



# 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  
NORTE DE LA PROVINCIA DE ZAMORA CHINCHIPE,  
ECUADOR

TESIS DE GRADO PREVIA A LA  
OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
MÉDICO VETERINARIO  
ZOOTECNISTA

**AUTOR:**

HENRY PAÚL CORREA ESCUDERO

**DIRECTOR:**

DR. TITO MUÑOZ GUARNIZO Mg.Sc.

LOJA – ECUADOR

2017

## CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

Dr. Tito Muñoz Guarnizo Mg. Sc.


**DIRECTOR DE TESIS**

### CERTIFICA:

Que he revisado la presente tesis titulada **“PREVALENCIA DE *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* EN EXPLOTACIONES GANADERAS DEL SECTOR NORTE DE LA PROVINCIA ZAMORA CHINCHIPE, ECUADOR”**, realizada por el egresado **Henry Paúl Correa Escudero**, 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, 21 de Noviembre 2016

**Atentamente**



Dr. Tito Muñoz Guarnizo Mg. Sc.

**DIRECTOR DE TESIS**

## CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

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

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

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**APROBADA**

Loja, 21 de Noviembre 2016

Dra. Laura de Jesús Peña Merino

PRESIDENTA DEL TRIBUNAL



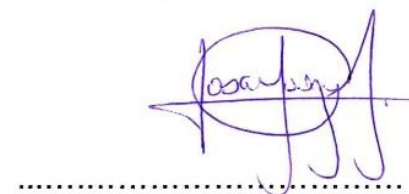
Dr. Segundo Germán Barragán Fierro Mg. Sc.

VOCAL



Dr. José Stalin Yaguana Jiménez Mg. Sc.

VOCAL



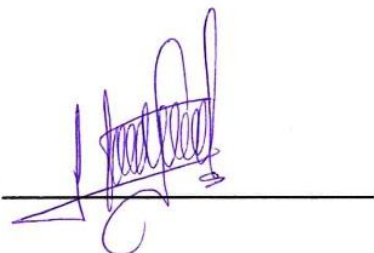
## AUTORÍA

Yo, **Henry Paúl Correa Escudero**, 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; los conceptos, ideas, resultados, conclusiones y recomendaciones vertidos en el desarrollo del presente trabajo de investigación son de absoluta responsabilidad de su autor.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi tesis en el Reposito Institucional – Biblioteca Virtual

**Autor:** Henry Paúl Correa Escudero

**Firma:**



**Cédula:** 1105219941

**Fecha:** Loja, 03 de febrero de 2017

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

Yo, **Henry Paúl Correa Escudero**, declaro ser autor de la tesis titulada

**“PREVALENCIA DE *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* EN EXPLOTACIONES GANADERAS DEL SECTOR NORTE 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:

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 3 días del mes de febrero de dos mil diecisiete. Firma el autor.

Firma:  \_\_\_\_\_

**Autor:** Henry Paúl Correa Escudero

**Número de cédula:** 1105219941

**Dirección de domicilio:** Loja, calle Mercadillo entre 18 de noviembre y sucre

**Correo Electrónico:** [henrypaul.ce@gmail.com](mailto:henrypaul.ce@gmail.com)

**Teléfono:** 072570632    **Celular:** 0992970381

**DATOS COMPLEMENTARIOS**

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

**TRIBUNAL DE GRADO:** Dra. Laura de Jesús Peña Merino

Dr. Segundo Germán Barragán Fierro Mg. Sc.

Dr. José Stalin Yaguana Jiménez Mg. Sc

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco primeramente a Dios por darme la sabiduría necesaria para poder avanzar cada día, a la Universidad Nacional de Loja y a la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia por acogerme en sus aulas y formarme como profesional.

A mi director de tesis el Dr. Tito Muñoz por haberme ayudado en el proceso de realización de la presente investigación. Al centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja y sus Profesionales Loidy Zamora y Carmita Pineda por su incalculable bondad y apoyo.

A los señores ganaderos del Norte de Zamora Chinchipe por permitirme realizar el presente estudio en sus fincas.

Finalmente a todos quienes de una manera u otra colaboraron para que el presente trabajo pueda culminarse, a todos Gracias.

*Henry Paúl*

## DEDICATORIA

La presente investigación se la dedico a mi familia quienes han estado todo este tiempo a mi lado, a mis Padres Ángel y Amparito por ser mi apoyo y base para llegar hasta aquí a mis hermanas y hermano quienes han estado presentes y me han soportado por horas y horas mientras realizaba mis estudios.

Sé que estas palabras no son suficientes para expresar mi agradecimiento, pero espero que con ellas, se den a entender mis sentimientos de aprecio y cariño a todos ellos.

*Henry Paúl*

# ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS .....	ii
CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO.....	iii
AUTORÍA .....	iv
CARTA DE AUTORIZACIÓN .....	v
AGRADECIMIENTO .....	vi
DEDICATORIA.....	vii
ÍNDICE GENERAL .....	viii
ÍNDICE DE CUADROS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN.....	xiv
<b>1 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>3</b>
2.1 BABESIOSIS BOVINA.....	3
2.1.1 Definición .....	3
2.1.2 Morfología .....	3
2.1.3 Clasificación Taxonómica .....	4
2.1.4 Características Moleculares del Género Babesia .....	4
2.1.5 Gen RAP1 .....	5
2.1.6 Ciclo biológico del Género <i>Babesia spp.</i> .....	6
2.1.7 Patogenia .....	7
2.1.8 Transmisión.....	8
2.1.9 Epidemiología.....	8
2.1.10 Síntomas .....	9
2.1.11 Diagnóstico .....	10
2.1.12 Técnicas de Diagnóstico .....	11
2.1.13 Control.....	19
2.1.14 Tratamiento .....	20
2.2 GÉNEROS DE GARRAPATAS.....	21
2.2.1 Suborden Ixodida .....	22
<b>3 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
3.1 MATERIALES .....	27
3.1.1 De Campo .....	27
3.1.2 De laboratorio.....	27
3.1.3 De oficina .....	29
3.2 MÉTODOS.....	30



3.2.1	Ubicación del Área de Estudio.....	30
3.2.2	Tamaño de la Población.....	31
3.2.3	Tamaño de la Muestra.....	31
3.2.4	Variables a Evaluar .....	32
3.2.5	Análisis Estadístico.....	32
3.2.6	Selección de Fincas .....	32
3.2.7	Recolección de las Muestras de Sangre.....	33
3.2.8	Recolección de Garrapatas .....	33
3.2.9	Identificación de Géneros de Garrapatas .....	33
3.2.10	Realización de Frotis Sanguíneos .....	34
3.2.11	Coloración de Giemsa .....	34
3.2.12	Técnica de Extracción de ADN (con el Kit Pure link® genomic).....	35
3.2.13	Verificación de Calidad del ADN.....	36
3.2.14	Realización de los Ensayos de nPCR.....	37
3.2.15	Técnica de PCR y nPCR .....	38
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
4.1	PREVALENCIA TOTAL DE <i>Babesia spp.</i> .....	43
4.1.1	Prevalencia de <i>Babesia spp.</i> , por Sexo .....	44
4.1.2	Prevalencia de <i>Babesia spp.</i> , por Cantón.....	45
4.1.3	Prevalencia de <i>Babesia spp.</i> , por Edad.....	47
4.1.4	Prevalencia de <i>Babesia spp.</i> , por Raza .....	49
4.1.5	Comparación de las pruebas diagnósticas .....	50
4.2	GÉNEROS DE GARRAPATAS.....	50
4.3	ANÁLISIS EPIDEMIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD.....	51
4.3.1	Sistemas de pastoreo.....	51
4.3.2	Tipo de explotación ganadera .....	51
4.3.3	Procedencia del ganado.....	52
4.3.4	Cuarentena .....	52
4.3.5	Presencia de la Enfermedad .....	53
4.3.6	Diagnóstico y control de la enfermedad.....	55
4.3.7	Fuentes de contaminación y Control de garrapatas.....	58
<b>5</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>62</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>70</b>
<b>7</b>	<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>71</b>
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>72</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>76</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

CONTENIDO	PÁGINA
Cuadro 1 Clasificación taxonómica de Babesia .....	4
Cuadro 2 Fármacos utilizados para el tratamiento de Babesiosis .....	20
Cuadro 3 Características meteorológicas de los cantones en estudio .....	30
Cuadro 4 Sectores de toma de muestras .....	32
Cuadro 5 Características individuales de los géneros de garrapata.....	34
Cuadro 6 Cebadores utilizados para <i>Babesia bovis</i> .....	37
Cuadro 7 Cebadores utilizados para <i>Babesia bigemina</i> .....	38
Cuadro 8 Mix para PCR de <i>Babesia bovis</i> .....	39
Cuadro 9 Mix para nPCR de <i>Babesia bovis</i> .....	39
Cuadro 10 Ciclos y temperaturas para PCR y nPCR <i>Babesia bovis</i> .....	40
Cuadro 11 Mix para PCR de <i>Babesia bigemina</i> .....	40
Cuadro 12 Mix para nPCR de <i>Babesia bigemina</i> .....	41
Cuadro 13 Ciclos y temperaturas para PCR y nPCR <i>Babesia bigemina</i> .....	41
Cuadro 14 Prevalencia Total de <i>Babesia spp.</i> ,.....	43
Cuadro 15 Prevalencia de <i>Babesia spp.</i> , por sexo .....	44
Cuadro 16 Prevalencia de <i>Babesia spp.</i> , por cantón .....	45
Cuadro 17 Prevalencia de <i>Babesia spp.</i> , por edad .....	47
Cuadro 18 Prevalencia de <i>Babesia spp.</i> por raza .....	49
Cuadro 19 Comparación de las pruebas diagnósticas Giemsa y nPCR .....	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	PÁGINA
Figura 1 Mapa cromosómico de <i>Babesia bovis</i> .....	5
Figura 2 Proceso de replicación del ADN por PCR .....	13
Figura 3 Desnaturalización del ADN .....	14
Figura 4 Alineación de cebadores .....	15
Figura 5 Alineación de fragmentos de ADN .....	16
Figura 6 Nuevas cadenas bicatenarias de ADN .....	16
Figura 7 Mecanismo de detección y lectura de los resultados con PCR en tiempo real.....	17
Figura 8 Garrapata del género Amblyoma .....	23
Figura 9 Garrapata del género Haemaphysalis .....	23
Figura 10 Garrapata del género Ixodes .....	24
Figura 11 Garrapatas del género Rhipicephalus .....	24
Figura 12 Garrapatas del género Dermacentor .....	25
Figura 13 Mapa político de la provincia de Zamora Chinchipe.....	30
Figura 14 Prevalencia Total de <i>Babesia spp.</i> , .....	43
Figura 15 Prevalencia de <i>Babesia spp.</i> , por sexo .....	44
Figura 16 Prevalencia de <i>Babesia bovis</i> y <i>Babesia bigemina.</i> , por sexo .....	45
Figura 17 Prevalencia de <i>Babesia spp.</i> , por cantón .....	46
Figura 18 Prevalencia de <i>Babesia bovis</i> y <i>Babesia bigemina.</i> , por cantón .....	47
Figura 19 Prevalencia de <i>Babesia spp.</i> , por edad .....	48
Figura 20 Prevalencia de <i>Babesia bovis</i> y <i>Babesia bigemina.</i> , por edad .....	48
Figura 21 Prevalencia de <i>Babesia spp.</i> por raza .....	49
Figura 22 Prevalencia de <i>Babesia bovis</i> y <i>Babesia bigemina.</i> por raza .....	50
Figura 23 Sistemas de pastoreo.....	51
Figura 24 Tipo de explotación ganadera .....	52
Figura 25 Procedencia del ganado.....	52
Figura 26 Práctica de cuarentena .....	53
Figura 27 Conocimiento de la enfermedad .....	53
Figura 28 Presencia de la enfermedad en la finca .....	54
Figura 29 Épocas del año en que aparece la enfermedad.....	54
Figura 30 Síntomas de la babesiosis .....	55
Figura 31 Utiliza servicios de profesionales veterinarios .....	55

Figura 32 Edad a la que enferman los animales .....	56
Figura 33 Morbilidad de <i>Babesia spp.</i> .....	56
Figura 34 Mortalidad de <i>Babesia spp.</i> .....	57
Figura 35 Tratamiento que utilizan para babesiosis .....	57
Figura 36 Presencia de garrapatas en la finca .....	58
Figura 37 Grado de infestación de garrapatas en la finca.....	58
Figura 38 Productos utilizados en el control de garrapatas.....	59
Figura 39 Frecuencia de control de garrapatas.....	59
Figura 40 Rotación de productos en el control de garrapatas .....	60
Figura 41 Conocimiento de la transmisión de la babesiosis.....	60
Figura 42 Contacto de los bovinos con fauna silvestre .....	61

**PREVALENCIA DE *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* EN  
EXPLORACIONES GANADERAS DEL SECTOR NORTE DE LA  
PROVINCIA DE ZAMORA CHINCHIPE, ECUADOR**

## RESUMEN

Se analizaron 98 y 72 muestras de sangre bovina, tomadas de animales asintomáticos en el sector Norte 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.* A través de la técnica de Giemsa se reportó una prevalencia general de 26% y por la técnica de nPCR 69,4% de prevalencia general; encontrándose el 25% de *B. bovis* y 52,8% de *B. bigemina*. Con respecto a la edad y de acuerdo a las dos técnicas, los animales menores a un año resultaron positivos el 18.2% y el 61.5% respectivamente; el grupo comprendido entre uno y dos años, resultó positivo el 34.4% y el 76%; los animales entre tres y cuatro años, 27.3% y el 71.4%; mientras que el grupo de animales mayores a cuatro años resultó positivo el 21.2% y el 66.7%. En cuanto a las razas, la Mestiza tuvo una prevalencia de 30% y 64.7% respectivamente; la raza charolais 21.2 y 66.7%; mientras que la raza holstein 26.3 y 74.2%. En lo que respecta al sexo, en los machos se encontró prevalencia de 20 y 56.3%, mientras que en las hembras la prevalencia fue de 27 y 73.2% respectivamente. Se concluye que la técnica de nPCR por su sensibilidad y especificidad es más efectiva que la técnica de Giemsa en el diagnóstico de animales asintomáticos; con lo cual podemos confirmar que la prevalencia de *Babesia spp.*, en el Norte de la provincia de Zamora Chinchipe es elevada, con mayor presencia de *B. bigemina*.

**Palabras clave:** Diagnóstico, Prevalencia, nPCR, Giemsa, Babesia, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*.

## SUMMARY

A total of 98 and 72 bovine blood samples were taken from asymptomatic animals in the northern sector of the province of Zamora Chinchipe, which were analyzed using Giemsa and nPCR techniques accordingly, in order to develop a diagnosis of *Babesia spp.* Giemsa technique reported a general prevalence of 26% and through the nPCR technique the result was 69,4% of general prevalence; with 25% of *B. bovis* and 52.8% of *B. bigemina*. With regards to age and based on results from both techniques, animals younger than one year were tested positive with 18.2% and 61.5% accordingly; The group between one and two years old turned out positive with 34.4% and 76% correspondingly; The animals between three and four years old 27.3% and 71.4%; While the group of animals older than four years resulted positive 21.2% and 66.7%. Regarding races, the Mestiza breed had a prevalence of 30% and 64.7% respectively; the breed charolais 21.2 and 66.7%; While the Holstein breed 26.3% and 74.2%. In connection with sex, males had a prevalence of 20% and 56.3%, whereas in females the prevalence was 27% and 73.2% respectively. It is concluded that the nPCR technique due to its sensitivity and specificity is more effective than the Giemsa technique in the diagnostic of asymptomatic animals. It is possible to confirm that the prevalence of *Babesia spp.* in the northern sector of the province of Zamora Chinchipe is high, with greater presence of *B. bigemina*.

**Key words:** Diagnosis, Prevalence, nPCR, Giemsa, Babesia, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*.

# 1 INTRODUCCIÓN

La babesiosis bovina es una enfermedad de carácter febril causada por protozoarios del género *Babesia*, habitualmente se caracteriza por una lisis eritrocítica extensiva que conduce a anemia, ictericia, hemoglobinuria y muerte (Gasque, 2008).

Es la enfermedad transmitida por artrópodos más importante del mundo. Las regiones mayormente afectadas son las tropicales y subtropicales, siendo *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* las especies que afecta a un gran número de bovinos, estas dos especies causan pérdidas considerables particularmente en los países subdesarrollados (Gasque, 2008). El vector principal para la transmisión de esta parasitosis es la garrapata del género *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Vasco, 2013).

La babesiosis bovina es cosmopolita, afecta tanto a ganado de carne como de leche, provocando pérdidas de tipo directo con la muerte del animal o animales al igual que pérdidas de carácter indirecto con tratamientos, atención del Veterinario, fármacos para la recuperación de los animales así mismo bajas en la producción, por lo cual se la clasifica en el grupo de las hemoparasitosis (Bravo, 2012).

En el año 2012 en Ecuador, se registró 5.2 millones de vacunos distribuidos en regiones, Sierra 50,64%, Costa 36,30% y Oriente con 13,07%. La región oriental obtuvo un 3,49% en términos de crecimiento, superando a la Sierra y Costa (Lorena et al., 2012).

Analizando el incremento de la producción de ganado bovino en la región Oriental se tomó como lugar de estudio al sector Norte de la provincia de Zamora Chinchipe. La economía de dicha provincia se cimienta a través del desarrollo agrícola y pecuario, el área destinada a la producción en Zamora Chinchipe tiene una superficie de 132.066 hectáreas, equivalente al 26% de la superficie total provincial (Andrade, 2016).



Según el III Censo Agropecuario Nacional, publicado en el año 2002, Ecuador cuenta con una población aproximada de 4,5 millones de bovinos distribuidos en todo el territorio nacional, donde el 12% de bovinos se encuentran en la Amazonía. El tipo de manejo del hato en la región es extensivo, al sogueo y pastoreo siendo el ganado Criollo, Brown Swiss, Charolais y Holstein las razas de predilección para los ganaderos ("Zamora Chinchipe", 2016).

Los hatos ganaderos de la provincia de Zamora Chinchipe se ven afectados por enfermedades como: mastitis, gastroenteritis en terneros, infestaciones parasitarias (internos y externos), anaplasmosis, piroplasmosis, aftosa, carbunco sintomático, edema maligno, septicemia hemorrágica, intoxicación alimenticia y deficiencias minerales ("Zamora Chinchipe", 2016). La babesiosis afecta prioritariamente al ganado en producción y su principal vector de transmisión son las garrapatas consideradas como los grandes problemas sanitarios de la producción ganadera en la región ("Zamora Chinchipe", 2016).

Por lo tanto el presente estudio tuvo como objetivo establecer la prevalencia de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en explotaciones bovinas través de técnicas de diagnóstico de laboratorio.

Los Objetivos específicos planteados fueron:

- Determinar la prevalencia molecular de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en el sector Norte de la provincial de Zamora Chinchipe
- Establecer un diagnóstico comparativo entre las técnicas de Giemsa y nPCR.
- Estudiar los factores asociados a la presencia de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*

## 2 REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 BABESIOSIS BOVINA

#### 2.1.1 Definición

Gasque (2008) señala que la piroplasmosis o babesiosis bovina es una enfermedad de cuadro febril transmitida por garrapatas infectadas por protozoarios del género *Babesia* causan lisis eritrocítica extensiva que conduce a anemia, ictericia, hemoglobinuria y muerte. Existen por lo menos seis especies de *Babesia* descritas, que son responsables de la babesiosis bovina.

Las especies de mayor interés en nuestra región son: *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*, transmitidas primariamente por las garrapatas el género *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Estas especies y sus garrapatas vectores están presentes en la mayoría de las zonas tropicales y subtropicales del hemisferio occidental (Gasque, 2008).

#### 2.1.2 Morfología

*Babesia bigemina* Se caracteriza por ser grande y pleomórfica; se identifica por un par de corpúsculos en forma de pera unidos en ángulo agudo dentro del eritrocito maduro. Se las encuentra en formas redondas que miden entre 2 y 3 micras y en forma de pera o alargadas, que miden entre 4 y 5 micras (Gasque, 2008).

*Babesia bovis* a diferencia de *bigemina* es pequeña y pleomórfica, se identifica como un sólo corpúsculo pequeño, redondo o como pares de corpúsculos redondos en forma de pera unidos en ángulo obtuso dentro de un eritrocito maduro. Las formas redondas miden de 1 a 1.5 micras y las de forma de pera de 1.5 a 2.4 micras (Gasque, 2008).

### 2.1.3 Clasificación Taxonómica

El género *Babesia* pertenece phylum Apicomplexa es un linaje eucariota de ramificación temprana que contiene una serie de importantes patógenos animales. Sus ciclos de vida complejos y las características únicas del citoesqueleto los distinguen de otros modelos de eucariotas (Mosqueda et al., 2012).

**Cuadro 1** Clasificación taxonómica de *Babesia*

<i>Dominio:</i>	Eucaryota
Reino:	Protista
<i>Subreino:</i>	sin clasificación (Alveolata, Biciliata, Neozoa o Protozoo)
<i>Filo:</i>	Apicomplexa
<i>Clase:</i>	Aconoidasida
<i>Subclase:</i>	Piroplasma
<i>Orden:</i>	Piroplasmida
<i>Superfamilia:</i>	Babesioidea
<i>Familia:</i>	Babesiidae
	<i>Babesia</i>
<i>Género:</i>	bovis, bigemina,
<i>Especie</i>	microti, divergens entre otros

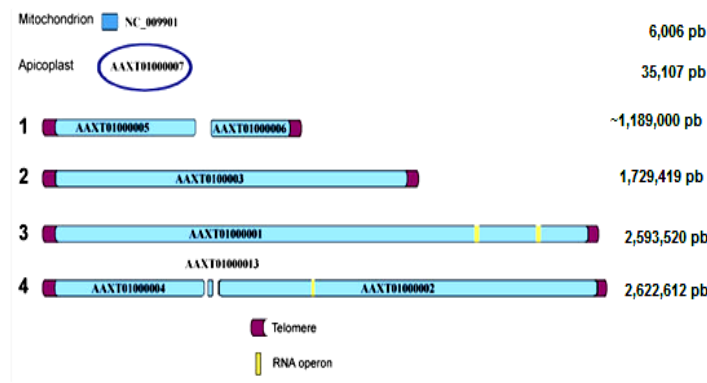
Fuente Vasco et al., 2012

### 2.1.4 Características Moleculares del Género *Babesia*

#### a. Secuencia genómica

Según un estudio del departamento de microbiología y patología veterinaria de la Universidad Estatal de Washington, hasta el momento se ha estudiado el genoma de *Babesia bovis* cepa Tejas T2Bo, el cual está constituido por cuatro cromosomas. 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 contiguos de 827.912 pb y 1.794.700 (Brayton et al., 2007)



**Figura 1** Mapa cromosómico de *Babesia bovis* cepa Tejas T2Bo (Washington State University, 2012)

## b. 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 $\alpha$ , msa-1, msa-2, RAP-1, CT-SPR, rARN y SBP 1,2,3. Su utilización en la detección de la Babesia bovina 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 & Ríos, 2011).

### 2.1.5 Gen RAP1

Son proteínas asociadas a roptrias que proporcionan un buen nivel de detección de las infecciones tempranas y tardías de los bovinos debido a su grado de conservación entre diferentes regiones geográficas. Este estudio mostró la alta conservación del marcador molecular RAP 1 entre cepas de *B. bovis* pero no para *B. bigemina* lo que lo hace un marcador específico de especie (Obregón et al., 2012).

El complejo apical de los Apicomplexa incluye orgánulos como los cuerpos esféricos, las roptrias y las micronemas y participa en la invasión de los

eritrocitos, la adquisición de nutrientes y la ruptura de los eritrocitos parasitados. Las proteínas presentes en estas estructuras son a menudo solubles.

Las roptrias son orgánulos complejos, que contienen numerosas proteínas. La más conocida es RAP1, de 60 kDa, que también se presenta en la superficie de los merozoitos (Suarez et al., 1994) y que sus epitopes son inmunodominantes para los linfocitos T y B (Brown et al., 1996). En *B. bovis*, esta proteína es codificada por dos genes monomórficos (*rap1a1* y *rap1a2*), alineados de forma continua en un locus de simple estructura, determinando que la proteína sea conservada en los diferentes aislados geográficos de *B. bovis*; diferente de *B. bigemina*, donde RAP1 es codificada por cuatro genes polimórficos (Ríos & Ríos, 2011).

Las proteínas SBP son producidas en el cuerpo esférico del complejo apical; se localizan en el borde interno de la membrana del eritrocito infectado y participan en el proceso de invasión celular. Se han descrito cuatro de estas proteínas: SBP1 de 80 kDa, SBP2 de 225 kDa y las SBP3 y SBP4, que todavía no se ha determinado su tamaño (Dasiel Álvarez, 2012).

#### **2.1.6 Ciclo biológico del Género *Babesia* spp.**

El esporozoito de babesia invade un eritrocito para luego transformarse en un trofozoito, el mismo toma una forma circular como el de un anillo que sufre una fisión binaria donde genera dos merozoitos de cada trofozoito. Los merozoitos están inicialmente unidos asemejando dos peras en un ángulo agudo al llegar a ser maduros se separan antes de escapar del eritrocito (Mosqueda et al., 2012).

Los merozoitos liberados van a invadir nuevos eritrocitos y se convierten en trofozoito, mientras que otros serán recogidos por garrapatas adultas para continuar su ciclo en el huésped invertebrado.

En la etapa sexual los merozoitos son liberados de las células rojas de la sangre en el lumen intestinal y en el intestino medio de las garrapatas se desarrollan a gametocitos que luego se transforman en gametos masculinos y femeninos que forman un cigoto después de la fusión. El cigoto se desarrolla en una fase infectante y penetra en las células intestinales de las garrapatas después se desarrollan los cuerpos de fisión y de ellos forman kinetes móviles (Mosqueda et al., 2012).

Los kinetes móviles destruyen las células intestinales, escapan en la hemolinfa y se distribuyen en los diferentes tipos de células y tejidos, incluyendo los ovarios. En el ovario, las células embrionarias están infectados por kinetes (transmisión transovárica), cuando la garrapata hembra pone sus huevos, los embriones ya están infectados, las larvas infectadas eclosionan y van a atacar a los bovinos mientras que los kinetes migran a las glándulas salivales de la garrapata, donde forman una esporoblasto, miles de esporozoitos se desarrollan a partir de cada esporoblasto (Mosqueda et al., 2012).

Las larvas de garrapatas se alimentan de la sangre de bovino y los esporozoitos son liberados con la saliva en el sistema circulatorio del animal (Mosqueda et al., 2012).

### **2.1.7 Patogenia**

Smith (1978) señala que bajo condiciones normales una sola garrapata infectada produce la infección al bovino con *B. bigemina* y con *B.bovis*. Cada garrapata infectada inocula numerosas dosis infecciosas de babesias durante su periodo de alimentación sobre el huésped vertebrado.

Factores que condicionan la patogenia

- Hospedador:

  - Edad (más patógeno en adultos que en terneros de 6 a 9 meses).

  - Raza (más sensibles los *Bos taurus* que los *Bos indicus*).

  - Alimentación, sanidad y estado fisiológico (mal nutrición, enfermedades concomitantes, gestación, parto, inmunodepresión),

- Inmunización previa (endémica o vacunación).
- Parásito:
    - Especie (*B. bovis* es más patógena que *B. bigemina*); cepa e incluso aislado.
    - Tropismo del parásito (localización en SNC es más patógeno que en órganos o tejidos menos nobles)
    - Capacidad de multiplicación.
  - Medio ambiente:
    - Presencia e intensidad de los vectores competentes, que modifican la dosis del inóculo inyectado en cada toma de sangre por parte de éstos, como el ritmo y dosis de reinfección que se producirá (Vasco, 2013).

### 2.1.8 Transmisión

Las garrapatas adquieren la infección por babesia durante su alimentación en animales infectados. Una característica común de las parasitosis del Filo Apicomplexa es la existencia de fases celulares específicos que intervienen en su transmisión entre el huésped vertebrado y vector. Los vectores que intervienen en la transmisión de babesiosis son *Rhipicephalus microplus*, *R. annulatus*, *R. geigy* (Vasco et al., 2012).

La transmisión por inoculación directa entre animales infectados se puede dar, mientras que la transmisión por fómites infectados por sangre y moscas no tiene gran importancia (Vasco et al., 2012).

### 2.1.9 Epidemiología

La babesiosis bovina se puede encontrar en cualquier lugar donde existan garrapatas su principal vector, pero es más frecuente en ganaderías de zonas tropicales y subtropicales (Solorio Rivera & Rodriguez Vivas, 1997).

*Babesia bovis* y *Babesia bigemina* están distribuidas a nivel del mundo y su patrón de distribución está limitado por su vector *Rhipicephalus microplus*, son

particularmente importantes en Asia, África, América Central y del Sur, partes del Sur de Europa y Australia. Aunque *B. bovis* se encuentra con frecuencia en la misma zona geográfica que *B. bigemina*, hay géneros de garrapatas levemente diferentes que transmiten estas 2 especies y presentan algunas diferencias en su distribución, en América del sur son de carácter endémico (Solorio Rivera & Rodríguez Vivas, 1997).

La babesiosis bovina está determinada por factores como la edad, raza, el ambiente y la estación del año. Sin embargo, dado que este parásito necesita 80% de humedad, se puede encontrar sólo en algunos microambientes como la vegetación en los bosques, matorrales de cerros y terrenos bajos húmedos (Echaide, 2014).

#### **2.1.10 Síntomas**

Después de la inoculación con sangre infectada, el período de incubación puede ser entre 3 y 4 días, o menos, dependiendo del volumen del inóculo de exposición, además los signos clínicos varían según la edad del animal, la especie y cepa del parásito. La mayoría de los casos de babesiosis se observan en adultos, y los animales menores de 9 meses generalmente no presentan síntomas (Echaide, 2014).

Los primeros signos de la infección con frecuencia son el aislamiento del animal afectado del resto del hato, se observa inquieto, buscando sombra e incluso, puede echarse, el bovino puede estar parado con el lomo arqueado, al momento del chequeo puede presentar el pelo grueso o hirsuto y mostrar evidencia de disnea y taquicardia; las membranas mucosas se ven inyectadas y enrojecidas primero, pero conforme la lisis eritrocítica progresa, el color se va tornando a pálido debido a la anemia, la temperatura llega hasta los 41.5 °C (Echaide, 2014).

La anemia es un factor que contribuye a la debilidad y a la pérdida de la condición observada en el ganado sobreviviente a la fase aguda de la enfermedad. La anemia puede presentarse en pocos días con la destrucción de



75% o más de los eritrocitos. Esto, generalmente está asociado con hemoglobinemia y hemoglobinuria severas. Después del inicio de la fiebre, la crisis generalmente termina una semana después, y si el animal sobrevive comúnmente hay una severa pérdida de peso, baja de la producción láctea, aborto y una recuperación prolongada (Gasque, 2008).

La mortalidad es extremadamente variable, puede llegar a 50% o más, pero en la ausencia de un estrés marcado, la mayoría de los animales sobreviven. Las infecciones de *B. bovis* se asemejan en muchos aspectos a aquellas observadas en las de *B. bigemina*, pero existen algunas diferencias características: La hemoglobinuria y la hemoglobinemia no se observan con frecuencia en las infecciones por *B. bovis*, aunque pueden presentarse (Gasque, 2008).

Generalmente se acepta que la *B. bovis* es la más virulenta de ambos organismos. Comúnmente los animales desarrollan incoordinación y depresión postrándose con la cabeza extendida que más tarde echan hacia atrás, con movimientos involuntarios de las piernas durante la postración lateral; después sigue la muerte (Gasque, 2008).

## **2.1.11 Diagnóstico**

### **2.1.11.1 Diagnóstico de campo**

Para el diagnóstico de campo se debe conocer si es una zona endémica de garrapatas sobre todo del Género *Rhipicephalus microplus*, luego identificar los signos como fiebre, anemia, ictericia y hemoglobinuria, son signos clínicos sugestivos de babesiosis. Si estos signos están también ligados a esplenomegalia y a lesiones post mortem asociadas con destrucción eritrocítica, el diagnóstico positivo requiere la identificación de la Babesia en los frotis sanguíneos o pruebas serológicas (Gasque, 2008).

### **2.1.11.2 Diagnóstico de laboratorio**

La infección aguda con *Babesia* regularmente se detecta en los frotis sanguíneos delgados teñidos con Giemsa. Los frotis gruesos aumentan la posibilidad de detectar al organismo causal, pero la morfología característica es más difícil de identificar con esta técnica. En los casos de infección crónica, el diagnóstico generalmente se hace utilizando varias pruebas serológicas para la detección de anticuerpos específicos, ya que el organismo causal desaparece o está presente en un número extremadamente bajo, después de la infección aguda (Gasque, 2008).

La característica de baja parasitemia en la sangre circulante hace a esta técnica de Giemsa muy útil para mejorar las posibilidades de observar al organismo causal. Hay una marcada concentración de eritrocitos infectados en los capilares del cerebro. Las técnicas serológicas de diagnóstico son similares para *B. bigemina* y *B. bovis*. Actualmente, la prueba de inmunofluorescencia indirecta es la prueba de elección para el diagnóstico serológico de babesiosis (Gasque, 2008).

### **2.1.11.3 Diagnóstico diferencial**

Las enfermedades que deben ser consideradas para el diagnóstico diferencial son la anaplasmosis, tripanosomiasis, teileriasis, leptospirosis, hemoglobinuria bacilar, hemobartonelosis y eperitrozoonosis (Góes, Góes, Ribeiro, & Gontijo, 2008).

### **2.1.12 Técnicas de Diagnóstico**

#### **a. Técnica de Giemsa**

El colorante de Giemsa es la segunda coloración en uso, luego de la tinción de Wright, y en importancia de las mezclas de Romanowsky, también da

excelentes resultados para la tinción rutinaria de frotis sanguíneos. Cuando se va a teñir con este colorante, debe fijarse primero la muestra con metanol absoluto por un tiempo mínimo de tres minutos (cuando la preparación no incluye metanol). El colorante en solución nunca se utiliza de manera directa, por lo que se debe diluir con la solución amortiguadora en una proporción de 1:10 ó 1:20 y el tiempo de coloración podrá ser de 10 ó 20 minutos, respectivamente (Mancha, 2016).

**Material:** Colorante de Giemsa (constituido por una mezcla de azul de metileno, eosina y varios azules en dilución acuosa): 1.0g del colorante en polvo, 66mL de metanol absoluto y 66mL de glicerol. Se debe disolver el colorante con el glicerol, adicionar el metanol, mezclar bien y dejar a temperatura ambiente de 7-14 días (maduración). Filtrar antes de su empleo. Las indicaciones de preparación pueden variar dependiendo de la casa comercial

**Técnica:**

- Fijar el frotis con alcohol metílico de 3-4 minutos. En caso de que la preparación del colorante ya posea metanol, este paso queda obviado.
- Sumergirlo verticalmente en una solución de Giemsa preparada extemporalmente a partir de 1 volumen de la solución colorante más 9 volúmenes de solución tampón (pBs, pH 6.8) o bien en agua desionizada.
- Esperar durante 10-20 minutos.
- Lavar el frotis con abundante agua, directamente del chorro.
- Limpiar el dorso del portaobjetos con una gasa o algodón humedecido en alcohol para eliminar cualquier resto de colorante.
- Secar al aire y observar con el microscopio con el objetivo 100X y aceite de inmersión (Mancha, 2016).

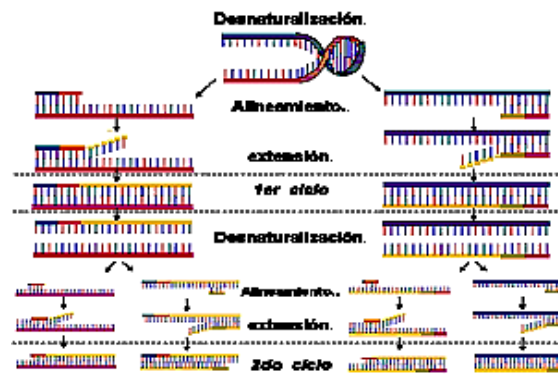
**b. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Otro salto tecnológico ocurrió en 1983, cuando Kary Mullis desarrolló una nueva técnica que hizo posible la síntesis de grandes cantidades de un

fragmento de ADN sin tener que clonarlo: la reacción en cadena de la polimerasa (conocida como PCR por sus siglas en inglés) (Erlich, 1989).

Pero la PCR no es sólo una técnica específica, sino también muy sensible. La PCR es un método *in vitro* de síntesis de ADN con el que un segmento particular de éste es específicamente amplificado al ser delimitado por un par de cebadores o iniciadores que lo flanquean. Su copiado se logra en forma exponencial a través de repetidos ciclos de diferentes periodos y temperaturas de incubación en presencia de una enzima ADN polimerasa termoestable. Así se obtienen en cuestión de horas millones de copias de la secuencia deseada del ADN (Barrera, 2004).

En general la PCR consta de tres ciclos o etapas que son



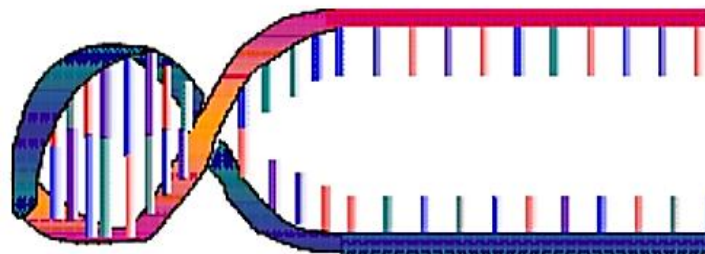
**Figura 2** Proceso de replicación del ADN por PCR(Barrera, 2004)

- **Desnaturalización:** En esta etapa, el ADN molde doble cadena se desnaturaliza y sus hebras se separan. Esto se logra aumentando la temperatura de la reacción, en general a 94 °C para asegurar que todas las moléculas se encuentran en simple hebra y permitir que ocurra el segundo paso o alineamiento (Erlich, 1989).
- **Anillado o alineamiento:** En esta etapa, la temperatura de la reacción disminuye para permitir que los oligonucleótidos cebadores que delimitan el fragmento que se desea amplificar se unan a su región blanco. La temperatura de unión de los cebadores depende de la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de los iniciadores, generalmente oscila entre 50 y 60°C (Erlich, 1989).

- **Extensión:** En este paso, la temperatura de la reacción es aquella que permite la actividad óptima de la enzima polimerasa presente en la reacción. El tercer paso se efectúa a 72°C, temperatura a la que la polimerasa extiende la longitud de los cebadores, añadiendo los diferentes nucleótidos libres en el orden que le va dictando la secuencia de nucleótidos de la cadena que actúa como molde

Para trabajar con ADN genómico se agrega una etapa previa de desnaturalización para regular las posibles estructuras secundarias.

- **Desnaturalización**



**Figura 3** Desnaturalización del ADN(Barrera, 2004)

El sustrato de la enzima de la PCR es el ADN de simple cadena que actúa como molde para la síntesis de su nueva cadena complementaria. Mediante un calentamiento a 94°C, el ADN de doble cadena logra que sus cadenas se separen o desnaturalicen ésta es una etapa crítica, ya que es muy importante que el ADN molde se desnaturalice completamente, lo que se consigue a temperaturas de 94°C, durante por lo menos un minuto. Si la muestra tiene alto contenido de G+C, se recomienda aumentar de preferencia el tiempo.

Sin embargo, la actividad de la enzima decrece de manera muy rápida a partir de los 95°C (vida media a 92.5°C = 2h, a 95°C = 40 min. y a 97.5°C = 5 min.), por lo que a estas temperaturas o superiores es aconsejable disminuir el tiempo de incubación (Barrera, 2004).

## - Alineamiento

La enzima, como todas las ADN polimerasas, necesita del grupo OH-libre en el extremo 3' del iniciador ya apareado al sitio blanco de la amplificación, a partir de donde inicia la síntesis. Este punto constituye el sitio de crecimiento de la cadena complementaria al molde.

Mientras que un cebador (referido como el 5' o sentido) es complementario a la secuencia del extremo 5' de la región del ADN molde a amplificar, el otro es al extremo 3' de la misma, pero en la cadena opuesta

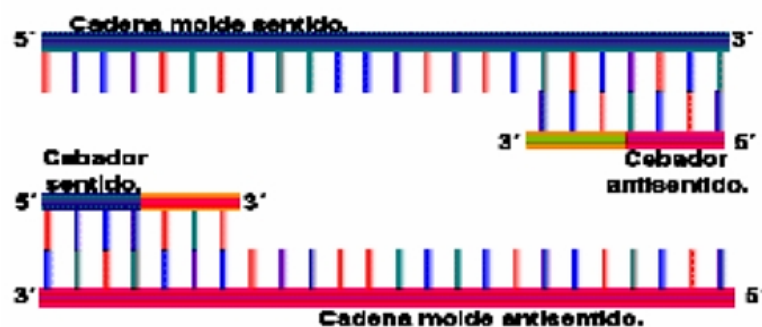


Figura 4 Alineación de cebadores(Barrera, 2004)

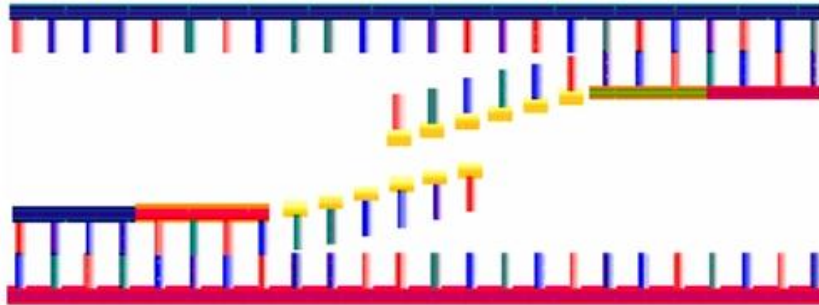
El alineamiento específico de ambos cebadores se produce a una temperatura determinada por composición de bases y oscila entre 40 y 72°C. Ambas cadenas originales del ADN sirven simultáneamente como moldes para sintetizar sus respectivas cadenas complementarias nuevas.

Un aumento de temperatura favorece la especificidad, ya que disminuye las uniones incorrectas de los cebadores con sitios apócrifos del ADN molde (Barrera, 2004).

## - Extensión

Con el ADN molde de cadena sencilla, excepto en los sitios donde los iniciadores se aparean, la polimerasa empieza a copiar la hebra, incorporando desoxirribonucleósidos monofosfatos en dirección 5'→3'. Esta etapa debe realizarse a una temperatura alta, que es la que coincide con la máxima actividad de la polimerasa (72°C) para evitar alineamientos inespecíficos de los

iniciadores. El tiempo de extensión depende del tamaño de la amplificación, debiendo estimar 1 min. Para alargar 1000 nucleótidos.

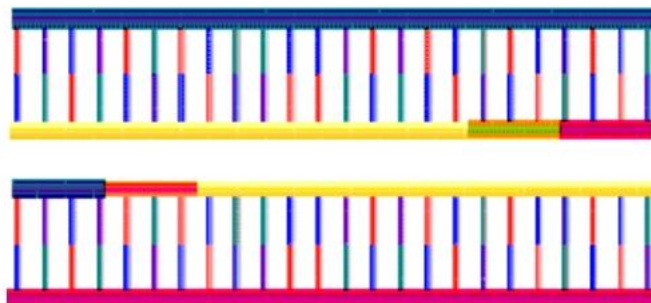


**Figura 5** Alineación de fragmentos de ADN(Barrera, 2004)

Es común que al finalizar todos los ciclos se realice un último alargamiento por 5 min a 72°C, para asegurarse que todos los productos de amplificación estén completamente terminados y tengan, por ende, exactamente la misma longitud (Barrera, 2004).

#### - **Naturaleza exponencial de los ciclos**

Al final del primer ciclo, ambas hebras de una molécula bicatenaria de ADN a las que se les hayan apareado los iniciadores han sido copiadas para generar dos nuevas cadenas bicatenarias (fig 6). Cuando se repite por segunda ocasión el ciclo de tres pasos, las dos moléculas del primer ciclo se copian para producir ahora cuatro moléculas. El tercer ciclo genera ocho moléculas (Barrera, 2004).

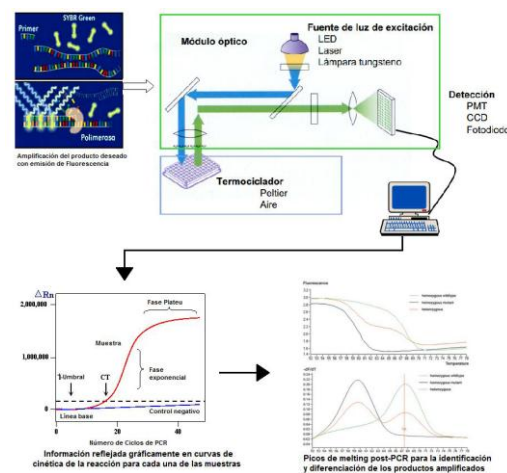


**Figura 6** Nuevas cadenas bicatenarias de ADN(Barrera, 2004)

En teoría, 20 ciclos producirán aproximadamente un millón de copias de la molécula molde de ADN, y 30 ciclos generarán alrededor de mil millones de copias de ésta.

Hay que tener en cuenta que la enzima sufre el efecto meseta que describe la atenuación en la tasa de la acumulación del producto, reflejándose esto en que después de un número determinado de ciclos la amplificación deja de comportarse de manera exponencial, volviéndose aritmética, y finalmente llega a una fase estacionaria. Afortunadamente, cuando el efecto meseta se presenta, la cantidad de ADN sintetizado es suficiente para su posterior utilización (Barrera, 2004).

- a. **RT PCR** Dado que el RNA usualmente es de una sola hebra y es sensible al calor, es necesario hacer una transcripción reversa (RT) antes de iniciar la amplificación por PCR. La transcripción reversa genera una copia de la hebra de RNA, pero esta copia es DNA complementario (cDNA) el cual es estable al calor y puede resistir la metodología PCR (Martínez & Silva, 2004).
- b. **PCR en tiempo real (RT-PCR).**-Es una técnica que amplifica y cuantifica un fragmento de ADN específico, que es observado en tiempo real mediante la detección de una señal fluorescente emitida durante la amplificación.



**Figura 7** Mecanismo de detección y lectura de los resultados con PCR en tiempo real (Vasco, 2013)



La PCR en tiempo real 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”). Se ha reportado que la sensibilidad de RT-PCR es cuatro veces mayor que PCR convencional (Vasco, 2013).

- c. **PCR anidada o nested:** Se trata de una técnica que aumenta la sensibilidad de la PCR. En este caso se trabaja con 4 cebadores, en una primera ronda se amplifica de manera convencional con los dos cebadores más externos a la región que se desea amplificar. El producto de este primer PCR se utiliza como molde para una segunda ronda que utiliza cebadores internos a la región previamente amplificada. La desventaja de esta técnica es la posibilidad aumentada de contaminación, y además no permite cuantificar la cantidad inicial de ADN molde presenta en la muestra analizada (Saceda, 2016).
  
- d. **PCR in situ:** La PCR in situ consiste en una reacción de PCR en secciones histológicas o células, donde los productos generados pueden visualizarse en el sitio de amplificación. Es realizada sobre preparaciones fijas en un portaobjetos. En la técnica de PCR in situ se realiza una primera amplificación de ADN blanco y luego detección mediante hibridación in situ convencional con sondas de ADN/ARN.
  
- e. **PCR múltiplex:** PCR en la cual se amplifica más de una secuencia en una misma reacción. Emplea dos o más pares de cebadores en un único tubo con el fin de amplificar simultáneamente diferentes fragmentos de ADN. Consiste en combinar en un único tubo de reacción todos los pares de cebadores de las secuencias que queremos amplificar, junto con el resto de los reactivos de la reacción en cantidades suficientes. Sus ventajas: se obtiene la información de varios locus en una sola reacción, requiere menor cantidad de molde para el análisis y menor cantidad de reactivos. Los

ejemplos de PCR múltiplex son muy comunes en el diagnóstico de agentes infecciosos, donde se intenta amplificar varios tipos virales en el mismo tubo y al mismo tiempo (ej. Amplificación de Herpes Virus en muestras biológicas)(Erlich, 1989).

### 2.1.13 Control

La babesiosis se puede erradicar mediante la eliminación de las garrapatas de los huéspedes con tratamiento del ganado bovino cada 2 o 3 semanas a base de acaricidas. En los países en los que la erradicación no es viable, el control de las garrapatas puede disminuir la incidencia de la enfermedad, las modificaciones ambientales puede destruir el hábitat de las garrapatas pero, en algunos casos, esto puede resultar difícil e indeseable desde el punto de vista ecológico (Góes et al., 2008).

En algunos países, las cepas vivas atenuadas de *B.bovis*, *B. bigemina* o *B. divergens* se utilizan para vacunar a los bovinos. Estas vacunas presentan problemas de seguridad, tales como su potencial de virulencia en animales adultos, posible contaminación con otros patógenos y reacciones de hipersensibilidad a las proteínas sanguíneas. Es mejor utilizarlas en animales menores de un año para minimizar el riesgo de que contraigan la enfermedad.

Los animales se pueden vacunar al comienzo de un brote, la utilización de ganado bovino genéticamente resistente, como *Bos. indicus*, también puede disminuir la incidencia de la enfermedad. 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 (Bremo Alvarado, 2012).

La quimioprofilaxis con un fármaco (imidocarb) puede proteger a los animales contra la enfermedad clínica y, a la vez, permitir una respuesta inmunológica. No obstante, los residuos en la leche y la carne son preocupantes, los desinfectantes y la higiene, en general, no resultan eficaces contra la

propagación de la babesiosis, es preciso tomar la precaución de no transferir sangre de un animal a otro (Brema Alvarado, 2012).

### 2.1.14 Tratamiento

El control de la babesiosis bovina se puede realizar mediante la inmunización, drogas antibabesiales o por una combinación de estas. En zonas endémicas, los animales enfermos deben ser tratados con un fármaco eficaz tan pronto como sea posible (Madrid, Fuentes, Romero, & Álvarez, 2012).

**Cuadro 2** Fármacos utilizados para el tratamiento de Babesiosis

Principio Activo	Babesia spp.	Dosis	Vía	Uso actual	Referencia
Imidocarb	B.bovis B.bigemina B. divergens B. caballi	1-3mg /kg	IM SC	SI	Kuttler, K.1981
Aceturato de diminazeno	B.bovis B.bigemina B. divergens B. caballi	3-5mg/kg	IM	SI	Kuttler, K.1982
Nerolidol	B.bovis B.bigemina B. ovata B. caballi	10µM 25µM	-	En estudio	AbouLaila,M.et al.,2010c
Artesunate	B.bovis B.gibsoni B. caballi B. microti	2.6µM 10µM ml 10mg/kg	-	En estudio	Goo, Y. Et al.,2010
Triclosan	B.bovis B.bigemina B. caballi	100µg/ ml 50µg ml	-	En estudio	Bork, S. et al., 2013
Epoxomicin	B.bovis B.bigemina B. ovata B. caballi B. microti	10nM 5nM 0.05- 0.5mg/kg	-	En estudio	AbouLaila,M.et al.,2010b
Gossypol	B.bovis	100Mm	-	En estudio	Bork, S. et al., 2004
Atovaquone	B. divergens	1mg/Kg	-	En estudio	Pudney, M et al., 1997

IM: Intramuscular; SC: Subcutáneo

Fuente. Vasco, 2013

Durante el tratamiento 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. En el Cuadro 2 se describen los fármacos antibabesiales desarrollados para el tratamiento de la babesiosis bovina citados por (Vasco, 2013).

## **2.2 GÉNEROS DE GARRAPATAS**

Las garrapatas son ácaros pertenecientes al Phylum Artrópoda Subphylum Chelicerata, Clase Aracnoidea, Orden Acari, Suborden Ixodoidea; el cual se divide en tres familias: Ixodidae, Argasidae y Nutalliellidae. Dentro del Orden Acari los individuos se caracterizan por tener el cefalotórax y el abdomen fusionados. Son ectoparásitos obligados, no permanentes de vertebrados de sangre caliente y fría. Todas las especies son hematófagas exclusivas en todos los estadios de desarrollo (Alvarez Calderón, Hernández Fonseca, & Hernández Gamboa, 2005).

Su importancia radica en que tienen la capacidad de parasitar vertebrados domésticos, silvestres y al hombre, lo cual puede resultar en problemas sanitarios para sus hospedadores como debilitamiento, disminución de la producción, daños en las pieles, problemas alérgicos, inoculación de toxinas causantes de parálisis temporales, aumento en los costos de producción, problemas ambientales por los productos químicos que se utilizan en el control, desarrollo de resistencia, residuos en los productos de consumo humano de origen animal y muerte del hospedador (Alvarez Calderón et al., 2005).

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 (Guglielmone A A & Nava S, 2005).

Alrededor del mundo se han descrito cerca de 870 especies de garrapatas, todas agrupadas en el suborden Ixodida, el cual está dividido en tres familias Ixodidae, Argasidae y Nuttalliellidae (Faccioli, 2011)

### 2.2.1 Suborden Ixodida

#### a. Subfamilia Ixodidae

El dimorfismo sexual es la característica de los ixódidos, a traviesan por cuatro estadios: huevo, larva, ninfa y adulto; Tienen sólo un estadio ninfal. Cada etapa requiere de varios días para ingerir sangre, las ninfas y hembras solo se alimentan una vez, las hembras producen una gran masa de huevos y mueren, pero la mayoría de las garrapatas de ésta familia requieren tres hospedadores diferentes que pueden o no ser de la misma especie (Faccioli, 2011).

Con frecuencia, larvas y ninfas se alimentan sobre pequeños y medianos mamíferos pájaros, roedores y conejos, mientras que los adultos se alimentan sobre especies mayores incluyendo perros, coyotes, panteras, osos y zorrillos (Hertz & Kaufman, 2014). Existen aproximadamente 702 especies en el mundo, son conocidas como garrapatas duras, el gnatosoma está compuesto por el hipostoma (utilizado para fijarse al huésped) y los palpos u órganos táctiles (Faccioli, 2011).

Entre las variedades tenemos:

- **Amblyomma.** Son garrapatas de tres huéspedes. Las especies de este género presentan un aparato bucal grande, la mayoría de sus miembros son ornados, algunos de ellos son poco específicos en su predilección por una especie de hospedero, muchas de las especies presentes están vinculadas a la fauna silvestre y algunas especies están involucradas en la transmisión de enfermedades de alto riesgo para los humanos y los animales (Alvarez Calderón et al., 2005).



**Figura 8** Garrapata del género Amblyoma (Hertz & Kaufman, 2014)

- **Haemaphysalis.** Usualmente son garrapatas pequeñas con un dimorfismo sexual poco acentuado. No poseen ojos, con la base del gnatosoma de forma cuadrangular. Se encuentran parasitando, sobre todo, animales silvestres (Alvarez Calderón et al., 2005).



**Figura 9** Garrapata del género Haemaphysalis (Storey, 2015)

- **Ixodes.** Son garrapatas sin ornamentos, carecen de ojos, no presentan festones. El surco anal está claramente definido y curvado anteriormente alrededor del ano. Presenta un dimorfismo sexual muy marcado, algunas especies están vinculadas con la transmisión de enfermedades de alto riesgo como borreliosis (Alvarez Calderón et al., 2005).



**Figura 10** Garrapata del género *Ixodes* (Plonsky, 2005)

- **Anocentor.** Posee solo una especie, *Anocentor nitens*. Es una especie sin ornamentos ni placas ventrales, sus pedipalpos son cortos y la dentición del hipostoma presenta un 4/4, poseen festones. Sus placas estigmatales muestran glóbulos grandes claramente definidos. Muestra una alta especificidad por los equinos y está vinculada con la transmisión de enfermedades a estos (Alvarez Calderón et al., 2005).
- **Boophilus o Rhipicephalus.** No presenta ornamentos, con un dimorfismo sexual claramente definido. El aparato bucal es pequeño. Los machos presentan un proceso caudal característico. Es la garrapata de mayor distribución y está asociada con la transmisión de babesiosis y anaplasmosis a los bovinos (Alvarez Calderón et al., 2005).



**Figura 11** Garrapatas del género *Rhipicephalus* (Faccioli, 2011)

*Rhipicephalus*. (*B*) *microplus* es una garrapata específica del bovino, a los cuales infesta severamente. Los hallazgos sobre otros

hospedadores, incluido el hombre, son frecuentes, pero esta garrapata dependería de la presencia de vacunos para su subsistencia (Faccioli, 2011).

- **Dermacentor.** Son garrapatas usualmente ornamentadas, con la base del gnatosoma de forma rectangular. Poseen ojos y festones. Están asociadas con la transmisión de enfermedades al ser humano y a los animales (Alvarez Calderón et al., 2005).



**Figura 12** Garrapatas del género *Dermacentor* (Discoverlife.org, 2004)

### b. Subfamilia Argasidae

El carecer de escudo quitinoso es su característica principal, se las conoce como garrapatas blandas, con aproximadamente 193 especies en el mundo (Guglielmone A A & Nava S, 2005). Anatómicamente el gnatosoma se coloca ventralmente, subterminal o invisible cuando se mira el ejemplar por el dorso (a diferencia de Ixodidae); en las larvas siempre es terminal. Los palpos son cilíndricos. El idiosoma tiene los bordes continuos y carece de escudo dorsal (Faccioli, 2011).

Esta subfamilia presenta la cutícula estriada y mamelonada regularmente o presenta foseas ovales o circulares. La cara ventral presenta varios detalles de valor sistemático: abertura genital con forma de incisura transversa en las hembras y semilunar o en herradura en machos; abertura anal o nefrostoma (por detrás de la mitad del cuerpo); peritremas entre las coxas del tercer y cuarto par de patas de cada lado, circulares o semilunares. Toda la superficie



ventral está surcada por profundas y definidas depresiones o surcos. En cuanto a las patas, en las coxas del primer par de patas se abre el orificio excretor de las glándulas coxales que cumplen funciones de osmorregulación (Faccioli, 2011)

El patrón de alimentación incluye diversos hospedadores, con varios estadios ninfales, adultos que ingieren sangre en varias ocasiones, seguida cada una de ellas por la producción de huevos o de esperma (Guglielmo A A & Nava S, 2005). En general, el ciclo de vida comprende los estadios de huevo, larva, ninfas, adulto (macho y hembra).

- **Ornithodoros.** La cutícula presenta discos y mamilas. No presenta línea de sutura que separe la superficie dorsal de la ventral. Presenta un hipostoma bien desarrollado en todos los estadios(Alvarez Calderón et al., 2005).

### c. Subfamilia Nuttalliellidae

Presentan características intermedias de las dos familias anteriores, representada por una única especie africana, *Nuttalliella namaqua* de la cual solo se registraron ninfas y hembras(Faccioli, 2011).

## **3 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1 MATERIALES**

#### **3.1.1 De Campo**

- 98 bovinos de diferente edad, raza y sexo
- Jeringas de 10 ml
- Tubos Vacutainer para recolección de sangre con EDTA
- Capuchón
- Agujas hipodérmicas
- Termo o cooler
- Frascos plásticos de boca ancha
- Lápiz dermatográfico
- Guantes de manejo (látex)
- Equipo de sujeción del animal (sogas de 6 m y de 9 m y nariguera)
- Etanol al 96%
- Alcohol, algodón
- Overol
- Botas de caucho
- Registros de campo
- Encuestas
- Cámara fotográfica
- Lanceta de laboratorio
- Portaobjetos para frotis

#### **3.1.2 De laboratorio**

- Mandil
- Cajas petri
- Estereomicroscopio
- Clave dicotómica para garrapatas (Faccioli, 2011)
- Pipeta plástica
- Pinza anatómica

- Pinza entomológica
- Algodón
- Lápiz dermatográfico
- Colorante Giemsa
- Marcos y frascos de tinción
- Alcohol metílico
- Agua destilada
- Aceite de inmersión
- Microscopio
- Kit de extracción de ADN, **PureLink Genomic DNA kits** (Invitrogen).
- Etanol de grado molecular al 96%
- Vórtex disruptor genic
- Microcentrífuga 5415D (Eppendorf)
- Baño maría (Mettler)
- Tubos de microcentrífuga 2 ml
- Cámara de bioseguridad (Labconco-Purifier clase II)
- KIT PCR Applied biosystems™
- Agua
- Primers específicos para *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*(Figuerola, Chievas, Johnson, & Buening, 1993)
- Bloques de hielo para tubos de PCR
- Tubos de PCR de 0,2 ml
- ADN de *Babesia bigemina* y *Babesia bovis* (Controles positivos)
- Termociclador punto final Applied biosystems™
- Autoclave
- Estufa
- Micropipetas y puntas de pipetas desechables 0.5-10 µl, 20-100 µl, 100-1000µl
- Agarosa (Invitrogen®)
- Solución tampón TAE 1X
- SYBR® Safe DNA gel stain
- Track it™ 100 bp DNA Ladder (Invitrogen®)
- Cámara de Electroforesis (Enduro y Bio Rad)
- Fuente de poder Bio Rad

- Fotodocumentador y trasn iluminador Labnet
- Balanza analítica Traveler TA150L
- Puntas de pipetas desechables 0.5-10  $\mu$ l
- Parafilm®
- 10X Blue juice™

### **3.1.3 De oficina**

- Computadora
- Libreta de apuntes
- Impresora
- Internet

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Ubicación del Área de Estudio

La presente investigación se desarrolló en los cantones El Pangui, Yantzaza y Yacuambi de la provincia de Zamora Chinchipe, en el sector norte que presenta una superficie de 10.556 km<sup>2</sup>, orografía montañosa única que la distingue del resto de provincias amazónicas ("Maravillas Ecuatorianas," s.f.), y que cuenta con la siguientes características meteorológicas.

**Cuadro 3** Características meteorológicas de los cantones del Norte de la provincia de Zamora Chinchipe

CARACTERÍSTICAS	EL PANGUI	YANTZAZA	YACUAMBI
Altitud	748 msnm hasta los 2178 msnm.	887 m s. n. m.	entre 885 y 3.805 m.s.n.m.
Temperatura	20 °C y 24 °C	17°C a 23°C	21.7 °C.
Clima	Cálido y húmedo	Cálido y húmedo	Cálido y húmedo
Precipitación	1828 mm al año.	1959 mm	2111 mm.
Humedad	90%	90%	90%

Fuente: I. Municipio de los cantones El Pangui, Yantzaza y Nangaritzza ("Zamora Chinchipe", 2016)



**Figura 13** Mapa político de la provincia de Zamora Chinchipe ("Cantones de Zamora Chinchipe 2011 - Zamora Chinchipe", 2016)

### 3.2.2 Tamaño de la Población

La población bovina de los cantones El Pangui, Yantzaza, Yacuambi pertenecientes al sector norte de la provincia de Zamora Chinchipe está constituida por 31556 bovinos (Instituto Nacional de Estadística y Censos, 2000) de diferentes edades razas y sexo, donde se extrajo estadísticamente una muestra para su estudio.

### 3.2.3 Tamaño de la Muestra

El tamaño de la muestra se calculó en base a la siguiente fórmula matemática

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

Donde:

N = tamaño de la población

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 %)

Teniendo en cuenta que la población bovina de este sector que es 31556 animales; y que la probabilidad de prevalencia del parasito es de 50 %, y un error de precisión permitido de 10 %; la fórmula se desarrolló de la siguiente forma:

$$n = \frac{(31556)1,96^2 * 0,5(1 - 0,5)}{(31556 - 1)0,1^2 + 1,96^2 * 0,5(1 - 0,5)} = 96$$

Por lo tanto, el tamaño de la muestra fue de 96 bovinos seleccionados de forma aleatoria en todo el sector norte de la provincia.

### 3.2.4 Variables a Evaluar

Se consideraron las siguientes variables:

- Prevalencia de *Babesia spp.* por Giemsa
  - Sexo
  - Edad
  - Cantón
  - Raza
- Prevalencia de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* por nPCR
  - Sexo
  - Edad
  - Cantón
  - Raza
- Identificación de géneros de garrapatas existentes
- Análisis epidemiológico de la enfermedad

### 3.2.5 Análisis Estadístico

La información recopilada se tabuló y 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

### 3.2.6 Selección de Fincas

Las muestras fueron seleccionadas aleatoriamente en los tres cantones del sector Norte de la provincia de Zamora Chinchipe de la siguiente manera:

**Cuadro 4** Sectores de toma de muestras

NORTE	Cabezas	Factor	Muestra	Fincas	Factor	Muestra
Yacuambi	12924	0,00304221	39	647	0,02305085	15
El Pangui	7555	0,00304221	23	311	0,02305085	7
Yantzaza	11077	0,00304221	34	517	0,02305085	12
<b>Total</b>	<b>31556</b>	<b>0,00304221</b>	<b>96</b>	<b>1475</b>	<b>0,02305085</b>	<b>34</b>

### **3.2.7 Recolección de las Muestras de Sangre**

Las muestras se tomaron asépticamente de la vena yugular y coxígea en tubos vacutainer con EDTA, se realiza movimientos suaves de la sangre con el EDTA para que puedan mezclarse, luego las colocamos en un termo frío para luego ser llevadas a su análisis en el laboratorio de Diagnóstico Veterinario de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, así mismo las muestras fueron transportadas al laboratorio de Biología Molecular en el Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

### **3.2.8 Recolección de Garrapatas**































De cada animal seleccionado para la extracción de sangre se recolectaron garrapatas de diferente tamaño en una cantidad de 20 garrapatas por cada finca. Las garrapatas se colocaron en frascos con paños húmedos y con tapas agujereadas manteniendo así un medio de conservación de las mismas, hasta llegar al laboratorio y ser clasificadas por su género, siguiendo la guía práctica de identificación de géneros (Solari et al., 2006)

### **3.2.9 Identificación de Géneros de Garrapatas**

Los géneros de garrapatas que existen en las ganaderías del sector norte de la provincia de Zamora Chinchipe se clasificaron e identificaron de acuerdo con la guía manual de identificación de garrapatas (Solari et al., 2006), con la ayuda del estereoscopio y la pinza anatómica se logró observar las características propias de cada género de garrapatas, cuyos datos se registraron en el respectivo anexo.



**Cuadro 5** Características individuales de los géneros de garrapata

	ROSTRO	ESCUDO	OJOS	SURCO ANAL	FESTONES	COXATI	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)

### 3.2.10 Realización de Frotis Sanguíneos

Con la ayuda de una lanceta de laboratorio se extrajo una gota de sangre de la oreja del bovino, dejamos caer la gota de sangre sobre un portaobjetos y con otro portaobjetos se extendió la sangre, el extendido debe presentar una punta de cola, luego se dejó secar el frotis sanguíneo.

### 3.2.11 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
6. Observar al microscopio con aceite de inmersión y lente de 100X.

### 3.2.12 Técnica de Extracción de ADN (con el Kit Pure link® genomic).

Procedimiento:

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.

### 3.2.13 Verificación de Calidad del ADN

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

Para comenzar, se debe limpiar las superficies ópticas superiores e inferiores del sistema de espectrofotómetro con un paño limpio adecuado.

Colocar 1  $\mu$ l de agua desionizada limpia en la superficie inferior óptica.

Cierre el brazo de palanca, asegurando que el pedestal superior entra en contacto con el agua desionizada.

Levante el brazo de palanca y limpie tanto las superficies ópticas con un paño limpio, seco y sin pelusa, un paño de laboratorio.

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  $\mu$ l 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.

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.

Elija la constante apropiada para la muestra que se va a medir.

Colocar 1  $\mu$ l del extracto de ADN y correr la muestra. Visualizar en el monitor la calidad de ADN de la muestra.

### 3.2.14 Realización de los Ensayos de nPCR

#### a. nPCR *Babesia bovis*

Para la realización de la nPCR de *Babesia bovis* se utilizaron los cebadores descritos por (Figuerola et al., 1993), con los que se amplifica un fragmento de ADN correspondiente al gen *Rap1* de *B. bovis*.

**Cuadro 6** Cebadores utilizados para *Babesia bovis*

Etapa	Cebadores Externos	Etapa	Cebadores internos
PCR 1	5'-CACGAGGAAGGAACTACCGATGTTGA-3'	PCR2	5'-TCAACAAGGTACTCTATATGGCTACC3'
	5'-CCAAGGAGCTTCAACGTACGAGGTCA-3'		5'CTACCGAGCAGAACCTTCTTCACAT 3'

En la primera etapa se amplifica un fragmento de 356pb y en la segunda etapa se amplifica un fragmento de 291pb.

Las dos etapas (PCR<sub>1</sub> y PCR<sub>2</sub>) se realizaron en una mezcla de reacción de 25µl. La mezcla contenía 1X Platinum DNA taq polymerase (Applied), 1µl de cada uno de los cebadores. En el PCR<sub>1</sub> se utilizó 1µl de ADN de *Babesia bovis* (control positivo) y en el PCR<sub>2</sub> se utilizó 1µl del producto del PCR<sub>1</sub>. Como control positivo se estandarizó ADN *B. bovis* con 291pb, de las muestras positivas a Giemsa

El programa de amplificación para los dos PCR: un ciclo de 95 °C/2 min., 35 ciclos de 95°C/1 min., 55°C/1 min., 73°C/1.5 min, y una extensión final de a 73 °C/15 min.

#### b. nPCR *Babesia bigemina*

Para la realización de la nPCR para *Babesia bigemina* se utilizaron los cebadores descritos por (Figuerola et al., 1993), con los que se amplifica un fragmento de ADN correspondiente al gen *Rap1* de *B. bigemina*.

### Cuadro 7 Cebadores utilizados para *Babesia bigemina*

Etapa	Cebadores Externos	Etapa	Cebadores internos
PCR 1	5'- 'CATCTAATTTCTCTCCATACCCCTCC -3'	PCR2	5'-CGCAAGCCCAGCACGCCCCGGTGC-3'
	5'-CCTCGGCTTCAACTCTGATGCCAAAG 3'		5' CCGACCTGGATAGGCTGTGTGATG3'

En la primera etapa se amplifica un fragmento de 278pb y en la segunda etapa amplifica un fragmento de 170pb, dicho fragmento se estandarizó como control positivo.

Se utilizaron mezclas de reacción similares a las antes descrita. El programa de amplificación para el PCR<sub>1</sub>: un ciclo de 95 °C/2 min., 35 ciclos de 95°C/1 min., 52 °C /1 min., y 72 °C/1 min. Y una extensión final de a 72 °C/10 min. Para el PCR<sub>2</sub>: un ciclo de 95 °C/2 min., 35 ciclos de 95°C/1 min., 58 °C /1 min., y 72 °C/45 seg. Y una extensión final de a 72 °C/10 min.

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

#### 3.2.15 Técnica de PCR y nPCR

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

##### Preparación de primers

- A 100 µl del primer mamá se le agregó 1000 µl de agua ultra pura.
- Del primer mamá se tomó 10 µl y se añadió 90 µl de agua ultra pura.

##### a. Mix PCR *Babesia bovis*

En *Babesia bovis* se utilizó los primers 1 y 2 para la primera PCR y los primer 3 y 4 para la segunda PCR o PCR anidada. A continuación presentamos los reactivos con se colocaron en la mix con sus cantidades:

**Cuadro 8** Mix para PCR de *Babesia bovis*

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad (µl)</b>
Enzima	12.5
GC Enhancer	2.0
Primer 1	1.0
Primer 2	1.0
Agua ultra pura	7.5

Se recomienda centrifugar esta preparación por al menos 10 segundos a 10000 rpm para mejorar la mezcla de los componentes.

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

Luego 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 *Babesia bovis***

Una vez preparados los primers 3 y 4 del mismo modo en que se prepararon los primers 1 y 2, se realiza el mix que se utilizara en este proceso.

**Cuadro 9** Mix para nPCR de *Babesia bovis*

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad(µl)</b>
Enzima	12.5
GC Enhancer	2.0
Primer 3	1.0
Primer 4	1.0
Agua ultra pura	7.5

Para realizar la nPCR se toma 1 µl del producto de la primera PCR y se lo diluye añadiéndole 9 µl de agua ultra pura, de esta mezcla tomamos 1uL y le

añadimos 24 µl del mix antes preparado y se lleva al Termociclador para su amplificación.

**Cuadro 10** Ciclos y temperaturas para PCR y nPCR *Babesia bovis*

PROCESO	TIEMPO(min)	TEMPERATURA(°C)
PCR y nPCR	2	95
	1	95
	1	55
	1,5	73
	15	73
	∞	4

### c. Mix PCR *Babesia bigemina*

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

**Cuadro 11** Mix para PCR de *Babesia bigemina*

Reactivo	Cantidad(µl)
Enzima	12.5
GC Enhancer	2.0
Primer 5	1.0
Primer 6	1.0
Agua ultra pura	7.5

La preparación se centrifuga por 10 segundos a 10000 rpm para mejorar la mezcla de los componentes.

Luego de la preparación del mix se toma 1 µl del 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.

**d. Mix nPCR *Babesia bigemina***

**Cuadro 12** Mix para nPCR de *Babesia bigemina*

Reactivo	Cantidad( $\mu$ l)
Enzima	12.5
GC Enhancer	2.0
Primer 7	1.0
Primer 8	1.0
Agua ultra pura	7.5

Para realizar la nPCR se toma 1  $\mu$ l del producto de la primera PCR y se lo diluye añadiéndole 9  $\mu$ l de agua ultra pura, de esta mezcla tomamos 1ul y le añadimos 24  $\mu$ l del mix antes preparado y se lleva al Termociclador para su amplificación.

**Cuadro 13** Ciclos y temperaturas para PCR y nPCR *Babesia bigemina*

PROCESO	TIEMPO(min)	TEMPERATURA( $^{\circ}$ C)
PCR	2	95
	1	95
	1	52
	1	72
	10 min	72
	$\infty$	4
nPCR	2	95
	1	95
	1	58
	45 seg	72
	10	72
	$\infty$	4



### e. Electroforesis

Para electroforesis preparamos 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 calienta en microondas por 1 minuto aproximadamente y se le añade 8  $\mu$ l de SYBR® Safe DNA gel stain Invitrogen. Se coloca en la cámara de electroforesis BioRad, ubicamos los peines para la formación de pocillos y se deja enfriar hasta que el gel solidifique.

Una vez que el gel esté solidificado se procede a llenar la cámara de electroforesis con TAE 1x al cual se le añade 15  $\mu$ l de SYBR® Safe DNA gel stain Invitrogen y se deja incubar a temperatura ambiente.

Por otro lado colocamos sobre el mesón de trabajo papel parafilm, en este haremos la mezcla de los productos que irán a los pocillos del gel de agarosa en la siguiente relación.

Marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder de Invitrogen: 2  $\mu$ l de 10X Blue Juice™ Invitrogen + 2  $\mu$ l de marcador de peso Molecular Trackit™ Invitrogen.

Productos de PCR: 2  $\mu$ l de 10X Blue Juice™ Invitrogen + 6  $\mu$ l de productos de PCR.

Controles: 2  $\mu$ l de 10X Blue Juice™ Invitrogen + 6  $\mu$ l de productos de control positivo, negativo y mix.

Luego de cargar el contenido de los productos de nPCR 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.

Una vez que haya 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.

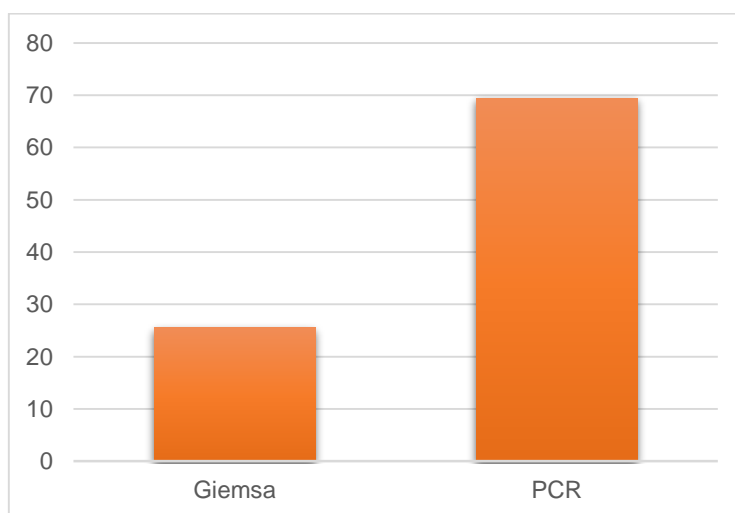
## 4 RESULTADOS

### 4.1 PREVALENCIA TOTAL DE *Babesia spp.*

En el Cuadro 14 se observa la prevalencia total de *Babesia spp.*, que se obtuvo por las técnicas de Giemsa y nPCR.

**Cuadro 14** Prevalencia Total de *Babesia spp.*, en bovinos del sector Norte de la provincia de Zamora Chinchipe

TÉCNICA	RESULTADOS				
	Muestras	Positivos	Porcentaje (%)	Negativos	Porcentaje (%)
Giemsa	98	25	26	73	74
nPCR	72	50	69,4	22	31



**Figura 14** Prevalencia Total de *Babesia spp.*, en bovinos del sector Norte de la provincia de Zamora Chinchipe (%)

Por la técnica de Giemsa se analizaron 98 muestras de sangre bovina, de las cuales 25 resultaron positivas a *Babesia spp.*, representando el 26%; mientras que 73 muestras fueron negativas (74%).

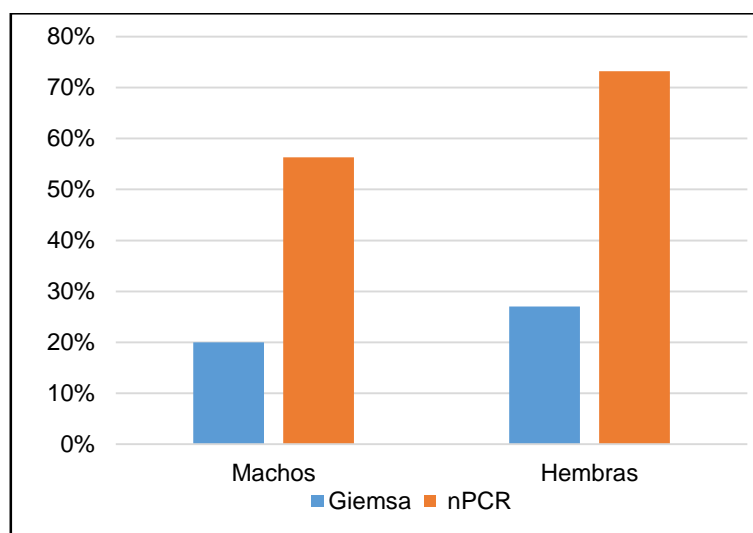
A través de la técnica de nPCR se analizaron 72 muestras, 50 de estas muestras dieron resultado positivo representando el 69,4%; las 22 muestras restantes (31%) fueron negativas.

#### 4.1.1 Prevalencia de *Babesia spp.*, por Sexo

En el Cuadro 15 se muestra la prevalencia de *Babesia spp.*, por sexo que se obtuvo aplicando las técnicas de diagnóstico Giemsa y nPCR.

**Cuadro 15** Prevalencia de *Babesia spp.*, por sexo en bovinos del sector Norte de la provincia de Zamora Chinchipe

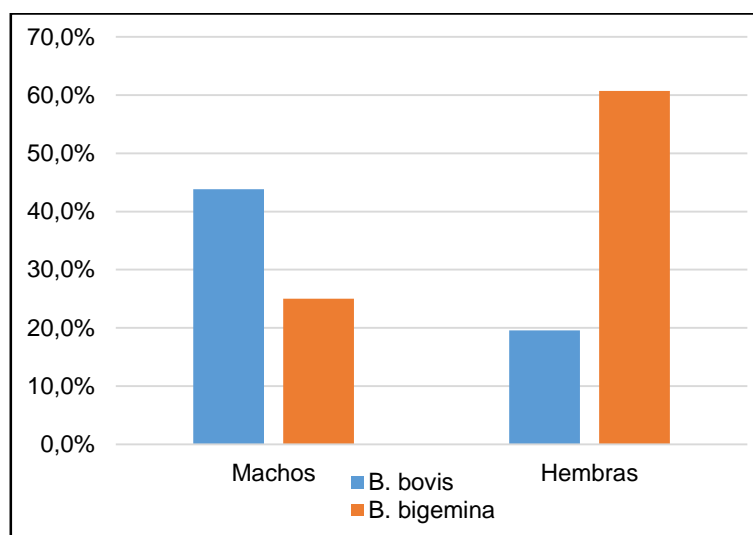
Sexo	Técnica de Diagnóstico									
	Giemsa			PCR						
	Muestras	Positivas	%	Total			<i>B. bovis</i>		<i>B. bigemina</i>	
				Muestras	Positivas	%	Positivas	%	Positivas	%
<b>Machos</b>	25	5	20	16	9	56,3	7	43,8	4	25
<b>Hembras</b>	73	20	27	56	41	73,2	11	19,6	34	60,7
<b>Total</b>	98	25	26	72	50	69,4	18	25	38	52,8



**Figura 15** Prevalencia de *Babesia spp.*, por sexo en bovinos del sector Norte de la provincia de Zamora Chinchipe

En esta variable el 20% de machos resultaron positivos por la técnica de Giemsa y 56,3% a la técnica de nPCR; mientras que el 27% de hembras resultaron positivas a Giemsa y 73,2 % a la técnica de nPCR. De acuerdo a los

resultados por especie de *Babesia* en machos se obtuvo 43,8% de muestras positivas a *B. bovis* y 25% de muestras positivas a *B. bigemina*. Y, en hembras el 19,6% resultaron positivas a *B. bovis* y 60,7% a *B. bigemina*, Siendo los machos más afectados con *B. bovis* y las hembras con *B. bigemina*.



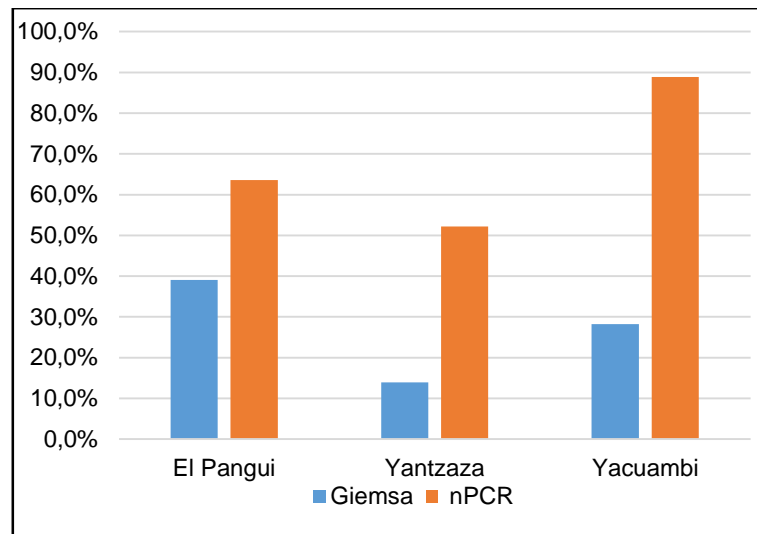
**Figura 16** Prevalencia de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*., por sexo en bovinos del sector Norte de la provincia de Zamora Chinchipe

#### 4.1.2 Prevalencia de *Babesia spp.*, por Cantón

En el Cuadro 16 se detallan los resultados de acuerdo al lugar de procedencia por las técnicas de Giemsa y nPCR.

**Cuadro 16** Prevalencia de *Babesia spp.*, por cantón en bovinos del sector Norte de la provincia de Zamora Chinchipe

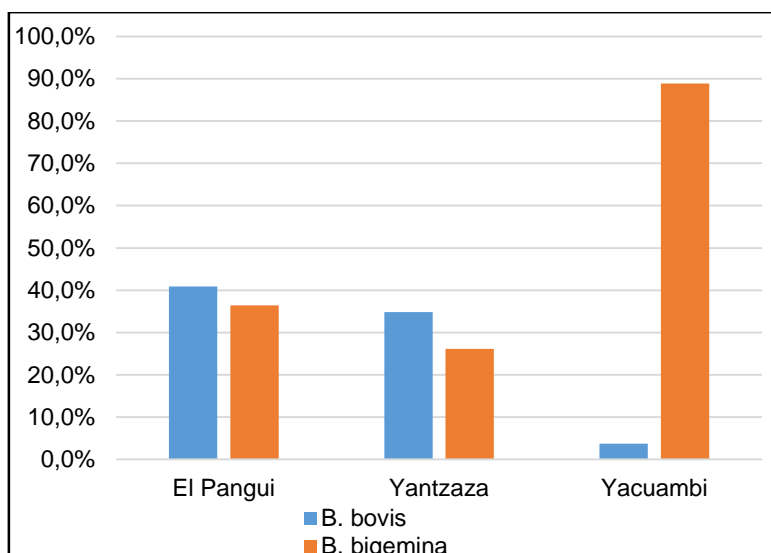
Cantones	Técnica de Diagnóstico									
	Giemsa			PCR						
				Total			<i>B. bovis</i>		<i>B. bigemina</i>	
	Muestras	Positivas	%	Muestras	Positivas	%	Positivas	%	Positivas	%
El Pangui	23	9	39,1	22	14	63,6	9	40,9	8	36,4
Yantzaza	36	5	13,9	23	12	52,2	8	34,8	6	26,1
Yacuambi	39	11	28,2	27	24	88,9	1	3,7	24	88,9
<b>Total</b>	<b>98</b>	<b>25</b>	<b>26</b>	<b>72</b>	<b>50</b>	<b>69,4</b>	<b>18</b>	<b>25</b>	<b>38</b>	<b>52,8</b>



**Figura 17** Prevalencia de *Babesia* spp., por cantón en bovinos del sector Norte de la provincia de Zamora Chinchipe

En los resultados por Cantones se evidenció que en el Cantón El Pangui 39,1% son positivas a la técnica de Giemsa y 63,6% a la técnica de nPCR; En el cantón Yantzaza resultaron positivas 13,9% a la técnica de Giemsa y 52,2% a nPCR; Finalmente en el cantón Yacuambi se obtuvo 28,2% de muestras positivas a Giemsa y 88,9 % positivas a nPCR.

Por especie de babesia en el cantón El Pangui 40,9% fueron positivas a *B. bovis* y 36,4% positivas a *B. bigemina*; para Yantzaza 34,8% resultaron positivas a *B. bovis* y 26,1% a *B. bigemina*; en el cantón Yacuambi 3,7% dieron positivo a *B. bovis* y 88,9% fueron positivas a *B. bigemina*; *B. bovis* tienen mayor presencia en el cantón El Pangui, en cambio *B. bigemina* afecta en mayor número a las ganaderías del cantón Yacuambi.



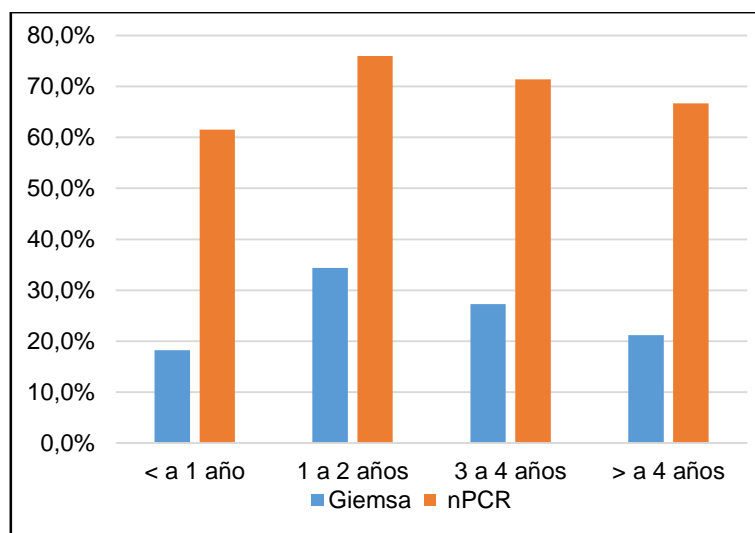
**Figura 18** Prevalencia de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*., por cantón en bovinos del sector Norte de la provincia de Zamora Chinchipe

#### 4.1.3 Prevalencia de *Babesia* spp., por Edad

Para analizar los datos por edad se clasificó a los bovinos en cuatro categorías de edades las cuales se detallan en el Cuadro 17

**Cuadro 17** Prevalencia de *Babesia* spp., por edad en bovinos del sector Norte de la provincia de Zamora Chinchipe

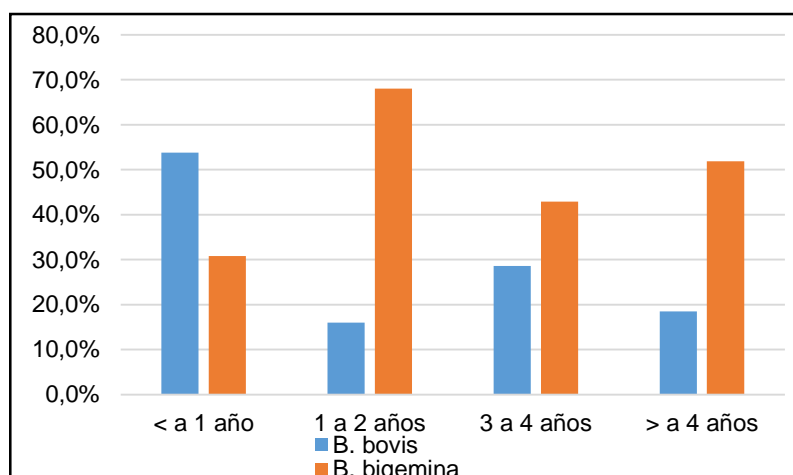
Edad	Técnica de Diagnóstico									
	Giemsa			PCR						
				Total			B. bovis		B. bigemina	
	Muestras	Positivas	%	Muestras	Positivas	%	Positivas	%	Positivas	%
< a 1 año	22	4	18,2	13	8	61,5	7	53,8	4	30,8
1 a 2 años	32	11	34,4	25	19	76	4	16	17	68
3 a 4 años	11	3	27,3	7	5	71,4	2	28,6	3	42,9
> a 4 años	33	7	21,2	27	18	66,7	5	18,5	14	51,9
<b>Total</b>	<b>98</b>	<b>25</b>	<b>26</b>	<b>72</b>	<b>50</b>	<b>69,4</b>	<b>18</b>	<b>25</b>	<b>38</b>	<b>52,8</b>



**Figura 19** Prevalencia de *Babesia spp.*, por edad en bovinos del sector Norte de la provincia de Zamora Chinchipe

En la categoría de menores a un año el 18,2% fueron positivas a Giemsa y 61,5% positivas a nPCR, así mismo en la categoría de uno a dos años 34,4% fueron positivas a Giemsa y 76% positivas a nPCR. En la categoría de tres a cuatro años se obtuvo 27,3% de positivas a Giemsa y 71,4% positivas a nPCR. Para finalizar en la categoría de mayor a cuatro años, se obtuvo 21,2% positivas a Giemsa y 66,7% positivas a nPCR.

Es evidente que el sector Norte de la provincia de Zamora Chinchipe *B. bovis* prevalece en mayor porcentaje en animales menores a un año con 53,8%, en cambio que *B. bigemina* prevalece en mayor porcentaje en animales entre uno y dos años con 68%.



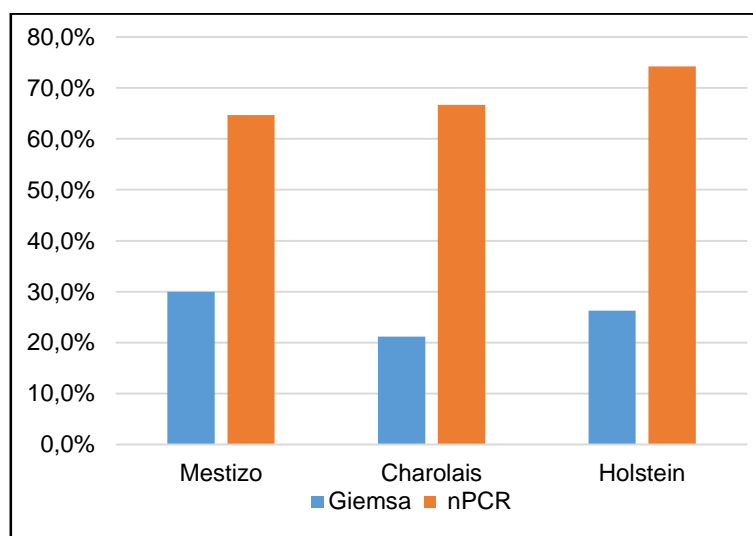
**Figura 20** Prevalencia de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*., por edad en bovinos del sector Norte de la provincia de Zamora Chinchipe

#### 4.1.4 Prevalencia de *Babesia* spp., por Raza

En el Cuadro 18 se especifica los resultados obtenidos por las técnicas de Giemsa y nPCR de acuerdo a la raza

**Cuadro 18** Prevalencia de *Babesia* spp., por raza en bovinos del sector Norte de la provincia de Zamora Chinchipe

Raza	Técnica de Diagnóstico									
	Giemsa			PCR						
				Total			<i>B. bovis</i>		<i>B. bigemina</i>	
	Muestras	Positivas	%	Muestras	Positivas	%	Positivas	%	Positivas	%
Mestizo	27	8	30	17	11	64,7	1	6	10	58,8
Charolais	33	7	21,2	24	16	66,7	8	33,3	11	45,8
Holstein	38	10	26,3	31	23	74,2	9	29	17	54,8
<b>Total</b>	98	25	26	72	50	69,4	18	25	38	52,8

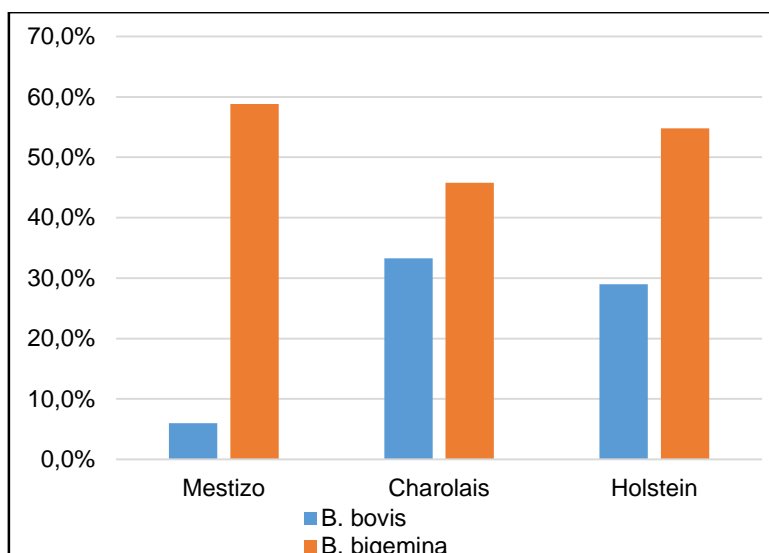


**Figura 21** Prevalencia de *Babesia* spp., por raza en bovinos del sector Norte de la provincia de Zamora Chinchipe

En los bovinos Mestizos 30% de muestras resultaron positivas a Giemsa y 64,7% a nPCR. En la raza charoláis se encontró 21,2% positivos a Giemsa mientras que 66,7% positivas a nPCR. En la raza holstein se obtuvo 26,3% positivas a Giemsa y 74,2% positivas a nPCR.

Podemos observar que *B. bovis* afecta más a la raza charoláis; mientras que *B. bigemina* afecta en mayor grado a los bovinos Mestizos





**Figura 22** Prevalencia de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*., por raza en bovinos del sector Norte de la provincia de Zamora Chinchipe

#### 4.1.5 Comparación de las pruebas diagnósticas

En el cuadro 19 se evidencia las comparaciones que existen entre la técnica Giemsa y la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa Anidada (nPCR), en el diagnóstico de *Babesia spp.*

**Cuadro 19** Comparación de las pruebas diagnósticas Giemsa y nPCR

Giensa	nPCR	Total	%
(-)	(-)	15	20,8
(-)	(+)	32	44,4
(+)	(-)	7	9,7
(+)	(+)	18	25
<b>TOTAL</b>		72	100

Se observa que el 44,4 % de las muestras es negativo para Giemsa pero positivo para nPCR, el 9,7 % de las muestras es negativo para nPCR, pero positivo para Giemsa; se concluye que existe 45,8 % de concordancia en el diagnóstico y 54,1 % de discordancia diagnóstica.

#### 4.2 GÉNEROS DE GARRAPATAS

El 100% de las garrapatas encontradas en los tres cantones pertenecen al género *Rhipicephalus microplus*

### 4.3 ANÁLISIS EPIDEMIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD

Con la finalidad de determinar los factores asociados a la presencia de *Babesia spp.*, en el Sector Norte de la provincia de Zamora Chinchipe, se aplicó una encuesta semiestructurada a los ganaderos con la finalidad de recabar información sobre el tema, cuyos resultados los presentamos a continuación.

#### 4.3.1 Sistemas de pastoreo

En la figura 23 se presenta los sistemas de pastoreo al cual están sometidos los bovinos en el sector norte de la provincia de Zamora Chinchipe, siendo el 50% el sistema de pastoreo al sogueo, seguido del 44% con el sistema de pastoreo libre y el 6% utiliza el sistema semiestabulado.

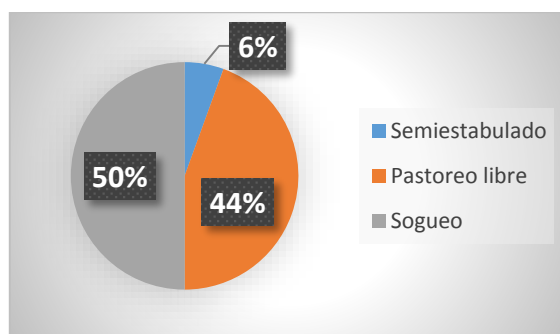
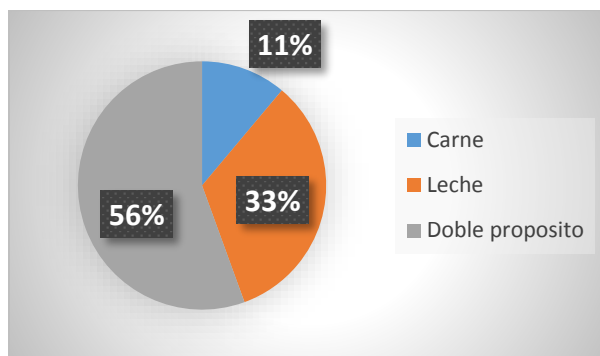


Figura 23 Sistemas de pastoreo

#### 4.3.2 Tipo de explotación ganadera

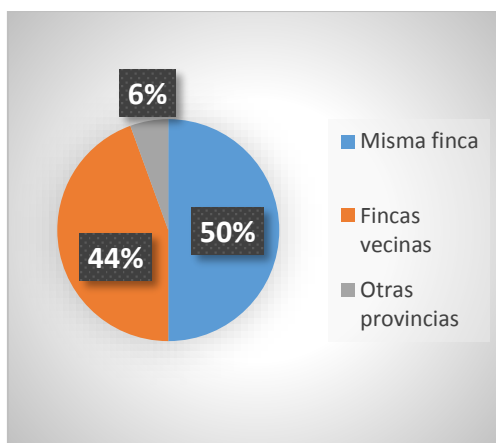
La figura 24 muestra el tipo de explotación ganadera donde el 56% corresponde a la ganadería de Leche, seguido por el 33% de carne y el 11% de doble propósito.



**Figura 24** Tipo de explotación ganadera

### 4.3.3 Procedencia del ganado

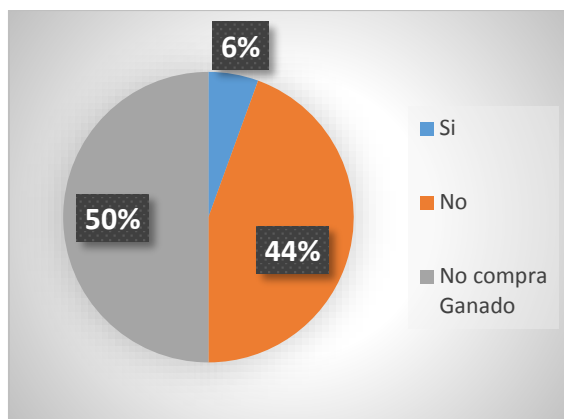
En la figura 25 se presenta los resultados de la procedencia del ganado, donde se pone de manifiesto que el 50% del ganado es producido en la misma finca, el 44% procede de las fincas vecinas y el 6% lo compran en otras provincias.



**Figura 25** Procedencia del ganado

### 4.3.4 Cuarentena

En la figura 26 se observa que el 50% de los ganaderos no compra ganado por lo que no realiza cuarentena, en cambio el 44% de ganaderos que compran su ganado en otras ciudades o fincas vecinas no realizan la práctica de cuarentena y tan sólo el 6% sí la realiza cuarentena.

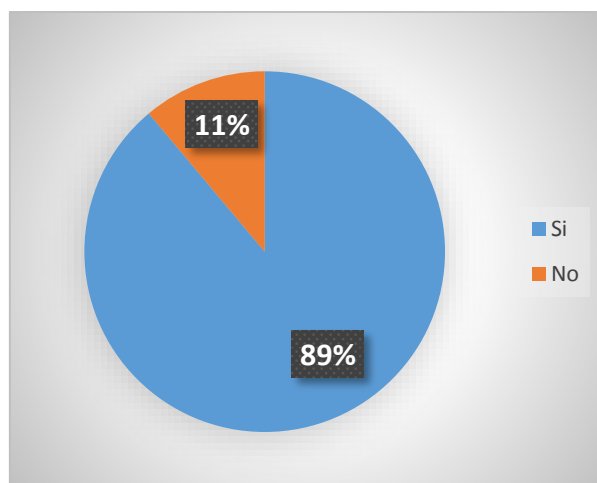


**Figura 26** Práctica de cuarentena

#### 4.3.5 Presencia de la Enfermedad

##### a. Conocimiento de la enfermedad

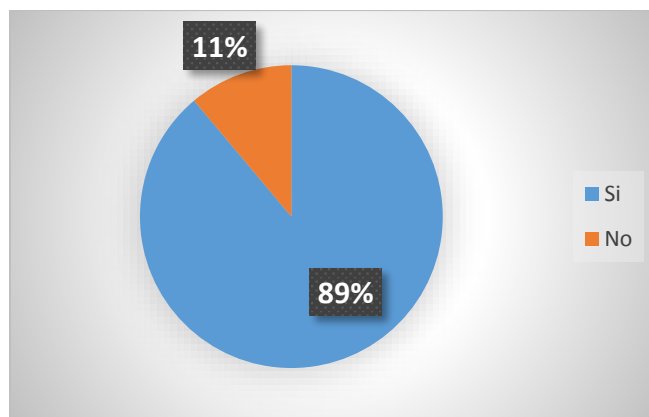
En la figura 27 se observa que el 89% de los ganaderos conocen la enfermedad mientras que el 11 % la desconocen.



**Figura 27** Conocimiento de la enfermedad

##### b. Presencia de la enfermedad

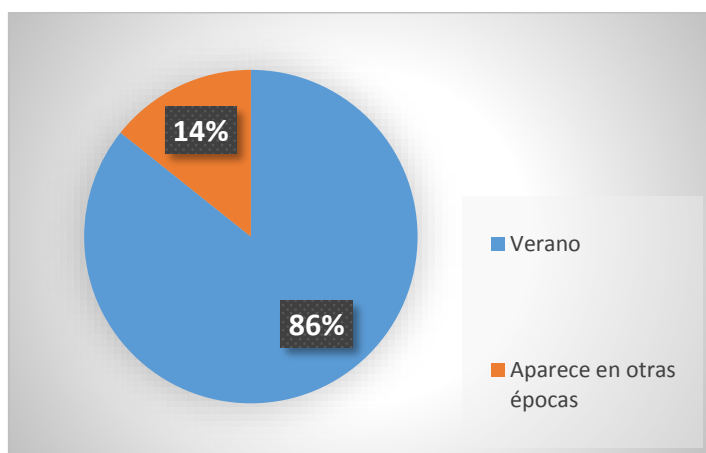
El 89% de los ganaderos ha tenido la presencia de la piroplasmosis en la finca en cambio que 11% de los ganaderos reporta que no ha sido afectado por la piroplasmosis en su ganadería.



**Figura 28** Presencia de la enfermedad en la finca

### c. Épocas del año en que aparece la enfermedad

Según el reporte de los ganaderos la babesiosis aparece con más frecuencia en época de verano (86%), mientras el 14% manifiesta que la enfermedad aparece en otras épocas.



**Figura 29** Épocas del año en que aparece la enfermedad

### d. Síntomas de la enfermedad

El 31% de los ganaderos manifiesta que ha observado tristeza; el 27% fiebre; el 18 % ha observado postración del animal, así mismo el 18% dice haber observado orina con sangre; el 4% ha observado reingueras; y el 2%, también ha observado diarrea.

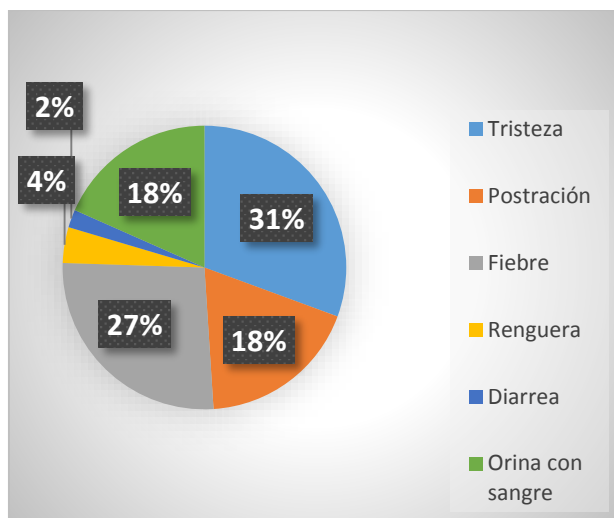


Figura 30 Síntomas de la babesiosis

#### 4.3.6 Diagnóstico y control de la enfermedad

##### a. Servicios profesionales

En la figura 31 observamos que el 78% de los ganaderos utilizan los servicios profesionales de un Médico Veterinario, mientras que el 22% no utiliza los servicios de un profesional.

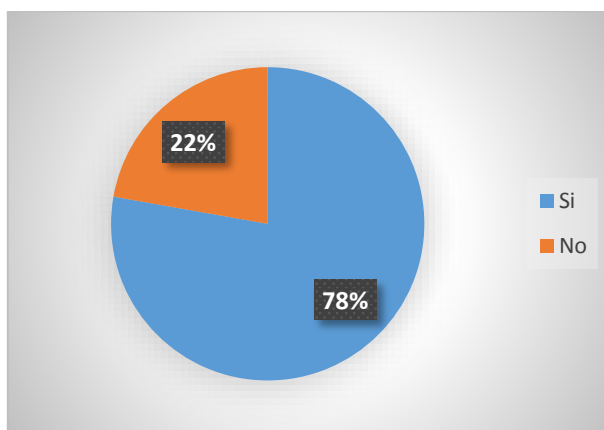


Figura 31 Utiliza servicios de profesionales veterinarios

##### b. Envío de muestras

En el sector existen los servicios de un profesional sin embargo, no se envían muestras al laboratorio para diagnóstico.

### c. Edad a la que enferman los animales

Para esta variable se clasificó a los animales en cuatro grupos etarios, encontrando que el 39% de los ganaderos manifiestan que los animales enferman a una edad superior a los dos años, el 31 % dice que la enfermedad aparece de 6 a 12 meses, el 26% de 1 a 2 años y el 4% de 0 a 6 meses.

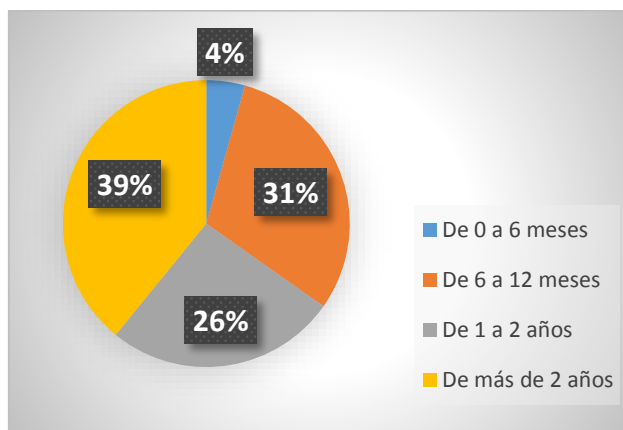


Figura 32 Edad a la que enferman los animales

### d. Morbilidad

En la figura 33 se observa que el 39% de ganaderos señala que la morbilidad está entre 2 a 4% y mayor a 4%, mientras que el 11% de los ganaderos señala de morbilidad es del 2% o también que no existe morbilidad.

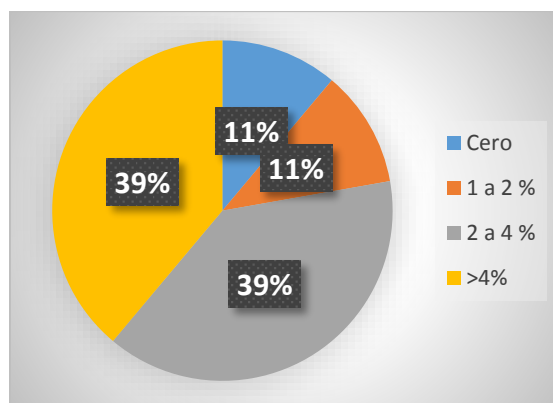


Figura 33 Morbilidad de *Babesia spp.*

### e. Mortalidad

En cuanto a la mortalidad el 50% de los ganaderos señala que está entre 1 y 2%; y el 50% manifiesta que es mayor a 2%.

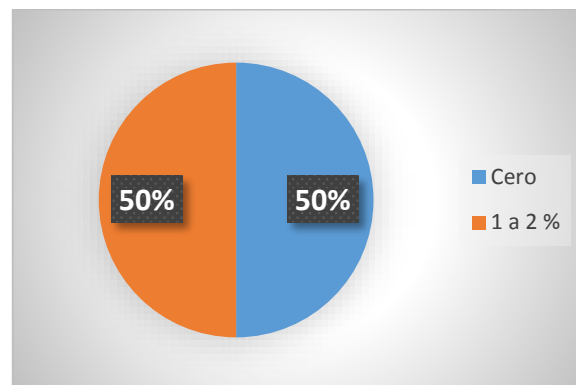


Figura 34 Mortalidad de *Babesia spp.*

### f. Uso de vacunas

El 100% de los ganaderos reporta que en el sector no se utilizan vacunas para el control de la enfermedad

### g. Tratamiento

El 39% de los ganaderos del sector tratan la enfermedad con diminaceno; el 33% usa tetraciclinas; el 11 % utilizan tetraciclinas más diminaceno; otro 11% utiliza otros productos y, el 6% no utiliza ningún producto

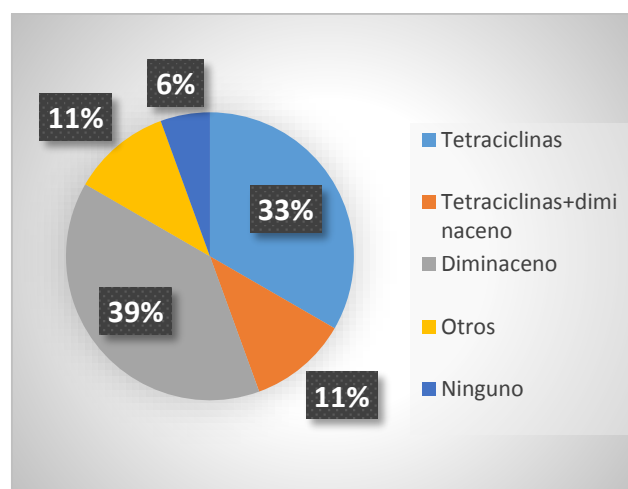


Figura 35 Tratamiento que utilizan para babesiosis



### 4.3.7 Fuentes de contaminación y Control de garrapatas

#### a. Presencia de garrapatas

El 94% de los ganaderos entrevistados dicen tener presencia de garrapatas en su ganadería, mientras que el restante 6% señala no tener la presencia de estos parásitos.

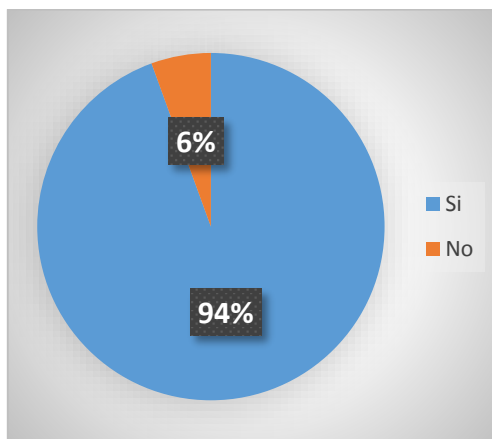


Figura 36 Presencia de garrapatas en la finca

#### b. Grado de infestación

De acuerdo al informe de los ganaderos, el 34% reporta infestación alta, mientras que el 33% expone que existe infestación media y el otro 33% manifiestan que es baja

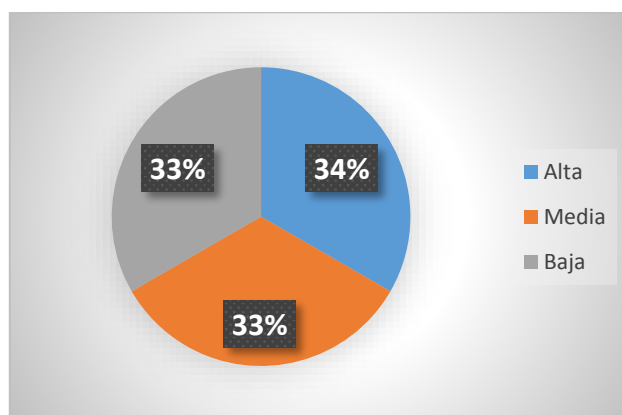


Figura 37 Grado de infestación de garrapatas en la finca

### c. Control de garrapatas

Para el control de garrapatas, el 44% de los ganadero utiliza Amitraz, el 28% utiliza Ivermectina, el 11% cipermetrina, el 6% utiliza cipermetrina más clorpirifos y otro 6% utiliza fipronil más abamectina. El 5% utiliza Fluazuron.

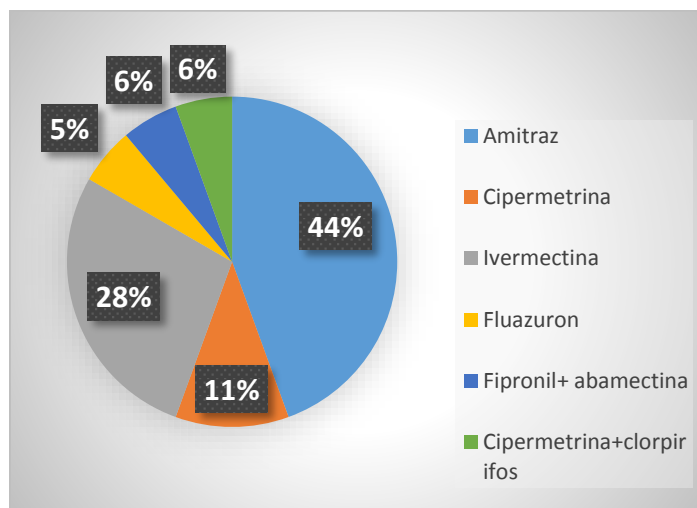


Figura 38 Productos utilizados en el control de garrapatas

### d. Frecuencia de control de garrapatas

La figura 39 nos muestra la frecuencia con la que los ganaderos realizan los baños por aspersion a sus animales el 45% lo realiza cada 30 días, el 22% cada 15 días, 11% lo realiza cada 8 días, otro 11% de los ganaderos lo realiza cada 90 días al igual que otro 11% lo realiza cada 180 días.

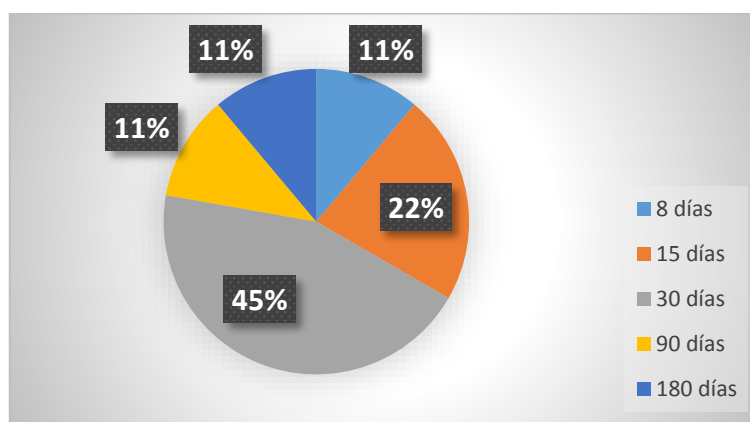
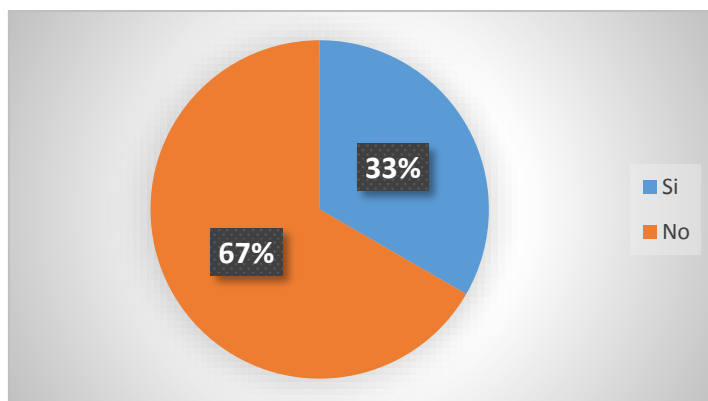


Figura 39 Frecuencia de control de garrapatas

### e. Rotación de productos

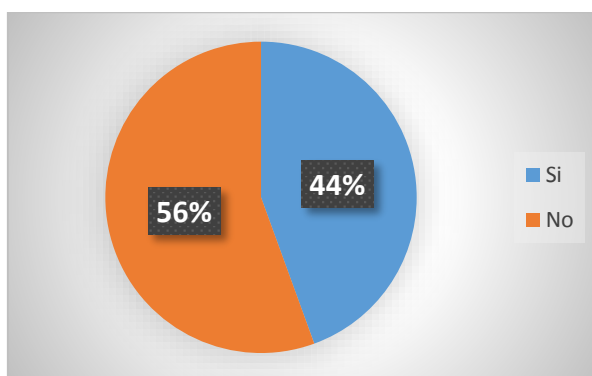
En las fincas del sector Norte el 67% de los ganaderos no realiza la rotación de productos para el control de garrapatas y el 33% si realiza la rotación de productos como lo podemos observar en la figura 40



**Figura 40** Rotación de productos en el control de garrapatas

### f. Conocimiento de la transmisión de la enfermedad

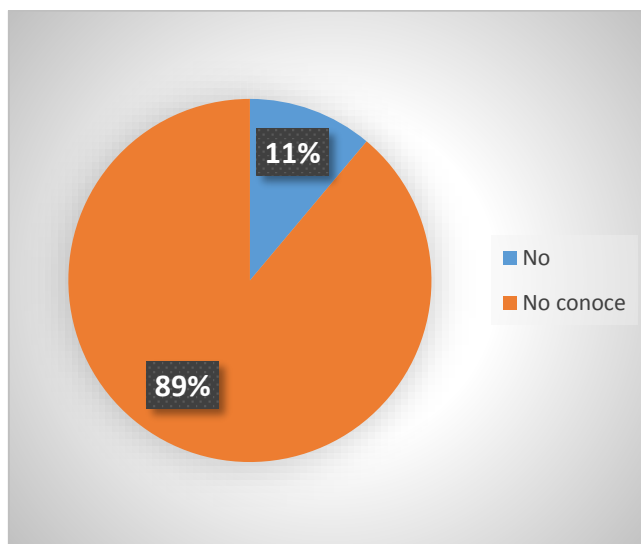
En la figura 41 observamos que el 56% de los ganaderos no conoce los mecanismos de transmisión de la babesiosis y que el 44% si conoce el medio de transmisión de la enfermedad.



**Figura 41** Conocimiento de la transmisión de la babesiosis

### g. Contacto con fauna silvestre

En la figura 42 observamos que el 89% de los ganaderos desconoce si su ganado está en contacto con animales silvestres mientras que el 11% asevera que su ganado no está en contacto con la fauna silvestre



**Figura 42** Contacto de los bovinos con fauna silvestre

## 5 DISCUSIÓN

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

Se analizó 98 muestras por el método de Giemsa, de las cuales 25 resultaron positivas que representa el 26% de Prevalencia de *Babesia spp.*; para el análisis por nPCR se consideró 72 muestras resultando 50 muestras positivas que representan el 69,4%, quedando el 25% a *Babesia bovis* y 52,8% a *Babesia bigemina*, esto indica que las herramientas biotecnológicas como nPCR ofrecen un diagnóstico certero, específico, altamente sensible (Bolívar, 2013) con relación a la técnica de Giemsa que el principal inconveniente es la baja sensibilidad que ofrece (Sibusiso Mtshali & Mtshali, 2014).

Los resultados del presente trabajo concuerdan con los datos obtenidos por Sibusiso Mtshali & Mtshali, 2014 en bovinos de rebaños de nueve provincias de Sudáfrica, analizaron 430 muestras de sangre por nPCR obteniendo 64,7% de resultados positivos a *Babesia bigemina* y 35,1% a *Babesia bovis*.

En San Carlos Sudeste de Brasil en la empresa EMBRAPA considerada una área endémica de babesiosis, en un análisis de 52 muestras de sangre de bovinos cruzados, las especies de babesia fueron similares tanto en terneros como en vacas, *Babesia bovis* fue detectada en 85.2% en terneros y 100% en vacas. *Babesia bigemina* fue detectada el 92.6% en terneros y 84% en vacas (Oliveira-Sequeira, Oliveira, Araujo, & Amarante, 2005).

Hernández 2012, realizó un muestreo de 350 bovinos en 17 haciendas del cantón Santo Domingo de los Tsáchilas con el fin de determinar la prevalencia de Babesiosis en el cantón, las muestras fueron analizadas tanto para frotis como para PCR, del total de muestras ninguna fue positiva a las técnicas aplicadas

### 5.2 PREVALENCIA DE *Babesia spp.* POR SEXO

A través de la técnica de Giemsa se evidenció en los machos una prevalencia del 20% y 27% a las hembra, a través de la técnica de nPCR se obtuvo 56,3%

de prevalencia para machos siendo 43,8% positivos a *Babesia bovis* y 25% a *Babesia bigemina*; en la hembras se obtuvo 73,2 % de prevalencia lo cual encierra 19,6% para *Babesia bovis* y 60,7% para *Babesia bigemina*.

Mediante estadística descriptiva de  $X^2$  a *Babesia spp*, no se encuentra diferencia estadística ( $P>0,05$ ), pero en cuestión de especie se encuentra diferencia estadística *B. bovis* y *B. bigemina* la cual afecta en mayor proporción a las hembras.

De acuerdo a los resultados que se obtuvo existe similitud con los trabajos realizados por León, Ribera, & Villegas, 2002 quienes efectuaron su estudio en la Sierra de Bolivia muestreando a 323 animales, que los clasificaron por especie encontrando una prevalencia en *Babesia bovis* de 87% para las hembras y 86% para los machos; en *Babesia bigemina* obtuvieron en hembras 96% y machos 95% de prevalencia.

Con respecto al Sexo dichos resultados se deben a que las hembras son más susceptibles por la condición a la que son sometidas para producción de leche (Manejo Sanitario Eficiente del Ganado Bovino: Principales Enfermedades, 2010).

### **5.3 PREVALENCIA DE *Babesia spp*. POR EDAD**

Para el análisis de la variable con respecto a la edad se clasificó a los animales en cuatro grupos.

A la técnica de Giemsa se encontró una prevalencia de 18,2% para los animales menores a un año, los animales entre 1 y 2 años obtuvieron una prevalencia de 34,4%, en el grupo de los animales entre tres y cuatro años la prevalencia fue de 27,3%, los animales comprendidos en el grupo de mayor a cuatro años se encontró una prevalencia de 21,2%; Mediante la técnica de nPCR los animales menores a un año se evidenció una prevalencia de 61,5% siendo 53,8% de prevalencia para *Babesia bovis* y 30,8% para *Babesia bigemina*; el grupo de animales entre uno y dos años se obtuvo una prevalencia de 76% existiendo 16% de prevalencia a *Babesia bovis* y 68% a *Babesia bigemina*; en el grupo de animales entre tres y cuatro años la

prevalencia fue de 71,4% la cual abarca 28,6% a *Babesia bovis* y 42,9% a *Babesia bigemina*; el grupo de los animales mayores a cuatro años se obtuvo una prevalencia de 66,7% y comprende 18,5% para *Babesia bovis* y 51,9% a *Babesia bigemina*

A través de estadística descriptiva de  $X^2$  a *Babesia spp*, no se encuentra diferencia estadística ( $P>0,05$ ), pero en diferenciación de especie se encuentra diferencia estadística de *Babesia bovis* con relación a *Babesia bigemina*, siendo los animales jóvenes más afectados por *B. bovis* y los adultos por *B. bigemina*.

Los animales que se han visto afectados con *Babesia* por lo regular son los mayores a un año debido a que los animales menores a esta edad generalmente no presentan síntomas como lo señala Echaide, 2014. Mientras que Cipolini, M.F., Mangold, A. y Jacobo, 2004 exponen que el síndrome clínico de estas enfermedades en su mayoría afecta a los bovinos mayores a seis meses, aumentando la gravedad del cuadro clínico de acuerdo a la edad.

#### **5.4 PREVALENCIA DE *Babesia spp*. POR CANTÓN**

La prevalencia que se encontró en los cantones a la técnica de Giemsa es 39,1% de prevalencia para el cantón El Pangui, 13,9% en el cantón Yantzaza, y 28,2% en el cantón Yacuambi, en la técnica de nPCR se evidenció 63,6% de prevalencia para el cantón El Pangui, y por especie 40,9% para *Babesia bovis* y 36,4% para *Babesia bigemina*, en el cantón Yantzaza se encontró 52,2% de prevalencia y corresponde 34,8% a *Babesia bovis* y 26,1% a *Babesia bigemina*, en el cantón Yacuambi se evidenció 88,9% de prevalencia y por especie 3,7% a *Babesia bovis* y 88,9% a *Babesia bigemina*.

En la estadística descriptiva de  $X^2$  a *Babesia spp*, se encuentra diferencia estadística ( $P>0,05$ ) por lo que depende mucho de las condiciones climáticas de cada cantón como el clima y la altitud para que el vector se desarrolle y transmita la enfermedad, así mismo al diferenciar por especie se encuentra diferencia estadística de *Babesia bovis* que afecta mayormente en el cantón El Pangui y *Babesia bigemina* aqueja en mayor proporción en el cantón Yacuambi

Ávila, B.D.I.; Ribera, C.H.; Villegas, 2005 realizaron un estudio durante los años 2000 a 2004 para determinar la presencia de Babesiosis bovina en las provincias Andrés Ibáñez, Warnes, Sara y Obispo Santisteban, confirmando la presencia de Babesiosis, las provincias donde realizaron el estudio presentan características similares en cuanto a temperatura, clima y región oriental con respecto a los cantones del sector Norte de la provincia de Zamora Chinchipe que son zonas aptas para que el vector *Rhiphicephalus microplus* pueda desarrollarse y transmitir la enfermedad.

### 5.5 PREVALENCIA DE *Babesia* spp. POR RAZA

En el sector norte encontramos algunas razas, y de acuerdo a las técnicas aplicadas dieron los siguientes resultados, a la técnica de Giemsa, 30% de prevalencia para los bovinos Mestizos, 21,2% para los bovinos de raza Charolais, 38% a la raza Holstein, mediante la técnica de nPCR se evidenció 64,7% de prevalencia para bovinos Mestizos en la cual 6% es de prevalencia para *Babesia bovis* y 58,8% para *Babesia bigemina*, en la raza Charolais se encontró 66,7% que encierra 33,3% de prevalencia para *Babesia bovis* y 45,8% a *Babesia bigemina*, en la raza Holstein se obtuvo 74,2% de prevalencia siendo 29% de prevalencia a *Babesia bovis* y 54,8% de prevalencia a *Babesia bigemina*. No se encuentra diferencia estadística entre razas ( $P > 0,05$ ), al distinguir por especie no se reporta diferencia entre *B. bovis* y *B. bigemina*.

La raza es un factor importante para la presentación de *Babesia* spp. En el Manual de Anaplasmosis y Babesiosis, 2015 destaca que las razas que pertenecen a la especie *Bos indicus* es decir razas dedicadas a la producción de carne son más resistente que las razas que pertenecen a la especie *Bos Taurus* razas con mayor énfasis en la producción lechera, con relación a la infección por Babesia debido a que las razas pertenecientes a la especie *Bos indicus* presentan mayor resistencia al vector transmisor de la babesiosis como es la garrapata.

En los datos que se analizaron los bovinos con mayor afección por la babesiosis son los Holstein, se debe a que este tipo de ganado está sometido a



estrés permanente por la producción de leche por ende cuando sus defensas caen y la enfermedad se presenta (Cipolini, M.F., Mangold, A. y Jacobo, 2004).

## 5.6 ANÁLISIS EPIDEMIOLÓGICO DE LA BABESIOSIS

Para hacer el análisis epidemiológico de la enfermedad se estudiaron varios factores asociados a la enfermedad entre ellos el tipo de pastoreo que realizan los ganaderos a sus animales y se obtuvo que el 50% de ganaderos utilizan el sistema de pastoreo al sogueo, seguido del 44% con el sistema de pastoreo libre, el 6% utiliza el sistema semiestabulado.

El pastoreo constituye un factor determinante en la prevalencia de la Babesiosis bovina, esto se debe a que en el suelo de la pradera las garrapatas hacen su ovoposición, luego en calidad de larvas apenas imperceptibles trepan hierbas y arbustos, desde donde lo infestan al bovino (Hernández, 2013).

El 56% de la producción bovina es de Leche, seguido por el 33% de carne y el 11% de doble propósito se llegó a determinar que la enfermedad afecta en su mayor grado a los bovinos de leche que se encuentran con pastoreo al sogueo.

Se considera que el tipo de explotación ganadera es determinante en la prevalencia de Babesiosis, pues la raza es un factor importante en la infección con hemoparásitos, los bovinos destinados a la explotación de leche y sus cruces son genéticamente más susceptibles que las razas de carne, debido a una mayor resistencia natural de este ganado a las garrapatas vectores (Gugliemone, 1995).

Con relación a la procedencia del ganado el 50% del ganado se produce en la misma finca, el 44% procede de las fincas vecinas y el 6% lo compran en otras provincias, En esta región, *Rhipicephalus microplus* (garrapata que activa durante todo el año), es considerada el principal vector de la babesiosis y anaplasmosis (Casas y col., 2009); constituyendo la procedencia del ganado un factor importante en la prevalencia de la enfermedad.

El 44 % de los ganaderos que compran ganado en otras fincas y ciudades no realizan cuarentena es un factor predisponente para que la babesiosis pueda aparecer en los hatos ganaderos, así mismo se obtuvo que sólo 6% de los ganaderos cuando llevan su ganado de otras provincias realizan la cuarentena recomendada. Camargo y col. (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.

El 89% de los ganaderos aseguran conocer la enfermedad de piroplasmosis y 11 % de los ganaderos desconocen la enfermedad, los mismos propietarios que conocen de la enfermedad registran la enfermedad en su finca sin diferenciar si se trata también de anaplasmosis que afecta a la zona.

El verano es una época muy marcada para el desarrollo de la Babesiosis bovina, 67% de los ganaderos se han visto afectados por la enfermedad en mayor grado durante esa época. 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.

Los síntomas que presentan los animales son varios entre ellos el 31% de los ganaderos observa a sus animales con tristeza, el 27% con fiebre, el 18 % observa postración del animal, así mismo el 18% observa hematuria (orina con sangre), el 4% observa renguera y el 2% observa diarrea.

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. Olguín (2013), añade que los valores de la temperatura están en 41,5 °C, a más de la frecuencia cardíaca elevada y la bilirrubinemia.

La mayor parte de los propietarios de las fincas utiliza los servicios profesionales de un médico veterinario que diagnostica la enfermedad y la trata a base de diminaceno, tetraciclinas, pero no se realiza toma de muestras ni envíos al laboratorio.

León (1991); señala que el diagnóstico de la enfermedad, las muestras a tomar y los criterios a seguir, variarán según las situaciones que se enfrenten; manifiesta que puede hacerse diagnóstico en animales vivos, recién muertos, muertos en descomposición y en animales en recuperación.

La edad a la que enferman los animales es sin duda un factor a tomar en cuenta, 39% de los animales enferma a una edad superior a los dos años, el 31 % de 6 a 12 meses, el 26% de 1 a 2 años y el 4% de 0 a 6 meses, teniendo en cuenta que la morbilidad es del 4% y la mortalidad del 2%, además en el sector no se realiza la inmunización.

Rhades (2005); manifiesta que todos los bovinos, independientemente de la edad, se enferman de tristeza bovina. 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 grado de infestación de garrapatas es medio alta y los controles los realizan periódicamente cada 30 días pero varía desde los 8 días hasta los 180 días a

través de baños garrapaticidas a base Amitraz, cipermetrina y organofosforados. Para el control de la garrapatas también utilizan tratamiento endectocida a base de Ivermectinas siendo esto un problema a la salud pública estamos tratando con un sector donde abundan las lecherías y los ganaderos no respetan el tiempo de retiro de leche.

En el uso de producto para el control de las garrapatas 67% de los ganaderos no realiza la rotación de productos para el control de las mismas lo cual es perjudicial porque puede crear resistencia al producto por parte de las garrapatas, los ganaderos en su gran mayoría no conocen el proceso de transmisión de la babesiosis siendo un tema a tratar ya que han tenido pérdidas cuantiosas por esta parasitosis finalmente existe poco control o el ganadero en 89% no conoce si sus animales están en contacto con animales silvestres .

## 6 CONCLUSIONES

- En las ganaderías del sector Norte de la provincia de Zamora Chinchipe existe un alto índice de prevalencia de *Babesia spp* (69,4 %), en donde *Babesia bovis* representa un 25% y *Babesia bigemina* 52,8%.
- La técnica de nPCR presenta mayor sensibilidad y especificidad que la técnica de frotis sanguíneo coloreado con Giemsa.
- De acuerdo a los factores asociados que estudiamos concluimos que los animales jóvenes son más resistentes a la babesiosis; y, los animales adultos entre uno y dos años son más sensibles a padecer esta enfermedad; el sexo más sensible a la enfermedad son las hembras bovinas ya que están sometidas a mayor estrés por su condición productiva; la raza Holstein está mayormente afectada en el sector norte por la babesiosis bovina.

## **7 RECOMENDACIONES**

- Orientar a los ganaderos de la zona en la elaboración y ejecución de planes de manejo sanitario de sus hatos bovinos que incluyan un control adecuado de vectores, tratamientos específicos de la enfermedad.
- Ante la sospecha de la presencia de Babesiosis, el ganadero debe acudir a las instituciones correspondientes (MAGAP, AGROCALIDAD, GAD Provincial) de la provincia a fin de constatar, diagnosticar, controlar y tratar adecuadamente la enfermedad.
- Las instituciones antes señaladas deben organizar talleres y charlas técnicas a los ganaderos con un enfoque al manejo del hato bovino y control de enfermedades hematozoáricas.

## 8 BIBLIOGRAFÍA

- Adjou Moumouni, P., Aboge, G., Terkawi, M., Masatani, T., Cao, S., & Kamyinkird, K. et al. (2015). Molecular detection and characterization of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Theileria* species and *Anaplasma marginale* isolated from cattle in Kenya. *Parasites & Vectors*, 8(1). <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-1106-9>
- Alvarez Calderón, V., Hernández Fonseca, V., & Hernández Gamboa, J. (2005). Catálogo de garrapatas suaves (Acari : Argasidae) y duras (Acari : Ixodidae) de Costa Rica. *Brenesia*, 63–64, 81–88.
- Avila, B.D.I.<sup>2</sup>; Ribera, C.H.<sup>3</sup>; Villegas, A. F. A. . (2005). DETERMINAR LA PRESENCIA DE BABESIOSIS BOVINA EN LAS PROVINCIAS ANDRÉS IBÁÑEZ, WARNES, SARA Y OBISPO SANTISTEBAN DEL AÑO 2000 A JUNIO DEL 2004.
- Barrera, I. R. H. (2004). La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*, 3. Retrieved from [http://eprints.uanl.mx/1584/1/art\\_cadena.pdf](http://eprints.uanl.mx/1584/1/art_cadena.pdf)
- Bravo, S. (2012). *Babesiosis bovina*. Cuenca.
- Brayton, K. A., Lau, A. O. T., Herndon, D. R., Hannick, L., Kappmeyer, L. S., Berens, S. J., ... Nene, V. M. (2007). Genome sequence of *Babesia bovis* and comparative analysis of apicomplexan hemoprotozoa. *PLoS Pathogens*, 3(10), 1401–1413. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030148>
- Cipolini, M.F., Mangold, A. y Jacobo, R. A. (2004). 30-Tristeza\_Bovina, 1–5.
- Dasiel, M., & Álvarez, O. (2012). UNIVERSIDAD AGRARIA DE LA HABANA &quot; Fructuoso Rodríguez Pérez &quot; Facultad de Medicina Veterinaria.
- Echaide, I. (2014). Babesiosis bovina. *XX Reunión Científico Técnica. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico.*, 1–6.
- Erllich, H. A. (1989). Polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Immunology*, 9(6), 437–447. <http://doi.org/10.1007/BF00918012>

- Faccioli, V. (2011). Garrapatas (Acari: Ixodidae y Argasidae) de la colección de invertebrados del Museo Provincial de Ciencias Naturales Florentino Ameghino. *Museo Provincial De Ciencias Naturales "Florentino Ameghino,"* 25, 34.
- Figueroa, J. V., Chieves, L. P., Johnson, G. S., & Buening, G. M. (1993). Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Veterinary Parasitology*, 50(1–2), 69–81. [http://doi.org/10.1016/0304-4017\(93\)90008-B](http://doi.org/10.1016/0304-4017(93)90008-B)
- Gasque, R. (2008). *MVZ Esp . Ramón Gasque Gómez* (Primera ed). México.
- Gasque Gómez, R. (2008). Babesiosis bovina. *Enciclopedia Bovina*, (18), 97–101. Retrieved from [http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/e\\_bovina/04BabesiosisBovina.pdf](http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/e_bovina/04BabesiosisBovina.pdf)
- Góes, T. S., Góes, V. S., Ribeiro, M. F. B., & Gontijo, C. M. (2008). Bovine Babesiosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 116, 1–6. <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.12.011>
- Guglielmone A A, & Nava S. (2005). Argasidae Y DE LOS GÉNEROS Dermacentor , Haemaphysalis , Ixodes y Rhipicephalus ( Ixodidae ) DE LA ARGENTINA : DISTRIBUCIÓN Y. *Ria*, 34(2), 123–141.
- Hernández, A. J. (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)., 26.
- León, A. M., Ribera, C. H., & Villegas, F. (2002). *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, 1–56.
- Lorena, I., Directora De Estadísticas, N., Realizadores, E., Chaves, R., Salazar, D., Orejuela, D., ... Villafuerte, W. (2012). Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua 2012 Dirección responsable de la información estadística y contenidos: DIRECCIÓN DE ESTADÍSTICAS ECONÓMICAS. *INEC*. Retrieved from <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web->



inec/Estadisticas\_agropecuarias/espac/espac\_2012/InformeEjecutivo.pdf

Madrid, C., Fuentes, H., Romero, W., & Álvarez, A. (2012). babesia 5 Madrid, *30*(1), 9–15.

Martínez, C., & Silva, E. (2004). Metodos fisico quimicas en biotecnologia. *Analytical Chemistry*, *62*(13), 1202–1214. <http://doi.org/10.1021/ac00212a004>

MAUTONE, S. M. A. C. U. T. A. y, & Gabriel. (2006). Taxonomía de los cinco géneros de garrapatas diagnosticados en bovinos en Uruguay.

Mosqueda, J., Olvera-Ramirez, a, Aguilar-Tipacamu, G., & Canto, G. J. (2012). Current advances in detection and treatment of babesiosis. *Current Medicinal Chemistry*, *19*(10), 1504–1518. <http://doi.org/10.2174/092986712799828355>

Obregón, D. I., Cristina, M., Oliveira, D. S., Cristine, P., Iii, T., Elizabeth, M., ... Vi, A. H. F. (2012). babesia en bufalos. *Dasiel*, *34*(2), 101–108.

Oliveira-Sequeira, T. C. G., Oliveira, M. C. S., Araujo, J. P., & Amarante, A. F. T. (2005). PCR-based detection of Babesia bovis and Babesia bigemina in their natural host Boophilus microplus and cattle. *International Journal for Parasitology*, *35*(1), 105–111.

Provincia de zamora chinchipe. (2010), 2001. Retrieved from <https://maravillasocultas.wordpress.com/oriente/provincia-de-zamora-chinchipe/>

Ríos, S., & Ríos, L. (2011). Principales marcadores moleculares utilizados para la identificación de Babesia bovis y Babesia bigemina Principal molecular markers used to identify Babesia bovis and Babesia bigemina. *Revista MVZ Córdoba*, *16*(2), 2470–2483. Retrieved from <http://revistas.unicordoba.edu.co/revistamvz/mvz-162/V16N2A4.pdf>

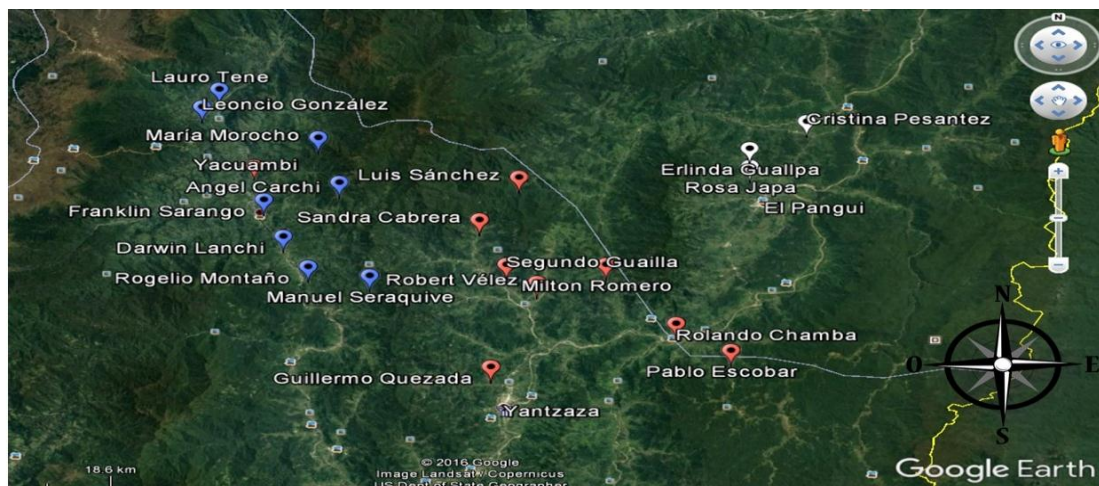
Sibusiso Mtshali, M., & Mtshali, P. S. (2014). Prevalence and phylogenetic analysis of Babesia bigemina and Babesia bovis hemoparasites from cattle in South Africa. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, *4*(3), 234. [http://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60533-8](http://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60533-8)

- Smith, R. (1978). Ciclo biológico de Babesia en la Garrapata. *Departamento de Hemoprotozoarios.*, 2, 234–264.  
<http://doi.org/10.3989/scimar.2006.70n3355>
- Solorio Rivera, J. L., & Rodriguez Vivas, R. I. (1997). Epidemiología de la babesiosis bovina. I. Componentes Epidemiológicos. *Rev Biomed* 1997, 8(1), 37–47. Retrieved from <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb97817.pdf>
- Vasco, K. (2013). *Babesia 1*. Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador. Retrieved from <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/975/1/T-UCE-0014-28.pdf>
- Vasco, K., Bovina, A. T., Clínico, D., Identificaci, I., Hernández, A. J., Medicina, E. D. E., ... Nene, V. M. (2012). Babesiosis bovina. *Experimental Parasitology*, 4(2), 1–6. <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.12.011>

## 9 ANEXOS

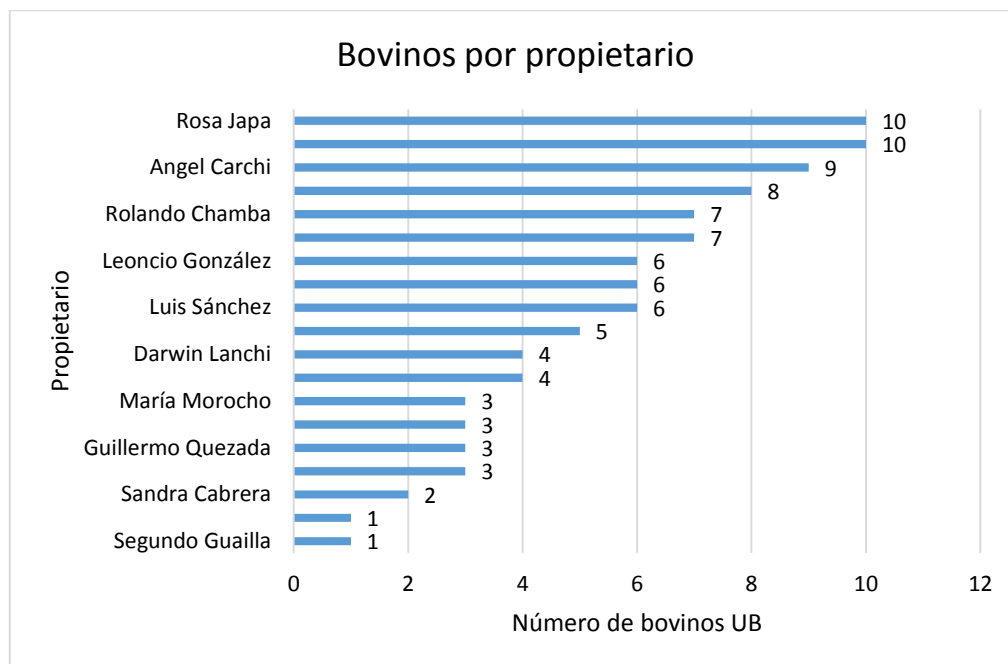
### a. ANEXOS DE TABLAS Y DATOS

**Anexo 1** Ubicación de la investigación cantones El Pangui, Yantzaza y Yacuambi del sector Norte de la provincia Zamora Chinchipe.



**Anexo 2** Fincas seleccionadas (Propietario y número de bovinos)

No. Bovino	Propietario	Coordenadas		Procedencia
		Latitud (S)	Longitud(W)	
1	Erlinda Gualpa	3° 37' 34"	78° 35' 45"	Pangui
2	Rosa Japa	3° 33' 42"	78° 33' 11"	Pangui
3	Cristina Pesantez	3° 33' 43"	78° 33' 10"	Pangui
4	Luis Sánchez	1° 59' 57"	78° 45' 6"	Yantzaza
5	Guillermo Quezada	3° 48' 20"	78° 46' 14"	Yantzaza
6	Sandra Cabrera	3° 39' 36"	78° 46' 41"	Yantzaza
7	Segundo Guaila	3° 42' 15"	78° 45' 36"	Yantzaza
8	Milton Romero	3° 42' 15"	78° 41' 36"	Yantzaza
9	Robert Vélez	3° 43' 19"	78° 44' 22"	Yantzaza
10	Rolando Chamba	3° 45' 46"	78° 38' 45"	Yantzaza
11	Pablo Escobar	3° 47' 22"	78° 36' 33"	Yantzaza
12	Darwin Lanchi	3° 40' 34"	78° 54' 35"	Yacuambi
13	Rogelio Montaña	3° 42' 22"	78° 53' 35"	Yacuambi
14	Manuel Seraquive	3° 42' 54"	78° 51' 05"	Yacuambi
15	María Morocho	3° 34' 48"	78° 53' 05"	Yacuambi
16	Franklin Sarango	3° 38' 23"	78° 55' 22"	Yacuambi
17	Lauro Tene	3° 31' 52"	78° 57' 06"	Yacuambi
18	Leoncio González	3° 32' 56"	78° 57' 46"	Yacuambi
19	Angel Carchi	3° 37' 24"	78° 52' 17"	Yacuambi



### Anexo 3 Resultados generales por Giemsa y nPCR

No. Bovino	PROPIETARIO	CÓDIGO	SEXO	EDAD (años)	RAZA	GIEMSA	<i>Babesia bovis</i>	<i>Babesia bigemina</i>
1	Erlinda Guallpa	PG1	Hembra	5	Holstein	Positivo	Negativo	Negativo
2	Erlinda Guallpa	PG2	Macho	5	Holstein	Negativo	Negativo	Positivo
3	Erlinda Guallpa	PG3	Macho	0,6	Holstein	Positivo	Negativo	Negativo
4	Erlinda Guallpa	PG4	Hembra	10	Holstein	Negativo	Negativo	Positivo
5	Erlinda Guallpa	PG5	Hembra	4	Holstein	Positivo	Positivo	Negativo
6	Erlinda Guallpa	PG6	Hembra	7	Holstein	Negativo	Negativo	Positivo
7	Erlinda Guallpa	PG7	Hembra	6	Holstein	Positivo	Positivo	Negativo
8	Erlinda Guallpa	PG8	Macho	0,6	Holstein	Positivo	Positivo	Negativo
9	Erlinda Guallpa	PG9	Hembra	6	Holstein	Negativo	Negativo	Positivo
10	Erlinda Guallpa	PG10	Macho	0,2	Holstein	Positivo	Negativo	Negativo
11	Rosa Japa	PG11	Hembra	5	Charolais	Positivo	Negativo	Negativo
12	Rosa Japa	PG12	Macho	0,8	Charolais	Negativo	Positivo	Positivo
13	Rosa Japa	PG13	Macho	0,5	Charolais	Negativo	Positivo	Positivo
14	Rosa Japa	PG14	Hembra	5	Charolais	Negativo	Negativo	Negativo
15	Rosa Japa	PG15	Hembra	7	Charolais	Negativo	Negativo	Positivo
16	Rosa Japa	PG16	Hembra	4	Charolais	Negativo	Negativo	Negativo
17	Rosa Japa	PG17	Hembra	6	Charolais	Positivo	Positivo	Negativo
18	Rosa Japa	PG18	Hembra	7	Charolais	Negativo		
19	Rosa Japa	PG19	Hembra	5	Charolais	Positivo	Negativo	Negativo
20	Rosa Japa	PG20	Hembra	0,4	Charolais	Negativo	Positivo	Positivo
21	Cristina Pesantez	PG21	Macho	0,3	Charolais	Negativo	Negativo	Negativo

22	Cristina Pesantez	PG22	Hembra	5	Charolais	Negativo	Positivo	Negativo
23	Cristina Pesantez	PG23	Macho	0,4	Charolais	Negativo	Positivo	Negativo
24	Luis Sánchez	YT1	Macho	0,5	Holstein	Negativo	Positivo	Negativo
25	Luis Sánchez	YT2	Hembra	2	Holstein	Negativo		
26	Luis Sánchez	YT3	Hembra	2	Holstein	Negativo	Negativo	Negativo
27	Luis Sánchez	YT4	Hembra	4	Holstein	Positivo	Negativo	Negativo
28	Luis Sánchez	YT5	Macho	0,6	Holstein	Negativo		
29	Luis Sánchez	YT6	Hembra	2	Holstein	Negativo	Negativo	Negativo
30	Guillermo Quezada	YT7	Macho	1	Charolais	Negativo	Positivo	Negativo
31	Guillermo Quezada	YT8	Hembra	7	Charolais	Negativo		
32	Guillermo Quezada	YT9	Macho	0,5	Charolais	Negativo	Negativo	Negativo
33	Sandra Cabrera	YT10	Hembra	5	Holstein	Negativo		
34	Sandra Cabrera	YT11	Hembra	5	Holstein	Negativo	Negativo	Negativo
35	Segundo Guaiña	YT12	Macho	1	Charolais	Positivo	Negativo	Negativo
36	Milton Romero	YT13	Hembra	3	Mestizo	Negativo		
37	Milton Romero	YT14	Hembra	5	Mestizo	Negativo	Negativo	Negativo
38	Milton Romero	YT15	Hembra	4	Mestizo	Negativo		
39	Milton Romero	YT16	Hembra	2	Mestizo	Negativo	Negativo	Negativo
40	Robert Vélez	YT17	Hembra	2	Charolais	Negativo		
41	Robert Vélez	YT18	Hembra	2	Charolais	Negativo	Negativo	Negativo
42	Robert Vélez	YT19	Hembra	4	Charolais	Negativo		
43	Robert Vélez	YT20	Hembra	4	Charolais	Negativo	Positivo	Negativo
44	Robert Vélez	YT21	Macho	0,8	Mestizo	Negativo	Positivo	Negativo
45	Robert Vélez	YT22	Macho	0,6	Charolais	Negativo		
46	Robert Vélez	YT23	Hembra	5	Mestizo	Negativo	Negativo	Negativo
47	Rolando Chamba	YT24	Macho	1	Holstein	Negativo	Negativo	Negativo
48	Rolando Chamba	YT25	Macho	1	Holstein	Negativo		
49	Rolando Chamba	YT26	Hembra	12	Holstein	Negativo	Positivo	Negativo
50	Rolando Chamba	YT27	Hembra	2	Holstein	Negativo	Positivo	Negativo
51	Rolando Chamba	YT28	Hembra	2	Holstein	Negativo		
52	Rolando Chamba	YT29	Hembra	2	Holstein	Positivo	Positivo	Positivo
53	Rolando Chamba	YT30	Hembra	3	Holstein	Negativo	Positivo	Positivo
54	Pablo Escobar	YT31	Hembra	2	Holstein	Negativo	Negativo	Positivo
55	Pablo Escobar	YT32	Hembra	3	Holstein	Negativo		
56	Pablo Escobar	YT33	Hembra	3	Holstein	Positivo	Negativo	Positivo
57	Pablo Escobar	YT34	Hembra	3	Holstein	Negativo		
58	Pablo Escobar	YT35	Hembra	3	Holstein	Negativo	Negativo	Positivo
59	Pablo Escobar	YT36	Hembra	3	Charolais	Positivo	Negativo	Positivo
60	Darwin Lanchi	YC1	Hembra	1	Charolais	Negativo	Negativo	Positivo
61	Darwin Lanchi	YC2	Macho	2	Mestizo	Negativo	Negativo	Negativo
62	Darwin Lanchi	YC3	Hembra	8	Mestizo	Positivo	Negativo	Positivo
63	Darwin Lanchi	YC4	Macho	0,5	Charolais	Negativo		
64	Rogelio Montaña	YC5	Hembra	5	Mestizo	Negativo	Negativo	Negativo
65	Rogelio Montaña	YC6	Hembra	2	Mestizo	Positivo	Negativo	Positivo
66	Rogelio Montaña	YC7	Hembra	6	Mestizo	Negativo		

67	Manuel Seraquive	YC8	Hembra	6	Mestizo	Negativo	Negativo	Negativo
68	Manuel Seraquive	YC9	Hembra	3	Charolais	Negativo		
69	Manuel Seraquive	YC10	Hembra	12	Mestizo	Positivo	Negativo	Positivo
70	Manuel Seraquive	YC11	Hembra	3	Holstein	Negativo	Negativo	Positivo
71	Manuel Seraquive	YC12	Macho	1	Mestizo	Positivo	Negativo	Positivo
72	María Morocho	YC13	Macho	1	Charolais	Negativo		
73	María Morocho	YC14	Hembra	2	Charolais	Positivo	Negativo	Positivo
74	María Morocho	YC15	Hembra	3	Charolais	Negativo	Negativo	Positivo
75	Franklin Sarango	YC16	Hembra	1	Charolais	Negativo	Negativo	Positivo
76	Lauro Tene	YC17	Hembra	4	Mestizo	Negativo		
77	Leoncio González	YC18	Macho	1	Charolais	Negativo		
78	Lauro Tene	YC19	Hembra	3	Mestizo	Positivo	Negativo	Positivo
79	Lauro Tene	YC20	Hembra	1	Mestizo	Negativo		
80	Lauro Tene	YC21	Macho	0,7	Mestizo	Negativo		
81	Lauro Tene	YC22	Hembra	5	Mestizo	Negativo		
82	Lauro Tene	YC23	Hembra	3	Mestizo	Positivo	Negativo	Positivo
83	Lauro Tene	YC24	Macho	0,7	Mestizo	Negativo		
84	Lauro Tene	YC25	Macho	1	Mestizo	Negativo		
85	Leoncio González	YC26	Hembra	2	Charolais	Negativo	Negativo	Positivo
86	Leoncio González	YC27	Hembra	3	Charolais	Positivo	Negativo	Positivo
87	Leoncio González	YC28	Hembra	5	Holstein	Negativo	Negativo	Positivo
88	Leoncio González	YC29	Hembra	4	Holstein	Negativo	Negativo	Positivo
89	Leoncio González	YC30	Hembra	7	Holstein	Negativo	Negativo	Positivo
90	Angel Carchi	YC31	Hembra	9	Mestizo	Negativo	Negativo	Positivo
91	Angel Carchi	YC32	Hembra	4	Mestizo	Positivo	Negativo	Positivo
92	Angel Carchi	YC33	Hembra	6	Mestizo	Negativo	Negativo	Positivo
93	Angel Carchi	YC34	Hembra	9	Holstein	Negativo	Negativo	Positivo
94	Angel Carchi	YC35	Hembra	3	Holstein	Positivo	Negativo	Positivo
95	Angel Carchi	YC36	Hembra	5	Holstein	Negativo	Negativo	Positivo
96	Angel Carchi	YC37	Hembra	7	Holstein	Negativo	Positivo	Positivo
97	Angel Carchi	YC38	Hembra	2	Mestizo	Positivo	Negativo	Positivo
98	Angel Carchi	YC39	Hembra	11	Mestizo	Negativo		

#### Anexo 4 Distribución de Chi cuadrado para la técnica de Giemsa

Factores	$\chi^2$	P≤0,05
Sector	4,95302	0,0840
Sexo	0,53625	0,4640
Edad	2,28392	0,5156
Raza	0,57491	0,7502

**Anexo 5** Distribución de Chi cuadrado para la técnica de nPCR

<b>Factores</b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b>P<math>\leq</math>0,05</b>
<b>Sector</b>	8,39370	0,0150
<b>Sexo</b>	1,68779	0,1939
<b>Edad</b>	1,00043	0,8011
<b>Raza</b>	0,59667	0,7421

**Anexo 6** Distribución de Chi cuadrado para *B. bovis*

<b>Factores</b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b>P<math>\leq</math>0,05</b>
<b>Sector</b>	10,67447	0,0048
<b>Sexo</b>	3,85714	0,050
<b>Edad</b>	7,50179	0,0575
<b>Raza</b>	4,47143	0,1069

**Anexo 7** Distribución de Chi cuadrado para *B. bigemina*

<b>Factores</b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b>P<math>\leq</math>0,05</b>
<b>Sector</b>	23,07958	0,00001
<b>Sexo</b>	6,36886	0,0116
<b>Edad</b>	5,13660	0,1621
<b>Raza</b>	0,76654	0,6816

**b. ANEXO FOTOGRÁFICO**  
**Anexo 8 Extracción de sangre**

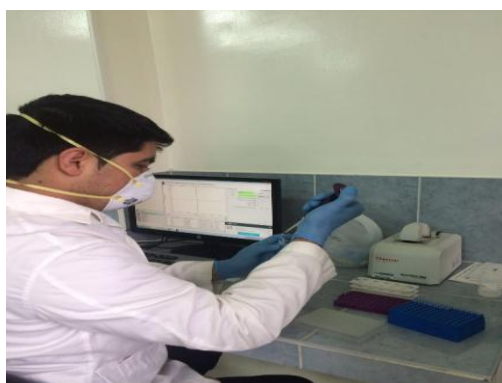


**Anexo 9 Método de Giemsa**

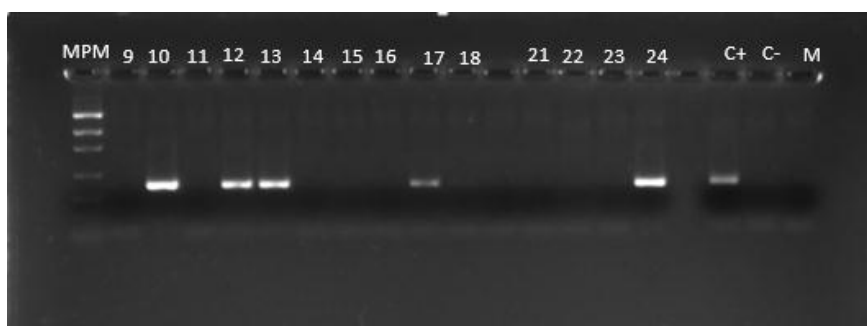




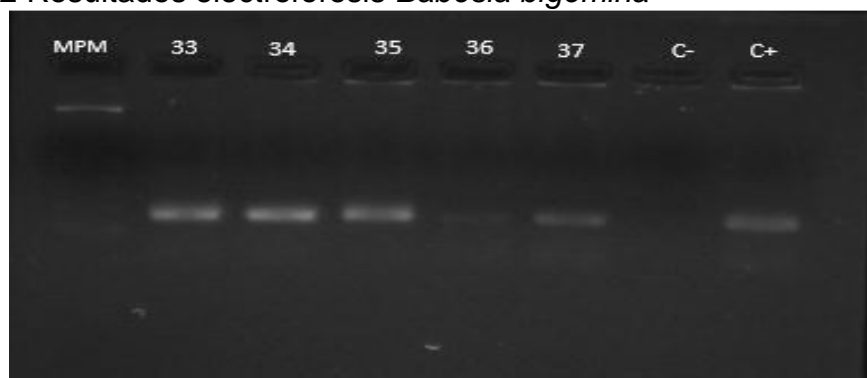
## Anexo 10 Método de nPCR



## Anexo 11 Resultados electroforesis *Babesia bovis*



## Anexo 12 Resultados electroforesis *Babesia bigemina*



### Anexo 13 Identificación de garrapatas

