorne o el uso de sangradores para la investigación de la Brucelosis son elementos accidentales y raros en la transmisión de la enfermedad. La infección de las garrapatas pasa por herencia a su progenie durante el verano, pero estas mismas larvas infectantes dejan de serlo cuando disminuye la temperatura del medio (Boero, 1976).

En climas cálidos y húmedos, la transmisión natural es casi exclusiva por el *Rhipicephalus(Boophilus) microplus*. Esta garrapata multípara, es infectiva y transmite la infección a su generación especialmente a temperaturas de 28 a 32 °C, humedad relativa de 85 - 90% (Instituto Colombiano Agropecuario, 1980).

2.1.14. Diagnóstico

2.1.14.1. Diagnóstico Clínico

Se sospecha de babesiosis en bovinos que presentan fiebre, anemia, ictericia y hemoglobinuria (OIE, 2009).

2.1.14.2. Diagnóstico diferencial

La babesiosis se asemeja a otras enfermedades que producen fiebre y anemia hemolítica. El diagnóstico diferencial incluye anaplasmosis, tripanosomiasis, teileriosis, leptospirosis, hemoglobinuria bacilar, eperitrozoonosis, intoxicación por colza e intoxicación crónica por cobre. La rabia y otras encefalitis también pueden considerarse en el ganado bovino con signos del SNC (CFSPH, 2008).

2.1.15. Técnicas de diagnóstico

a. Frotis sanguíneos finos y de gota gruesa

El primer método para detectar parásitos en muestras clínicas fueron los frotis finos de sangre y son los más ampliamente usados. Los frotis gruesos son útiles en la detección de pocas cantidades de parásitos, pues se analiza una cantidad diez veces mayor que en el frotis fino, sin embargo, con frotis finos se realiza de mejor manera la identificación de especies. Diariamente se utiliza la coloración de Giemsa o naranja de acridina. También se describen la inmunofluorescencia y la identificación por inmunoperoxidasa. *Babesia* se puede identificar bajo un microscopio con el lente de inmersión (100X), donde se observan todos los estadios divisionales del parásito (Mosqueda et. al, 2012). La sensibilidad es de un parásito por 106 glóbulos rojos (Bose et al., 1995; OIE, 2010).

b. Frotis de cerebro

En un animal que ha muerto y se sospecha que sufrió babesiosis con la presencia de signos nerviosos, mediante improntas de la corteza cerebral teñidas se puede identificar al parásito al igual que en los frotis sanguíneos. Casi la totalidad de los capilares del cerebro están infectados. Los frotis de otros órganos como el riñón o el hígado también puede llevarse a cabo con buenos resultados (Mosqueda, et. al, 2012).

c. Pruebas de hemolinfa

La garrapata ingiere los parásitos tras succionar la sangre de un bovino infectado, que pronto penetran el lumen del intestino y posteriormente la hemolinfa de las garrapatas infectando a varios órganos. En este caso se toma una gota de hemolinfa y se le realiza un frotis regular donde el diagnóstico se basa en la observación de los kinetos, que tienen forma vermicular. La prueba de hemolinfa requiere un microscopista experimentado ya que las garrapatas

en áreas endémicas tienen una muy baja cantidad de kinetos (Mosqueda, et. al, 2012).

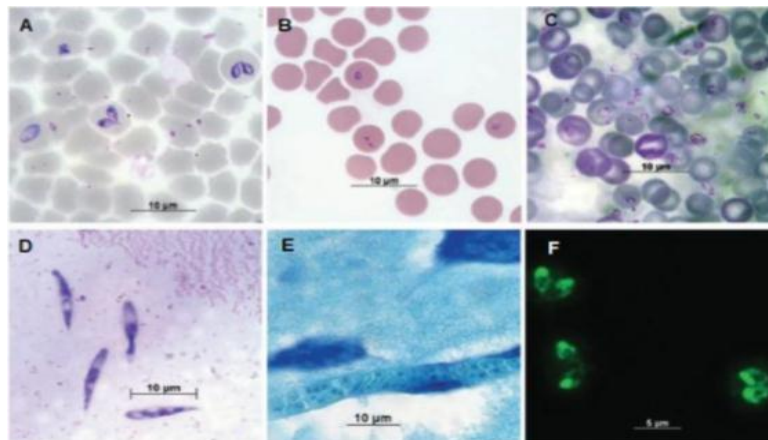


Figura 9. Especies del parásito en el huésped y tejidos. . **A)** *Babesia bigemina* en eritrocitos bovinos. Frotis teñido con Giemsa. **B)** *Babesia bovis* en eritrocitos bovinos. Frotis teñido con Giemsa. **C)** *Babesia microti* en eritrocitos de ratón. Frotis teñido con Giemsa. **D)** Kinetos de *Babesia bigemina* en hemolinfa de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Frotis teñido con Giemsa. **E)** *Babesia bovis* en capilar cerebral de bovino. Sección histológica de cerebro con Giemsa. **F)** Detección de anticuerpos contra *Babesia bigemina* por la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI).100X (Mosqueda et. al, 2012).

2.1.15.1. Métodos inmunológicos

a. Prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFAT)

Se basa en el reconocimiento de antígenos del parásito con los anticuerpos del suero de los animales testeados. Es fiable en la identificación de portadores infectados o anteriormente expuestos, pues tiene un buen nivel de especificidad y sensibilidad (Burrige, 1973). Puede discriminar entre especies de *Babesia* aunque se ha reportado reacción cruzada (Goodger, 1971).

b. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Tiene la ventaja de que se puede leer un gran número de muestras con facilidad y presenta mayor especificidad de la IFAT. Hay varias versiones de ELISA para la detección de varias especies de *Babesia* incluyendo *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. divergens*, *B. caballi*, *B. canis*, *B. gibsoni* y *B. microti* (Weiland, 1986; Purnell et. al, 1976; Waltisbuhl, 1987). Evalúa la presencia de

anticuerpos anti-*Babesia* utilizando un conjugado anti-IgG con una enzima, por lo general de peroxidasa. Con esta prueba, es posible detectar anticuerpos hasta cuatro años después de una infección simple. Deberían producirse de un 95-100% de reacciones positivas con animales inmunes a *B. bovis*, 1.2% de reacciones falsos positivos con suero negativo y <2% de reacciones falsos positivos con animales inmunes a *B. bigemina* (OIE, 2010).

c. Prueba de inmunocromatografía (ICT)

Es un dispositivo de diagnóstico rápido que detecta los anticuerpos contra un antígeno específico impregnado en una tira de nitrocelulosa utilizando una pequeña cantidad de suero. Es muy fácil de realizar y leer, no utiliza ningún equipo especial, por lo que se puede implementar en el campo y tiene un bajo costo comparable con otras técnicas, es una prueba rápida (sólo diez a quince minutos) y muy estable frente a diferentes temperaturas. Han sido desarrollados para *Babesia bovis*, *B. bigemina*, *B. caballi*, *B. gibsoni* y *B. microti* (Luo et. al, 2011; Kim et. al, 2007; Jia et. al, 2007; Verdida et. al, 2005; Huang, 2006).

2.1.15.2. Cultivos In vitro

Se han utilizado para demostrar la presencia de portadores de *Babesia* spp. (Holman et. al, 1993), y *B. bovis*. La parasitemia mínima detectable podría ser baja (10-10) (Friedhoff & Bose, 1994), por lo que es un método muy sensible, con 100% de especificidad, para la demostración de la infección (OIE, 2010).

2.1.15.3. Inoculación en animales

Se hace mediante la transfusión de aproximadamente 500 ml de sangre por vía intravenosa en la yugular de un becerro esplenectomizado libre de *Babesia*. Este método es engorroso y caro, y, obviamente, no es adecuado para uso en

diagnóstico de rutina. Se han utilizado para demostrar la presencia de *B. divergens* (Zintl et al, 2003).

2.1.15.4. Métodos moleculares

Las técnicas moleculares están destinadas a la detección de ácidos nucleicos del parásito, mostrando una sensibilidad y especificidad muy elevadas, cuyo enfoque se ha ido desarrollando en la detección de especies de *Babesia* en sus hospedadores y vectores.

a. Sondas de ADN

Fue la primera técnica desarrollada para detectar el ADN de *Babesia* en sangre. La detección se lleva a cabo por autorradiografía, quimioluminiscencia o un sustrato colorimétrico. Con esta técnica se ha detectado *Babesia* en tejidos de garrapatas y en portadores infectados (Hodgson et, al, 1992; Ramos et. al, 1992).

b. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Esta técnica se ha desarrollado desde 1992 ha permitido determinar con una alta sensibilidad (1000 veces más sensible que la microscopía, 1 parásito en 109 glóbulos rojos) y alta especificidad para varias especies de *Babesia* (Criado-Fornelio, 2007). Sin embargo, requiere de tiempo, dinero y personal capacitado. Es útil como prueba confirmatoria y regulatoria, y en algunos casos como marcador de cepas vacunales.

Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN. Para realizar la técnica se necesitan: los 4 desoxirribonucleósidos-trifosfato (dNTP), dos cebadores (en inglés, primers), iones divalentes $MgCl_2$, una solución tampón (buffer) de la ADN polimerasa, ADN polimerasa (la más común es la polimerasa Taq), ADN molde y un termociclador (Rådström et. al, 2004).

El proceso de PCR por lo general consiste en una serie de 20 a 35 ciclos; cada ciclo suele consistir en 2-3 pasos a diferentes temperaturas. El inicio consiste en llevar la reacción hasta una temperatura de 94-96°C necesaria para que se activen las ADN polimerasas. La desnaturalización permite la separación de las dos cadenas de ADN y se da entre los 94-95°C. El alineamiento es la unión del cebador a su secuencia complementaria en el ADN molde, para ello es necesario bajar la temperatura a 40-68°C. La extensión o elongación de la cadena, consiste en la síntesis de una nueva hebra de ADN complementaria a la hebra molde por parte de la polimerasa, la cual añade los dNTP complementarios en dirección 5'→ 3', uniendo el grupo 5'-fosfato de los dNTP con el grupo 3'-hidroxilo del final de la hebra de ADN creciente (la cual se extiende). Para la Taq polimerasa, la temperatura de máxima actividad es de 72°C. La elongación final es una etapa única que se lleva a cabo a una temperatura de 70-74°C durante 5-15 minutos tras el último ciclo de PCR. Con ella se asegura que cualquier ADN de cadena simple restante sea totalmente amplificado. Finalmente la fase de conservación se lleva a cabo a 4-15°C durante un tiempo indefinido para conservar la reacción a corto plazo (OIE, 2008) (Fig. 10; Fig. 11).

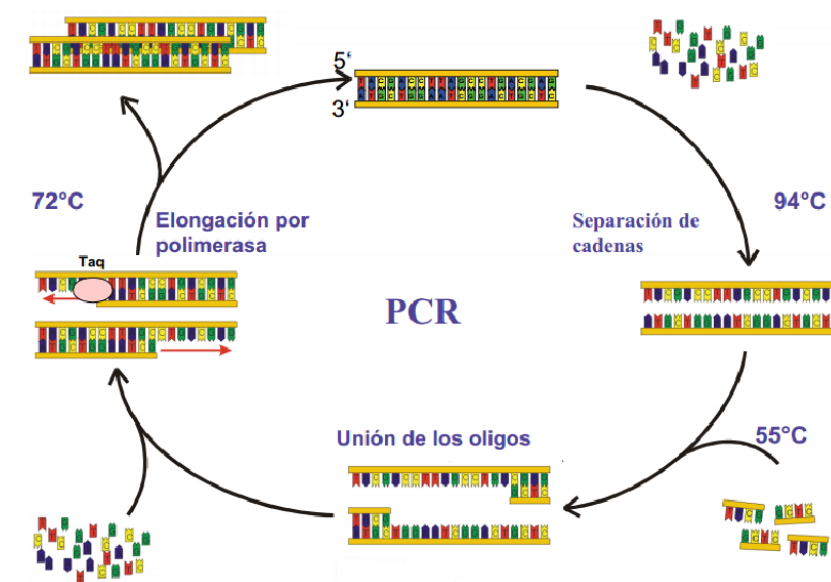


Figura 10. Ciclo de amplificación de la PCR (Padro E., 2010).

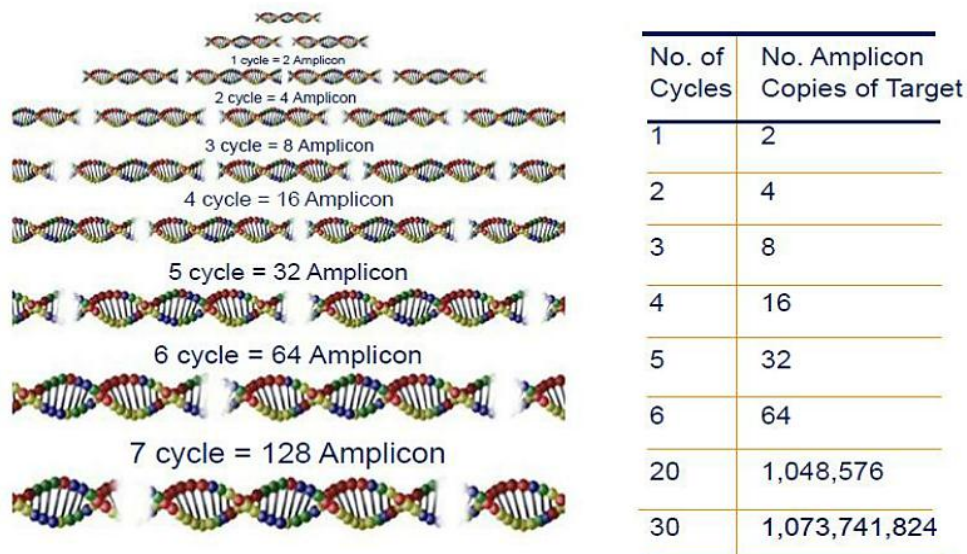


Figura 11. Esquema de amplificación de ADN por PCR (Grothusen H., 2008).

El producto PCR, amplicón o amplímero puede detectarse utilizando varios procedimientos. El más común utiliza electroforesis en gel de agarosa y tiñendo el ADN con un tinte intercalado no específico, como el bromuro de etidio (OIE, 2008) (Fig. 11).

c. PCR en tiempo real (RT-PCR)

Observado en tiempo real mediante la detección de una señal fluorescente emitida durante la amplificación, es una técnica que amplifica y cuantifica un fragmento de ADN específico. Tiene muchas ventajas sobre la PCR convencional, ya que no requiere un análisis post-PCR, es más rápido, no genera gastos debido a un análisis electroforético o fotodocumentación y permite identificar con una alta probabilidad los productos de PCR a partir de su temperatura de fusión (denominado valor T_m , del inglés “melting temperatura”). La primera RT-PCR descrita para la cuantificación de *Babesia* fue en 2003 cuando se utilizó SYBR Green para cuantificar la transcripción del gen rap-1 de *Babesia bigemina* (Suárez et. al, 2003). Se han publicado varios protocolos para la cuantificación de *B. bovis* y *B. bigemina* (Buling et. al, 2007; Kim et. al; 2007; Bhoora et. al, 2010; Ramos et. al, 2011). Probablemente, la

única desventaja de esta metodología es el alto costo de los equipos, que duplica o triplica el costo de una máquina de PCR convencional (Fig. 12). Se ha reportado que la sensibilidad de RTPCR es cuatro veces mayor que PCR convencional (Chiang, et. al, 1996).

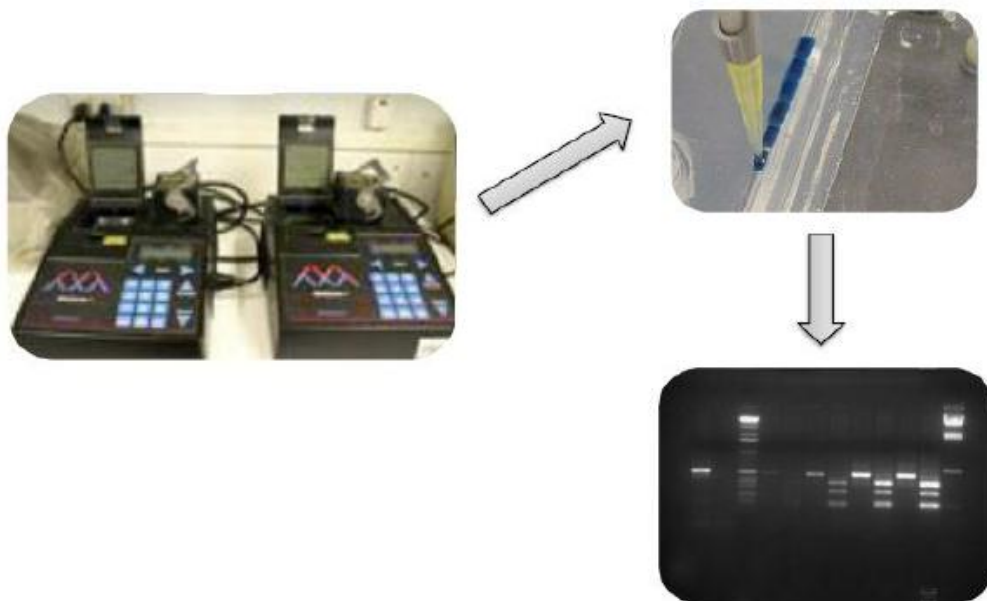


Figura 12. Visualización de un producto de PCR convencional (de *Padro E., 2010*).

2.1.16. Tratamiento de la babesiosis

El control de la *babesiosis* bovina se puede realizar mediante la inmunización, drogas anti-babesiales o por una combinación de estas (Suárez, et. al, 2011). En zonas endémicas, los animales enfermos deben ser tratados con un fármaco eficaz tan pronto como sea posible (Vial et. al, 2006; CFSPH, 2011). La terapia de apoyo puede ser necesaria en casos graves de babesiosis mediante transfusiones sanguíneas, antiinflamatorios no esteroideos, eliminación de garrapatas, hierro, dextrosa, vitaminas (complejo B), purgantes, y reemplazo de fluidos (Zintl A. et. al, 2003). En el cuadro 2 se describen los fármacos anti-babesia desarrollados para el tratamiento de la babesiosis bovina.

Cuadro 2. Fármacos utilizados en el tratamiento de la *babesiosis* bovina.

Compuesto	Nombre Comercial	<i>Babesia spp.</i>	Dosis	Vía	Uso Actual	Referencia
Imidocarb	Imidox® 120	<i>B. bovis</i> <i>B. bigemina</i> <i>B. divergens</i> <i>B. caballi</i>	1-3 mg kg ⁻¹	IM SC	Si	Kuttier, K. 1981
Acetato de diminazeno	Berenil®	<i>B. bovis</i> <i>B. bigemina</i> <i>B. divergens</i> <i>B. caballi</i>	3-5mg kg ⁻¹	IM	Si	Kuttier, K. 1981
Nerolidol	-----	<i>B. bovis</i> <i>B. bigemina</i> <i>B. ovata</i> <i>B. caballi</i>	10 µM 25 µM	-	En Estudio	AbouLaila, M, et. Al, 2010c.
Artesunate	-----	<i>B. bovis</i> <i>B. gibsoni</i> <i>B. caballi</i> <i>B. microti</i>	2.6µM 10µg ml ⁻¹ 10 mg Kg ⁻¹	-	En Estudio	Gooo, Y., et. AL, 2010.
Triclosan	-----	<i>B. bovis</i> <i>B. bigemina</i> <i>B. caballi</i>	100 µg ml ⁻¹ 50 µg ml ⁻¹	-	En Estudio	Bork, S. et. Al, 2003.
Epoxomicin	-----	<i>B. bovis</i> <i>B. bigemina</i> <i>B. ovata</i> <i>B. caballi</i> <i>B. microti</i>	10 nM 5 nM 0.05-0.5 mg kg ⁻¹	-	En Estudio	AbouLaila, M, et. Al, 2010c.
Gossypol	-----	<i>B. bovis</i>	100 Mm	-	En Estudio	Bork, S. et. Al, 2004.
Atovaquone	-----	<i>B. divergens</i>	1 mg kg ⁻¹	-	En Estudio	Pudney, M et al, 1997.

Fuente: (Mosqueda J et. Al., 2012).

2.1.17. Prevención y Control

El control de la Piroplasmosis se basa en:

1. Control estratégico de la garrapatas (OIE, 2009).
2. Quimioterapia en los animales infectados. La estabilidad endémica natural no es confiable como única estrategia de control, puesto que ésta puede verse afectada por el clima, los factores relacionados con los huéspedes y el manejo. En zonas endémicas, los animales enfermos se deben tratar lo antes posible con antiparasitarios (CFSPH, 2008).
3. Reducir la exposición a los vectores, evitando áreas donde las garrapatas están presentes (Cordero del Campillo M., 1999).
4. Cuarentena de los animales infectados o provenientes de zonas endémicas (Coetzer, 2004).
5. Inspección y certificación de que los animales estuvieron libres de garrapatas antes de permitir su movilización (OIE, 2009).
6. Inmunización natural (el ganado desarrolla una larga inmunidad después de una infección con *B. bovis* o *B. bigemina*) o mediante vacunas específicas para Babesia o para el control del vector (OIE, 2009).
7. Utilización de ganado bovino genéticamente resistente, como *Bos indicus* (Coetzer, 2004).
8. Testear y sacrificar a los animales infectados (Coetzer, 2004).

2.2. GÉNEROS DE GARRAPATAS

Las garrapatas, juntamente con otros invertebrados tales como insectos, arañas, ácaros y crustáceos, pertenecen al Phylum Arthropoda, el cual se divide en dos subphylum: Mandibulata y Chelicerata. Las garrapatas pertenecen a la Clase Arachnida (dentro del subphylum Chelicerata).

Existen aproximadamente 870 especies de garrapatas descritas en el mundo, todas agrupadas en el suborden Ixodida, el cual está dividido en tres familias: Ixodidae, Argasidae y Nuttalliellidae (*Guglielmone et al., 2010*).

Carecen de antenas, tienen cabeza y tórax fusionados y cuatro pares de patas, al igual que las arañas y escorpiones, con excepción de las larvas, que presentan tres pares de patas. La clase agrupa al Orden Acari y dentro de éste al suborden Ixodida al que pertenecen las garrapatas que se diferencian de los demás ácaros en que presentan hipostoma dentado y una estructura quimiorreceptora en el primer par de patas denominada órgano de Haller (*Barros et al., 2006*).

Son ectoparásitos obligados, necesitan alimentarse de sangre para completar su desarrollo y tienen un complejo ciclo de vida, presentando una fase parasitaria de alimentación sanguínea (lo hacen penetrando en la piel de sus huéspedes con el hipostoma) y una fase de vida libre (período de oviposición y entre mudas) (*Boero, 1957; Gatto et al., 2006*).

Algunas especies de garrapatas aceptan una variedad de especies hospedadoras, otras son más selectivas y algunas son extremadamente exigentes y se alimentan de una sola especie de hospedador. Las garrapatas son reconocidas por su capacidad de parasitar vertebrados domésticos, silvestres y al hombre, lo cual puede resultar en problemas sanitarios para sus hospedadores (*Guglielmone et al., 2003*).

El ciclo de vida de las garrapatas de la familia Ixodidae presenta una etapa inactiva (huevos) y tres etapas móviles hematófagas: larva, ninfa y adulto. Cada una de estas requiere de varios días de fijación en el hospedero (*Gatto et al., 2006, Barros et al., 2006*). En contraste, las garrapatas de la familia Argasidae pueden pasar por varios estadios ninfales antes de alcanzar la fase adulta y las etapas de alimentación pueden ser muy cortas (de minutos a horas). Los requerimientos de hábitat son un aspecto importante en la biología de garrapatas y afectan los estados no parasíticos así como la oportunidad de contacto con un hospedero para la ingesta de sangre (*Oliver, 1989*).

2.2.1. Subfamilia Ixodidae

Caracterizadas por la presencia de escudo quitinoso y conocidas como garrapatas duras, con aproximadamente 702 especies en el mundo. El gnatosoma está compuesto por el hipostoma (utilizado para fijarse al huésped) y los palpos (órganos táctiles). En la cara dorsal de la base del gnatosoma de las hembras, se encuentran las áreas porosas, variando la forma según las especies. Los quelíceros son utilizados para perforar la piel del huésped. El idiosoma es de forma variable según las especies y sexo. Aplanado dorso-ventralmente en machos y en larvas, ninfas y hembras que no se han alimentado. En las larvas, ninfas y hembras repletas, el cuerpo es globoso.

La cara dorsal del idiosoma, está compuesta por el escudo (placa de quitina, lisa o con dibujos (ornato). Cubre el tercio anterior en las hembras no alimentadas y casi toda la superficie dorsal en los machos. Sobre la superficie del escudo, se encuentran surcos más o menos marcados. Entre estos y el borde posterior del cuerpo pueden existir pequeños surcos que delimitan celdas más o menos cuadrangulares (festones marginales). En algunos géneros, el borde del escudo presenta dos estructuras de ubicación simétrica, los ojos. La cara ventral del idiosoma presenta detalles de importancia para la clasificación. En la parte anterior se encuentra el poro genital. En la parte posterior se localiza el poro excretor o nefrostoma. Las patas son 8 en los adultos y 6 en las larvas. Todas compuestas por 6 artículos: coxa, trocánter, fémur, tibia, protarso y tarso. Los tarsos terminan en dos uñas y una pieza intermedia que actúa como órgano de adherencia (Boero, 1957; Barros et al., 2006).

Los ixódidos se caracterizan por su dimorfismo sexual. Pasan por cuatro estadios: huevo, larva, ninfa y adulto. Tienen sólo un estadio ninfal. Cada etapa requiere de varios días para ingerir sangre y también requieren ingestas más abundantes de sangre. Las ninfas y hembras solo se alimentan una vez. Las hembras producen una gran masa de huevos y mueren. La mayoría de las garrapatas de ésta familia requieren tres hospedadores diferentes que pueden o no ser de la misma especie. Con frecuencia, larvas y ninfas se alimentan sobre pequeños y medianos mamíferos, mientras que los adultos se alimentan

sobre especies mayores. Algunos ixódidos no requieren múltiples hospederos y se alimentan sobre uno o dos (Oliver, 1989).

Larvas y ninfas que se alimentan sobre animales de sangre caliente, necesitan 3-7 y 4-8 días respectivamente, mientras que las que se alimentan sobre reptiles requieren unos días más. Las hembras adultas que parasitan aves y mamíferos requieren usualmente 7-12 días y las que se encuentran en reptiles aún más tiempo. Los machos se alimentan intermitentemente, tomando pequeñas cantidades de sangre y permaneciendo en el hospedador por semanas o meses. La mayoría de las garrapatas, tienen un ritmo definido de alimentación, así como en la búsqueda de hospedador, diapausa y puesta de huevos (Oliver, 1989).

2.2.2. Géneros

a. Dermacentor

Se conocen unas treinta especies del género *Dermacentor* las cuales son relativamente grandes, las hembras repletas de sangre pueden medir de 1.5 a 2 cm de tamaño. Son garrapatas con la base del capítulo cuadrangular desde una vista dorsal, más ancha que larga, los palpos son cortos y gruesos. Los ojos son pequeños, circulares y planos (figura 13). El escudo dorsal y las extremidades tienen un color de fondo rojo (Junquera 2013).



Figura 13. Ejemplar adulto de garrapata *Dermacentor*.

Garrapata de uno o tres hospedadores que parasitan una gran variedad de mamíferos domésticos como bovinos, ovinos, equinos, caninos, felinos y el hombre (Junquera 2013).

b. Amblyoma

Especie de garrapata dura en la que la hembra es más grande que el macho se caracteriza por tener tres hospedadores, y ser muy difícil de extraer manualmente. El escudo distintivo es de un tono más pálido en el macho y la hembra presenta una mancha plateada en forma de estrella en el margen posterior. Tienen unas trompas largas que generalmente ocasionan heridas profundas y sensibles a contaminarse con larvas de gusanos barrenadores y bacterias (Fairchild et al., 1966).

Una de las especies más conocidas en América del Sur es la *Amblyomma cajennense* (Figura 14), que en la mayoría de los casos llega a parasitar hasta a el hombre y cuya actividad es continua durante todo año (Faccioli et al., 2011).

Un adulto dilatado por sangre desciende de un huésped principal y pone huevos en la tierra. De éstos nacen larvas que pueden vivir de 50 a 80 días sin alimentarse. Las larvas se instalan en un huésped para extraer sangre, y descienden para mudar a ninfas sobre el pasto. Las ninfas pueden vivir hasta 15 meses sin alimentarse. Prefiere fundamentalmente como hospedadores al ganado bovino, ovino, equino y todo tipo de mamíferos domésticos y salvajes, algunas veces a las aves, seres humanos, caninos, equinos, y otras especies (Camilo et al., 2010).



Figura 14. Fase de la garrapata del genero Amblyoma

Las ninfas toman un nuevo huésped para extraer sangre, y descienden para mudar a garrapatas, que pueden estar hasta 14 meses sin alimentarse. Los adultos jóvenes ascienden al huésped principal para reiniciar este ciclo. El huésped puede ser el mismo animal, otro animal de la misma especie o un animal de otra especie (Fabricius, 1787).

c. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Es una garrapata es introducida y específica del bovino, a los cuales infesta severamente y transmite enfermedades como la babesiosis, causando importantes pérdidas a la producción ganadera. Los hallazgos sobre otros hospedadores, incluido el hombre, son frecuentes, pero esta garrapata dependería de la presencia de vacunos para su subsistencia (Figura 15). Estos hospedadores incluyen la comadreja overa, caballo, caprinos, cerdo doméstico, corzuelas, liebre europea (*Lepus europaeus*), perro, ovinos, tapir, zorros del género *Lycalopex* sp. En 1902 se inician las primeras acciones sanitarias para evitar su difusión a través de una campaña de erradicación (Guglielmone y Nava, 2005).



Figura 15. Hembra adulta de garrapata de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Los machos tienen un tamaño de 3 a 4 mm y las hembras de 10 a 12 mm. Este género de garrapatas se encuentran comúnmente en Argentina. Las larvas pueden sobrevivir hasta 7 meses sin alimentarse, y en verano unos dos meses. Este género de garrapatas se llegan a desarrollar en 45 días, aproximadamente. Estas garrapatas se localizan en toda la piel del animal,

especialmente en tabla del cogote y entropierna, transmiten la enfermedad denominada *Babesiosis* (Voltzit 2007).

d. Ixodes

Ixodes ricinus es una garrapata dura que infesta ganado, venados, perros y una gran variedad de otras especies, incluidos los humanos. Esta garrapata tiene piezas bucales largas que pueden hacer que sus picaduras sean dolorosas y molestas; además, las picaduras pueden infectarse debido a la presencia de bacterias. La alimentación de un gran número de garrapatas puede provocar anemia en el hospedador. *I. ricinus* también puede transmitir varios patógenos, entre ellos *Babesia divergens* (babesiosis, el virus de la encefalomielitis ovina o louping ill, virus de encefalitis transmitido por garrapatas, *Borrelia burgdorferi* (enfermedad de Lyme) y *Anaplasma phagocytophila* (fiebre producida por garrapatas en rumiantes y anaplasmosis granulocítica humana (Chapman & Hall, 1997).



Figura 16. Garrapata adulta del género Ixodes






























I. ricinus es una garrapata de tres hospedadores. Las larvas, ninfas y adultos tienden a alimentarse en animales de distintos tamaños. A menudo se encuentran *I. ricinus* alrededor de la boca, en las orejas y los párpados de ovejas, perros y gatos, y alrededor de la ubre y región axilar del ganado (Figura 16). *I. ricinus* pertenece a la familia Ixodidae (garrapatas duras). Las garrapatas duras tienen un escudo dorsal (scutum) y sus piezas bucales (capitulum) sobresalen hacia adelante cuando se las observa desde arriba. Las garrapatas de la especie Ixodes carecen de ojos y los pedipalpos son más largos que

anchos. No presentan ornamentaciones o festones. El surco anal es distintivo y rodea el ano por adelante. Ixodes presenta dimorfismo sexual: las placas estigmáticas (espiráculo) tienen forma ovalada en los machos y circular en las hembras. La superficie ventral del macho tiene siete placas no prominentes que hacen de escudo. Las garrapatas adultas de *I. ricinus* son de color marrón rojizo, aunque las hembras son de color gris claro cuando están ingurgitadas. Antes de alimentarse, los machos miden aproximadamente entre 2.5 - 3 mm de largo y las hembras, entre 3 - 4 mm de largo. Cuando se ingurgitan, las hembras pueden medir hasta 1 cm de largo. Esta especie tiene un espolón en el ángulo posterior interno de la coxa del primer par de patas; este espolón se solapa con la coxa del segundo par de patas. Los tarsos son relativamente largos y afinados (Chapman & Hall, 1997).

2.3. Identificación de géneros de Garrapatas

Los géneros de garrapatas pueden identificarse gracias a algunas características morfológicas como es el rostro, el escudo, los ojos, el surco anal, los festones, etc. (Solari et al, 2006).

Cuadro 3. Características individuales de los géneros de garrapata.

	ROSTRO	ESCUDO	OJOS	SURCO ANAL	FESTONES	COXA I	PLACAS ADANALES	ESPIRACULOS	ESCUDO ORNAMENTADO	TAMAÑO
Ixodes spp	 Largo		No	Ant.	 No	 Sin Nada	 2		No	Medio
Amblyomma spp	 Largo		Si	Post.	 Si	 Con Espinas	 No		Si	Grande
Boophilus spp	 Corto		Si	No muy obvio	 No	 Bifid.	 4		No	Medio
Haemaphysalis spp	 Corto		No	Post.	 Si	 Con espinas cortas	 No		No	Medio
Rhipicephalus spp	 Corto		Si	Post.	 Si	 Bifid.	 2		No	Medio

Fuente: Solari et al, 2006

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Materiales de Campo

- 95 Bovinos de diferente raza, edad y sexo
- Overol
- Botas
- Cuerdas
- Nariguera
- Tubos vacutainer con anticoagulante EDTA
- Aguja hipodérmica
- Capuchones
- Termo para conservación de muestras
- Algodón y alcohol
- Lápiz dermatográfico
- Cámara fotográfica
- Placas portaobjetos para frotis sanguíneos
- Registros de campo
- Encuestas

3.1.2. Materiales de Laboratorio

- Mandil
- Guantes
- Mascarilla
- Placas portaobjetos

- Aceite de inmersión
- Giemsa
- Microscopio
- Cabina de bioseguridad LABCONCO Purifer Class II Biosafety Cabinet
- Kit de extracción de DNA Pure Link® Genomic Invitrogen
- KIT para PCR Applied biosystems™
- Primers específicos para *B. bovis* y *B. bigemina* (Figueroa, Chieves, Johnson, & Buening 1993)

Primer 1 Invitrogen® 1 – F CACGAGGAAGGAACTACCATGTTGA

Primer 2 Invitrogen® 1 – R CCAAGGAGCTTGAACGTACGAGGTCA

Primer 3 Invitrogen® 2 – F TCAACAAGGTACTCTATATGCTACC

Primer 4 Invitrogen® 2 – R CTACCGAGCAGAACCTCCACCAT

Primer 5 Invitrogen® 3 – R CATCTAATTTCTCTCCATACCCTCC

Primer 6 Invitrogen® 3 – F CCTCGGCTTCAACTCTGATCCAAAG

Primer 7 Invitrogen® 4 – F CGCAAGCCCAGCACGCCCGGTGC

Primer 8 Invitrogen® 4 – R CCGACCTGGATAGGCTGTATG

- Etanol de grado molecular al 96%
- Termociclador punto final Applied biosystems™
- Autoclave
- Estufa
- Centrífuga
- Micro centrífuga
- Balanza Analítica
- Microondas
- Baño María

- Vórtex
- Micropipetas y puntas desechables de 0.5-10 μ l, 20-100 μ l, 100-1000 μ l
- Agua destilada desionizada
- Frasco lavador o lavador de placas
- Equipo de electroforesis BIO-RAD
- Congeladores
- Transluminador y fotodocumentador Labnet
- Gradillas
- Tubos ependorff de 50 μ L, 600 μ L y 1500 μ L
- Parafilm
- Espectrofotómetro NanoDrop 2000 Thermo scientific
- Tijeras
- Clave dicotómica para garrapatas (Faccioli, 2011)

3.1.3. Materiales de Oficina

- Ordenador
- Memoria USB
- Borrador
- Impresora
- Papel bond
- Calculadora
- Lápices
- Esferográficos
- Registros

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Ubicación

La presente investigación se desarrolló en el sector Este de la provincia de Zamora Chinchipe, específicamente en los cantones Nangaritza y Paquisha los cuales abarcan una superficie de 2335 km² y que cuentan con la siguientes características agrometeorológicas:

Cuadro 4. Características agrometeorológicas de los Cantones Nangaritza y Paquisha.

Característica	Nangaritza	Paquisha	Unidad de medida
Altitud	830-2600	800-2000	m.s.n.m.
Temperatura	15 – 35	18 – 24	°C
Clima	Subtropical cálido húmedo	Cálido húmedo	Holdridge
Precipitación:	2211	2095	mm/año
Humedad	90%	91%	%

Fuente: *I. Municipio de los cantones Nangaritza y Paquisha.*

La técnica de Giemsa y la Identificación de géneros de garrapatas se realizaron en el Laboratorio Clínico de la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Loja; la técnica de Reacción en Cadena de la polimerasa (nPCR), se realizó en el Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

3.2.2. Tamaño de la Población

La población estuvo constituida por 351 fincas y 6651 bovinos del sector Este de la provincia de Zamora Chinchipe de diferente edad, raza y sexo, de donde se extrajo estadísticamente una muestra para su estudio.

3.2.3. Tamaño de la Muestra

a. Número de animales

El tamaño de la muestra se calculó partiendo del conocimiento de la población bovina existente en el sector Este de la provincia de Zamora Chinchipe, a través de la siguiente fórmula:

$$n = \frac{NZ^2P(1 - P)}{(N - 1)d^2 + Z^2P(1 - P)}$$

Donde:

N = tamaño de la población 6651

Z = Percentil 1-alfa/2 de la normal para alfa=0,05 Z=1,96

P = Probabilidad de encontrar el efecto (50 %)

d = Error máximo permisible o precisión (10 %)

Partiendo de que la población bovina del sector Este de la provincia de Zamora Chinchipe es de 6551 animales; y que la probabilidad de prevalencia de encontrar el efecto es de (50 %), y con un error de precisión permitido de 10 %; la fórmula se desarrolló así:

$$n = \frac{(6651)1,96^2 * 0,5(1 - 0,5)}{(6651 - 1)0,1^2 + 1,96^2 * 0,5(1 - 0,5)} = 95$$

El tamaño de la muestra fue de 95 bovinos escogidos de forma aleatoria en todo el sector Este de la provincia.

Por asuntos de logística, para la realización del diagnóstico por nPCR, de las 95 muestras se tomaron al azar 70, para ser sometidas al análisis de esta técnica.

Cuadro 5. Cálculo de tamaño muestral de bovinos

ESTE	Cabezas	Factor	Muestra
Paquisha	2046	0,01428357	29
Nangaritzza	4605	0,01428357	66
Total	6651	0,01428357	95

b. Número de Fincas

El tamaño de la muestra se calculó partiendo del conocimiento del número de fincas existentes en el sector Este de la provincia de Zamora Chinchipe, a través de la siguiente fórmula:

$$n = \frac{NZ^2P(1 - P)}{(N - 1)d^2 + Z^2P(1 - P)}$$

Donde:

N = tamaño de la población 351

Z = Percentil 1-alfa/2 de la normal para alfa=0,05 Z=1,96

P = Probabilidad de encontrar el efecto (94 %)

d = Error máximo permisible o precisión (10 %)

Partiendo de que el número de fincas del sector Este de la provincia de Zamora Chinchipe es de 351; y que la probabilidad de prevalencia de encontrar el efecto es de (94 %), y con un error de precisión permitido de 10 %; la fórmula se desarrolló así:

$$n = \frac{(351)1,96^2 * 0,94(1 - 0,94)}{(351 - 1)0,1^2 + 1,96^2 * 0,94(1 - 0,94)} = 21$$

El tamaño de la muestra fue de 21 fincas escogidas de forma aleatoria en todo el sector Este de la provincia.

Cuadro 6. Cálculo del número de fincas para la encuesta

ESTE	Fincas	Factor	Muestra
Paquisha	96	0,09116809	6
Nangaritza	255	0,09116809	15
Total	351	0,09116809	21

3.2.4. Variables a Evaluar

En el presente estudio se consideraron las siguientes variables:

- Prevalencia de *Babesia spp.* en el sector Este de la provincia de Zamora Chinchipe por edad, raza y sexo:
 - Por Giemsa
 - Por PCR

- Identificación de géneros de garrapatas existentes

3.2.5. Análisis Estadístico

La información recopilada se tabuló y se presentó en cuadros y gráficos con promedios y porcentajes, utilizando la estadística descriptiva; y la prueba de Chi cuadrado (X^2) para determinar diferencias estadísticas.

Para la realización de la entrevista a los ganaderos y la toma de muestras, se seleccionaron aleatoriamente las fincas en los dos cantones de la zona Este de la provincia de Zamora Chinchipe.

3.2.6. Técnica de Recolección de las Muestras de sangre

Las muestras se tomaron asépticamente en animales asintomáticos de la vena yugular en tubos vacutainer con EDTA, agitando lentamente para favorecer su

mezclado, se las colocó en un termo para su conservación hasta su análisis en el laboratorio de diagnóstico de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia y en el Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

3.2.7. Recolección de Garrapatas

A más de las muestras de sangre, se procedió a recolectar de los animales seleccionados, garrapatas de diferente tamaño y de las distintas regiones del cuerpo, en una cantidad de 25 garrapatas por cada finca. Las garrapatas fueron colocadas en frascos con paños húmedos y con tapas agujereadas, hasta llegar al laboratorio y ser clasificadas por su género, siguiendo la guía práctica de identificación de géneros (Solari et al, 2006).

3.2.8. Realización de Frotis Sanguíneos

Los frotis se realizaron extrayendo una gota de sangre de la oreja del bovino, ubicándola sobre el porta objetos y realizando el extendido de la gota con la ayuda de otro porta objetos o con una laminilla, en la que debe presentar una punta de cola, luego se procede al secado.

3.2.9. Coloración de Giemsa

Los frotis de sangre se ubicaron en una gradilla portaobjetos para luego proceder a realizar la tinción de Giemsa de acuerdo a la siguiente técnica:

1. Fijado con alcohol metílico
2. Dejar secar de 5 a 10 minutos
3. sumergir en Giemsa durante 30 minutos
4. eliminar el colorante y Lavar con agua destilada

5. Dejar secar a temperatura ambiente; y,
6. Observar al microscopio con aceite de inmersión y lente de 100X.

3.2.10. Técnica de extracción de ADN (Pure link® genomic).

1. Poner el baño María a una temperatura de 55°C.
2. Poner 200µl de sangre (fresca o congelada) en un tubo estéril.
3. Adicione 20 µl de proteinasa K a la muestra.
4. Adicione 20µl de ARNasa a la muestra y mezcle en vórtex e incube a temperatura ambiente por 2 minutos.
5. Adicione 200 µl de Pure Link Genomic Lisis/Binding Buffer y mezcle en vórtex hasta obtener una solución homogénea.
6. Incube a 55°C por 10 minutos para promover la digestión de las proteínas.
7. Adicione 200µl de etanol 96-100%, mezcle en vórtex por 5seg. Hasta obtener una solución homogénea.
8. Colocar una columna dentro del tubo colector.
9. Adicionar aproximadamente 640µl de lisado celular en la columna.
10. Centrifugue la columna a 10000g por un minuto a temperatura ambiente
11. Descarte el tubo colector y coloque un tubo colector nuevo.
12. Adicione 500µl de Wash buffer 1 preparado con etanol en la columna.
13. Centrifugue la columna a 10000g por un minuto.
14. Descarte el tubo colector y coloque uno nuevo.
15. Adicione 500µl de Wash buffer 2 preparado con etanol en la columna.

16. Centrifugue la columna a 10000g por 3 minutos a temperatura ambiente y descarte el tubo colector.
17. Coloque la columna en un tubo estéril de 1,5ml.
18. Adicione 25-200ul de Pure Link Genomic Elution Buffer en la columna.
19. Incube a temperatura ambiente por un minuto. Centrifugue a 10000g por 1 minuto a temperatura ambiente.

3.2.11. Verificación de calidad del ADN

Se utilizó un Espectrofotometro Nanodrop™ 2000, el cual permite cuantificar la calidad de las muestras de ADN. El manejo del equipo se describe a continuación:

- a. Para comenzar, se debe limpiar las superficies ópticas superiores e inferiores del sistema de espectrofotómetro con un paño limpio adecuado.
- b. Colocar 1 µl de agua desionizada limpia en la superficie inferior óptica.
- c. Cierre el brazo de palanca, asegurando que el pedestal superior entra en contacto con el agua desionizada.
- d. Levante el brazo de palanca y limpie tanto las superficies ópticas con un paño limpio, seco y sin pelusa, un paño de laboratorio.
- e. Abra el software NanoDrop y seleccione la aplicación de ácidos nucleicos. Utilice un pequeño volumen, pipeta calibrada para realizar una medición en blanco mediante la supresión de 1 µl de Pure Link Genomic Elution Buffer sobre la superficie óptica inferior. Baje el brazo de palanca y seleccione "En blanco" en la aplicación de ácido nucleico.
- f. Una vez que la medición en blanco es completa, limpie las superficies ópticas con un paño limpio, seco y sin pelusa, un paño de laboratorio.
- g. Elija la constante apropiada para la muestra que se va a medir.

- h. Colocar 1 μl del extracto de ADN y correr la muestra. Visualizar en el monitor la calidad de ADN de la muestra.

3.2.12. Técnica de PCR y nPCR

Todos los reactivos se manipularon en flujo laminar bioseguridad LABCONCO purifer Class II Biosafety Cabinet, utilizando puntas descartables resistentes a aerosoles. Las reacciones se desarrollaron en un Termociclador (Applied Biosystems).

Tanto para los ensayos de PCR y nPCR para *B. bovis* y *B. bigemina* se utilizó el mismo procedimiento, el cual se describe a continuación.

3.2.13. Preparación de primers

- A 100 μl del primer madre se le agregó 100 μl de agua ultrapura.
- Tomar 10 μl del primer y añadir 90 μl de agua ultra pura.

a. Mix PCR *B. bovis*

Para *B. bovis* de utilizo los primers 1 y 2 para la primera PCR y los primer 3 y 4 para la segunda PCR. Para realizar este mix se utiliza los siguientes componentes con las cantidades indicadas a continuación:

Cuadro 7. Esquema de mezclado de componentes para el mix PCR de *Babesia bovis*

Reactivo	Cantidad
Enzima	12.5 μl
GC Enhancer	2 μl
Primer 1	1 μl
Primer 2	1 μl
Agua ultra pura	7.5 μl

Se recomienda centrifugar esta preparación por al menos 10 segundos a 12000 rpm para mejorar la mezcla de los componentes.

Luego de la preparación del mix se toma 1 µl del extracto de ADN y se le añade 24 del mix anteriormente preparado.

Enseguida de este proceso se lleva las muestras al Termociclador el cual debe estar calibrado con la temperatura y los tiempos indicados para cada proceso.

b. Mix nPCR B. bovis

Después de haber preparado los primer 3 y 4 de la misma manera en que se prepararon los primers 1 y 2, se realiza el mix que se utilizara en este proceso

Cuadro 8. Esquema de mezclado de componentes para el mix nPCR de *Babesia bovis*

Reactivo	Cantidad
Enzima	12.5 µl
GC Enhancer	2 µl
Primer 3	1 µl
Primer 4	1 µl
Agua ultra pura	7.5 µl

Se debe centrifugar este mix para un mejor funcionamiento.

Ahora se toma 1 µl del producto de PCR y se le añade 9 µl de agua ultra pura, de esta mezcla tomamos 1 uL y le añadimos 24 µl del mix antes preparado y se lleva al Termociclador para su amplificación.

Cuadro 9. Temperaturas y Ciclos PCR y nPCR *B. bovis*.

PROCESO	CICLOS	TIEMPO	TEMPERATURA
PCR y nPCR	1	2 min	95° C
	35	1 min	95 °C
		1 min	55 °C
		1,5 min	73 °C
	1	15 min	73 °C
Conservación	∞	4 °C	

a. Mix PCR *B. bigemina*

En este caso para *B. bigemina* se utilizó los primers 5 y 6 para la primera PCR y los primers 7 y 8 para la segunda PCR. Para realizar este mix se utiliza los siguientes componentes con las cantidades indicadas a continuación:

Cuadro 10. Esquema de mezclado de componentes para el mix PCR de *Babesia bigemina*

Reactivo	Cantidad
Enzima	12.5 µl
GC Enhancer	2 µl
Primer 5	1 µl
Primer 6	1 µl
Agua ultra pura	7.5 µl

Se recomienda centrifugar esta preparación por al menos 10 segundos a 12000 rpm para mejorar la mezcla de los componentes.

Luego de la preparación del mix se toma 1 µl del extracto de ADN y se le añade 24 µl del mix anteriormente preparado.

Después de este proceso se lleva las muestras al termociclador el cual debe estar calibrado con la temperatura y los tiempos indicados para este proceso.

c. **Mix nPCR *B. bigemina***

Cuadro 11. Esquema de mezclado de componentes para el mix nPCR de *Babesia bigemina*

Reactivo	Cantidad
Enzima	12.5 µl
GC Enhancer	2 µl
Primer 7	1 µl
Primer 8	1 µl
Agua ultra pura	7.5 µl

Se debe centrifugar este mix para un mejor funcionamiento.

Ahora se toma 1 µl del producto del primer PCR y se le añade 9 µl de agua ultra pura, de esta mezcla tomamos 1uL y le añadimos 24 µl del mix para antes preparado y se lleva al termociclador para su ampliación.

Cuadro 12. Temperaturas y Ciclos PCR y nPCR *B. bigemina*.

PROCESO	CICLOS	TIEMPO	TEMPERATURA
PCR	1	2 min	95 °C
	35	1 min	95 °C
		1 min	52 °C
		1 min	72 °C
	1	10 min	72 °C
Conservación	∞	4 °C	
nPCR	1	2 min	95 °C
	35	1 min	95 °C
		1 min	58 °C
		45 seg	72 °C
	1	10 min	72 °C
Conservación	∞	4 °C	

3.2.14. Electroforesis

Se preparó un gel de agarosa al 2% Invitrogen, utilizando 2gr de agarosa y 100 ml de TAE 1x (Tris-HCL- Ácido bórico- EDTA, pH 7.6), esto se lo calentó en microondas por 1 minuto aproximadamente y se le añadió 8 µl de SYBR® Safe DNA gel stain Invitrogen. Se colocó en la cámara de electroforesis BioRad, se ubicó los peines para la formación de pocillos y se dejó enfriar hasta que el gel solidifique.

Una vez que el gel estuvo solidificado se procedió a llenar la cámara de electroforesis con TAE 1X al cual se le añadió 15 µl de SYBR® Safe DNA gel stain Invitrogen y se dejó incubar a temperatura ambiente. Por otro lado colocamos sobre el mesón de trabajo un pedazo de papel parafilm, en este hicimos la mezcla de los productos que fueron a los pocillos del gel de agarosa en la siguiente relación: 2 µl de 10X Blue Juice™ invitrogen + 2 µl de marcador de peso Molecular Trackit™ Invitrogen de 100 pb. Para determinar la presencia de productos de nPCR se cargó 8 µl de muestra en cada pocillo, 2 µl de 10X Blue Juice™ Invitrogen + 6 µl de producto de PCR, control positivo (+), Control Negativo (-).

Luego de cargar el contenido de las muestras en los pocillos del gel de agarosa conectamos la cámara de electroforesis a la fuente de poder que debe estar calibrada a 100 voltios, 400 mA y la dejamos correr por 25 minutos.

Para la realización del nPCR de *B. bovis* se utilizaron los cebadores descritos por Figueroa *et al.* (1993), con los que se amplifica un fragmento de ADN el cual codifica al gen rap1 presente en las proteínas asociadas a roptrias de *B. bovis*. En la primera etapa (PCR₁) se emplearán los cebadores externos (5'-CACGAGGAAGGAACTACCGATGTTGA-3'; 5'-CCAAGGAGCTTCAACGTACGAGGTCA-3'), que amplifican un fragmento de 356 pb y en la segunda etapa (PCR₂) se emplearon los cebadores internos (5'-TCAACAAGGTA CTCTATATGGCTACC3'); (5'CTACCGAGCAGAACCTTCTTCACAT 3'), con los que se amplifica un fragmento de 291 pb.

Para la realización del nPCR para *B. bigemina* se utilizaron los cebadores descritos por Figueroa et al. 2013, con los que se amplifica un fragmento de ADN que codifica al gen rap1 de *B. bigemina* presente en las proteínas asociadas a roptrias. En la primera etapa (PCR₁) se emplearon los cebadores externos (5'- 'CATCTAATTTCTCTCCATACCCCTCC-3'); (5'- CCTCGGCTTCAACTCTGATGCCAAAG 3'), que amplifican un fragmento de 278 pb y en la segunda etapa (PCR₂) se emplearon los cebadores internos (5'- CGCAAGCCCAGCACGCCCCGGTGC-3'); (5' CCGACCTGGATAGGCTGTGTGATG3'), con los que se amplifica un fragmento de 170 pb.

Una vez transcurrido el tiempo antes señalado tomamos el gel de agarosa y lo llevamos al fotodocumentador ENDURO™ GDS TUOCH Labnet, para obtener la imagen que nos permitirá constatar la presencia de Babesia en las muestras.

3.2.15. Análisis estadístico

Una vez concluidos los análisis de laboratorio, los resultados se colocaron en cuadros, se calculó la prevalencia; se plantearon conjeturas y se realizó la prueba de Chi cuadrado y se comparó con su valor crítico para tomar decisiones.

4. RESULTADOS

4.1. PREVALENCIA DE *Babesia spp.*

4.1.1. Prevalencia Total

En el siguiente cuadro observamos la prevalencia total de *Babesia spp.*, del sector Este de la provincia de Zamora Chinchipe, diagnosticada mediante las técnicas Giemsa y Reacción en cadena de la polimerasa (nPCR).

Cuadro 13. Porcentaje de prevalencia total de *Babesia spp.*, del sector Este de la provincia de Zamora Chinchipe.

TÉCNICA	RESULTADOS				
	Muestras	Positivos	%	Negativos	%
Giemsa	95	28	29	67	71
nPCR	70	61	87	9	13

De 95 muestras analizadas, 28 (29 %) resultaron positivos a Giemsa, mientras que de 70 muestras analizadas 61 (87 %) resultaron positivos a la técnica de nPCR.

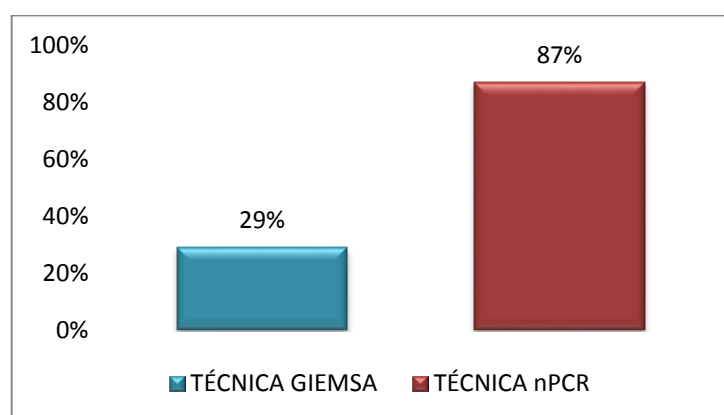


Figura 17. Porcentaje de prevalencia total de *Babesia spp.*, en el sector Este de la provincia de Zamora Chinchipe.

4.1.2. Prevalencia de *Babesia spp.*, en Bovinos de Acuerdo a los Cantones del Sector Este de la Provincia Zamora Chinchipe (%)

El siguiente cuadro detalla la prevalencia de *Babesia spp.*, por cantones del sector Este de la provincia de Zamora Chinchipe (Nangaritza y Paquisha).

Cuadro 14. Porcentaje de prevalencia de *Babesia spp.*, por cantones del sector Este de la provincia Zamora Chinchipe.

Cantones	Técnica de Diagnóstico									
	Giemsa			Npcr						
				Total			<i>B. bovis</i>		<i>B. bigemina</i>	
	Muestras	Positivas	%	Muestras	Positivas	%	Positivas	%	Positivas	%
NANGARITZA	66	18	27	49	42	86	29	59	33	67
PAQUISHA	29	10	34	21	19	90	11	52	19	90
TOTAL	95	28	29	70	61	87	40	57	52	74

Mediante la técnica de Giemsa, el cantón Nangaritza tiene una prevalencia del 27 % y el cantón Paquisha del 34 %. Mientras que por la técnica de nPCR el cantón Nangaritza tiene una prevalencia del 86 % y el cantón Paquisha del 90 %.

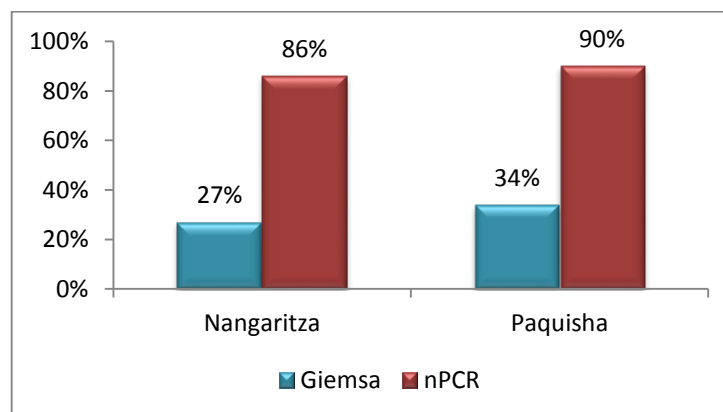


Figura 18. Porcentaje de prevalencia de *Babesia spp.*, por cantones del sector Este de la provincia de Zamora Chinchipe.

Asimismo cabe señalar que la prevalencia de *Babesia bovis* en el cantón Nangaritza es del 59 % y en el cantón Paquisha de 52 %; mientras que la prevalencia de *Babesia bigemina* en Nangaritza es de 67 % y en Paquisha del 90 %.

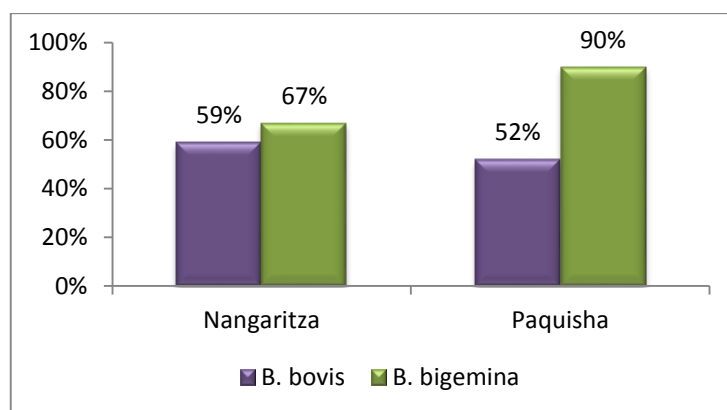


Figura 19. Porcentaje de prevalencia de *B. bovis* y *B. bigemina* por cantones del sector Este de la provincia de Zamora Chinchipe.

4.1.3. Prevalencia de *Babesia spp.*, por Edad en Bovinos del Sector Este de la Provincia Zamora Chinchipe (%)

En el siguiente cuadro se observa la prevalencia de *Babesia spp.*, en cuatro categorías de bovinos.

Cuadro 15. Prevalencia de *Babesia spp.*, por edad en bovinos del sector Este de la Provincia de Zamora Chinchipe (%).

Edad	Técnica de Diagnóstico									
	Giemsa			nPCR						
				Total			<i>B. bovis</i>		<i>B. bigemina</i>	
	Muestras	Positivas	%	Muestras	Positivas	%	Positivas	%	Positivas	%
< 1 Año	12	8	67	12	9	75	9	75	5	42
De 1 a 2 Años	22	5	23	18	17	94	13	72	14	78
De 3 a 4 Años	28	7	25	14	12	86	7	50	12	86
> De 4 Años	33	8	24	26	23	88	11	42	21	81
Total	95	28	29	70	61	87	40	57	52	74

Mediante la técnica de Giemsa los animales menores a un año tuvieron una prevalencia de 67 %; los animales comprendidos entre uno y dos años fueron prevalentes en un 23 %; los comprendidos entre tres y cuatro años tuvieron una prevalencia del 25 %; mientras que el grupo etario mayor a cuatro años presentó una prevalencia del 24 %. Por la técnica de nPCR los animales menores a un año tuvieron una prevalencia de 75 %; los animales comprendidos entre uno y dos años fueron prevalentes en un 94 %; los

comprendidos en tres y cuatro años tuvieron una prevalencia del 86 %; y el grupo etario mayor a cuatro años presentó una prevalencia del 88 %.

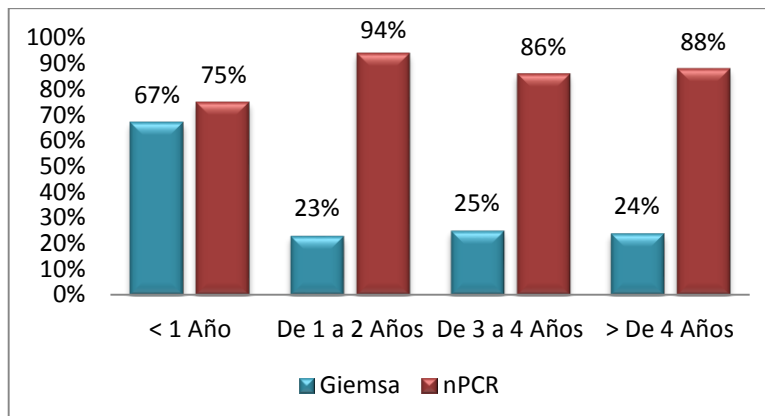


Figura 20. Prevalencia de *Babesia spp.*, por edad en el sector Este de la Provincia de Zamora Chinchipe (%).

La prevalencia de *Babesia bovis* en animales menores a un año fue del 75%; en animales comprendidos entre 1 a 2 años fue de 72%; en los animales entre 3 y 4 años fue del 50% y animales mayores a 4 años fue de 42%; mientras que la prevalencia de *Babesia bigemina* en animales menores a 4 años fue de 81%; los animales comprendidos entre 3 y 4 años fue de 86%; mientras que los animales entre 1 y 2 Años fue de 78% y en los animales menores a un año fue del 42%.

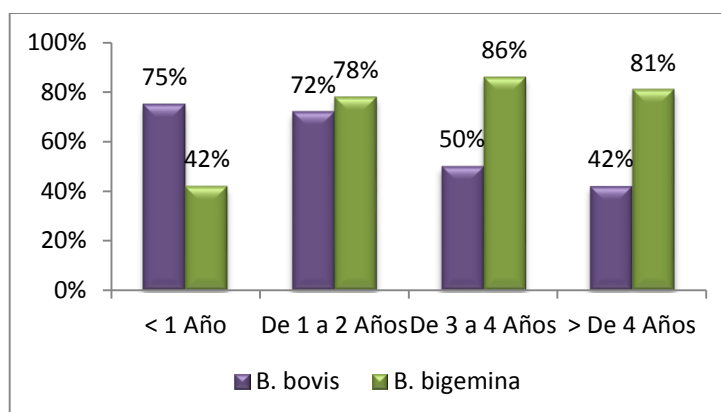


Figura 21. Prevalencia de *B. bovis* y *B. bigemina* por edad en el sector Este de la Provincia de Zamora Chinchipe (%).

4.1.4. Prevalencia de *Babesia spp.*, por Raza Bovina en el Sector Este de la Provincia Zamora Chinchipe (%)

En el siguiente cuadro se observa la prevalencia de *Babesia spp.*, en tres categorías de bovinos en cuanto a su raza.

Cuadro 16. Prevalencia de *Babesia spp.* por raza en el sector Este de la Provincia de Zamora Chinchipe (%).

Raza	Técnica de Diagnóstico									
	Giemsa			nPCR						
				Total			B. bovis		B. bigemina	
	Muestras	Positivas	%	Muestras	Positivas	%	Positivas	%	Positivas	%
Holstein	14	5	36	12	9	75	4	33	8	67
Charolais	12	2	17	9	7	78	5	56	6	67
Mestiza	69	21	30	49	45	92	31	63	38	76
Total	95	28	29	70	61	87	40	57	52	74

Mediante la técnica de Giemsa los animales de la raza Holstein tuvieron una prevalencia de 36 %, la raza Charolais manifestó una prevalencia de 17 %, y los animales Mestizos de un 30 %. Mientras que por la técnica de nPCR la raza Holstein mostró una prevalencia del 75%, el ganado Charolais tuvo una prevalencia de 78% y los animales mestizos indicaron una prevalencia del 92%.

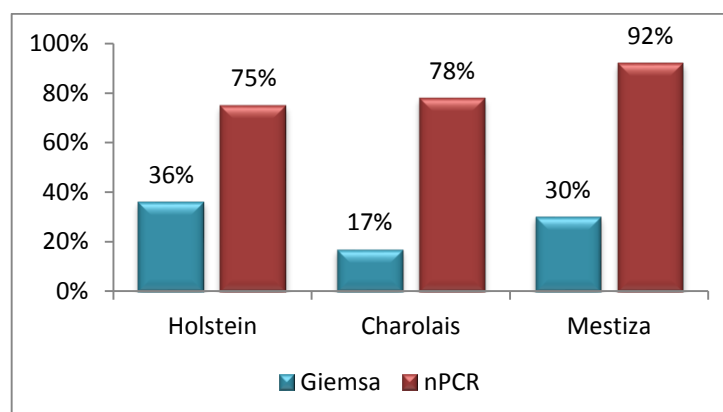


Figura 22. Prevalencia de *Babesia spp.*, por raza en el sector Este de la Provincia de Zamora Chinchipe (%).

La prevalencia de *Babesia bovis* en las razas: Holstein es del 33 %, en la raza Charolais es de 56 %, y en los animales Mestizos de un 63%. En cambio

la prevalencia de *Babesia bigemina* en la raza Holstein es de 67 %, en la raza Charolais indica el 67 % y en los animales mestizos presenta una prevalencia del 76 %.

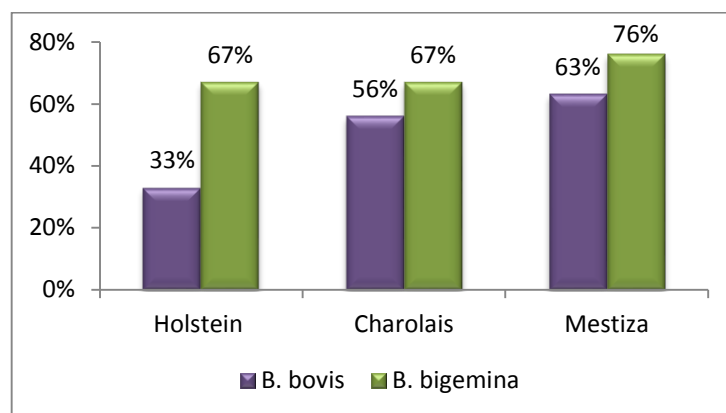


Figura 23. Prevalencia de *B. bovis* y *B. bigemina* por raza en el sector Este de la Provincia de Zamora Chinchipe.

4.1.5. Prevalencia de *Babesia spp.*, con Respecto al Sexo en Bovinos del Sector Este de la Provincia Zamora Chinchipe (%)

En el siguiente cuadro se observa el porcentaje de *Babesia spp.*, mediante las técnicas Giemsa y nPCR en animales con respecto al Sexo.

Cuadro 17. Prevalencia de *Babesia spp.*, por Sexo en el sector Este de la Provincia de Zamora Chinchipe (%).

Sexo	Técnica de Diagnóstico									
	Giemsa			nPCR						
				Total			<i>B. bovis</i>		<i>B. bigemina</i>	
	Muestras	Positivas	%	Muestras	Positivas	%	Positivas	%	Positivas	%
Machos	24	11	46	18	18	100	14	78	13	72
Hembras	71	17	24	52	43	83	26	50	39	75
Total	95	28	29	70	61	87	40	57	52	74

Con respecto a la técnica de Giemsa la prevalencia en los machos fue de 46 % mientras que la prevalencia en las hembras fue de 24 %. Mediante la técnica nPCR los machos indicaron una prevalencia del 100 % y las hembras fueron prevalentes en un 83 %.

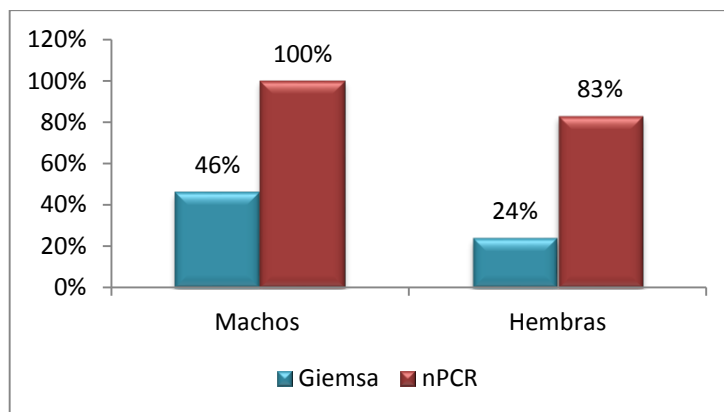


Figura 24. Prevalencia de *Babesia spp.*, por Sexo en bovinos del sector Este de la Provincia de Zamora Chinchipe (%).

La prevalencia de *Babesia bovis* en los machos fue de 78% y las hembras tuvieron una prevalencia de 50%. Mientras que a *Babesia bigemina* los machos fueron prevalentes en un 72% y las hembras tuvieron una prevalencia del 75%.

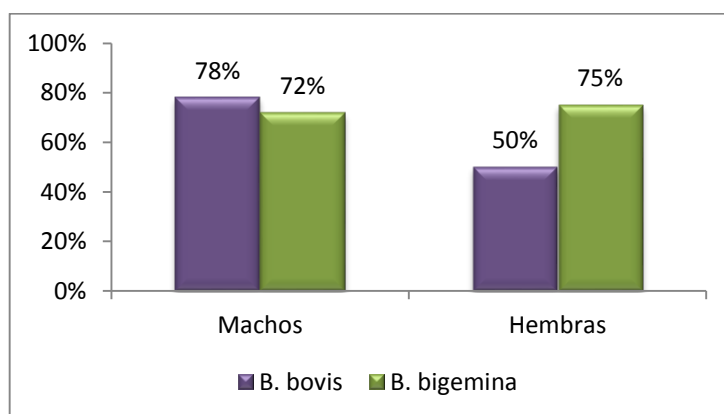


Figura 25. Prevalencia de *B. bovis* y *B. bigemina* por Sexo en bovinos del sector Este de la Provincia de Zamora Chinchipe (%).

4.1.6. COMPARACIÓN DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

En el presente cuadro se muestra las comparaciones que existen entre la técnica Giemsa y la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (nPCR), en el diagnóstico de *Babesia spp.*

Cuadro 18. Comparación de las dos pruebas diagnósticas Giemsa y nPCR (%).

Giemsa	nPCR	Total	%
(-)	(-)	5	9
(-)	(+)	36	62
(+)	(-)	4	7
(+)	(+)	13	22
TOTAL		58	100

Se observa que un 62 % de las muestras es negativo para Giemsa pero positivo para nPCR, el 7 % de las muestras es negativo para nPCR, pero positivo para Giemsa; concluyéndose que hay un 31 % de concordancia en el diagnóstico y un 69 % de discordancia diagnóstica.

4.2. GÉNEROS DE GARRAPATAS EXISTENTES

El 100% de las garrapatas encontradas en el sector Este de la provincia de Zamora Chinchipe pertenecen al género *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

4.3. ANÁLISIS EPIDEMIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD

Para este estudio, se realizó una encuesta a los ganaderos propietarios de las fincas de donde se obtuvo importante información sobre los factores epidemiológicos asociados a la presencia de *Babesia spp.*; cuyos resultados se exponen a continuación:

4.3.1. Composición de la Muestra de Acuerdo a la Edad

De 95 animales utilizados para esta investigación el 35 % fueron mayores a 4 años; el 13 % terneros; el 23 % de 1 a 2 años y el 29 % restante fueron de 3 a 4 años.

En la presente figura se detalla la composición de la muestra de acuerdo a la edad.

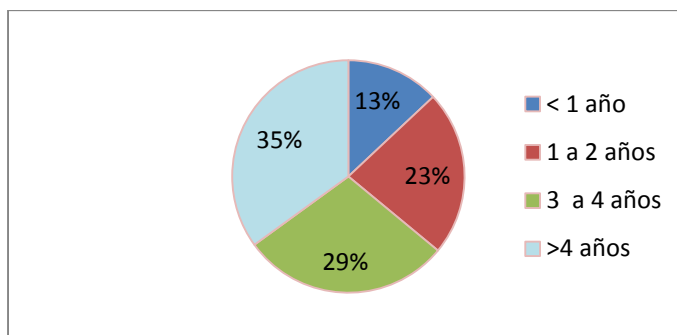


Figura 26. *Composición de la muestra de acuerdo a la edad (%)*

4.3.2. Composición de la Muestra de Acuerdo a la Raza

De 95 animales estudiados el 15 % fueron de la raza Holstein; el 13 % Charolais; y el 72 % fueron animales mestizos.

En la presente figura se detalla la composición de la muestra de acuerdo a la raza.

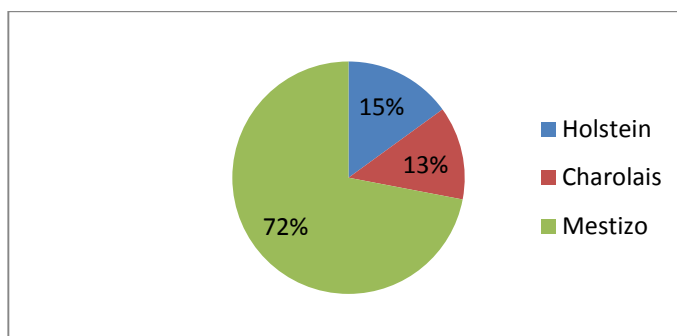


Figura 27. *Composición de la muestra de acuerdo a la Raza*

4.3.3. Composición de la Muestra de Acuerdo al Sexo

De los 95 animales examinados, el 75 % fueron hembras, mientras que el 25 % fueron machos.

En la presente figura se detalla la composición de la muestra de acuerdo al sexo.

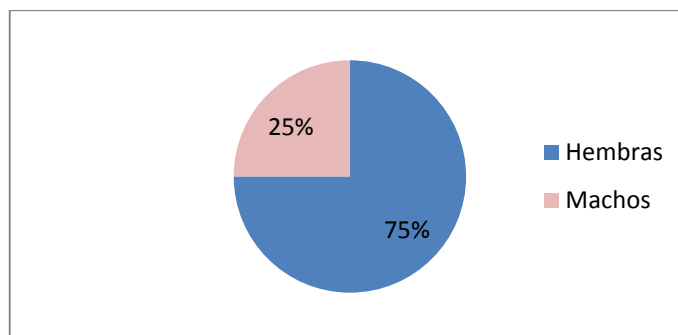


Figura 28. *Composición de la muestra de acuerdo al sexo*

4.3.4. Tipo de Explotación Ganadera

El sector Este de la provincia Zamora Chinchipe predomina la ganadería de doble propósito (90 %); mientras que la ganadería tipo leche representa el 5 %; y la de tipo carne representa el 5 % (figura 30).

En la presente figura se detalla el tipo de explotación ganadera en el sector Este de la provincia Zamora Chinchipe.

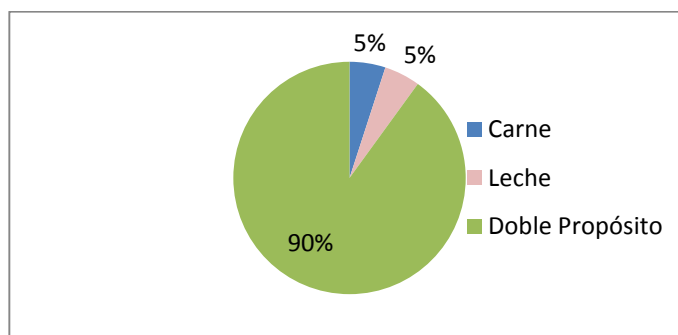


Figura 29. *Tipo de explotaciones ganaderas existentes en el sector Este de la provincia de Zamora Chinchipe.*

4.3.5. Procedencia del Ganado

La mayoría del ganado bovino del sector Este de la provincia Zamora Chinchipe procede de la misma finca (100 %), aunque hay también un considerable porcentaje que procede de fincas vecinas (50 %), y de otras provincias (30 %).

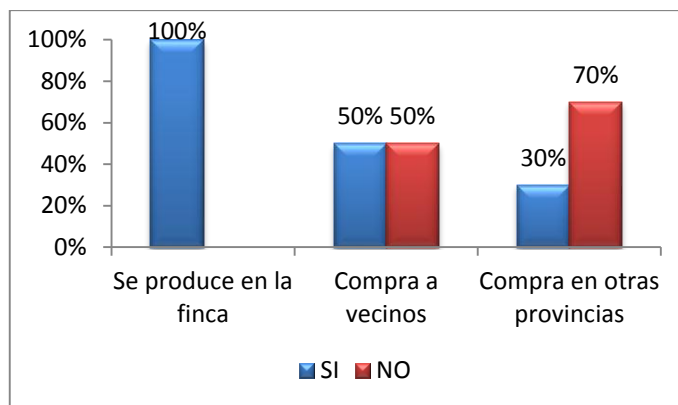


Figura 30. Procedencia del ganado bovino en el sector Este de la Provincia de Zamora Chinchipe (%).

4.3.6. Práctica de Cuarentena

El 100 % de las fincas encuestadas no realizan cuarentena de animales que ingresan por primera vez a las mismas.

4.3.7. Presencia de la Enfermedad

a. Conocimiento de la enfermedad

La mayoría de los ganaderos del sector Este de la provincia Zamora Chinchipe (81 %), tiene conocimiento de la Babesiosis bovina, piroplasmosis, tristeza bovina, fiebre de garrapatas, etc.

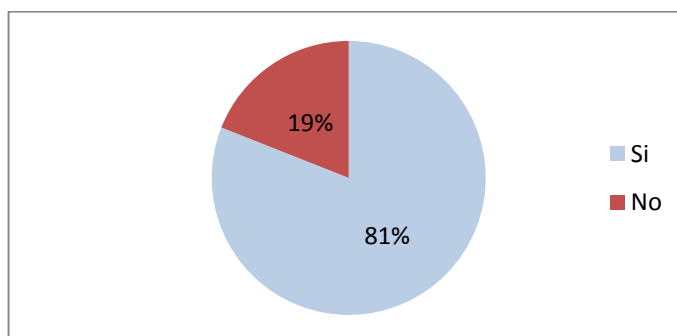


Figura 31. Ganaderos que conocen la Babesiosis bovina (%).

b. Presencia de la enfermedad

El 90 % de los ganaderos encuestados del sector Este de la provincia de Zamora Chinchipe aseguran tener la enfermedad en su finca.

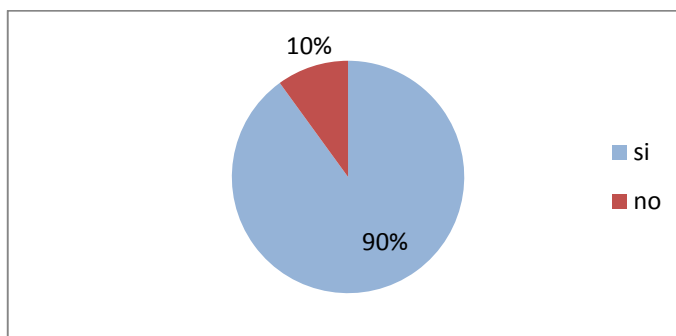


Figura 32. Presencia de la enfermedad en las fincas del Sector Este de la Provincia de Zamora Chinchipe (%)

c. Épocas del año en que aparece

De acuerdo a la información proporcionada por los ganaderos (figura 33), la enfermedad aparece con mayor frecuencia en verano (71 %); observándose también en bajo porcentaje durante el invierno (29 %).

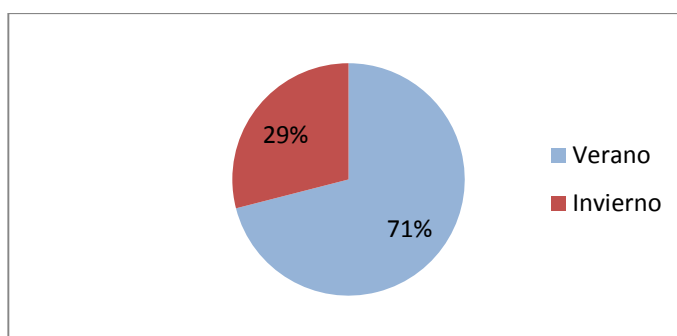


Figura 33. Épocas del año en que aparece la enfermedad en el sector Este de la provincia de Zamora Chinchipe (%).

d. Persistencia de la enfermedad

El 42 % de los ganaderos expresan que la enfermedad ha existido siempre; en el 24% hace 10 años; el 19 % manifiesta que ha existido desde hace 15

años, el 10 % indica que la enfermedad está presente desde hace 20 años; y, el 5 % de los ganaderos manifiesta que la enfermedad nunca se ha presentado.

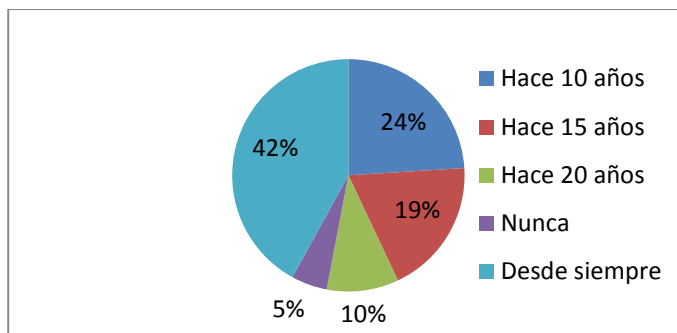


Figura 34. Existencia de Babesiosis en las fincas del sector Este de la Provincia de Zamora Chinchipe (%).

e. Síntomas que se presentan en la enfermedad

El 25 % de los ganaderos señala que el principal síntoma es la tristeza, el 19 % la fiebre, un 10 % manifiesta que hay postración; un 12 % también señala la orina con sangre; el 14 % indica como síntoma la renguera; el 12 % también señala la inapetencia, el 4 % ha observado diarrea y el 4 % estreñimiento (figura 35).

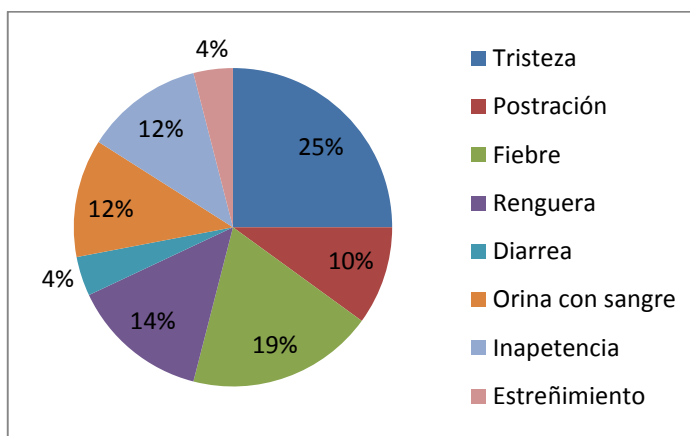


Figura 35. Síntomas que presentan los animales con la enfermedad (%).

4.4. DIAGNÓSTICO Y CONTROL DE LA ENFERMEDAD

a. Uso de servicios veterinarios

El 81 % de los ganaderos de la provincia utiliza los servicios profesionales veterinarios para el tratamiento y control de la enfermedad. Un elevado porcentaje (19 %), no utiliza estos servicios pese a la existencia de agencias de servicios agropecuarios (AGROCALIDAD), instaladas a lo largo y ancho de todo el país.

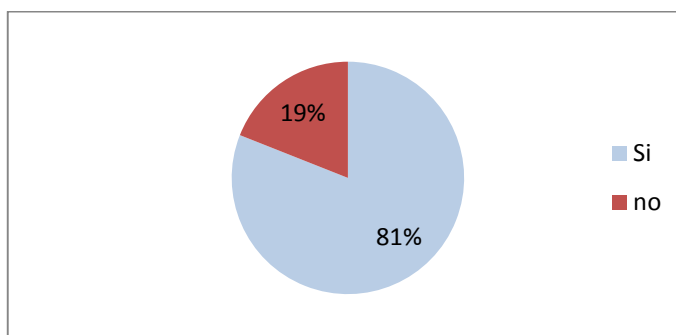


Figura 36. Ganaderos que usan servicios veterinarios para diagnosticar la enfermedad (%).

b. Toma de muestras para el diagnóstico

Ningún profesional que visita las fincas, toma muestras para el diagnóstico de laboratorio.

c. Edades en que enferman los animales

El 33 % de los ganaderos encuestados señalan que la enfermedad aparece con más frecuencia entre uno y dos años de edad; mientras que el 43 % manifiesta que enfermedad está presente antes del año; y el 24 % de los ganaderos indican que la enfermedad se presenta en animales de más de dos años de edad (figura 37).

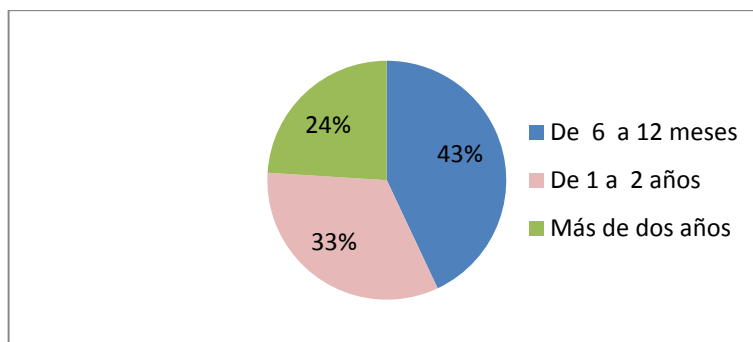


Figura 37. Edades más frecuentes en que enferman los animales (%).

d. Morbilidad anual

El 38 % de los ganaderos señala que la morbilidad alcanza entre 1 y 2 % de su población ganadera; mientras que el 43 % indica que enferman entre el 3 y 4 %; el 14 % manifiesta que la morbilidad alcanza valores superiores al 4 %; y, el 5 % informa que no se enferman los animales (figura 38).

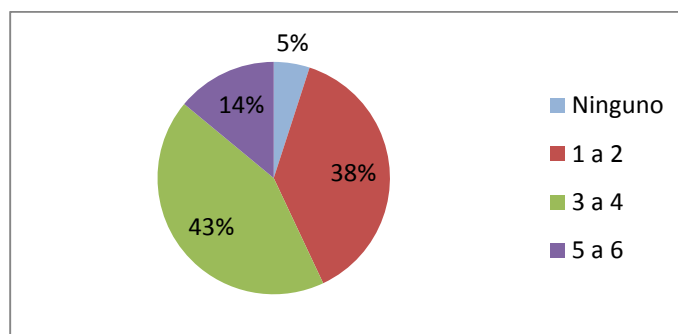


Figura 38. Morbilidad anual de Babesiosis en el sector Este de la Provincia de Zamora Chinchipe (%).

e. Mortalidad anual

El 19 % de los ganaderos no reporta mortalidad, mientras que 81 % indica que hay una mortalidad que va de 1 al 2% (figura 39).

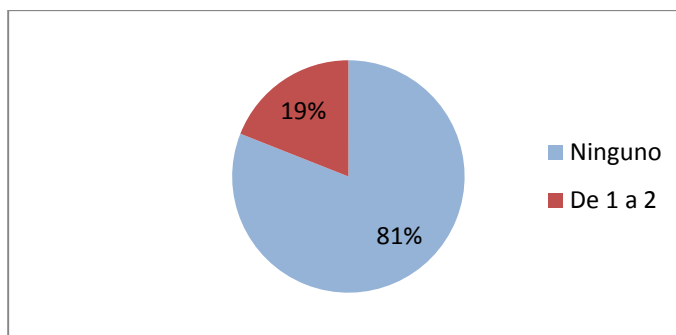


Figura 39. Mortalidad anual por Babesiosis en las fincas del sector Este de la Provincia de Zamora Chinchipe(%).

f. Reporte de la enfermedad en la finca

El 38 % de las fincas encuestadas, manifiesta que la enfermedad estuvo presente entre 6 meses a 1 año atrás; el 33 %, señala que la enfermedad estuvo presente hace más de 1 año; el 24 % indica que la enfermedad estuvo presente hace menos de 6 meses; y, el 5 % manifiesta que la enfermedad nunca ha estado presente en la finca.

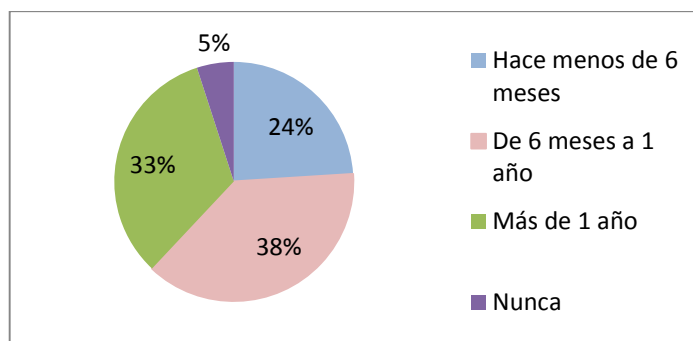


Figura 40. Reporte de la enfermedad en las fincas del sector Este de la Provincia de Zamora Chinchipe (%).

g. Control de la Enfermedad

El 14 % de los ganaderos encuestados usa para el tratamiento de la enfermedad Oxitetraciclina; el 24 %, utiliza combinaciones de Tetraciclinas + Diminazeno; el 29% utiliza Oxitetraciclina + Diminazeno; y el 33 %, utiliza Aceturato de Diminaceno (figura 41).

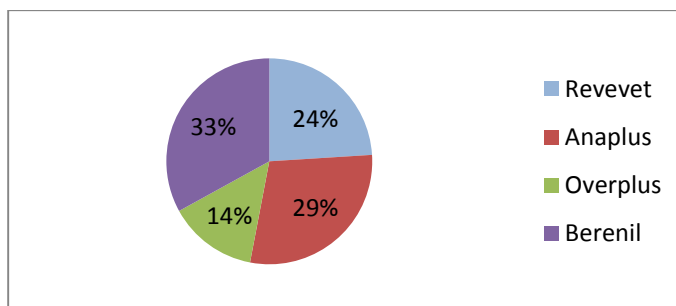


Figura 41. *Fármacos más comunes utilizados en el tratamiento de la Babesiosis en el sector Este de la provincia de Zamora Chinchipe (%).*

4.5. CONTROL DE GARRAPATAS

a. Presencia de garrapatas

Según el reporte de los ganaderos en el 100 % de las fincas estudiadas existe la presencia de garrapatas en su finca; lo cual convierte a este parásito en uno de los principales vectores de la enfermedad.

b. Grado de infestación

El 29 % de los ganaderos dice tener un grado alto de infestación, mientras que el 57 % señala que el grado de infestación es medio; y, el 14 % indica que la infestación por garrapatas es baja (figura 42).

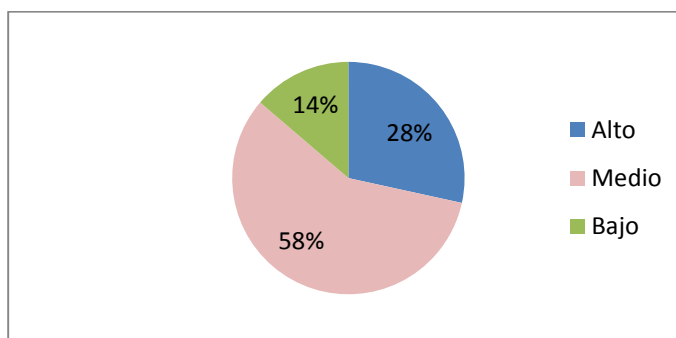


Figura 42. *Grado de infestación con garrapatas en las fincas del sector Este de la provincia de Zamora Chinchipe(%).*

c. Control de garrapatas

El 42 % de las ganaderías utiliza amitraz para el control de las garrapatas, el 24% hace uso de ivermectinas, el 24 % de las ganaderías utilizan

combinaciones de Diamidina + Amitraz; y el 10 %, usa organofosforados (figura 43).

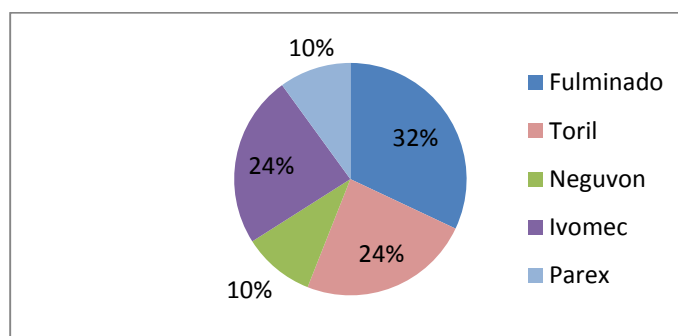


Figura 43. *Fármacos utilizados en el control de las garrapatas (%).*

d. Frecuencia del control

El 33 % de los ganaderos realiza el control cada 30 días; el 43 % lo practica cada 90 días; el 14 % lo hace cada 15 días; y, el 10 % manifiesta hacerlo cada 180 días; esto está relacionado directamente con el uso de productos como las avermectinas que son sustancias de aplicación parenteral con períodos de permanencia largos (figura 44).

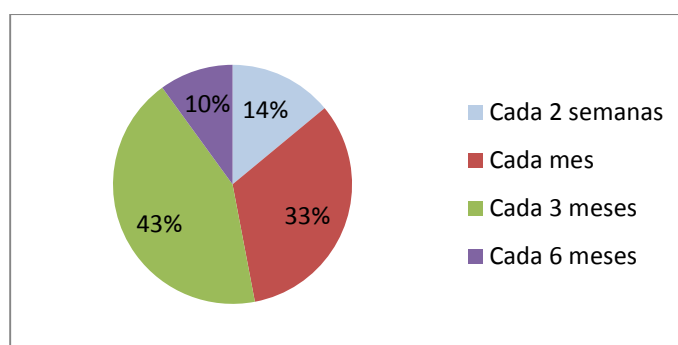


Figura 44. *Frecuencia de control de las garrapatas en las ganaderías del sector Este de la provincia de Zamora Chinchipe (%).*

e. Alternabilidad de productos

El 52 % de los ganaderos no realiza alternabilidad de productos, generando probablemente mecanismos de resistencia en las garrapatas, lo cual favorece indudablemente una elevada prevalencia de la enfermedad.

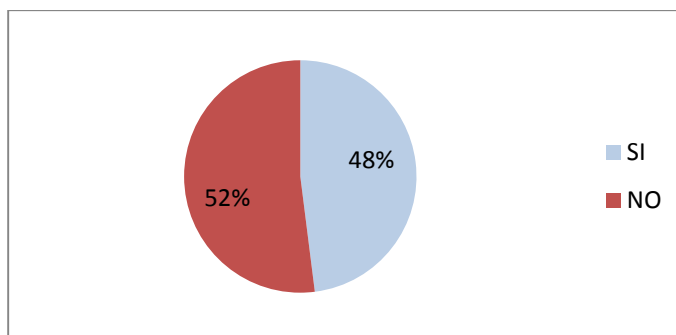


Figura 45. Alternabilidad de productos en el control de garrapatas (%).

4.6. SALUBRIDAD

a. Período de retiro de la leche

En la encuesta realizada el 62 % de los ganaderos realiza el retiro de la leche.

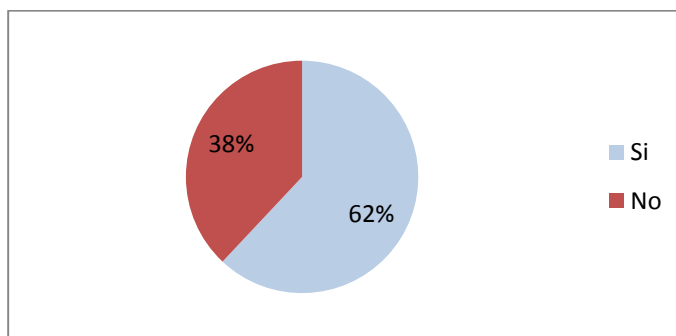


Figura 46. Retiro de la leche en las fincas del sector Este de la provincia de Zamora Chinchipe (%).

b. Consumo de carne

El 86% de los ganaderos encuestados no consume la carne de los animales tratados contra esta enfermedad.

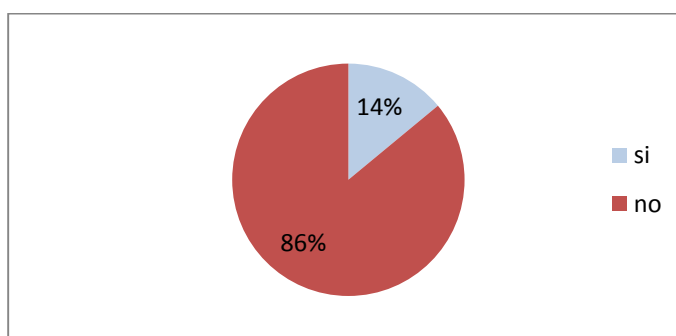


Figura 47. Consumo de carne de animales tratados y muertos con Babesiosis (%).

5. DISCUSIÓN

5.1. PREVALENCIA DE *Babesia spp.* EN EL SECTOR ESTE DE LA PROVINCIA DE ZAMORA CHINCHIPE

Mediante la coloración Giemsa se obtuvo una prevalencia de 29 %; mientras que por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (nPCR) se obtuvo una prevalencia del 87 %. Esto se debe a que si bien Giemsa es un método confiable y barato, solo detecta niveles de parasitemia de 0.1 a 0.2 % (Eriks et al., 1989); es decir niveles mayores a 10^6 eritrocitos infectados por mililitro de sangre (Gale y et al., 1996); en cambio PCR es un método molecular que está dirigido a la detección de ácidos nucleicos del parásito, con una alta sensibilidad (1000 veces más sensible que la microscopía, 1 parásito en 10^9 glóbulos rojos) y alta especificidad para varias especies de *Babesia* (Criado-Fornelio, 2007). Haciendo de esta una prueba muy segura en los diagnósticos de prevalencia de *Babesia spp.*; por lo tanto podemos decir con toda seguridad que la prevalencia de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en el sector Este de la provincia de Zamora Chinchipe es del 87 %, conforme lo determina la prueba de nPCR, con valores que van de 57 % para *B. bovis* y 74 % para *B. bigemina*.

Estos estudios concuerdan con lo descrito por Ramos, et al 1992; y, Figueroa et al 1993; en estudios realizados en México con bovinos pertenecientes a ranchos de zonas ganaderas previamente identificadas como regiones enzoóticas para hemoparásitos. De 421 muestras de sangre colectadas en Yucatán y analizadas por la prueba de PCR múltiple se determinó una tasa de prevalencia de 66.7% Y 60.1 % en bovinos infectados con *B. bigemina* y *B. bovis*, respectivamente. A partir de 963 muestras de sangre colectadas en el estado de Tabasco y analizadas por la prueba de PCR múltiple se determinó una tasa de infección de 32.7% y de 35.9% para *B. bigemina* y *B. bovis*, respectivamente (Álvarez, et al., 1993); mientras que en el estudio epidemiológico conducido en Campeche se determinó una tasa de infección con *B. bovis* y *B. bigemina* del 53.8% en muestras de sangre colectadas de 305 bovinos asintomáticos (Álvarez, et al., 1994).

Pazmiño 2011; determinó la presencia de *B. bovis* en el Camal del Distrito Metropolitano de Quito (CDMQ), detectando un 29,29% de muestras positivas a IFI y de 0,71% a frotis sanguíneo; siendo diferente a lo reportado por Hernández 2012; quien analiza la presencia de *Babesia bovis* en 350 muestras de sangre de 17 fincas de Santo Domingo de los Tsáchilas mediante frotis y PCR convencional sin detectar muestras positivas.

5.2. PREVALENCIA DE *Babesia spp.* POR CANTÓN

Mediante la técnica Giemsa, la prevalencia en los cantones Nangaritza es de 27 % y para el cantón Paquisha de 34 %. Mediante la técnica de nPCR la prevalencia del cantón Nangaritza es del 86 % donde *B. bovis* está presente en un 59 % y *B. bigemina* un 90 %; y, en el cantón Paquisha la prevalencia total es de 90 % donde *B. bovis* representa el 52 % y *B. bigemina* el 90 %. A la prueba estadística de X^2 , en cuanto a *Babesia spp.*, no se encuentra diferencia estadística entre cantones ($P>0,05$), pero al discriminar por especie, la presencia de *B. bigemina* si reporta diferencia en relación a *B. bovis*. Los animales estudiados del cantón Nangaritza se encontraban entre 837-1513 m.s.n.m., en relación al cantón Paquisha que estuvieron entre 809-900 m.s.n.m., esto nos indica que el clima y altitud influye en la presencia de la enfermedad, mientras la altura sea mayor sobre el nivel del mar, la enfermedad va desapareciendo ya que el vector no se adapta a estas condiciones; mientras la altitud sea menor encontraremos mayor frecuencia de la enfermedad.

En Colombia, la garrapata vector se encuentra ampliamente distribuida en altitudes inferiores a los 2.200 metros sobre el nivel del mar, y temperaturas que oscilan entre los 28 y 32°C, una humedad relativa entre 85 y 90% (Vizcaíno, 1980); sin embargo, existen reportes en la literatura que describen la presencia de babesiosis bovina en zonas ubicadas a mayor altitud sobre el nivel del mar, relacionada con el efecto del cambio climático al favorecer la adaptación de las garrapatas (Gómez, 2005 & Jonsson 2008).

5.3. PREVALENCIA DE *Babesia spp.* POR EDAD

En la presente investigación y para su mejor estudio dividimos a los animales en cuatro grupos y obtuvimos los siguientes resultados:

Mediante la técnica de Giemsa, los animales menores a 1 año presentan una prevalencia de 67 %; los comprendidos entre 1 y 2 años tuvieron una prevalencia de 23 %; el grupo de 3 a 4 Años indicó una prevalencia del 25 % y los mayores de 4 años indicaron una prevalencia del 24 %. Mediante la técnica de nPCR los animales menores a 1 año reportaron una prevalencia del 75 % los mismos que con *B. bovis* 75 % y con *B. bigemina* 42 %; de 1 a 2 Años son prevalentes el 94 % positivos los cuales tienen *B. bovis* el 72 % y *B. bigemina* el 78 %; de 3 a 4 Años son el 86% prevalentes, los cuales tienen *B. bovis* el 50% y *B. bigemina* el 86 % ; y mayores de 4 años indican una prevalencia de 88 %, los mismos que muestran *B. bovis* 42 % y *B. bigemina* 81 %. A la prueba estadística de X^2 , en cuanto a *Babesia spp.*, no se encuentra diferencia estadística en edad ($P>0,05$), pero al diferenciar por especie, la presencia de *B. bigemina* si reporta diferencia en relación a *B. bovis*.

Uilenberg G., 1995; menciona que los animales jóvenes son más resistentes en comparación con los de mayor edad, o bien puede ser que sean susceptibles a la infección pero la presentación de la enfermedad sea menos grave, lo cual corresponde con mayores tasas de mortalidad y pérdidas económicas en función al incremento en la edad del animal. Esta resistencia o tolerancia a la infección en los animales jóvenes depende principalmente de la inmunidad materna. En el caso de la babesiosis causada por *B. bovis* y *B. bigemina*, el período atribuible a la protección pasiva es en promedio de nueve meses, a partir de los cuales comienza a disminuir de manera gradual.

5.4. PREVALENCIA DE *Babesia spp.* POR RAZA

En los bovinos estudiados del sector Este de la provincia Zamora Chinchipe, mediante la técnica de Giemsa la raza Holstein tiene una prevalencia del 36 %,

Charolais con 17 %, y Mestiza con 30 %. De acuerdo a la técnica nPCR los animales de la raza Holstein tuvieron una prevalencia del 75 % en la cual hay 33% *B. bovis* y 67 % *B. bigemina*, Charolais con 78 % en la cual *B. bovis* representa 56 % y *B. bigemina* 67 %, y Mestiza con 92 % en la cual existe *B. bovis* en un 63 % y *B. bigemina* con un 76 %. A la prueba estadística de X^2 , en cuanto a *Babesia spp.*, no se encuentra diferencia estadística entre razas ($P>0,05$), al distinguir por especie no se reporta diferencia alguna entre *B. bovis* y *B. bigemina*.

De acuerdo con Guglielmone, 1992; la raza es un factor importante en la infección con hemoparásitos; los bovinos dedicados a la explotación de leche y sus cruces son más susceptibles que las razas tipo carne, debido a una mayor susceptibilidad de animales con genes lecheros a las garrapatas, vectores y al parásito.

Las razas cebuínas tienen menor cantidad de garrapatas, por tanto reducen las posibilidades de infección; sin embargo en las mismas condiciones son igualmente susceptibles (Mora, 1993). Sin embargo Córdoba, 2008; en Venezuela, encontró una mayor frecuencia hemoparasitaria en los animales de sistema de explotación doble propósito, seguida de los animales tipo carne, y por último, los animales tipo leche.

5.5. PREVALENCIA DE *Babesia spp.* POR SEXO

Mediante la técnica de Giemsa los machos tuvieron una prevalencia de 46% mientras que las hembras 24%. Por nPCR Los machos tuvieron una prevalencia con el 100% lo cual encierra el 78% para *B. bovis* y 72% para *B. bigemina*, mientras que las hembras indicaron una prevalencia de un 83% el cual para *B. bovis* representa 50% y *B. bigemina* 75%. A la prueba estadística de X^2 , en cuanto a *Babesia spp.*, no se encuentra diferencia estadística entre sexo ($P>0,05$), pero al diferenciar por especie, la presencia de *B. bovis* si reporta diferencia en relación a *B. bigemina*.

Al respecto Alfaro et al, 1998; señalan que en los animales machos y hembras,

no se observan diferencias significativas entre los valores de prevalencia.

El sexo está ligado a un estado fisiológico productivo, las vacas en producción láctea tienen mayor número de garrapatas que las secas y el stress del parto reduce las defensas del organismo, facilitando la infección o la recaída (Mora, 1993).

5.6. GÉNEROS DE GARRAPATAS EXISTENTES

Se determinó mediante la clasificación taxonómica de garrapatas que en las fincas estudiadas del sector Este de la provincia de Zamora Chinchipe, el 100% de garrapatas pertenece al género *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Este dato concuerda con lo reportado por Chamba J., 2011; quien en el cantón Centinela del Cóndor también encontró un 100 % del género *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Los animales en el sector Este de la provincia Zamora Chinchipe todo el tiempo se encuentran infestados de garrapatas, que encuentran un hábitat ideal dadas las condiciones edafoclimáticas que garantizan su evolución durante todas las épocas del año (Alfaro et al., 1998).

5.7. FACTORES ASOCIADOS A LA PRESENCIA DE *Babesia spp.*

El sector Este de la provincia Zamora Chinchipe pese a poseer un clima tropical que favorece la producción de carne, predomina la ganadería de doble propósito (90 %); mientras que la ganadería tipo leche representa el 5 %; y la de tipo carne representa el 5 %. La mayoría de los ganaderos indican que sus animales proceden de la misma finca (100 %), aunque hay también un considerable porcentaje que dice que sus animales proceden de fincas vecinas (50 %), y de otras provincias (30 %).

El 100 % de las fincas encuestadas no realizan cuarentena de animales que ingresan por primera vez a las mismas. Camargo y et al, (1974), señalan que la babesiosis y anaplasmosis son enfermedades de fuerte impacto que se constituyen en un grande problema para el asentamiento del ganado

proveniente de otras latitudes, y que es requerido ejecutar trabajos de cuarentena tendientes a su control.

La mayoría de los ganaderos (81 %), tiene conocimiento de la Babesiosis bovina, piroplasmosis, tristeza bovina, fiebre; el 90 % de los ganaderos encuestados aseguran tener la enfermedad en su finca, hecho que ha sido corroborado por diagnósticos realizados en frotis sanguíneo teñido por Giemsa en algunos cantones de la provincia de Zamora Chinchipe (Chamba J.,2011), cuya prevalencia ha sido elevada. Este hecho predispone al ganadero a realizar actividades preventivas y curativas de la misma, aunque con poca asistencia profesional, conforme se lo señala más adelante en las medidas de control y tratamiento de la enfermedad.

De acuerdo a la información proporcionada por los ganaderos la enfermedad aparece con mayor frecuencia en verano (71 %); observándose también en bajo porcentaje durante el invierno (29 %). García y col. (1992), señala que los aspectos eco-epidemiológicos, donde se ha observado que a pesar de existir condiciones adversas para el desarrollo de los vectores, su número aumenta en esta época de mínima precipitación, debido a la disminución de la inmunidad de los bovinos que se hace evidente como consecuencia de los factores ambientales y nutricionales de esta época del año, lo que conlleva al resurgimiento del proceso infeccioso en los animales. Por lo tanto, la época del año es un factor importante dentro de la prevalencia de la enfermedad.

El 25 % de los ganaderos señala que el principal síntoma es la tristeza, el 19 % la fiebre, un 10 % manifiesta que hay postración; un 12 % también señala la orina con sangre; el 14 % indica como síntoma la renguera; el 12 % también señala la inapetencia, el 4 % ha observado diarrea y el 4 % estreñimiento. León (1991), al hacer una descripción de la enfermedad, señala que durante la fase aguda, los síntomas clínicos más significantes son: fiebre, anemia, aislamiento del animal, debilidad, disminución de la producción, pérdida de apetito, deshidratación, respiración dificultosa, constipación, temblor muscular e ictericia en los casos muy avanzados. Las vacas enfermas con preñez avanzada, frecuentemente abortan. Estos síntomas coinciden plenamente con

los reportados por los ganaderos de Zamora Chinchipe. Olgúin (2013), añade que los valores de la temperatura están en 41,5 °C, a más de la frecuencia cardíaca elevada y la bilirrubinemia.

El 81 % de los ganaderos de la provincia utiliza los servicios profesionales veterinarios para el tratamiento y control de la enfermedad. Un elevado porcentaje (19 %), no utiliza estos servicios pese a la existencia de agencias de servicios agropecuarios (AGROCALIDAD), instaladas a lo largo y ancho de todo el país.

No cabe duda de que la sanidad animal constituye un elemento crítico que tiene una gran repercusión en el estado sanitario y de bienestar de los animales. Hoy día como complemento a la pericia del profesional veterinario, existe en el mercado una amplia gama de productos que contribuyen a mantener un buen estado de salud de los animales, primero con el diagnóstico precoz de las enfermedades, pasando por la prevención de las mismas y si ésta no ha sido posible, con el tratamiento adecuado (VETMASI,2013). Ningún profesional que visita las fincas, toma muestras para el diagnóstico de laboratorio. El 33 % de los ganaderos encuestados señalan que la enfermedad aparece con más frecuencia entre uno y dos años de edad; mientras que el 43 % manifiesta que enfermedad está presente antes del año; y el 24 % de los ganaderos indican que la enfermedad se presenta en animales de más de dos años de edad.

Rhades (2005); manifiesta que todos los bovinos, independientemente de la edad, se enferman de tristeza. Los animales jóvenes son más resistentes, pero por causas estresantes ligadas al manejo, deficiencias nutricionales, enfermedades, excesiva carga de garrapatas, pueden contraer la enfermedad. Animales jóvenes, entre 6 y 9 meses de edad, ya no poseen la resistencia conferida por el calostro y son propensos a la infección; ya que un animal infectado no presenta signos clínicos al inicio de la infección o solo cuando más del 15 % de sus eritrocitos han sido invadidos por la rickettsia (Sierra, 2013).

El 38 % de los ganaderos señala que la morbilidad alcanza entre 1 y 2 % de su población ganadera; mientras que el 43 % indica que enferman entre el 3 y 4 %;

el 14 % manifiesta que la morbilidad alcanza valores superiores al 4 %; y, el 5 % informa que no se enferman los animales. Olguín (2013), señala que en la Babesiosis la morbilidad es alta y la mortalidad depende de la receptividad y susceptibilidad del ganado y puede ser de hasta el 30 %. De acuerdo al presente reporte, estos índices son bajos, dando a entender que la estabilidad enzoótica de la enfermedad, ejerce un control natural de la misma, reduciendo significativamente los casos de Babesiosis clínica en el ganado del sector. El cuadro clínico agudo ocurre únicamente en animales adultos susceptibles cuando se transportan a regiones endémicas (Sierra, 2013). En sistemas intensivos de áreas no endémicas (Rossanigo y col, 2000), encontraron valores de 2,5 % de morbilidad y una mortalidad del 0,8 %.

El 19 % de los ganaderos no reporta mortalidad, mientras que 81 % indica que hay una mortalidad que va de 1 al 2%. Quiroz (1990), señala que la frecuencia, incidencia, prevalencia, de la morbilidad y mortalidad varían de acuerdo con la edad. En general los becerros muestran mayor grado de resistencia que los adultos y que algunas veces se presentan brotes en animales jóvenes; manifiesta que en general, se considera a las razas europeas más susceptibles que las cebuínas, debido al hecho de que éstas tienen menor cantidad de garrapatas y por tanto, reducen las posibilidades de infección; sin embargo, en las mismas condiciones, son igualmente susceptibles.

El 38 % de las fincas encuestadas, manifiesta que la enfermedad estuvo presente entre 6 meses a 1 año atrás; el 33 %, señala que la enfermedad estuvo presente hace más de 1 año; el 24 % indica que la enfermedad estuvo presente hace menos de 6 meses; y, el 5 % manifiesta que la enfermedad nunca ha estado presente en la finca.

El 100 % de los ganaderos dice no aplicar ningún tipo de vacuna, lo cual favorece el estudio de la enfermedad y permite un diagnóstico más efectivo de la misma. El sector Este de la provincia de Zamora Chinchipe al ser una zona bastante aislada de la influencia del comercio de productos biológicos especialmente de origen colombiano, no se ha logrado introducir hasta el momento ningún tipo de vacuna comercial para la prevención de la

enfermedad. Olgúin (2013), manifiesta que las vacunas utilizadas de manera adecuada y tomando las medidas de precaución debidas, pueden llegar a ser una opción.

La existencia de inmunidad previa, la velocidad de transmisión y la edad a la que ocurre el primer contacto con el parásito (primoinfección), determinan el efecto clínico que causa este contacto entre el huésped y el parásito (Sierra, 2013).

El 14 % de los ganaderos encuestados usa para el tratamiento de la enfermedad Oxitetraciclina; el 24 %, utiliza combinaciones de Tetraciclinas + Diminazeno; el 29% utiliza Oxitetraciclina + Diminazeno; y el 33 %, utiliza Aceturato de Diminaceno. Los tratamientos más eficaces se han logrado con tetraciclinas a dosis de 10 mg/kg de peso de 1 a 3 días; siendo el Imidocarb otra droga de utilidad para el tratamiento de la infección a dosis de 2,5 a 3,5 mg/kg de peso (Sierra, 2013); sin embargo, Olgúin (2013), señala que la dosis de tetraciclina debe ser de 20 mg/kg de peso de 2 a 3 días, incluyendo cardiotónicos y transfusiones sanguíneas en anemias intensas. Según el reporte de los ganaderos en el 100 % de las fincas estudiadas existe la presencia de garrapatas en su finca; lo cual convierte a este parásito en uno de los principales vectores de la enfermedad. Las condiciones ecológicas del trópico sudamericano proveen un hábitat adecuado para la multiplicación de artrópodos vectores (garrapatas, moscas, tábanos y mosquitos) de una serie de enfermedades tropicales, dentro de las cuales está la Babesiosis (Benavides, 2008). Las garrapatas son parásitos hematófagos que se fijan firmemente al hospedero, son altamente resistentes al ambiente, relativamente libres de enemigos naturales, con poca especificidad en cuanto a hospederos y alto potencial biótico; cuya capacidad de vector patógeno se conoció recién afines del siglo XIX, cuando se descubrió que ellas transmitían la babesiosis al ganado vacuno (Del Río y et al, 2010). De las estimadas 1,000 millones de cabezas de ganado vacuno en el mundo, entre 70 y 80 % vive en países tropicales y subtropicales en los que la garrapata es activa durante todo el año. La pérdida de peso de un bovino parasitado por garrapatas *Boophilus spp.*, se calcula en 0.26 kg/garrapata/año y por *Amblyomma spp.*, hasta 1.09 kg/garrapata/ año; esto ocasiona pérdidas de varios miles de millones de

dólares en la economía pecuaria mundial (Hernández, 2013).

El grado de infestación se determinó en base a la encuesta y a la observación directa del ganado por parte del encuestador; asumiendo los tres niveles que se remiten en los resultados (Álvarez y Hernández, 2010).

El 29 % de los ganaderos dice tener un grado alto de infestación, mientras que el 57 % señala que el grado de infestación es medio; y, el 14 % indica que la infestación por garrapatas es baja. Este reporte permite considerar al grado de infestación como un factor determinante en la elevada prevalencia de Babesiosis bovina en el sector Este de la provincia Zamora Chinchipe.

El 42 % de las ganaderías utiliza amitraz para el control de las garrapatas, el 24% hace uso de ivermectinas, el 24 % de las ganaderías utilizan combinaciones de Diamidina + Amitraz; y el 10 %, usa organofosforados. Como puede observarse, todos los ganaderos encuestados realizan control químico de la garrapata en el sector Este de la provincia Zamora de Chinchipe, utilizando diferentes principios activos pertenecientes a grupos de sustancias con efecto acaricida entre los que destacan las amidinas, piretroides, organofosforados y avermectinas con efecto endectocida. El método más utilizado para la aplicación de estos productos a excepción de la avermectinas, es el baño por aspersión, utilizando bomba mochila. Rodríguez y col. (2006), señala que el método más eficiente para el control de garrapatas es la utilización de productos químicos a una frecuencia de tratamientos variables dependiendo del nivel de infestación de los animales. El 33 % de los ganaderos realiza el control cada 30 días; el 43 % lo practica cada 90 días; el 14 % lo hace cada 15 días; y, el 10 % manifiesta hacerlo cada 180 días; esto está relacionado directamente con el uso de productos como las avermectinas que son sustancias de aplicación parenteral con períodos de permanencia largos

Al ser la región amazónica ideal para la reproducción de la garrapata, los controles deben realizarse con determinada frecuencia y asociados a sustancias fijadoras para evitar el lavado con la lluvia. Esta actividad laboriosa ha cambiado drásticamente desde el apareamiento de la avermectinas, que

las aplican generalmente en lapsos de 90 días. Los tratamientos contra *Boophilus spp.*, se realizan a intervalos de 14 a 21 días y contra *Amblyomma spp.*, cada 7 a 10 días en las épocas de alta infestación (Hernández, 2013).

Actualmente, la concepción del enfoque de control de garrapatas ha cambiado. Con el propósito de retardar el problema de resistencia a los garrapaticidas, es necesario desestimular la recomendación de aquellas estrategias de control que promuevan la extrema reducción de las poblaciones de garrapatas en el hospedero y el “refugio” (garrapatas que se encuentran en el ambiente que no han recibido tratamiento con garrapaticidas) a través de tratamiento sistemático del garrapaticida. Se ha demostrado que los ranchos que utilizan garrapaticidas para el control de garrapatas más de 6 veces al año tienen más probabilidad esta población de garrapatas de generar resistencia (Rodríguez y et al., 2006).

El 52 % de los ganaderos no realiza alternabilidad de productos, generando probablemente mecanismos de resistencia en las garrapatas, lo cual favorece indudablemente una elevada prevalencia de la enfermedad. Cuando la resistencia está presente no tiene sentido seguir utilizando la misma droga e incluso el mismo grupo químico en el caso de los piretroides y amidinas; sin embargo, en el caso de los organofosforados, puede existir resistencia al diazinón y las garrapatas pueden ser controladas por un corto período mediante el uso de coumafos, clorfenvinfos o clorpirifos (Rodríguez y et al., 2006).

6. CONCLUSIONES

- Existe una elevada prevalencia de Babesiosis bovina en el sector Este de la provincia de Zamora Chinchipe (87 %) debido a la presencia de *Babesia bovis* (57 %) y *Babesia bigemina* (74 %).
- La técnica PCR es una de las más precisas, sensibles y confiables al momento de la detección de la enfermedad.
- La utilización de la técnica Giemsa puede ser efectivo en el momento óptimo de la presencia de la enfermedad, de lo contrario puede originar falsos positivos ya que los animales pueden ser portadores asintomáticos.
- Los animales menores a un año son más resistentes a Babesiosis por su elevado número de anticuerpos que recibe de la leche materna, los animales mayores a un año son más sensibles a la enfermedad.
- La raza es un factor importante en la infestación con hemoparásito, ya que los bovinos destinados a la explotación de leche, por su producción y por los partos se producen situaciones de estrés y bajan sus defensas.
- El sexo más sensible a la enfermedad son las hembras bovinas ya que está ligado a un estado fisiológico productivo que reduce las defensas del organismo, facilitando la infección de Babesiosis.
- En todas las fincas ganaderas del sector Este de la provincia de Zamora Chinchipe existe un 100 % de infestación con garrapatas del género *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.
- La época de mayor prevalencia de *Babesia spp.* es en verano ya que por la baja precipitación y el estrés en los animales bajan sus defensas.

7. RECOMENDACIONES

- Deben establecerse medidas de control más efectivas de la enfermedad, especialmente en ganado bovino lechero, en donde indiscriminadamente se utilizan sustancias endectocidas, sin respetarse el tiempo de retiro.
- En las ganaderías bovinas del sector Este de la provincia de Zamora Chinchipe, debe implementarse medidas de bioseguridad, que contemplen el control de vectores y los medios mecánicos de transmisión como son el uso de agujas hipodérmicas no esterilizadas de un animal a otro, o cualquier otro fómite que se convierta en un medio de transmisión.
- La continua toma de muestras por parte del Médico Veterinario del sector, ayuda para la identificación de posibles problemas presentes en el hato ganadero.

8. BIBLIOGRAFIA

ALFARO C; GARCÍA F; TORO M; VALLE A; Prevalencia de Anaplasmosis Bovina de acuerdo a factores intrínsecos del hospedador en bovinos del Estado Monagas. Memorias VIII Congreso Venezolano de Zootecnia. San Juan de los Morros, Venezuela. 1998.

ALMERIA S., CASTELLA J., FERRER D. (2002). Reverse line blot hybridization used to identify hemoprotozoa in Minorcan cattle. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 969, 78-82.

ÁLVAREZ, J .A., FIGUEROA, J. V., RAMOS, J .A., VEGA, CA., BUENING, G.M.: Epidemiological survey of cattle babesiosis in Tabasco México. Resúmenes "74th Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Disease". Chicago, Illinois. Noviembre, 8-9, pp. 75, 1993.

ÁLVAREZ, J.A., RAMOS, J .A., FIGUEROA, J. V., MOSQUEDA, J J., VEGA, CA., Buening, G.M.: Descriptive epidemiology of anaplasmosis and babesiosis in cattle farms from Campeche México. Resúmenes "75th Annual Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Disease". Chicago, Ill. Nov., 14-15, pp. 56, 1994.

BARROS-Battesti, D.M.; ARZUA, M.; BECHARA, G.H. Garrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: Vox/ICTTD/Butantan, 2006. 223p.

BENAVIDES E.; Consideraciones sobre epidemiología de Anaplasmosis y babesiosis de los bovinos, efecto de la estabilidad enzoótica de los hatos, 2008; disponible en: <http://www.slideshare.net/EVBenavides/epidemiologia-anaplasmosis-y-babesiosis>

BOSE R., JORGENSEN W.K., DALGLIESH R.J., FRIENDHOFF K.T. & DEVOS A.J. (1995). Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Vet. Parasitol.*, 57, 61–74

BOERO J. J. 1957. Las garrapatas de la República Argentina (Acarina: Ixodoidea). Buenos Aires: Eudeba.

BOERO, J. 1976. Parasitosis de Animales. Piroplasmosis, Anaplasmosis. 4 ed. Universitaria .Buenos Aires, Argentina. pp. 201 - 236

BLOOD, D.C.; HENDERSON, J.A.; RADOSTITS, O.M. 1986. Medicina Veterinaria. 6 ed. Interamericana. México, D.F. pp. 1038 – 1067

BOCK R.E., DE VOS A.J. & MOLLOY J.B. (2006). Tick-borne diseases. In: Australian New Zealand Standard Diagnostic Procedures, Faragher J.T., ed. Subcommittee on Animal Health Laboratory Standards http://www.scahls.org.au/___data/assets/pdf_file/0008/1280852/tick_borne_diseases.pdf.

BOSE R., JORGENSEN W.K., DALGLIESH R.J., FRIENDHOFF K.T. & DE VOS A.J. (1995). Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Vet. Parasitol.*, 57, 61–74.

BRAYTON K, LAU A, HERNDON D, et al. (2007). Genome Sequence of *Babesia bovis* and Comparative Analysis of Apicomplexan Hemoprotozoa. *PLoS Pathog* 3(10): e148. doi:10.1371/journal.ppat.0030148

BULING A., CRIADO-FORNELIO A., ASENZO G., BENITEZ D., BARBACARRETERO J.C. & FLORIN-CHRISTENSEN M. (2007). A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Vet. Parasitol.*, 147, 16–25.

BURRIDGE M., KIMBER C., MCHARDY N. (1973). Detection of antibodies to *Babesia bigemina* in dried blood samples using the indirect fluorescent antibody test. *Annals of tropical medicine and parasitology*, 67, (2), 191-195.

BUTLER C., NIJHOF A., VAN DER KOLK. (2008). Repeated high dose imidocarb dipropionate treatment did not eliminate *Babesia caballi* from naturally infected horses as determined by PCR-reverse line blot hybridization. *Veterinary parasitology*, 151, (2-4), 320-322.

CAMARGO A., SERRATE H., Y SAAVEDRA A.. II Reunión Nacional de Investigadores en Ganadería, Bolivia, 1974; pág. 147

CAMILO, J. ANCIZAR, M. 2010. Garrapatas Amblyomma. (en línea). Huila, CO. Tecnólogo en producción pecuaria ecológico. Consultado 28 set. 2013. pdf. Disponible en: <http://pecuariaecologica7305.blogspot.com/2010/03/garrapatas-amblyomma.html>

CARRIQUE, J.; RIBERA, H. 2000. Manual Práctico sobre Garrapatas y Enfermedades transmitidas por Garrapatas. LIDIVET. Santa Cruz, Bolivia. pp. 1 - 36.

Centro para la Seguridad Alimentaria y la Salud Pública (CFSPH), 2008. Bovine Babesiosis. Food Security and Public Health. Institute for Internal Cooperation in Animal Biologics. Recuperado el 15 de diciembre de 2011. Disponible en: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/bovine_babesiosis.pdf

CHAMBA J., Estudio de los ectoparásitos en el ganado bovino del cantón Centinela del Cóndor de la provincia de Zamora Chinchipe; 2011; Tesis de Grado, Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Loja.

CHAPMAN & HALL, (1997) Ixodes, In Veterinary Entomology: Arthropod Ectoparasites of Veterinary Importance. Edited by R. Wall and D. Shearer. London, pp. 117–20.

CORDERO DEL CAMPILLO, M. (1999). Parasitología veterinaria. Madrid [etc.]: McGraw-Hill.

CORDERO DEL CAMPILLO, M.; ETAL. Parasitología Veterinaria. España : McGraw-Hill Interamericana De España, S.A.U., 1999. págs. 283, 284, 285, 286, 287, 291, 292, 293. 84-4860236-6.

COETZER, J. A. W. , & TUSTIN, R. C. (2004). Infectious Diseases of Livestock [libro impreso]. 2da edición. Oxford: Oxford University Press. ISBN 0-19-578202-X.

CRIADO-FORNELIO A., BULING A., ASENZO G., BENITEZ D., FLORIN-CHRISTENSEN M., GONZALEZ-OLIVA A., HENRIQUES G., SILVA M.,

CRIADO-FORNELIO A., BULING A., ASENZO G., BENITEZ D., FLORIN-CHRISTENSEN M., GONZALEZ-OLIVA A., HENRIQUES G., SILVA M., ALONGI A., AGNONE A., TORINA A. & MADRUGA C.R. (2009). Development of fluorogenic probe-based PCR assays for the detection and quantification of bovine piroplasmids. *Vet. Parasitol.*, 162, 200–206.

DEL RÍO M., DEL RÍO N. Y RODRÍGUEZ J. GARRAPATAS, 2010. Disponible en:http://www.slideshare.net/MYRIAM_DELRIO/garrapatas5586181?from_search=1

FACCIOLI, V. 2011. Garrapatas (acari: Ixodidae y Argasidae) de la colección de invertebrados del Museo Provincial de Ciencias Naturales Florentino Ameghino. (en línea). Serie catálogo N°25. Santa Fe, AR. Consultado 12 set. 2013.

FAIRCHILD, GB; KOHLS, GM; TIPTON, VJ; 1966. Ectoparasites of Panamá. (en línea). Chicago, US. Consultado: 28 mar. 2012. pdf. Disponible en: <http://archive.org/details/ectoparasitesofp00wenz>

FIGUEROA, J.V., ALVAREZ, J.A., RAMOS, J.A., VEGA, C.A. AND BUENING, G.M.: Use of a multiplex PCR assay to diagnose hemoparasite-infected bovine carriers in Mexico. *Reveu d'Elevage et de Medicine Vétérinaire des Pays tropicaux*. 46 (1-2): 71-75, 1993.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Epidemiology of tick-borne diseases: epidemiological parameters and their application to the control of tick-borne disease. In: FAO ed. *Ticks and tickborne disease control. A practical field manual*. Vol. II. Rome: FAO/UNO, 1984:373-381

FITZPATRICK JE, KENNEDY CC, MCGEOWN MG, OREOPOULOS DG, ROBERTSON JH, SOYANNWO MA. (1968) Human case of piroplasmiasis (babesiosis). *Nature*. 217(5131):861-2.

FRIEDHOFF, K. T. (1988) Transmission of Babesia. In *Babesiosis of Domestic Animals and Man* (ed. Ristic, M.), pp. 23–52. Boca Raton, Florida, CRC Press, Inc.

FRIEDHOFF K. & BOSE R. (1994). Recent developments in diagnostics of some tick-borne diseases. In: Use of Applicable Biotechnological Methods for Diagnosing Haemoparasites. Proceedings of the Expert Consultation, Merida, Mexico, 4–6 October 1993, Uilenberg G., Permin A. & Hansen J.W., eds. Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO), Rome, Italy, 46–57.

GATTO L.; GOULART Da Silva; SENA Oliveira M; DA SILVA BARBIERI, F. 2006. Bio-ecologia, importância médico veterinária e controle de carrapatos, com ênfase no carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Porto Velho: Embrapa Rondonia, 21 p. – (Documentos / Embrapa Rondonia, ISSN 0677-8618; 104).

GOODGER, B.V. (1971). Preparation and preliminary assessment of purified antigens in the passive haemagglutination test for bovine babesiosis. Australian veterinary journal, 47, (6), 251-256.

GÓMEZ, L. La Frontera Antioquia-Santander. Las fronteras de Antioquia. Aspectos físicos, jurídicos, históricos, económicos y socioculturales. Departamento Administrativo de Planeación. Gobernación de Antioquia. 1-80pp. 2005.

GORDON J. & SIBLEY L. (2005). Comparative genome analysis reveals a conserved family of actin-like proteins in apicomplexan parasites, BMC Genomics 6:179. doi:10.1186/1471-2164-6-179.

GRAHAM O. & HOURRIGAN J. (1977). Eradication programs for the arthropod parasites of livestock. Journal of medical entomology, 13, (6), 629-658.

GUGLIELMONE, A.; ROBBINS, R.; APANASKEVICH, D.; PETNEY, T.; ESTRADA-PEÑA, A.; HORAK, I.; SHAO, R. & S. BARKER. 2010. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. Zootaxa 2528: 1-28.

GUGLIELMONE, A; MANGOLD, A; PASSOS Friche; BARBOSA Ribeiro; BLOUIN E; KOCAN K. (2003): Phylogeography of New World isolates of *Anaplasma marginale* based on major surface protein sequences. Vet. Microbiol. 88(3): 275-285.

HERNÁNDEZ A. (2012) estimación de 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). Tesis de Grado

HERNÁNDEZ M., Manual Bayer de la Garrapata, 2013. Bayer México S.A.; División Animal.

HODGSON J., STILLER D., JASMER D. (1992). Babesia bigemina: quantitation of infection in nymphal and adult Boophilus microplus using a DNA probe. Experimental parasitology, 74, (1), 117-126

HOLMAN P.J., WALDRUP K.A., DROLESKEY R.E., CORRIER D.E. & WAGNER G.G. (1993). In vitro growth of Babesia bovis in white-tailed deer (Odocoileus virginianus) erythrocytes. J. Parasitol., 79, 233–237.

HOYTE, H.M. (1961) Initial development of infectious Babesia bigemina. Australian Veterinary Journal 8, 462–466.

HUANG X, XUAN X, VERDIDA R et. al. (2006). Immunochromatographic test for simultaneous serodiagnosis of Babesia caballi and B. equi infections in horses. Clinical and vaccine immunology : CVI, 2006, 13, (5), 553-555.

INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO. 1980. Control de Garrapatas. Compendio # 39. Bogotá, Colombia. pp. 59 - 78.

JIA H., LIAO M., LEE E., (2007) Development of an immunochromatographic test with recombinant BgSA1 for the diagnosis of Babesia gibsoni infection in dogs. Parasitology research, 100, (6), 1381-1384.

JUNQUERA, P. 2013. Garrapatas Dermacentor en el ganado y en Perros y Gatos: Biología, prevención y control.

KIM C., ISEKI H, HERBAS M. (2007). Development of TaqMan-based real-time PCR assays for diagnostic detection of Babesia bovis and Babesia bigemina. The American journal of tropical medicine and hygiene, 77, (5), 837-841.

LAPAGE, G. 1975. Parasitología Veterinaria. Continental. México. D.F. México. pp. 612 - 667.

LEÓN ARENAS E. Diagnostico, Síntomas y Control de la Anaplasmosis en Venezuela, 1991; Fonaiap Divulga no. 36; Disponible en: http://sian.inia.gov.ve/repositorio/revistas_tec/FonaiapDivulga/fd36/texto/diagnostico.htm

LUO Y., JIA H., TERKAWI M. (2011). Identification and characterization of a novel secreted antigen 1 of *Babesia microti* and evaluation of its potential use in enzymelinked immunosorbent assay and immunochromatographic test. *Parasitology international*, 60, (2), 119-125.

MACKENSTEDT, U., GAUER, M., FUCHS, P., ZAPF, F., SCHEIN, E. & MEHLHORN, H. (1995) DNA measurements reveal differences in the life cycles of *Babesia bigemina* and *B. canis*, two typical members of the genus *Babesia*. *Parasitol Res*81, 595–604.

MADRUGA C.R., KESSLER R.H., SCHENK M.A.M., HONER M.R. & MIQUITA M. (1995). Analise de testes de congulinacao rapida para deteccao de anticorpos contra *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, 47, 649–657.

MEHLHORN, H. & SHEIN, E. (1984). The piroplasms: life cycle and sexual stages. *Advances in Parasitology* 23, 37–103.

MONTENEGRO-JAMES S., TORO M. & GUILLEN A.T. (1992). Field evaluation of an exoantigen-containing *Babesia* vaccine in Venezuela. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 87, Supplement III, 283–288

MOSQUEDA G., FALCÓN N., RAMOS A., CANTO A AND CAMACHO N2012. Estrategias genimicas y moleculares para el control de la Babesiosis bovina. *Rev Mwx Ciencias pecuarias*. 3: 51-59.

NIU Q., LUO J., GUAN G., et. al. (2009). Differentiation of two ovine *Babesia* based on the ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) sequences. *Experimental parasitology*, 121, (1), 64-68.

OLGUÍN A., Anaplasmosis, 2013. Universidad Nacional Autónoma de México; Facultad de Medicina veterinaria y Zootecnia. Disponible en: <http://www.slideshare.net/cuencamvz24/anaplasmosis-16600480>

Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) OIE (2008). Validación y control de calidad de los métodos de la reacción en cadena de la polimerasa utilizados para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas. Manual de la OIE sobre animales terrestres 2008. Capítulo 1.1.5.1. Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/1.01.05.%20Validadci%F3n%20y%20control%20de%20calidad.pdf

Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (2009). Bovine Babesiosis. Technical Disease Cards. Recuperado el 10 de septiembre del 2012. Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/BOVINE_BABESIOSIS_FINAL.pdf

Organización Mundial de Sanidad Animal OIE (2010). Bovine Babesiosis. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2010. OIE Terrestrial Manual 2010 Chapter 2.4.2. Recuperado el 10 de octubre del 2012. Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.02_bovine_babesiosis.pdf

OLIVER, Jr. J.H. 1989. Biology and systematics of ticks (Acari: Ixodida). Annual Review of Ecology and Systematics, vol 20:397-430

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

POTGIETER, F. T. (1977) The life cycle of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in ticks and in cattle in South Africa. PhD thesis, Rand Afrikaans University.

POTGIETER, F. T. & ELS, H. J. (1977) Light and electron microscopic observations on the development of *Babesia bigemina* in larvae, nymphae and non-replete females of *Boophilus decoloratus*. Onderstepoort Journal of Veterinary Research 44, 213–231.

QUIROZ, R. H. 2000. Parasitología y Enfermedades Parasitarias de Animales Domésticos. 10 ed. Limusa. México D.F. pp. 187 - 797.

RÅDSTRÖM P, KNUTSSON R., WOLFFS P., LÖVENKLEV M. & LÖFSTRÖM C. (2004). PrePCR Processing Strategies to Generate PCR-Compatible Samples. *Molecular Biotechnology* , Volume 26, 2004. Humana Press Inc. Doi: 1073– 6085/2004/26:2/133–146.

RAMOS, J .A., ALVAREZ, J .A., FIGUEROA, J. V., SOLIS, J., RODRIGUEZ, R.I., Hernandez, R., Buening, G.M. and Vega, C.A.: Evaluation of the use of a *Babesia bigemina* DNA probe in an epidemiological survey. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 87: SIII, 213-217, 1992.

REY, C. (2004). Hemoparásitosis 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.

RHADES LUIS; Trsiteza Bovina: Babesiosis – Anaplasmosis Bovina, 2005; Agencia INTA Cambio Rural San Salvador. Disponible en: <http://www.vet-uy.com/articulos/bovinos/100/0052/bov052.htm>

RÍOS S. & RÍOS L. (2011). Principales marcadores moleculares utilizados para la identificación de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*. *Revista MVZ Córdoba*, ISSN 1909-0544, Vol. 16, Nº. 2, 2011, pags. 2470-2483

RISTIC M. (1988) *Babesiosis of domestic Animal and Man*. CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida. International Standard Book Lumber 0-8493-4908-7, Library Congress Card Number 87-242556. Printed in United States.

RODRÍGUEZ R., ROSADO A., BASTO G., SOTERO Z., ROSARIO R. Y FRAGOSO H., *Manual Técnico para el Control de Garrapatas en el ganado Bovino*, 2006. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Centro Nacional de Investigaciones en Parasitología Veterinaria. Jiutepec, Morelos, México.

SCHNITTGER L., YIN H., QI B., et. al. (2004) Simultaneous detection and differentiation of *Theileria* and *Babesia* parasites infecting small ruminants by reverse line blotting. *Parasitology research*, 92, (3), 189-196.

SIERRA J., Anaplasmosis Bovina, 2013. Slideshare. Disponible en: <http://www.slideshare.net/jesierra/anaplasmosis-bovina-jer>

SMITH T. & KILBORNE F. (1977). Investigations into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever. Bureau of Animal Industry, Bull 1, 85-114.

SOLARI M. Angélica; COURE Ulises; TRELLES Alfredo y MAUTONE Gabriel; 2006; Taxonomía de los cinco géneros de garrapatas diagnosticados en bovinos en Uruguay; FAO – TCP URU 3003^a, Pág. 5

SOULSBY, E. 1987. Parasitología y Enfermedades parasitarias en los Animales Domésticos. 7 ed. Interamericana. México D.F. pp. 719 - 767.

UILENBERG G. International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. *Vet Parasitol* 1995;57:19-42

VERDIDA R., XUAN X, FUKUMOTO S, et. al (2005). Development of a practical immunochromatographic test with recombinant P50 for the diagnosis of *Babesia gibsoni* infection in dogs. *Parasitology*, 131, (Pt 6), 769-774.

VETMASI; La sanidad Animal, 2013; disponible en: http://www.vetmasi.es/plataforma-tecnologica-espanola-de-sanidad-animal/espanol/la-sanidad-animal_20_1_ap.html

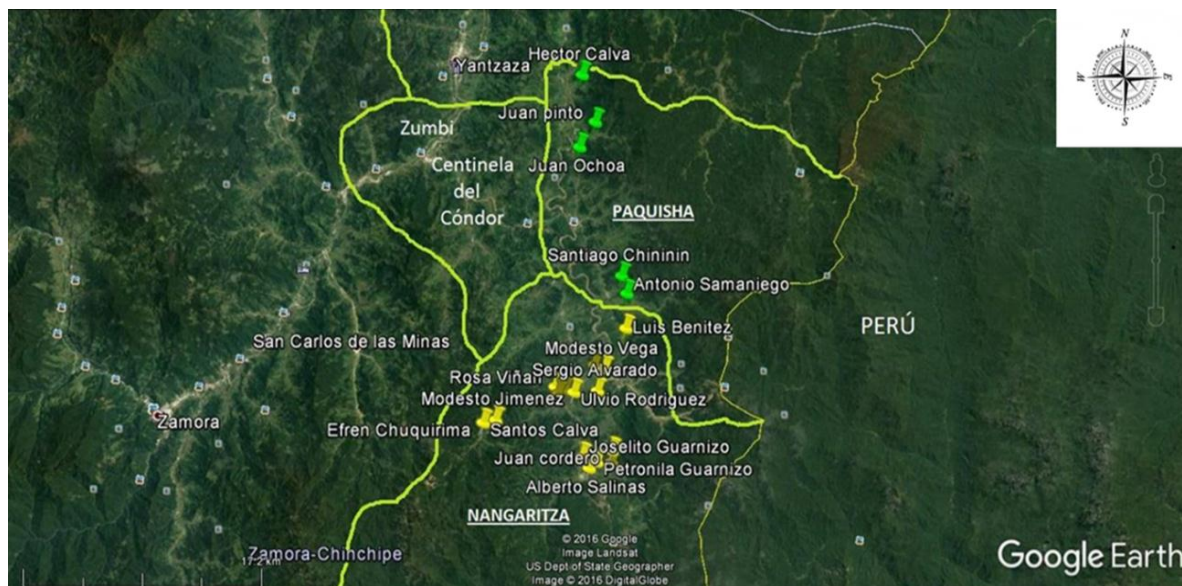
VIZCAÍNO, O. Anaplasmosis y babesiosis en el ganado bovino. En: Control de Garrapatas. Compendio N° 39. ICA, Medellín. 59-79pp. 1980.

VOLTZIT, OV. 2007. A review of neotropical *Amblyomma* Species (Acarina: Ixodidea). (en línea). 15(1). Moscú, RU. Consultado 21 oct. 2013. pdf. Disponible en: <http://www.afpmb.org/sites/default/files/whatsnew/2010/187495.pdf>

WALLER R. F. AND MCFADDEN G. I. 2005 The Apicoplast: A Review of the Derived Plastid of Apicomplexan Parasites. *Curr. Issues Mol. Biol.* 7: 57-80. Weiland, G. and Reiter, I., (1988) Methods for the measurement of the serological response to *Babesia*. In: M. Ristic (Editor), *Babesiosis of Domestic Animals and Man*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 143-162.

9. ANEXOS

ANEXO 1: Ubicación de la investigación sector Este de la provincia Zamora Chinchipe (Cantones Nangaritza y Paquisha)



ANEXO 2: Fincas seleccionadas

N°	PROPIETARIO	COORDENADAS		PROCEDENCIA	ALTURA
		LATITUD	LONGITUD		
1	Luis Benítez	4° 03' 03"	78° 58' 46"	Nangaritza	837 msnm
2	Sergio Alvarado	4° 31' 11"	78° 39' 27"	Nangaritza	835 msnm
3	Ulvio Rodríguez	4° 03' 16"	78° 40' 27"	Nangaritza	905 msnm
4	Ángel Belduma	4° 03' 11"	78° 40' 51"	Nangaritza	910 msnm
5	Jimmy Vega	4° 02' 09"	78° 39' 37"	Nangaritza	847 msnm
6	Modesto Vega	4° 02' 18"	78° 39' 11"	Nangaritza	829 msnm
7	Modesto Jiménez	4° 04' 25"	78° 43' 42"	Nangaritza	1387 msnm
8	Santos Calva	4° 04' 32"	78° 44' 12"	Nangaritza	1476 msnm
9	Efrén Chuquirima	4° 04' 43"	78° 44' 02"	Nangaritza	1513 msnm
10	Rosa Viñán	4° 03' 04"	78° 41' 15"	Nangaritza	941 msnm
11	Adela Granda	4° 03' 21"	78° 41' 07"	Nangaritza	931 msnm
12	Petronila Guarnizo	4° 06' 1,03"	78° 39' 23,9"	Nangaritza	861 msnm
13	Juan Cordero	4° 05' 33,79"	78° 38' 46,26"	Nangaritza	870 msnm
14	Horacio Jiménez	4° 06' 0,11"	78° 38' 46,26"	Nangaritza	869 msnm
15	Alberto Salinas	4° 06' 16"	78° 39' 42,67"	Nangaritza	867 msnm
16	Joselito Guarnizo	4° 05' 47,79"	78° 40' 0,98"	Nangaritza	866 msnm
17	Héctor Calva	03° 5' 33"	78° 40' 30"	Paquisha	809 msnm
18	Juan Ochoa	03° 53' 26"	78° 40' 31"	Paquisha	832 msnm
19	Juan Pinto	03° 59' 15"	78° 38' 20"	Paquisha	900 msnm
20	Antonio Samaniego	03° 59' 15"	78° 38' 20"	Paquisha	868 msnm
21	Santiago Chininin	03° 58' 33"	78° 38' 34"	Paquisha	881 Msnm

ANEXO 3: Resultados generales de bovinos sondeados

REGISTRO DE MUESTREO SECTOR ESTE DE ZAMORA CHINCHIPE								
N°	PROPIETARIO	CODIGO	SEXO	EDAD	RAZA	GIEMSA	<i>B. bovis</i>	<i>B. bigemina</i>
1	Luis Benítez	N1	Hembra	5 años	Holstein	Negativo (-)	Negativo (-)	Positivo (+)
2		N2	Hembra	3 años	Charolais	Negativo (-)	Negativo (-)	Negativo (-)
3		N3	Hembra	6 años	Holstein	Positivo (+)	Negativo (-)	Positivo (+)
4		N4	Macho	3 años	Mestizo	Negativo (-)	Negativo (-)	Positivo (+)
5		N5	Macho	3 años	Mestizo	Positivo (+)	Negativo (-)	Positivo (+)
6	Sergio Alvarado	N6	Hembra	2 años	Holstein	Negativo (-)	Negativo (-)	Negativo (-)
7		N7	Hembra	2 años	Charolais	Negativo (-)	Negativo (-)	Positivo (+)
8		N8	Macho	1 año	Holstein	Positivo (+)	Negativo (-)	Positivo (+)
9	Ulvio Rodríguez	N9	Macho	1 año	Charolais	Negativo (-)	Positivo (+)	Negativo (-)
10		N10	Macho	1 año	Mestizo	Positivo (+)	Negativo (-)	Positivo (+)
11	Ángel Belduma	N11	Hembra	6 años	Mestizo	Negativo (-)	Positivo (+)	Positivo (+)
12		N12	Hembra	5 años	Holstein	Negativo (-)	Negativo (-)	Negativo (-)
13	Jimmy Vega	N13	Hembra	5 años	Mestizo	Negativo (-)	Positivo (+)	Positivo (+)
14		N14	Hembra	1 año	Charolais	Negativo (-)		
15		N15	Macho	1 año	Mestizo	Negativo (-)		
16		N16	Hembra	6 años	Holstein	Negativo (-)		
17		N17	Hembra	2 años	Holstein	Negativo (-)	Positivo (+)	Positivo (+)
18	Modesto Vega	N18	Macho	2 años	Holstein	Negativo (-)	Positivo (+)	Negativo (-)
19		N19	Macho	8 Meses	Holstein	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)
20		N20	Macho	3 años	Mestizo	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)
21		N21	Macho	2 años	Mestizo	Negativo (-)	Positivo (+)	Negativo (-)
22		N22	Macho	2 años	Mestizo	Negativo (-)	Positivo (+)	Positivo (+)
23	Modesto Jimenez	N23	Macho	2 años	Mestizo	Negativo (-)	Positivo (+)	Positivo (+)
24		N24	Hembra	2 años	Mestizo	Negativo (-)	Positivo (+)	Positivo (+)
25		N25	Macho	3 años	Mestizo	Negativo (-)	Positivo (+)	Positivo (+)
26		N26	Hembra	1 año	Mestizo	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)
27		N27	Hembra	1 año	Mestizo	Negativo (-)	Negativo (-)	Positivo (+)
28	Santos Calva	N28	Hembra	4 Años	Mestizo	Negativo (-)	Positivo (+)	Positivo (+)
29		N29	Macho	3 años	Charolais	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)
30		N30	Hembra	6 Años	Mestizo	Negativo (-)	Positivo (+)	Negativo (-)
31		N31	Hembra	2 Años	Mestizo	Negativo (-)	Positivo (+)	Positivo (+)
32		N32	Hembra	5 Años	Mestizo	Positivo (+)	Negativo (-)	Positivo (+)
33	Efrén Chuquirima	N33	Hembra	6 Meses	Charolais	Negativo (-)	Negativo (-)	Negativo (-)
34		N34	Hembra	6 Meses	Charolais	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)
35		N35	Hembra	4 Años	Holstein	Negativo (-)	Negativo (-)	Positivo (+)
36		N36	Hembra	5 Meses	Mestizo	Negativo (-)	Negativo (-)	Negativo (-)
37	Rosa Viñán	N37	Hembra	7 Años	Mestizo	Negativo (-)	Positivo (+)	Negativo (-)
38		N38	Hembra	3 Meses	Mestizo	Negativo (-)	Positivo (+)	Negativo (-)

39	Adela Granda	N39	Hembra	1 año	Charolais	Negativo (-)	Positivo (+)	Positivo (+)
40		N40	Hembra	5 años	Mestizo	Negativo (-)	Negativo (-)	Positivo (+)
41	Petronila Guarnizo	N41	Hembra	8 años	Mestizo	Negativo (-)	Positivo (+)	Positivo (+)
42		N42	Hembra	4 años	Mestizo	Negativo (-)		
43		N43	Hembra	4 años	Mestizo	Negativo (-)	Negativo (-)	Positivo (+)
44		N44	Hembra	5 años	Mestizo	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)
45		N45	Macho	8 años	Mestizo	Negativo (-)		
46		N46	Hembra	7 años	Mestizo	Positivo (+)	Negativo (-)	Positivo (+)
47		N47	Hembra	6 años	Mestizo	Negativo (-)		
48		Juan Cordero	N48	Hembra	4 años	Mestizo	Negativo (-)	
49	N49		Hembra	3 años	Mestizo	Positivo (+)	Negativo (-)	Negativo (-)
50	N50		Macho	4 años	Mestizo	Negativo (-)		
51	N51		Hembra	3 años	Mestizo	Negativo (-)		
52	N52		Hembra	5 años	Mestizo	Positivo (+)	Negativo (-)	Negativo (-)
53	N53		Macho	4 años	Mestizo	Negativo (-)		
54	Horacio Jiménez	N54	Macho	2 años	Mestizo	Negativo (-)		
55		N55	Macho	8 meses	Mestizo	Positivo (+)	Positivo (+)	Negativo (-)
56		N56	Macho	8 meses	Mestizo	Positivo (+)	Positivo (+)	Negativo (-)
57		N57	Macho	2 años	Mestizo	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)
58		N58	Hembra	6 años	Mestizo	Negativo (-)		
59	Alberto Salinas	N59	Hembra	4 años	Mestizo	Negativo (-)		
60		N60	Hembra	6 meses	Mestizo	Positivo (+)	Positivo (+)	Negativo (-)
61		N61	Hembra	3 años	Mestizo	Negativo (-)		
62		N62	Macho	4 años	Mestizo	Negativo (-)		
63	Joselito Guarnizo	N63	Hembra	2 años	Mestizo	Negativo (-)	Positivo (+)	Positivo (+)
64		N64	Hembra	4 años	Mestizo	Negativo (-)		
65		N65	Hembra	2 años	Mestizo	Negativo (-)		
66		N66	Hembra	5 años	Mestizo	Negativo (-)	Positivo (+)	Positivo (+)
67	Héctor Calva	Pq 1	Hembra	5 años	Mestizo	Negativo (-)	Negativo (-)	Positivo (+)
68		Pq 2	Hembra	1 año	Mestizo	Negativo (-)		
69		Pq 3	Hembra	5 años	Mestizo	Negativo (-)	Negativo (-)	Positivo (+)
70		Pq 4	Hembra	6 años	Mestizo	Negativo (-)	Positivo (+)	Positivo (+)
71		Pq 5	Hembra	5 años	Mestizo	Negativo (-)		
72		Pq 6	Hembra	8 años	Mestizo	Negativo (-)	Negativo (-)	Positivo (+)
73		Juan Ochoa	Pq 7	Hembra	6 años	Mestizo	Positivo (+)	Positivo (+)
74	Pq 8		Hembra	3 años	Mestizo	Negativo (-)		
75	Pq 9		Hembra	3 años	Mestizo	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)
76	Pq 10		Hembra	7 años	Mestizo	Positivo (+)	Negativo (-)	Positivo (+)
77	Pq 11		Hembra	6 años	Charolais	Negativo (-)	Positivo (+)	Positivo (+)
78	Pq 12		Hembra	3 años	Charolais	Negativo (-)		
79	Juan Pinto	Pq 13	Hembra	4 años	Charolais	Negativo (-)	Negativo (-)	Positivo (+)
80		Pq 14	Hembra	3 años	Mestizo	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)
81		Pq 15	Hembra	3 años	Charolais	Negativo (-)		
82		Pq 16	Hembra	6 años	Mestizo	Negativo (-)	Positivo (+)	Positivo (+)
83		Pq 17	Hembra	4 años	Mestizo	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)

84		Pq 18	Hembra	5 años	Mestizo	Negativo (-)	Negativo (-)	Positivo (+)
85	Antonio Samaniego	Pq 19	Hembra	6 años	Holstein	Negativo (-)		
86		Pq 20	Hembra	6 años	Holstein	Positivo (+)	Negativo (-)	Negativo (-)
87		Pq 21	Hembra	7 meses	Mestizo	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)
88		Pq 22	Hembra	9 meses	Mestizo	Negativo (-)	Positivo (+)	Positivo (+)
89		Pq 23	Macho	6 meses	Holstein	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)
90		Pq 24	Hembra	6 años	Holstein	Negativo (-)	Negativo (-)	Positivo (+)
91	Santiago Chininin	Pq 25	Hembra	6 años	Mestizo	Negativo (-)		
92		Pq 26	Macho	2 años	Mestizo	Positivo (+)	Positivo (+)	Positivo (+)
93		Pq 27	Hembra	6 años	Mestizo	Negativo (-)	Negativo (-)	Positivo (+)
94		Pq 28	Hembra	4 años	Mestizo	Negativo (-)		
95		Pq 29	Hembra	9 meses	Mestizo	Positivo (+)	Negativo (-)	Negativo (-)

ANEXO 4: Análisis estadístico

Chi cuadrado Técnica nPCR

Variable	χ^2	$P \leq 0,05$
Edad	2,50160	0,475003
Sexo	3,5750315	0,058654
Raza	3,2473	0,19717588
Cantones	0,29751	0,5854

Chi cuadrado *B. bovis*

Variables	χ^2	$P \leq 0,05$
Edad	5,862001	0,118521
Sexo	4,212963	0,040116
Raza	3,5370	0,17058552
Cantones	0,27778	0,5982

Chi cuadrado *B. bigemina*

Variables	χ^2	$P \leq 0,05$
Edad	8,328448	0,03969
Sexo	0,054012	0,816223
Raza	0,09117	0,63391497
Cantones	4,11681	0,0425

ANEXO 5: Fotografías del Trabajo de Investigación

a. Materiales utilizados en la extracción de sangre



b. Extracción de sangre



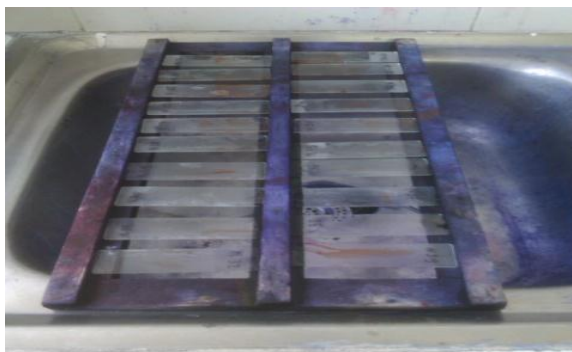
c. Ganaderos de los Cantones Nangaritza y Paquisha



d. Almacenamiento de frotis sanguíneos por finca



e. Frotis sanguíneos para teñir con Giemsa



f. Observación de las placas teñida al microscopio



h. Kit de extracción de ADN (Pure Link® Genomic)



i. Extracción de ADN



j. Realización de técnica de nPCR



k. Colocación de muestras en Termociclador



I. Electroforesis



m. observación de resultados de nPCR en fotodocumentador



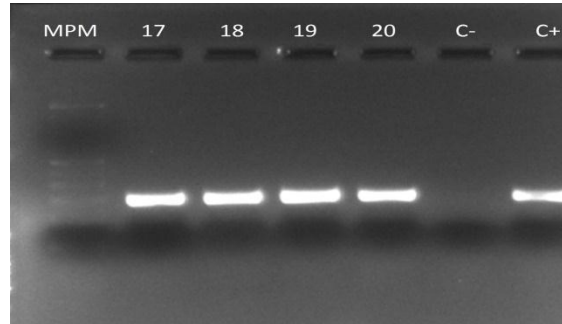
n. Trabajo de laboratorio



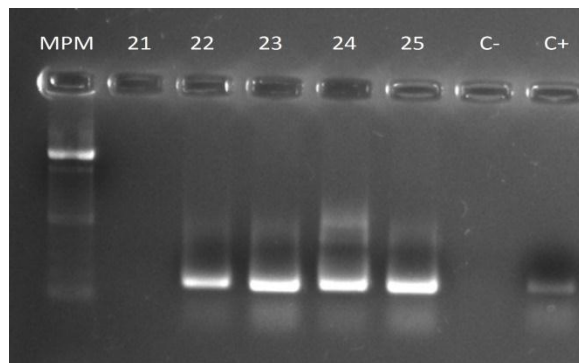
o. Personal técnico del laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Loja



- p. Resultados de electroforesis *B. bovis* (Marcador de peso molecular, muestras 17, 18, 19, 20, C-, C+)



- q. Resultados de electroforesis *B. bigemina* (Marcador de peso molecular, muestras 21, 22, 23, 24, 25, C-, C+)



- r. Observación de garrapatas en el estereoscopio.





s. Clasificación de garrapatas con estereoscopio

