



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS
NATURALES RENOVABLES
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“DIAGNÓSTICO DE *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* EN LAS GANADERÍAS DEL SECTOR OESTE DE LA PROVINCIA DE ZAMORA CHINCHIPE, MEDIANTE LOS MÉTODOS DE GIEMSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA”

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

AUTOR:

Daniel Alberto Benítez Miranda

DIRECTOR:

Dr. Tito Muñoz Guarnizo Mg. Sc.

Loja – Ecuador

2017

CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

Dr. Tito Muñoz Guarnizo

DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICA:

Que he revisado la presente tesis titulada “**DIAGNÓSTICO DE *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* EN LAS GANADERÍAS DEL SECTOR OESTE DE LA PROVINCIA DE ZAMORA CHINCHIPE, MEDIANTE LOS MÉTODOS DE GIEMSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA**” realizada por el egresado Daniel Alberto Benítez Miranda, la misma que ha concluido dentro del cronograma establecido, y autorizo se continúe en el trámite de graduación.

Loja, 28 de Octubre de 2016

Atentamente



Dr. Tito Muñoz Guarnizo, Mg.Sc.
DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

“DIAGNÓSTICO DE *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* EN LAS GANADERÍAS DEL SECTOR OESTE DE LA PROVINCIA DE ZAMORA CHINCHIPE, MEDIANTE LOS MÉTODOS DE GIEMSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA”

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

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADA

Dr. Galo V. Escudero Sánchez Mg. Sc

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Dr. Wilmer A. Vacacela Ajila Mg. Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dr. Hermógenes Chamba Ochoa Mg. Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

AUTORÍA

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

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

Autor: Daniel Alberto Benítez Miranda

Firma:



Cédula: 1103757801

Fecha: Loja, 10 de marzo de 2016

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

Yo, **Daniel Alberto Benítez Miranda**, declaro ser autor de la tesis titulada "**DIAGNÓSTICO DE *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* EN LAS GANADERÍAS DEL SECTOR OESTE DE LA PROVINCIA DE ZAMORA CHINCHIPE, MEDIANTE LOS MÉTODOS DE GIEMSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA**", 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 10 días del mes de marzo de dos mil diecisiete, firma el autor.

Firma:



Autor: Daniel Alberto Benítez Miranda

Número de cédula: 1103757801

Dirección de domicilio: Loja, Calle Caoba 25-20 y Laureles

Correo Electrónico: dbenitez22@hotmail.com

Numero de celular: 0985467625

DATOS COMPLEMENTARIOS

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Tito R. Muñoz Guarnizo

TRIBUNAL DE GRADO: Dr. Galo V. Escudero Sánchez

Dr. Wilmer A. Vacacela Ajila

Dr. Hermógenes Chamba Ochoa

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento de manera especial a Dios mi guía espiritual, a mi familia, amigos y demás personas que de una u otra manera han contribuido en mi formación profesional, brindándome la guía, consejos y el ánimo requerido en momentos difíciles a fin de culminar esta etapa en mi vida.

Así mismo, mi agradecimiento a la Universidad Nacional de Loja, a la Facultad Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables y a la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por acogerme en su seno y propiciar mi formación profesional; a los docentes de la prestigiosa carrera, que me brindaron lo mejor de sus conocimientos y experiencias. Al personal del centro de Biotecnología y del Laboratorio de Diagnóstico por su gran aporte para el desarrollo del presente trabajo investigativo.

Finalmente, hago una mención especial para el Dr. Tito Muñoz Guarnizo Director de tesis, quien con su significativo aporte mediante su guía, conocimiento, paciencia, y responsabilidad aportó en gran manera para el desarrollo y conclusión del presente trabajo investigativo.

Daniel A. Benítez Miranda

DEDICATORIA

Dedico este trabajo investigativo a mi esposa Ma. Cisne, mi hija Emely, mi madre Blanca, mis hermanos y hermanas por su incondicional apoyo, su sacrificio, comprensión y la confianza que depositaron en mí para culminar mi formación profesional. A mi Padre Marden (+) que aún sigue siendo mi fuente de inspiración mediante su ejemplo.

Daniel A. Benítez Miranda

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDOS	PÁG.
CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS.....	II
CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO.....	III
AUTORÍA	IV
CARTA DE AUTORIZACION.....	V
AGRADECIMIENTO.....	VI
DEDICATORIA.....	VII
ÍNDICE GENERAL.....	VIII
SUMMARY.....	XVI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. BABESIOSIS BOVINA.....	3
2.1.1. Definición.....	3
2.1.2. Sinonimias.....	3
2.1.3. Historia de la Enfermedad.....	3
2.1.4. Clasificación Taxonómica.....	4
2.1.5. Etiología.....	4
a. Babesia bovis.....	5
b. Babesia bigemina.....	5
2.1.6. Ciclo Biológico.....	6
a. Desarrollo en Hospederos Vertebrados.....	6
b. Desarrollo en el Hospedero Garrapata.....	6
2.1.7. Patogenia.....	7
2.1.8. Transmisión.....	8
2.1.9. Signos Clínicos.....	8
2.1.10. Diagnóstico.....	9
a. Frotis Sanguíneo.....	9
b. Frotis de Cerebro.....	10
c. Pruebas de Hemolinfa.....	10
d. Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR.....	10
e. PCR en Tiempo Real.....	12
f. PCR Múltiple.....	12
g. PCR Anidada (nPCR).....	12

h.	Cultivo Celular	13
i.	Sondas de ADN	13
2.1.10.2.	Indirectos	13
a.	Inmonofluorescencia	13
b.	Ensayo por Inmuno absorción Ligado a Enzimas (ELISA)	14
c.	Inmunocromatografía (ICT)	14
d.	Línea de Hibridación de Transferencia Inversa (RLB)	15
e.	Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP)	15
2.1.10.3.	Diagnóstico Diferencial	16
2.1.11.	Tratamiento	16
2.2.	CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DEL GÉNERO BABESIA	16
2.2.1.	Secuencia Genómica	16
2.2.2.	Marcadores Moleculares	17
2.3.	GARRAPATAS	19
2.3.1.	Tipos de Garrapatas	19
2.3.1.1.	Subfamilia Ixodidae	20
2.3.1.2.	Géneros	21
a.	<i>Dermacentor</i>	21
b.	<i>Amblyoma</i>	23
c.	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	24
d.	<i>Ixodes</i>	26
2.3.2.	Clasificación taxonómica	27
2.3.3.	Ciclo Biológico de la Garrapata	27
2.3.4.	Identificación de garrapatas	28
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1.	MATERIALES	29
3.1.1.	De Campo	29
3.1.2.	De Oficina	29
3.1.3.	De Laboratorio	30
3.2.	MÉTODOS	31
3.2.1.	Localización del Ensayo	31
3.2.2.	Tamaño de la Población	32
3.2.3.	Tamaño de la muestra	33
3.2.4.	Variables a Evaluar	34
3.2.5.	Análisis Estadístico	35
3.2.6.	Aplicación de Encuestas	35
3.2.7.	Toma y Recolección de las Muestras	35
3.2.8.	Recolección de Garrapatas	35
3.2.9.	Análisis de Laboratorio	36
a.	Realización de Frotis Sanguíneos	36
b.	Tinción de Giemsa	36
c.	Identificación de Garrapatas	36
d.	Extracción de ADN	37
e.	Verificación de Calidad de ADN	38
f.	Ensayos de PCR	39
g.	nPCR de <i>B. bigemina</i>	39
h.	Técnica de PCR y nPCR	40

i.	Electroforesis.....	44
4.	RESULTADOS.....	45
4.1.	PREVALENCIA DE <i>Babesia spp.</i> EN EL SECTOR OESTE DE LA PROVINCIA DE ZAMORA CHINCHIPE.....	45
4.1.1.	Prevalencia Total.....	45
4.1.2.	Prevalencia por nPCR y Especie de Babesia.....	46
4.1.3.	Prevalencia por Sexo.....	47
4.1.4.	Prevalencia por Cantón.....	48
4.1.5.	Prevalencia por Edad.....	49
4.1.6.	Prevalencia por Razas.....	50
4.1.7.	Comparación de las pruebas diagnósticas.....	51
4.1.8.	Coinfección.....	52
4.2.	GÉNEROS DE GARRAPARAS EXISTENTES EN EL SECTOR OESTE.....	53
4.3.	ANÁLISIS EPIDEMIOLÓGICO.....	53
4.3.1.	Composición de la Muestra de Acuerdo a la Edad.....	54
4.3.2.	Composición de la Muestra de Acuerdo a la Raza.....	54
4.3.3.	Composición de la Muestra de Acuerdo al Género.....	55
4.3.4.	Tipo de Explotación Ganadera.....	55
4.3.5.	Procedencia del Ganado.....	56
a.	Práctica de Cuarentena.....	56
4.3.6.	Presencia de la Enfermedad.....	57
a.	Conocimiento de la Enfermedad.....	57
b.	Presencia de la Enfermedad.....	57
c.	Época del año en que se presenta la enfermedad.....	57
d.	Persistencia de la Enfermedad.....	58
e.	Síntomas que se Presentan en la Enfermedad.....	59
4.3.7.	Diagnóstico y Control de la Enfermedad.....	59
a.	Uso de Servicios Veterinarios.....	59
b.	Toma de Muestras Para el Diagnóstico.....	60
c.	Edades en que se Enferman los Animales.....	60
d.	Morbilidad Anual.....	61
e.	Mortalidad Anual.....	62
f.	Reporte de la Enfermedad en la Finca.....	62
g.	Tratamiento de la Enfermedad.....	63
4.3.8.	Vías de Transmisión.....	63
a.	Conocimiento de la Transmisión de la Enfermedad.....	63
b.	Vacunación de los Animales.....	64
c.	Animales que Entran en Contacto con Animales Silvestres.....	64
4.3.9.	Control de Garrapatas.....	64
a.	Presencia de Garrapatas en el Ganado.....	64
b.	Grado de Infestación.....	64
c.	Control de Garrapatas.....	65
d.	Frecuencia de Control.....	66
e.	Alternabilidad de Productos.....	66
4.3.10.	Salubridad.....	67
a.	Periodo de Retiro de la Leche.....	67
a.	Consumo de Carne.....	67

5. DISCUSIÓN.....	68
6. CONCLUSIONES.....	78
7. RECOMENDACIONES.....	79
8. BIBLIOGRAFIA.....	80
9. ANEXOS.....	90

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	CONTENIDO	PÁG.
1	Principales marcadores moleculares utilizados para la identificación de <i>Babesia spp.</i>	18
2	Características individuales de los géneros de garrapatas	28
3	Características meteorológicas del sector Oeste de la provincia de Zamora Chinchipe	32
4	Población bovina sector oeste de la provincia de Zamora Chinchipe	32
5	Cabezas de ganado y fincas del sector oeste de la provincia de Zamora Chinchipe	34
6	Temperaturas y Ciclos PCR y nPCR <i>B. bovis</i>	42
7	Temperaturas y Ciclos PCR y nPCR <i>B. bigémina</i>	43
8	Prevalencia total sector oeste de la provincia de Zamora Chinchipe (%)	45
9	Prevalencia de <i>Babesia spp.</i> por técnica de nPCR en el sector oeste de la provincia de Zamora Chinchipe (%)	46
10	Prevalencia por sexo de <i>Babesia spp.</i> en el sector oeste de la provincia de Zamora Chinchipe (%)	47
11	Prevalencia de <i>Babesia spp.</i> por cantón en el sector oeste de la provincia de Zamora Chinchipe (%)	48
12	Prevalencia de <i>Babesia spp.</i> por edad en el sector oeste de la provincia de Zamora Chinchipe (%)	49
13	Prevalencia total por razas en el sector oeste de la provincia de Zamora Chinchipe (%)	50
14	Comparación de las dos pruebas diagnósticas Giemsa y nPCR (%)	52
15	Coinfección en las ganaderías del sector oeste de la provincia de Zamora Chinchipe (%)	53
16	Géneros de garrapatas existentes en el sector oeste de la provincia de Zamora Chinchipe (%)	53

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁG.
Figura 1. Diferentes tipos de Babesias.	5
Figura 2. Amplificación de la técnica de PCR	11
Figura 3. Mapa Cromosómico de <i>B. bovis</i> Cepa Tejas T2Bo.	17
Figura 4. Ejemplar del Género <i>Ixodidae</i>	21
Figura 5. Ejemplares de garrapata <i>Dermacentor variabilis</i>	22
Figura 6. Ejemplar de garrapata del Género <i>Amblyoma</i>	24
Figura 7. Ejemplar de garrapata <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	25
Figura 8. Garrapata adulta del género <i>Ixodes</i>	26
Figura 9. Ciclo biológico de la garrapata	28
Figura 10. Prevalencia total por técnicas.....	45
Figura 11. Prevalencia de Babesia por técnica de nPCR	46
Figura 12. Prevalencia total por sexo	47
Figura 13. Prevalencia total por cantón.....	48
Figura 14. Prevalencia total por edad.....	50
Figura 15. Prevalencia total por razas.....	51
Figura 16. Composición de la muestra de acuerdo a la edad.....	54
Figura 17. Composición de la muestra de acuerdo a la raza.....	54
Figura 18. Composición de la muestra de acuerdo al sexo	55
Figura 19. Tipo de explotación	55
Figura 20. Procedencia del ganado.....	56
Figura 21. Fincas que practican cuarentena	56
Figura 22. Presencia de la enfermedad en las fincas del sector Oeste	57
Figura 23. Época en la que aparece la enfermedad.....	58
Figura 24. Persistencia de la enfermedad.....	58
Figura 25. Síntomas que se presentan en la enfermedad	59
Figura 26. Uso de servicios veterinarios.....	60
Figura 27. Toma de muestras para laboratorio.....	60
Figura 28. Edades en las que se enferman los animales	61
Figura 29. Morbilidad anual de Babesiosis en el sector oeste.....	61
Figura 30. Mortalidad anual en el sector	62
Figura 31. Reporte de Babesiosis bovina en el sector.....	62
Figura 32. Control farmacológico de la enfermedad.....	63
Figura 33. Conoce cómo se transmite la enfermedad	63
Figura 34. Grado de infestación por garrapatas en el sector	65
Figura 35. Productos patentados para el control de garrapatas	65
Figura 36. Frecuencia de control de garrapatas.....	66
Figura 37. Alternabilidad de Productos	66
Figura 38. Periodo de retiro de la leche.....	67
Figura 39. Consumo de carne de animales tratados para Babesiosis en el sector.....	67

**“DIAGNÓSTICO DE *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* EN LAS
GANADERÍAS DEL SECTOR OESTE DE LA PROVINCIA DE ZAMORA
CHINCHIPE, MEDIANTE LOS MÉTODOS DE GIEMSA Y REACCIÓN EN
CADENA DE LA POLIMERASA”,**

RESUMEN

Se analizaron 96 muestras de sangre bovina de animales de las ganaderías del sector oeste de la provincia de Zamora Chinchipe mediante el método de tinción de Giemsa determinándose que la prevalencia de *Babesia spp.* en este sector es de 36,4%; por cantones se determinó que en el cantón Zamora es de 39,7 %, en el cantón Centinela del Cóndor la prevalencia es de 26,1 %; en cuanto a la prevalencia por género, en hembras fue de 37,8 % y 28,6 % en machos; en relación a la edad los animales mayores a 4 años fueron prevalentes en un 50 %, los animales comprendidos entre 1 y 2 años fue de 47,4 %, los animales entre 3 y 4 años fue de 29 %, y en los animales menores a un año la prevalencia es de 22,7 %; con respecto a las razas en la raza Gyr la prevalencia fue 66,7 %, en los mestizos fue del 44,2 %, en la raza Holstein fue de 32,4 %, en la raza Brown swiss fue de 22,2 %, y en la raza Charoláis fue de 14,3 %. De las 96 muestras se seleccionaron 70 las cuales se procesaron por el métodos nPCR con el fin de determinar la prevalencia de *B. bovis* y de *B. bigemina*, en donde la prevalencia general es de 81,7 %, de *B. bigemina* fue de 68,5 % y de *B. bovis* fue de 61,4%; en lo que respecta a los cantones se determinó que la prevalencia en el cantón Zamora fue de 90,7 % y en el cantón Centinela del Cóndor fue de 75 %; en cuanto al sexo la prevalencia en hembras fue de 88,3 % y en machos fue de 80 %; en cuanto a la edad en los animales entre 3 y 4 años fue de 95,2 %, en los menores a 1 año fue de 86,7 %; en los animales entre 1 y 2 años fue de 83,3 %; en los animales mayores a 4 años fue de 81,2 %; en lo que respecta a las razas, en la raza Charoláis fue de 100%, en los mestizos fue 91,9 %, en la raza Holstein fue de 88,9 %, en la raza Brown swiss fue de 66,7 % y en la raza Gyr fue de 33,3 %.

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

SUMMARY

In the present research a total of 96 bovine blood samples of cattle from the west sector in the province of Zamora Chinchipe were analyzed using the Giemsa staining method and the prevalence of *Babesia spp.* in this sector is 36.4%; It was determined by cantons, in the canton Zamora is 39.7%, and the prevalence in the canton Centinela del Cóndor is 26.1%; In terms of prevalence by gender, in females was 37.8% and 28.6% in males; in relation to age, animals older than 4 years were prevalent in 50%, animals between 1 and 2 years old were 47.4%, animals between 3 and 4 years old were 29%, and in animals less than one year the prevalence was 22.7%; With respect to breeds in the Gyr breed the prevalence was 66.7%, in the crossbred was 44.2%, in the Holstein was 32.4%, in the Brown Swiss was 22.2%, and in the Charolais was 14.3%. Of the 96 samples, 70 were selected which were processed by the nPCR methods in order to determine the prevalence of *B. bovis* and *B. bigemina*, where the overall prevalence is 81.7%, *B. bigemina* was 68.5% and *B. bovis* was 61.4%; with respect to the cantons, it was determined that the prevalence in the canton Zamora was 90.7% and in Centinela del Cóndor was 75%; In terms of gender, the prevalence in females was 88.3% and in males was 80%; regards to age in animals between 3 and 4 years was 95.2%, in less than 1 year was 86.7%; in animals between 1 and 2 years was 83.3%; in animals older than 4 years was 81.2%; towards breeds, the Charolais breed was 100%, the crossbred was 91.9%, the Holstein was 88.9%, the Brown Swiss was 66.7% and the Gyr was 33.3%.

KEY WORDS: Babesia, nPCR, Giemsa, Prevalence, Diagnosis

1. INTRODUCCIÓN

La Babesiosis o Piroplasmosis, es una enfermedad infecciosa de los bovinos y de otros animales, que prevalece en climas tropicales y subtropicales de todo el mundo, ocasionando cuantiosas pérdidas económicas relacionadas con su alta morbilidad, abortos, disminución y pérdida de lactancias; así como con el uso de insumos destinados a su tratamiento y control.

Esta enfermedad es transmitida por garrapatas del género *Rhipicephalus* (*Boophilus*) microplus CFSPH, (2008) aunque igualmente la pueden transmitir otros hemoparásitos, lo que provoca en todos los casos un elevado índice de morbilidad y mortalidad, lo que ha llevado al uso indiscriminado de sustancias endectocidas, generando también un problema de salud pública en la provincia de Zamora Chinchipe, ya que esta enfermedad afecta la producción de leche y carne, así mismo afecta la economía de los productores ya que estos tienen que invertir en la prevención y control de la enfermedad, así como en el control de vectores y suministros de insumos veterinarios para el tratamiento (Rey, 2004).

En nuestro país se han realizado algunos estudios en cuanto a la prevalencia de esta enfermedad en algunas provincias, es así que en un trabajo realizado en el camal Metropolitano de Quito Pazmiño, (2011) determinó la prevalencia de Babesiosis bovina en un 29,29 %; en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas se estimó la prevalencia de Babesiosis bovina en 0 % según Hernández, (2012), mediante la utilización de técnicas de diagnóstico moleculares, mientras que Yáñez, (2013) utilizando la técnica de tinción de Giemsa reportó una prevalencia del 2 % para *B. bigemina* en el parroquia Huigra del cantón Alausí.

La determinación de la presencia de estos hemoparásitos por medios moleculares permite entregar aportes importantes para el mejoramiento de programas de prevención y control alternativos a los que se vienen desarrollando, esto con el fin de promover a futuro el desuso de sustancias

tóxicas que hoy son utilizadas en el control de vectores; y de ser necesario incluir el uso de vacunas específicas para el control de la enfermedad.

El presente trabajo investigativo ha permitido conocer la prevalencia de estos hemoparásitos (*B. bovis* y *B. bigemina*) por medio del uso de la técnica de nPCR, ya que ésta, es mucho más sensible para su determinación. Permite comprobar afirmar y diferenciar con los resultados obtenidos por el tradicional método de diagnóstico conocido como tinción de Giemsa.

Para la realización de este trabajo investigativo se plantearon los siguientes objetivos:

- Determinar la prevalencia de *B. bovis* y *B. Bigemina* por los métodos de tinción de Giemsa y por la técnica de Reacción de Cadena de Polimerasa (nPCR) en el sector Oeste de la provincia de Zamora Chinchipe.
- Diferenciar la sensibilidad del diagnóstico de *B. bovis* y *B. bigemina* dado por los técnicas de tinción de Giemsa y nPCR.
- Estudiar los factores asociados a la prevalencia de *B. bovis* y *B. bigemina* en el sector oriental de la provincia de Zamora Chinchipe.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. BABESIOSIS BOVINA

2.1.1. Definición

La Babesiosis bovina es una enfermedad infecciosa transmitida por las garrapatas, importantes artrópodos que generalmente se encuentra en las regiones tropicales y subtropicales, las especies más prevalentes son *B. bovis* y *B. bigemina* Homer, (2000). La *Babesia spp.* es un protozoario intraeritrocitario que provoca lisis extensiva lo que ocasiona anemia, ictericia, hemoglobinuria y hasta la muerte, puede ser transmitido tanto por garrapatas adultas como por ninfas.

2.1.2. Sinonimias

La Babesiosis, también se conoce como Piroplasmosis, Ranilla Roja, Tristeza bovina, Fiebre de Texas, Fiebre de hemaruria, Malaria bovina, Red Water en EUA, Fiebre bovina transmitida por garrapatas (Cordero del Campillo, et al., 1999).

2.1.3. Historia de la Enfermedad

Tras analizar muestras sanguíneas de bovinos con signos de anemia hemolítica y hemoglobinuria en 1888 Viktor Babes en Rumania identifico por primera vez el parásito. En 1983 Theobal Smith y Frederick Kilborne demostraron que la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* transmitía la enfermedad en los bovinos Smith & Kilborne, (1977). Con esta investigación se crearon las bases para la elaboración del programa de erradicación de la

Babesiosis, a través de la eliminación de las garrapatas del ganado en los Estados Unidos, que culminó en 1943 (Graham & Hourrigan, 1977).

2.1.4. Clasificación Taxonómica

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

Dominio:	Eucaryota
Reino:	Protista
Subreino:	sin clasif. (Alveolata, Biciliata, Neozoa o Protozoo)
Filo:	Apicomplexa
Clase:	Aconoidasida
Subclase:	Piroplasmae
Orden:	Piroplasmida
Superfamilia:	Babesioidea
Familia:	Babesiidae
Género:	<i>Babesia Spp.</i>

2.1.5. Etiología

La Babesiosis es producida por un protozoo del género *Babesia Spp.*, siendo los más comunes en nuestro medio *B. bovis* y *B. bigenina* y como ya se mencionó son transmitidas por garrapatas del género *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Gray, 2006).

a. Babesia bovis

Este parásito generalmente se encuentra en la circulación capilar, ocupando del 0,1 a 1 % de eritrocitos infestados, son piriformes, redondos o ameboides algunos aparecen con una vacuola dando el aspecto de anillos tienen un tamaño aproximados de 2,4 μm por 1,5 μm (Moscoso, 2000).

Para el diagnóstico es importante conocer las formas frecuentes del parasito de acuerdo a sus fases de evolución que son: forma anaplasmoide (primer ciclo evolutivo), forma en división (bipartición transversal), forma redonda (estado adulto numeroso) (Kim, 2007).

b. Babesia bigemina

Es grande, pleomórfica, llega a ocupar hasta $\frac{3}{4}$ partes del eritrocito, se identifica por un par de corpúsculos en forma de pera, unidos en ángulo agudo dentro del eritrocito, madura mide entre 4 y 5 μm de longitud y entre 2 y 3 μm de diámetro ocupando un gran espacio en el eritrocito Homer, (2000). Se distribuye más uniformemente que *Babesia bovis* con un porcentaje superior al 2%, presenta la distribución más amplia que todas donde la parasitemia a menudo excede el 10% y puede llegar a un 30 % (Gray, et al., 2002).

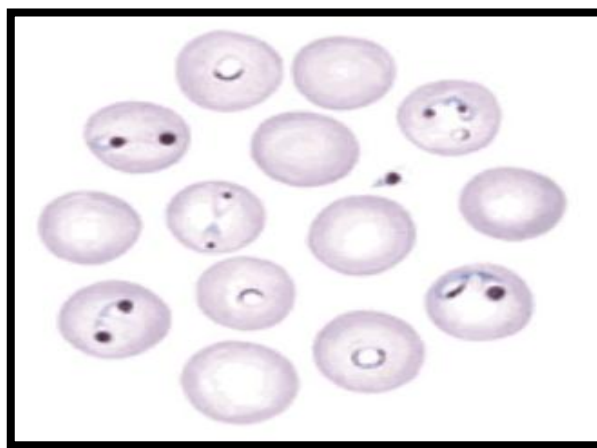


Figura 1. Diferentes tipos de Babesias. (Queensland government animal and plant health, 2011)

2.1.6. Ciclo Biológico

Babesia spp. utiliza estrategias de adaptación que le han permitido desarrollar interacciones de larga duración con sus hospedadores; la parasitemia baja en el vertebrado, así como la transmisión transovárica y transestadial en la garrapata permiten una equilibrada dinámica que permite la persistencia de *Babesia spp.* a largo plazo en el ecosistema (Chauvin et. al., 2009).

a. Desarrollo en Hospederos Vertebrados

El bovino se infecta tras la mordedura de la garrapata por la inoculación de esporozoitos *Babesia spp.* con la saliva. Los esporozoitos penetran directamente en los eritrocitos, donde se desarrollan todas las fases del parásito. Primero se producen dos merozoitos por fisión binaria, después se lisa el glóbulo rojo y cada merozoito invade un nuevo eritrocito produciéndose merogonias sucesivamente. La multiplicación es asíncrona y se pueden presentar varias etapas de división del parásito en el torrente sanguíneo al mismo tiempo (Chauvin et. al., 2009).

b. Desarrollo en el Hospedero Garrapata

Cuando los eritrocitos infectados con *Babesia spp.* son ingeridos por las garrapatas, la mayoría de los parásitos se degeneran y se destruyen, sin embargo, algunos estadios específicos del parásito ("pre-gametocitos") sobreviven para desarrollarse en gametocitos Chauvin et. al., (2009). Los gametos se fusionan en el lumen del tracto digestivo de la de garrapata para formar un cigoto alargado de 8 a 10 μm de longitud que lleva un organelo similar al pico de una cabeza flecha, que facilita su penetración en las células del intestino medio Chauvin, et. al., (2009). Una vez que el cigoto de *Babesia* se ha internalizado, el orgánulo punta de flecha se desintegra y el cigoto se

transforma en una fase móvil, denominada oocineto. El oocineto escapa del epitelio del intestino medio e invade los tejidos del cuerpo de la garrapata, incluyendo los ovarios donde muchos huevos son infectados con *Babesia spp* (transmisión transovárica) CFSPH, (2008). Posteriormente *Babesia spp.* se multiplica asexualmente, continuando como esporogonia *Babesia spp* y el desarrollo de numerosas kinetos (esporoquinetos); la infección se va adquiriendo durante una etapa de la vida a la siguiente (la transmisión transtadial). Algunos kinetos invaden las glándulas salivales de las garrapatas, donde se desarrollan en esporozoitos. Los esporozoitos representan la fase infecciosa del parásito en el huésped mamífero. Los parásitos *B. bovis* generalmente pueden ser infecciosos 2 a 3 días posteriores a que se prenden a las larvas de las garrapatas y se pueden transmitir a través de las larvas CFSPH, (2008). En *R. microplus*, *B. bovis* no sobrevive más allá del estadio larval. Por el contrario, *B. bigemina* madura aproximadamente 9 días después de que la larva de garrapata se prende y sólo se transmite a través de ninfas y adultos (CFSPH, 2008).

2.1.7. Patogenia

La principal reacción patogénica que producen los hemoparasitos es la anemia hemolítica, según Carrique y Rivera, (2000), se produce hemolisis al destruirse los eritrocitos parasitados, al romperse los glóbulos rojos y liberarse la hemoglobina, la que queda en libertad y se convierte en pigmentos biliares originando la producción de bilirrubina que tiñe de color amarillos las mucosas.

El exceso de hemoglobina que el hígado no puede transformar aparece en la orina que se torna de color rojo lo que se conoce con el nombre de hemoglobinuria (Bock et al., 2006).

2.1.8. Transmisión

Las especies de *Babesia spp.* se transmiten mediante garrapatas que se infectan al ingerir parásitos que se encuentran en la sangre del bovino infectado. Los principales vectores de *B. bigemina* son *Rhipicephalus microplus* (anteriormente *Boophilus microplus*) y *Rhipicephalus annulatus* (anteriormente *Boophilus annulatus*). *Rhipicephalus decoloratus*, *Rhipicephalus geigy* y *Rhipicephalus evertsi* también transmiten esta especie. Los principales vectores de *B. bovis* son *R. microplus* y *R. annulatus*, pero *R. geigy* también puede ser un vector (CFSPH, 2008).

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

2.1.9. Signos Clínicos

Las manifestaciones clínicas se caracterizan por una anemia hemolítica, la cual varía dependiendo del agente (especie de *Babesia*) y del hospedador (edad, inmunidad). *B. bovis* es generalmente más patógena que *B. bigemina* o *B. divergens*. Los animales infectados desarrollan una inmunidad de por vida contra la reinfección con la misma especie u otras especies debido a la reacción cruzada OIE, (2010). La mayoría de los casos de Babesiosis se observan en adultos, y los animales menores de 9 meses generalmente no presentan síntomas.

Los principales signos clínicos son: fiebre alta, anorexia, ataxia e incoordinación, mucosas pálidas, ictericia, producción de orina rojo oscura o café (hemoglobinuria), shock circulatorio, en casos raros signos nerviosos asociados al secuestro de eritrocitos infectados en los capilares del cerebro. En casos agudos la parasitemia máxima (porcentaje de eritrocitos infectados) es frecuentemente menor al 1 % para *Babesia bovis* mientras que en el caso de *Babesia bigemina* excede el 10% pudiendo llegar al 30 % (OIE, 2010).

Puede observarse diarrea o estreñimiento y manifestarse un síndrome de insuficiencia respiratoria con disnea en animales afectados gravemente. La fiebre puede producir abortos en vacas preñadas y los toros a veces presentan una disminución temporal de la fertilidad. Parte del ganado bovino puede aparecer echado con movimientos involuntarios en las piernas; la mayoría de los animales con signos nerviosos, muere (CFSPH, 2008).

2.1.10. Diagnóstico

Existen varios métodos para el diagnóstico de babesiosis bovina, ya sea identificando los parásitos directamente (métodos directos), o bien identificando los anticuerpos contra los parásitos (métodos indirectos) (Gray, 2006).

2.1.10.1. Métodos Directos

a. Frotis Sanguíneo

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

b. Frotis de Cerebro

Cuando un bovino ha muerto y se presume que sufrió de Babesiosis con la presencia de signos nerviosos, se puede identificar al parásito mediante improntas de la corteza cerebral teñidas igual que en frotis sanguíneos. Casi el cien por ciento de los eritrocitos presentes en los capilares del cerebro están infectados. Los frotis de otros órganos como el riñón o el hígado también pueden llevarse a cabo con buenos resultados (Mosqueda, et. al., 2012).

c. Pruebas de Hemolinfa

La garrapata tras succionar la sangre de un bovino infectado ingiere los parásitos, que pronto invaden el lumen del intestino y posteriormente la hemolinfa de las garrapatas infectando a varios órganos. En este caso se toma una gota de hemolinfa y se le realiza un frotis regular donde el diagnóstico se basa en la observación de los kinetos, que tienen forma vermicular. La prueba de hemolinfa requiere un microscopista experimentado ya que las garrapatas en áreas endémicas tienen una muy baja cantidad de kinetos (Mosqueda, et. al., 2012).

d. Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR

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

Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN. Para realizar la técnica se necesitan: los 4

desoxirribonucleósidos-trifosfato (dNTP), dos cebadores (en inglés, primers), iones divalentes $MgCl_2$, una solución tampón (buffer) de la ADN polimerasa, ADN polimerasa (la más común es la polimerasa Taq), ADN molde y un termociclador (Rådström et. al., 2004).

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

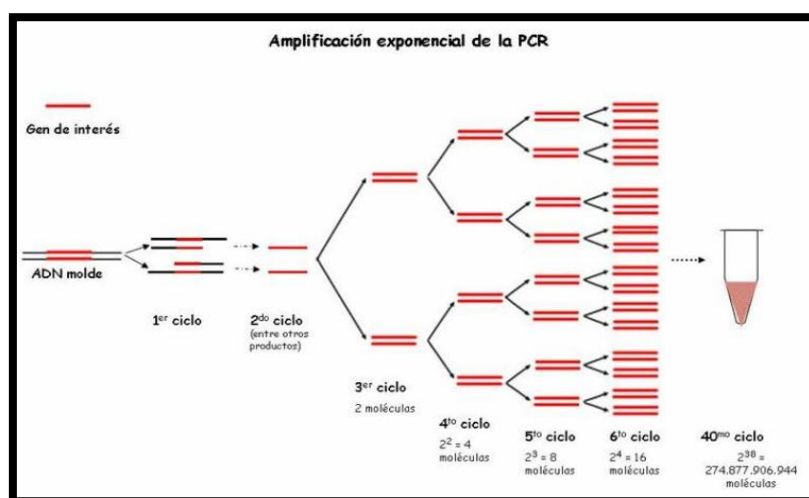


Figura 2. Amplificación de la técnica de PCR (AgenBio Cuaderno N^o 67, 2007)

e. PCR en Tiempo Real

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. Tiene muchas ventajas sobre la PCR convencional, ya que no requiere un análisis post-PCR, es más rápido, no genera gastos debido a un análisis electroforético o fotodocumentación y permite identificar con una alta probabilidad los productos de PCR a partir de su temperatura de fusión (denominado valor T_m , del inglés “melting temperatura”). La primera RT-PCR descrita para la cuantificación de *Babesia spp.* fue en 2003 cuando se utilizó SYBR Green para cuantificar la transcripción del gen rap-1 de *Babesia bigemina* Suárez et. al., (2011). Se han publicado varios protocolos para la cuantificación de *B. bovis* y *B. bigemina*, Buling et. al., (2007); Kim et. al., (2007); Bhoora et. al., (2010); Ramos et. al., (2011). Se ha reportado que la sensibilidad de RTPCR es cuatro veces mayor que PCR convencional Chiang, et. al., (1996). Probablemente, la única desventaja de esta metodología es el alto costo de los equipos, que duplica o triplica el costo de una máquina de PCR convencional.

f. PCR Múltiple

Es una variación de la técnica de PCR en donde se emplean dos o más pares de primers en un único tubo con el fin de amplificar simultáneamente varios segmentos de ADN, Gray, (2006), lo que permite diagnosticar varias enfermedades en una misma prueba.

g. PCR Anidada (nPCR)

Es una variante de la PCR convencional que comprende dos ciclos de amplificación con distintos pares de primers en cada una. Primero se realiza

una reacción con los primers externos para amplificar una región de ADN más extensa, que contiene el fragmento objetivo. Después, con este producto de amplificación, se ejecuta una segunda PCR con los iniciadores internos para amplificar la región específica. La principal ventaja es su mayor sensibilidad en comparación con la PCR normal o múltiple (Kim, 2007).

h. Cultivo Celular

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

i. Sondas de ADN

Fueron el primer método desarrollado para detectar el ADN de *Babesia spp* en sangre. La detección se lleva a cabo por autorradiografía, quimioluminiscencia o un sustrato colorimétrico. Con esta técnica se ha detectado *Babesia spp.* en tejidos de garrapatas y en portadores infectados Hodgson et. al., (1992); Ramos et. al., (1992). Esta metodología toma varios días y precisa de técnicos especializados.

2.1.10.2. Indirectos

a. Inmonofluorescencia

Esta técnica se fundamenta en que los anticuerpos pueden ser marcados con moléculas que poseen propiedades fluorescentes, es decir que estas moléculas absorben luz de una longitud de onda y emite luz de otra longitud

de onda, así los anticuerpos que están marcados con estas moléculas fluorescentes se pueden visualizar con un microscopio que posee una fuente de luz UV.

b. Ensayo por Inmuno absorción Ligado a Enzimas (ELISA)

Tiene la ventaja de que se puede leer un gran número de muestras con facilidad y presenta mayor especificidad de la IFAT. Hay varias versiones de ELISA para la detección de varias especies de *Babesia spp.* incluyendo *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. divergens*, *B. caballi*, *B. canis*, *B. gibsoni* y *B. microti* Weiland, (1986); Purnell et. al., (1977); Waltisbuhl, (1987). Evalúa la presencia de anticuerpos anti-Babesia utilizando un conjugado anti-IgG con una enzima, por lo general de peroxidasa. Con esta prueba, es posible detectar anticuerpos hasta cuatro años después de una infección simple. Deberían producirse de un 95 -100% de reacciones positivas con animales inmunes a *B. bovis*, 1.2 % de reacciones falsos positivos con suero negativo y <2% de reacciones falsos positivos con animales inmunes a *B. bigemina* (OIE, 2010).

c. Inmunocromatografía (ICT)

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

d. Línea de Hibridación de Transferencia Inversa (RLB)

Permite la detección de múltiples géneros, especies o cepas en una muestra de sangre o tejido. Este método ha sido utilizado para la detección de varias especies de *Babesia spp.* como: *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. divergens*, *B. major*, *B. motasi*, *B. crassa* y *B. caballi*. Se usa principalmente para la detección combinada de diferentes géneros y especies en estudios epidemiológicos (Gubbels et. al., 1999); (Almeria et. al., 2002); (Butler et. al., 2008); (Niu et. al., 2009); (Schnittger et. al., 2004).

e. Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP)

Amplificación Isotérmica Mediatizada en circuito, con sus siglas en ingles LAMP es un método de detección que amplifica ADN bajo condiciones isotérmicas con una alta eficiencia, especificidad y velocidad. Se basa en el uso de cuatro cebadores diseñados específicamente para amplificar seis secuencias diferentes en el mismo ADN diana, con la ayuda de una ADN polimerasa isotérmica. La especificidad de la amplificación es alta. No requiere de electroforesis y ni fotodocumentación posterior, pero puede ser visto directamente mediante fluoróforos como el SYBER-green y el Bromuro de Etidio Mosqueda, et. al., (2012). Con esta técnica se han detectado varias especies de *Babesia* incluyendo las cepas bovinas Iseki et. al., (2007). Para *Babesia bovis* y *B. bigemina* el nivel de detección se aumentó hasta 103 y 105, respectivamente, en comparación con PCR convencional Iseki et. al., (2007). Es una técnica con muchas ventajas sobre otras basadas en la detección de ácidos nucleicos y puede ser ventajoso en los países en vías de desarrollo o laboratorios donde se carece de equipos especializados.

2.1.10.3. Diagnóstico Diferencial

La Babesiosis se asemeja a otras enfermedades que producen fiebre y anemia hemolítica. El diagnóstico diferencial incluye Anaplasmosis, Tripanosomiasis, Teileriosis, Leptospirosis, Hemoglobinuria bacilar, Eperitrozonosis, intoxicación por colza e intoxicación crónica por cobre. La rabia y otras encefalitis también pueden considerarse en el ganado bovino con signos del SNC (CFSPH, 2008).

2.1.11. Tratamiento

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

2.2. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DEL GÉNERO BABESIA

2.2.1. Secuencia Genómica

Actualmente la Universidad Estatal de Washington está llevando a cabo los proyectos del genoma de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*. Hasta el momento se ha estudiado el genoma de *Babesia bovis* cepa Tejas T2Bo, el cual está constituido por cuatro cromosomas Brayton et. al., (2007). El cromosoma 1, el más pequeño, contiene un gran espacio físico, flanqueado por dos grandes contiguos de 821.816 pares de bases (pb) y 285.379 pb de longitud. Los

cromosomas 2 y 3 están conformados por 1.729.419 y 2.593.321 pb de longitud, respectivamente y el cromosoma 4 que contiene un espacio que no se ha resuelto y un cóntigo de 1.149 pb que separa dos cóntigos de 827.912 pb y 1.794.700 (Brayton et. al., 2007).

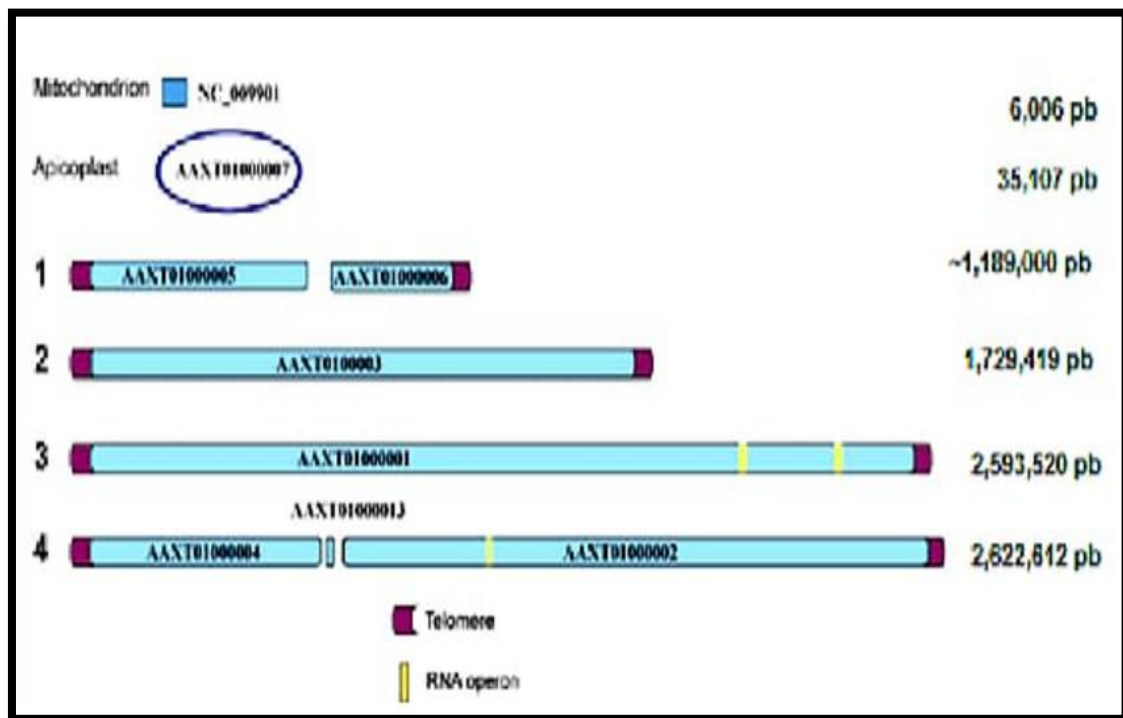


Figura 3. Mapa Cromosómico de *B. bovis* Ceba Tejas T2Bo. (WSU, 2012)

2.2.2. Marcadores Moleculares

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

Cuadro 1. Principales marcadores moleculares utilizados para la identificación de *Babesia spp.*

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

Fuente: Ríos et al., (2011).

2.3. GARRAPATAS

2.3.1. Tipos de Garrapatas

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

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

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

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

El ciclo de vida de las garrapatas de la familia Ixodidae presenta una etapa inactiva (huevos) y tres etapas móviles hematófagas: larva, ninfa y adulto. Cada una de estas requiere de varios días de fijación en el hospedero Gatto et al., (2006), Barros et al., (2006). En contraste, las garrapatas de la familia Argasidae pueden pasar por varios estadios ninfales antes de alcanzar la fase adulta y las etapas de alimentación pueden ser muy cortas (de minutos a

horas). Los requerimientos de hábitat son un aspecto importante en la biología de garrapatas y afectan los estados no parasíticos así como la oportunidad de contacto con un hospedero para la ingesta de sangre (Oliver, 1989).

2.3.1.1. Subfamilia *Ixodidae*

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

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

Los ixódidos se caracterizan por su dimorfismo sexual. Pasan por cuatro estadios: huevo, larva, ninfa y adulto. Tienen sólo un estadio ninfal. Cada etapa

requiere de varios días para ingerir sangre y también requieren ingestas más abundantes de sangre. Las ninfas y hembras solo se alimentan una vez. Las hembras producen una gran masa de huevos y mueren. La mayoría de las garrapatas de ésta familia requieren tres hospedadores diferentes que pueden o no ser de la misma especie. Con frecuencia, larvas y ninfas se alimentan sobre pequeños y medianos mamíferos, mientras que los adultos se alimentan sobre especies mayores. Algunos ixódidos no requieren múltiples hospederos y se alimentan sobre uno o dos (Oliver, 1989).



Figura 4. Ejemplar del Género *Ixodidae* (DPC Selvaggia, Higiene Ambiental, Málaga, 2008)

2.3.1.2. Géneros

a. *Dermacentor*

La mayoría de las especies se ubican en climas templados, algunas pueden transmitir infecciones zoonosicas, tiene la capacidad de transportar a otros parásitos del género protozoo como las Babesias, la Anaplasmosis, la Fiebre Q y otras enfermedades.

Este parásito se ubica principalmente en las orejas de su hospedador, sin embargo en casos clínicos puede llegar a infestar las fosas nasales y las crines del animal.

Los ojos son pequeños, circulares y planos. El escudo dorsal y las extremidades tienen color un fondo rojo (Junquera, 2013).



Figura 5. Ejemplares de garrapata *Dermacentor variabilis* (DPC Selvaggia, Higiene Ambiental, Málaga, 2008)

Este género son Garrapatas de tres huéspedes: Un adulto dilatado por sangre desciende de un huésped principal y pone huevos en la tierra, de éstos nacen larvas que pueden vivir de 20 a 115 días sin alimentarse. Las larvas se instalan en un huésped para extraer sangre, y descienden para mudar a ninfas sobre el pasto.

Las ninfas pueden vivir hasta 11 meses sin alimentarse. Las ninfas toman un nuevo huésped para extraer sangre, y descienden para mudar a garrapatas, que pueden estar hasta 14 meses sin alimentarse.

Los adultos jóvenes ascienden al huésped principal para reiniciar este ciclo, el huésped puede ser el mismo animal, otro animal de la misma especie o un animal de otra especie. Se localizan en toda la piel del animal, especialmente en tabla del cogote y entrepierna.

b. Amblyoma

Especie de garrapata dura en la que la hembra es más grande que el macho se caracteriza por tener tres hospedadores, y ser muy difícil de extraer manualmente.

El escudo distintivo es de un tono más pálido en el macho y la hembra presenta una mancha plateada en forma de estrella en el margen posterior.

Tienen unas trompas largas que generalmente ocasionan heridas profundas y sensibles a contaminarse con larvas de gusanos barrenadores y bacterias.

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

Estas garrapatas además de sus picaduras, son vectores de varias enfermedades como las siguientes:

- *Amblyomma hebraeum* transmite Lowdria (*Rickettsia ruminantium*) y fiebre de picadura de garrapata.
- *Amblyomma americanum* transmite la parálisis de garrapata y la fiebre Q. (*Rickettsia burnetii*).
- *Amblyomma maculatum* transmite la parálisis de la garrapata.

Un adulto dilatado por sangre desciende de un huésped principal y pone huevos en la tierra. De éstos nacen larvas que pueden vivir de 50 a 80 días sin alimentarse. Las larvas se instalan en un huésped para extraer sangre, y descienden para mudar a ninfas sobre el pasto. Las ninfas pueden vivir hasta 15 meses sin alimentarse (Camilo et al., 2010).



Figura 6. Ejemplar de garrapata del Género *Amblyoma* (DPC Selvaggia, Higiene Ambiental, Málaga, 2008)

Las ninfas toman un nuevo huésped para extraer sangre, y descienden para mudar a garrapatas, que pueden estar hasta 14 meses sin alimentarse. Los adultos jóvenes ascienden al huésped principal para reiniciar este ciclo. El huésped puede ser el mismo animal, otro animal de la misma especie o un animal de otra especie (Camilo et al., 2010).

c. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Son garrapatas de un solo huésped con ciclos que pueden durar entre tres y cuatro semanas y pueden llegar a causar infestaciones severas. Es considerada la garrapata más importante del mundo para el ganado por su resistencia a los garrapaticidas.

Tienen la capacidad de transmitir parásitos protozoarios como la Babesias y Anaplasmas.

Como en la mayoría de las garrapatas duras la hembra es de mayor tamaño que el macho y en la hembra a diferencia del macho el escudo dorsal no la cubre completamente (Gugliemone y Nava, 2005).



Figura 7. Ejemplar de garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

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

Estas garrapatas se localizan en toda la piel del animal, especialmente en tabla del codo y entrepierna.

Estas garrapatas transmiten la enfermedad denominada *Babesiosis*. Esta enfermedad, también conocida como Fiebre tic, es producida por un parásito de la garrapata (*Babesia bigemina*), que persiste en sus huevos. Generaciones sucesivas infectan entonces a los huéspedes de las garrapatas.

La *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* o garrapata tropical transmite la Anaplasmosis (*Anaplasma marginale*), la Piroplasmosis (*Babesia bovis*, *Babesia bigemina*) y la Fiebre Q (*Rickettsia burnetti*). *Boophilus calcaratus* transmite la Babesiosis y la Anaplasmosis (Voltzit, 2007).

d. Ixodes

Son garrapatas de tres huéspedes y pueden llegar a infectar a mamíferos, aves y reptiles.

La de mayor importancia en las zonas tropicales la *I. ricinus* ya que parasita al ganado y en algunos casos puede infestar al hombre.



Figura 8. Garrapata adulta del género *Ixodes*.

Un adulto dilatado por sangre desciende de un huésped principal y pone huevos en la tierra, de éstos nacen larvas que pueden vivir de 13 a 19 meses sin alimentarse. Las larvas se instalan en un huésped para extraer sangre, y descienden para mudar a ninfas sobre el pasto.

Las ninfas pueden vivir hasta 24 meses sin alimentarse, las ninfas toman un nuevo huésped para extraer sangre, y descienden para mudar a garrapatas, que pueden estar hasta 27 meses sin alimentarse. Los adultos jóvenes ascienden al huésped principal para reiniciar este ciclo. El huésped puede ser el mismo animal, otro animal de la misma especie o un animal de otra especie.

Transmiten la parálisis de la garrapata (*Ixodes ricinus*), transmite la Piroplasmosis (*Babesia divergens*, *Babesia bovis*) y la Anaplasmosis

(*Anaplasma marginale*). *Ixodes holocyclus* transmite la Fiebre Q (*Coxiellaburnetti*) (Gerson & Smiley, 1990).

2.3.2. Clasificación taxonómica

Siendo *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* la especie de garrapata más representativa se la ha tomado como ejemplo para destallar su taxonomía (Barker & Murrel, 2008).

Reino:	Animalia
Tipo:	Artrópoda
Subtipo:	Chelicerata
Clase:	Arácnida
Orden:	Ixodida
Familia:	Ixodidae
Género:	<i>Rhipicephalus</i>
Subgénero:	<i>Boophilus</i>
Especie:	<i>R. microplus</i>

2.3.3. Ciclo Biológico de la Garrapata

El ciclo biológico de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ocurre entre el hospedero, la vegetación y el suelo de un sitio específico, comprende cuatro estadios biológicos el de huevo (incuba de 17 a 21 días), larva (7 a 10 días), ninfa (5 a 6 días) y adulto (1 a 3 días) de una fase a otra se desarrolla el proceso de ecdisis o desprendimiento del exoesqueleto; la fase parasitaria (larva) se inicia en el suelo, luego trepa a las plantas más cercanas para más

tarde trepar al hospedero animal; tanto en los animales como en el suelo la garrapata está sujeta a cambios ambientales el adulto se deja caer del hospedero una vez que se realiza la cópula (Bazán, 2002).

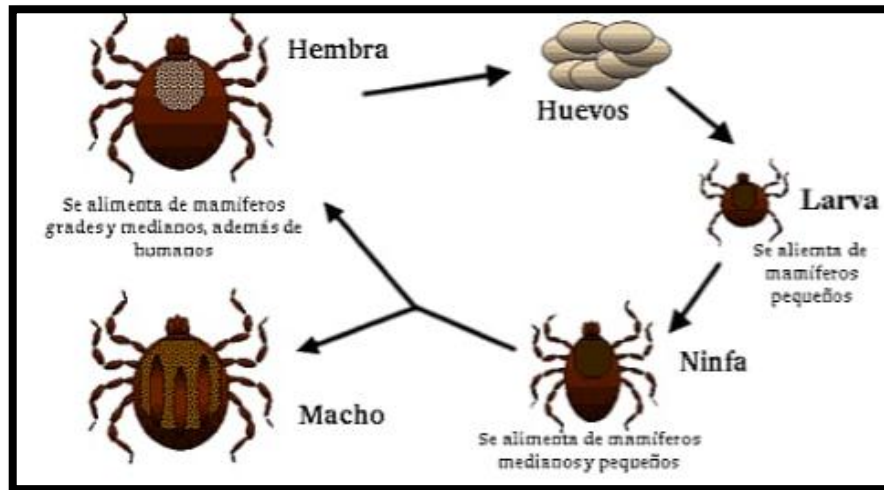


Figura 9. Ciclo biológico de la garrapata

2.3.4. Identificación de garrapatas

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

Cuadro 2. Características individuales de los géneros de garrapatas

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

Fuente: Solari et al., (2006).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. De Campo

- 96 Bovinos de diferente edad, raza y sexo.
- Overol
- Botas
- Cuerdas
- Nariguera
- Termo
- Tubos vacutainer con anticoagulante EDTA
- Agujas
- Capuchones
- Placas portaobjetos
- Marcador indeleble
- Frascos para garrapatas
- Hoja de registro
- Encuestas
- Cámara fotográfica

3.1.2. De Oficina

- Ordenador
- Memoria USB
- Impresora
- Papel bond
- Calculadora

- Lápices
- Esferográficos
- Registros
- Borrador

3.1.3. De Laboratorio

- Mandil
- Guantes
- Mascarilla
- Placas portaobjetos
- Aceite de inmersión
- Colorante de Giemsa
- Frasco lavador o lavador de placas
- Microscopio
- Estereoscopio
- Cajas Petri
- Kit QBC
- Pipeteador automático
- Micro centrífuga Indexx
- Equipo para hemogramas
- Cabina de bioseguridad LABCONCO Purifer Class II Biosafety Cabinet
- Kit de extracción de ADN Pure Link® Genomic DNA mini kit, Invitogen
- Micropipetas
- Puntas de pipetas desechables 0.5-10 µl, 20-100 µl, 100-1000µl
- Autoclave
- Estufa
- Baño María
- Vórtex
- Centrífuga EPPENDORF Centrifuge 5415 D
- Espectrofotometro NanoDrop™ 2000
- KIT para PCR Applied biosystems™

- Primer 1 Invitrogen® 1 – F CACGAGGAAGGAACTACCATGTTGA
- Primer 2 Invitrogen® 1 – R CCAAGGAGCTTGAACGTACGAGGTCA
- Primer 3 Invitrogen® 2 – F TCAACAAGGTACTCTATATGCTACC
- Primer 4 Invitrogen® 2 – R CTACCGAGCAGAACCTCCACCAT
- Primer 5 Invitrogen® 3 – R CATCTAATTTCTCTCCATACCCTCC
- Primer 6 Invitrogen® 3 – F CCTCGGCTTCAACTCTGATCCAAAG
- Primer 7 Invitrogen® 4 – F CGCAAGCCCAGCACGCCCGGTGC
- Primer 8 Invitrogen® 4 – R CCGACCTGGATAGGCTGTATG
- Agua destilada desionizada
- Tubos ependorff de 50 uL, 600µL y 1500uL
- Gradillas
- Termociclador punto final Applied Biosystems™
- Balanza Analítica
- Microondas
- Parafilm
- Tijeras
- Equipo de electroforesis
- Transluminador y fotodocumentador
- Congeladores

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Localización del Ensayo

El presente trabajo investigativo se llevó a cabo en los cantones Zamora y Centinela del Cóndor correspondientes al sector oeste de la provincia de Zamora Chinchipe, la superficie de estos cantones es de 2395 Km² (Centinela del Cóndor 519 Km² y Zamora 1876 Km²) y representa el 17,81 % de la superficie total de la provincia (10.556 km²), (GAD Provincial Zamora Chinchipe, 2014).

El sector oeste de la provincia de Zamora posee las siguientes características meteorológicas.

Cuadro 3. Características meteorológicas de los cantones del sector Oeste de la provincia de Zamora Chinchipe.

CARACTERÍSTICA	CANTÓN ZAMORA	CANTÓN CENTINELA DEL CÓNDOR
Altitud (msnm)	1000 a 3000	800 a 2000
Temperatura (°C)	18 a 22	18 a 24
Clima (Holdridge)	tropical cálido húmedo	Sub tropical
Precipitación (mm/año)	500 a 1000	2000 a 3000
Humedad (%)	92	30 – 95

Fuente: GAD Provincial Zamora Chinchipe, (2014)

3.2.2. Tamaño de la Población

La población estuvo constituida por 18 376 bovinos de las ganaderías del sector Oeste de la provincia de Zamora Chinchipe de diferentes edades, razas y sexo, de donde se extrajo estadísticamente una muestra para su estudio.

Cuadro 4. Población bovina sector oeste de la provincia de Zamora Chinchipe.

CANTONES	CABEZAS	UPAS
Zamora	13986	846
C. del Cóndor	4390	212
TOTAL	18376	1258

Fuente: GAD Provincial Zamora Chinchipe, (2014)

3.2.3. Tamaño de la muestra

Para obtener el tamaño de la muestra se calculó partiendo del conocimiento de la población bovina existente en el sector oeste de la provincia de Zamora Chinchipe y de la probabilidad de prevalencia junto con el error máximo permitido, mediante la siguiente fórmula:

$$n = \frac{Z^2 * N * P * Q}{E^2 * (N - 1) + Z^2 * P * Q}$$

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 %)

Q = Probabilidad de fracaso (50%)

E = Error máximo permisible o precisión (10 %)

Considerando que la población bovina del sector oeste de la provincia de Zamora Chinchipe es de 18 376 animales; y que la probabilidad de prevalencia de acuerdo a trabajos previos es elevada (80 %), y un error de precisión permitido es de 10 %; la fórmula se desarrolló así:

$$n = \frac{1,96^2 * 18376 * 0,5 * 0,5}{0,1^2 * (18376 - 1) + 1,96^2 * 0,5 * 0,5} = 96$$

Por lo tanto, el tamaño de la muestra fue de 96 bovinos escogidos de forma aleatoria en las ganaderías del sector oeste de la provincia.

Para la realización de la técnica de nPCR por cuestiones logísticas de las 96 muestras se seleccionaron al azar 70.

Cuadro 5. Cabezas de ganado y fincas del sector oeste de la provincia de Zamora Chinchipe

OESTE	Cabezas	Factor	Muestra	Fincas	Factor	Muestra
Zamora	13986	0,00522421	73	846	0,01795841	14
Centinela del Cóndor	4390	0,00522421	23	212	0,01795841	5
Total	18376	0,00522421	96	1058	0,01795841	19

3.2.4. Variables a Evaluar

Para el presente trabajo de investigación se considerarán las siguientes variables:

- Prevalencia de Babesia bovina en el sector Oeste de la provincia de Zamora Chinchipe por edad, por sexo y por raza
 - Por Giemsa
 - Por PCR
- Identificación de géneros de garrapatas presentes en el sector.
- Hemograma bovino
 - Hematocrito
 - Hemoglobina
 - Serie blanca
- Análisis epidemiológico

3.2.5. Análisis Estadístico

La información recopilada fue tabulada y se presenta en cuadros y gráficos con promedios y porcentajes, utilizando la estadística descriptiva, además para establecer diferencia estadística se utilizó la prueba de chi cuadrado (X^2).

3.2.6. Aplicación de Encuestas

Para la obtención de datos relevantes relacionados con la Babesiosis bovina, se aplicó una encuesta a diferentes fincas del sector oeste de la provincia de Zamora Chinchipe seleccionadas aleatoriamente.

3.2.7. Toma y Recolección de las Muestras

Las muestras se tomaron asépticamente de la vena yugular en tubos vacutainer con EDTA, agitando lentamente para favorecer su mezclado, se las colocó en un termo para su conservación hasta su análisis en el laboratorio de diagnóstico de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia y en el Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

3.2.8. Recolección de Garrapatas

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

3.2.9. Análisis de Laboratorio

a. Realización de Frotis Sanguíneos

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

b. Tinción de Giemsa

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

1. Fijado con alcohol metílico
2. Dejar secar de 5 a 10 minutos
3. Sumergir en Giemsa durante 30 minutos
4. Eliminar el colorante y Lavar con agua destilada
5. Dejar secar a temperatura ambiente; y,
6. Observar al microscopio con aceite de inmersión y lente de 100X.

c. Identificación de Garrapatas

Para la identificación de los distintos géneros de garrapatas existentes en el sector oeste de la provincia de Zamora Chinchipe, se utilizó un estereoscopio y como guía el manual de identificación de garrapatas Solari et al., (2006) en donde se distinguen características propias de cada género. Los datos fueron registrados en el anexo correspondiente.

d. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utilizó el kit de extracción Pure Link Genomic DNA mini kit de Invitogen. El protocolo empleado se describe a continuación:

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 5 segundos 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.

e. Verificación de Calidad de ADN

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

Se debe limpiar las superficies ópticas superiores e inferiores del sistema de espectrofotómetro con un paño limpio adecuado.

Colocar 1uL 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 uL 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 este completo, 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 uL del extracto de ADN y correr la muestra. Visualizar en el monitor la calidad de ADN de la muestra.

f. Ensayos de PCR

Para la realización del nPCR de *Babesia bovis* se utilizaron los cebadores descritos por Figueroa *et al.* (1993), con los que se amplifica un fragmento de ADN correspondiente al gen *rap1* de *B. bovis*. En la primera etapa (PCR₁) se emplearán los cebadores externos (5'-CACGAGGAAGGAACTACCGATGTTGA-3'; 5'-CCAAGGAGCTTCAACGTACGAGGTCA-3'), que amplifican un fragmento de 356pb y en la segunda etapa (PCR₂) se emplearán los cebadores internos (5'-TCAACAAGGTACTIONCTATATGGCTACCG-3'; 5'-CTACCGAGCAGAACCTTCTTCACAT 3'), con los que se amplifica un fragmento de 291pb.

Ambas etapas (PCR₁ y PCR₂) se realizaron en una mezcla de reacción de 25µl. Los componentes de esta mezcla y sus cantidades se describen más adelante.

El programa de amplificación para ambos 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.

g. nPCR de *B. bigemina*

Para la realización del nPCR para *Babesia bigemina* se utilizaron los cebadores descritos por Figueroa *et al.*, (2013), con los que se amplifica un fragmento de ADN correspondiente al gen *rap1* de *B. bigemina*. En la primera etapa (PCR₁) se emplearán los cebadores externos (5'-

'CATCTAATTTCTCTCCATACCCCTCC -3'); (5'-CCTCGGCTTCAACTCTGATGCCAAAG 3'), que amplifican un fragmento de 278pb y en la segunda etapa (PCR₂) se emplearán los cebadores internos (5'-CGCAAGCCCAGCACGCCCCGGTGC-3'); (5'-CCGACCTGGATAGGCTGTGTGATG3'), con los que se amplifica un fragmento de 170pb.

Se utilizaron mezclas de reacción similares que también se describen más adelante. El programa de amplificación para el PCR₁: 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 PCR₂: 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 flujo laminar bioseguridad LABCONCO purifer Class II Biosafety Cabinet, utilizando puntas descartables resistentes a aerosoles. Las reacciones se desarrollaron en un Termociclador (Applied Biosystems).

h. 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 uM del piemer madre se le agregó 100 uL de agua ultrapura.
 - Tomar 10 uM del primer y añadir 90 uL de agua ultra pura.
- **Mix PCR *B. bovis***

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

Enzima	12.5 uL
GC Enhancer	2uL
Primer 1	1uL
Primer 2	1uL
Agua ultra pura	7.5UI

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

Luego de la preparación del mix se toma 1 uL del extracto de ADN y se le añade 24 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 cada proceso.

- **Mix nPCR *B. bovis***

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

Enzima	12.5 uL
GC Enhancer	2uL
Primer 3	1uL
Primer 4	1uL
Agua ultra pura	7.5UI

También se debe centrifugar este mix para un mejor funcionamiento.

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

Cuadro 6. Temperaturas y Ciclos PCR y nPCR *B. bovis*

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

- **Mix PCR *B. bigémina***

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

Enzima	12.5 uL
GC Enhancer	2uL
Primer 5	1uL
Primer 6	1uL
Agua ultra pura	7.5UI

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

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

- **Mix nPCR *B. bigémina***

Enzima	12.5 uL
GC Enhancer	2uL
Primer 7	1uL
Primer 8	1uL
Agua ultra pura	7.5UI

También se debe centrifugar este mix para un mejor funcionamiento.

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

Cuadro 7. Temperaturas y Ciclos PCR y nPCR *B. bigémina*

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

i. Electroforesis

Para la electroforesis se debe preparar un gel de agarosa Invitrogen al 2 %, utilizando 2 gr 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 8uL de SYBR® Safe DNA gel stain Invitrogen. Se coloca en la cámara de electroforesis BioRad, se coloca los peines para la formación de pocillos y se deja enfriar hasta que el gel solidifique.

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

Por otro lado colocamos sobre el mesón de trabajo un pedazo de 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:** 2 uL de 10X Blue Juice™ invitrogen + 2 uL de marcador de peso Molecular Trackit™ Invitrogen.
- **Productos de PCR:** 2 uL de 10X Blue Juice™ Invitrogen + 6 uL de productos de PCR.
- **Control Positivo:** 2 uL de 10X Blue Juice™ Invitrogen + 6 uL de productos de PCR que haya marcado positivo anteriormente.
- **Control Negativo:** 2 uL de 10X Blue Juice™ Invitrogen + 6 uL de agua ultrapura.
- **Mix:** 2 uL de 10X Blue Juice™ Invitrogen + 6 uL del mix preparado para la reacción.

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

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 DE *Babesia spp.* EN EL SECTOR OESTE DE LA PROVINCIA DE ZAMORA CHINCHIPE

4.1.1. Prevalencia Total

En el cuadro ocho se observa la prevalencia total de *Babesia spp.* en el sector oeste de la provincia de Zamora Chinchipe considerando las muestras positivas por las técnicas de tinción de Giemsa y por nPCR.

Cuadro 8. Prevalencia total sector oeste de la provincia de Zamora Chinchipe (%)

TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO					
Giemsa			nPCR		
Muestras	Positivas	%	Muestras	Positivas	%
96	35	36,4	70	61	87,1

Mediante el uso de las técnicas establecidas se determinó que por la técnica de tinción de Giemsa se encontraron 35 muestras positivas de un total de 96, lo que representa el 36,4 %, mientras que por la técnica de nPCR se encontraron 61 muestras positivas de un total de 70 lo que representa el 87,1 %.

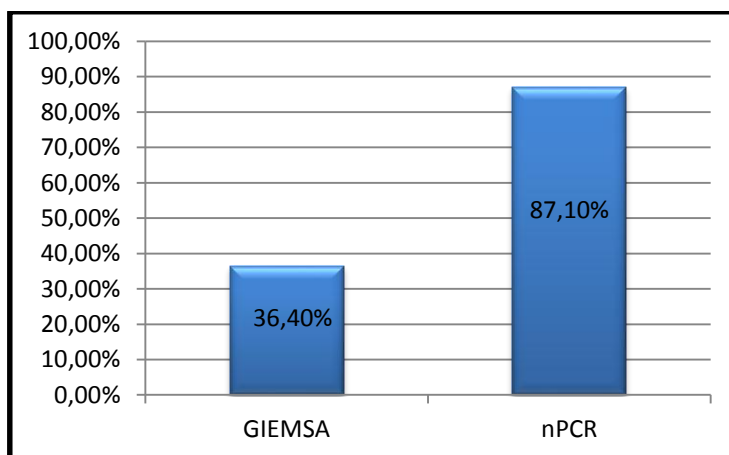


Figura 10. Prevalencia total por técnicas

4.1.2. Prevalencia por nPCR y Especie de Babesia

En el cuadro nueve a continuación aparece se muestra la prevalencia total de *Babesia spp.* diferenciada en dos especies utilizando la técnica de nPCR.

Cuadro 9. Prevalencia de *Babesia spp.* por técnica de nPCR en el sector oeste de la provincia de Zamora Chinchipe (%)

ESPECIE DE BABESIA					
<i>B. bovis</i>			<i>B. bigemina</i>		
Muestras	Positivas	%	Muestras	Positivas	%
70	43	61,4	70	48	68,5

La técnica de nPCR nos ha permitido establecer una prevalencia a *B. bovis* del 61.4 %. En cambio que la prevalencia de *B. bigemina* es del 68,5 %.

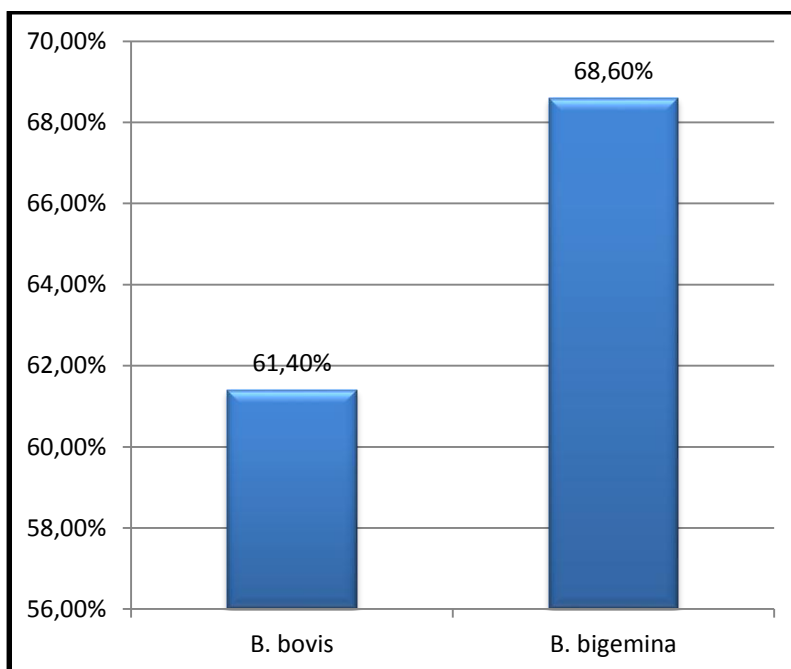


Figura 11. Prevalencia de Babesia por técnica de nPCR

4.1.3. Prevalencia por Sexo

En el cuadro 10 se muestra la prevalencia total por sexo en el sector oeste utilizando las técnicas de tinción de Giemsa y nPCR.

Cuadro 10. Prevalencia por sexo de *Babesia spp.* en el sector oeste de la provincia de Zamora Chinchipe (%)

Sexo	Técnica de Diagnóstico											
	Giemsa			nPCR								
				Total			<i>B. bovis</i>			<i>B. bigemina</i>		
	Muestras	Positivas	%	Muestras	Positivas	%	Muestras	Positivas	%	Muestras	Positivas	%
Hembras	82	31	37,8	60	53	88,3	60	37	61,7	60	42	70
Machos	14	4	28,6	10	8	80	10	6	60,0	10	6	60
Total	96	35	36,5	70	61	87,1	70	43	61,4	70	48	68,6

Con el uso de la técnica de tinción de Giemsa se obtuvo como resultado el 28.6% de prevalencia en machos, mientras que en cuanto a las hembras la prevalencia fue de 37,8 %.

Mientras que por la técnica de nPCR, el 80 % de los machos fueron positivos, en tanto que en las hembras la prevalencia fue del el 88,3 %.

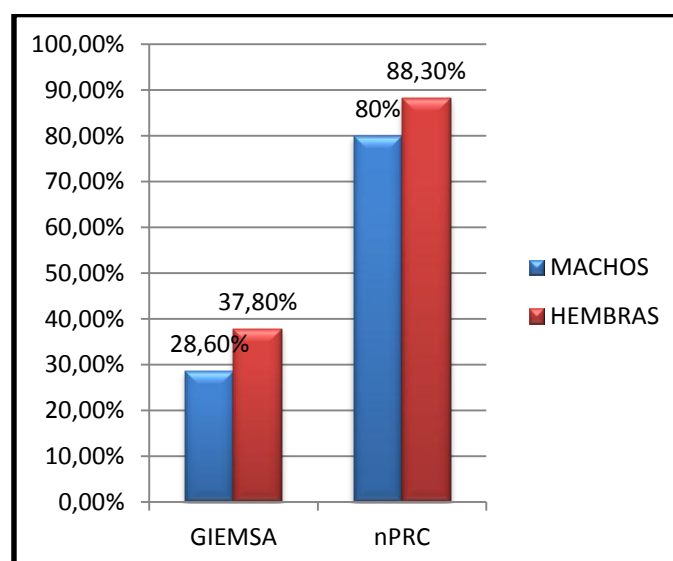


Figura 12. Prevalencia total por sexo

4.1.4. Prevalencia por Cantón

El cuadro once muestra la prevalencia de Babesiosis bovina por cantones en el sector oeste mediante el uso de las técnicas antes mencionadas.

Cuadro 11. Prevalencia de *Babesia spp.* por cantón en el sector oeste de la provincia de Zamora Chinchipe (%)

Cantones	Técnica de Diagnóstico											
	Giemsa			nPCR								
				Total			<i>B. bovis</i>			<i>B. bigemina</i>		
	Muestras	Positivas	%	Muestras	Positivas	%	Muestras	Positivas	%	Muestras	Positivas	%
Centinela del Cóndor	23	6	26,1	16	12	75	16	8	50,0	16	6	37,5
Zamora	73	29	39,7	54	49	90,7	54	35	64,8	54	42	77,8
Total	96	35	36,5	70	61	87,1	70	43	61,4	70	48	68,6

A la tinción de Giemsa en el cantón Zamora fueron positivas el 39,7 %; mientras que en canton Centinela del Cóndor fueron positivas el 26,1 %.

Mientras que para la técnica de nPCR en el cantón Zamora fueron positivas el 90,7 %; y en el cantón Centinela del Cóndor el 75% fueron positivas.

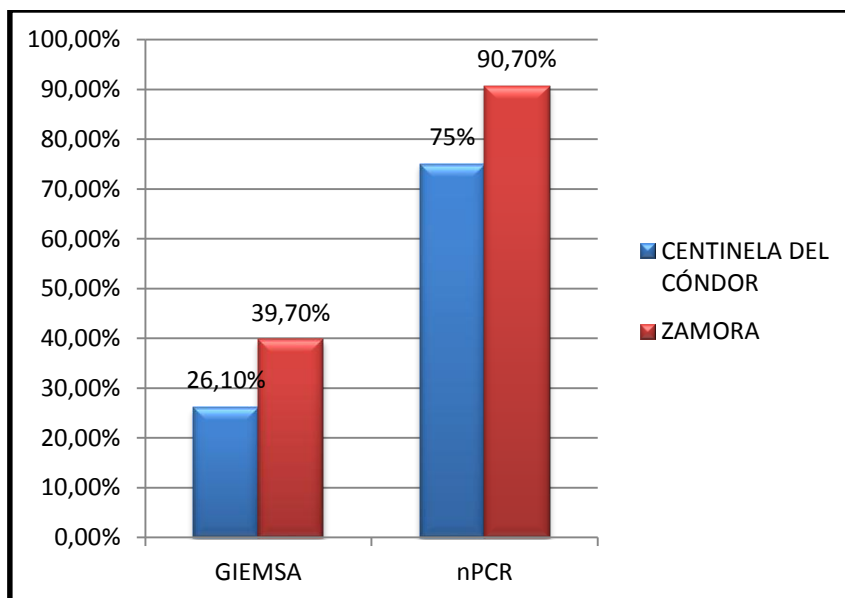


Figura 13. Prevalencia total por cantón

En cuanto a la prevalencia por cantones se establece que en el cantón Zamora es mayor que en el cantón Centinela del Cóndor.

4.1.5. Prevalencia por Edad

En el cuadro doce se muestra la prevalencia total por edad en el sector oeste de la provincia de Zamora Chinchipe por las técnicas de tinción de Giemsa y nPCR.

Cuadro 12. Prevalencia de *Babesia spp.* por edad en el sector oeste de la provincia de Zamora Chinchipe (%).

Edad	Técnica de Diagnóstico											
	Giemsa			nPCR								
				Total			<i>B. bovis</i>			<i>B. bigemina</i>		
	Muestras	Positivas	%	Muestras	Positivas	%	Muestras	Positivas	%	Muestras	Positivas	%
< a 1 año	22	5	22,7	15	13	86,7	15	13	86,7	17	8	47,1
de 1 a 2 años	19	9	47,4	18	15	83,3	18	8	44,4	17	13	76,5
de 3 a 4 años	31	9	29,0	21	20	95,2	21	13	61,9	20	16	80,0
> 4 años	24	12	50,0	16	13	81,3	16	9	56,3	16	11	68,8
Total	96	35	36,5	70	61	87,1	70	43	61,4	70	48	68,6

Mediante la tinción de Giemsa los animales menores a 1 año tuvieron una prevalencia del 22,7 %, los animales entre 1 a 2 años resultaron positivos en un 47,4 %: los animales comprendido entre los 3 y 4 años fueron positivos en un 29 %; por último los animales mayores a 4 años fueron positivos el 50 %.

Mientras que en la técnica de nPCR los animales menores a 1 año fueron positivos en un 86,7 %; los animales de 1 a 2 años mostraron una positividad del 83,3 %, los animales de 3 a 4 años fueron positivos en un 95,2 %, finalmente los animales mayores a 4 años fueron positivos en un 81,3 %.

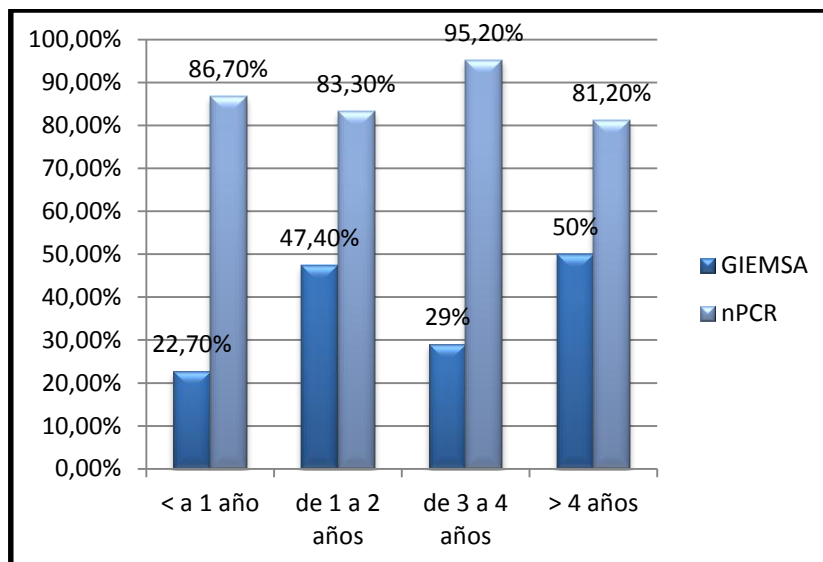


Figura 14. Prevalencia total por edad

4.1.6. Prevalencia por Razas

En el cuadro trece se muestra la prevalencia total de Babesiosis bovina en el sector oeste de la provincia de Zamora Chinchipe por las técnicas ya mencionadas.

Cuadro 13. Prevalencia total por razas en el sector oeste de la provincia de Zamora Chinchipe (%).

Raza	Técnica de Diagnóstico											
	Giemsa			nPCR								
				Total			B. bovis			B. bigemina		
	Muestras	Positivas	%	Muestras	Positivas	%	Muestras	Positivas	%	Muestras	Positivas	%
Holstein	34	11	32,4	18	16	88,9	18	9	50,0	17	12	70,6
Brown swiss	9	2	22,2	6	4	66,7	6	3	50,0	6	2	33,3
Mestiza	43	19	44,2	37	34	91,9	37	27	73,0	38	28	73,7
Gyr	3	2	66,7	3	1	33,3	3	0	0,0	3	1	33,3
Charolais	7	1	14,3	6	6	100	6	4	66,7	6	5	83,3
Total	96	35	36,5	70	61	87,1	70	43	61,4	70	48	68,6

Mediante la técnica de Giemsa en la raza Holstein la prevalencia fue del 32,4%; en la raza Brown swiss la prevalencia fue del 22,2 %; los animales mestizos fueron positivos en un 44,2 %, la raza Gyr tuvo una prevalencia del 66,7 %; finalmente la raza Charolais resultó positiva en un 14,3 %.

En lo que respecta a la técnica de nPCR en la raza Holstein la prevalencia fue del 89,9 %; en la raza Brown swiss la prevalencia fue del 66,7 %; los mestizos fueron positivos en un 91,9 %, la raza Gyr tuvo una prevalencia del 33,3 %; finalmente la raza Charolais resultó positiva en un 100 %.

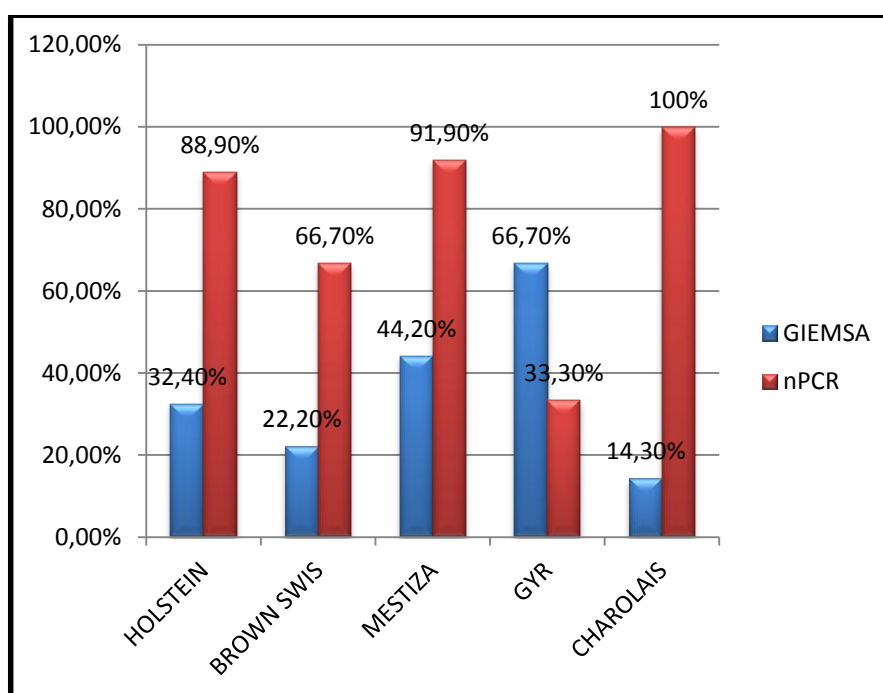


Figura 15. Prevalencia total por razas

4.1.7. Comparación de las pruebas diagnósticas

En el cuadro catorce se muestra las comparaciones que existen entre la técnica de tinción de Giemsa y la técnica nPCR en el diagnóstico de *Babesia spp.*

Cuadro 14. Comparación de las dos pruebas diagnósticas Giemsa y nPCR (%).

GIEMSA	nPCR	TOTAL	%
(-)	(-)	4	6,1
(-)	(+)	28	42,4
(+)	(-)	4	6,0
(+)	(+)	30	45,5
TOTAL		66	100,0

Podemos observar que un 42,4 % de las muestras son negativas a Giemsa pero positivo a nPCR; mientras que el 6,1 % de las muestras es negativo a nPCR, pero positivo a Giemsa; concluyendo así que hay un 51,6 % de concordancia en el diagnóstico y un 48,5 % de discordancia diagnóstica.

4.1.8. Coinfección

En el cuadro quince se muestra la coinfección que existe en las ganaderías del sector oeste de la provincia de Zamora Chinchipe.

Cuadro 15. Coinfección en las ganaderías del sector oeste de la provincia de Zamora Chinchipe (%).

Cantón	Muestras	<i>B. bovis</i>		<i>B. bigemina</i>		Coinfección	
		Positivas	%	Positivas	%	Positivas	%
Centinela del Cóndor	16	8	50	6	37,5	2	12,5
Zamora	54	35	64,1	42	77,8	27	38,6
TOTAL	70	43		48		29	41,4

El 41,4 % de las muestras sometidas a la prueba de nPCR resultaron positivas tanto a *B. bovis* como a *B. bigemina*.

4.2. GÉNEROS DE GARRAPARAS EXISTENTES EN EL SECTOR OESTE

En el cuadro dieciséis se dan a conocer los géneros de garrapatas existentes en las fincas se utilizaron para el presente estudio.

Cuadro 16. Géneros de garrapatas existentes en el sector oeste de la provincia de Zamora Chinchipe (%)

SECTOR	Nº FINCAS	<i>Boophilus spp</i>
Centinela del Cóndor	5	150
Zamora	14	325
TOTAL	19	475
	%	100

Del total de 19 fincas seleccionadas para este estudio, distribuidas en los cantones de Centinela del Cóndor y Zamora se recolectaron 475 garrapatas a razón de 25 por cada finca de las cuales el 100% resultaron ser del género *Boophilus spp.*

4.3. ANÁLISIS EPIDEMIOLÓGICO

Para el estudio de esta variable se utilizó una encuesta la misma que fue aplicada a los propietarios de las fincas del sector oeste de la provincia de Zamora Chinchipe y que estaba compuesta de varios ítems, los resultados obtenidos se muestran en los siguientes cuadros y figuras.

4.3.1. Composición de la Muestra de Acuerdo a la Edad

De un total de 96 muestras tomadas para este estudio el 31,2 % fueron de 3 a 4 años, el 25 % fueron animales mayores a 4 años y los animales menores a 1 año y de 1 a 2 años representan el 21,9 % cada grupo etario.

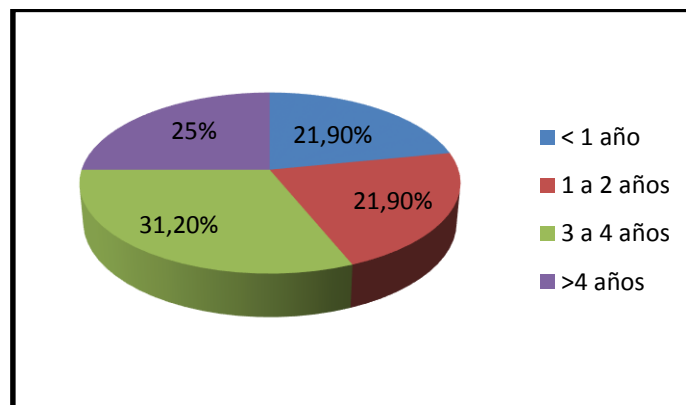


Figura 16. Composición de la muestra de acuerdo a la edad

4.3.2. Composición de la Muestra de Acuerdo a la Raza

De un total de 96 muestras tomadas en el sector oeste 48 muestras fueron mestizas lo que representa el 50 % del total, 33 muestras fueron de raza Holstein lo que representa un 34,4 %, 9 muestras fueron de raza Brown swiss, lo que representa el 9,4 %, mientras que de la raza Charoláis y Gyr hubo 3 muestras de cada una lo que representa el 3,2 %.

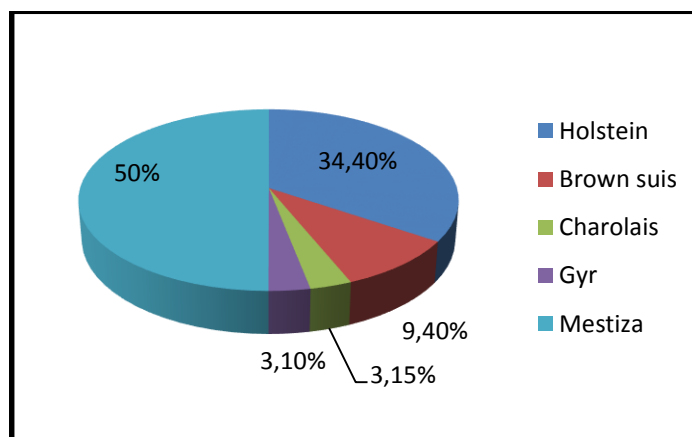


Figura 17. Composición de la muestra de acuerdo a la raza

4.3.3. Composición de la Muestra de Acuerdo al Género

De un total de 96 muestras tomadas en el sector oeste 11 fueron machos lo que representa el 11.5 %, mientras que 85 muestras fueron hembras lo que representa el 88,5 %.

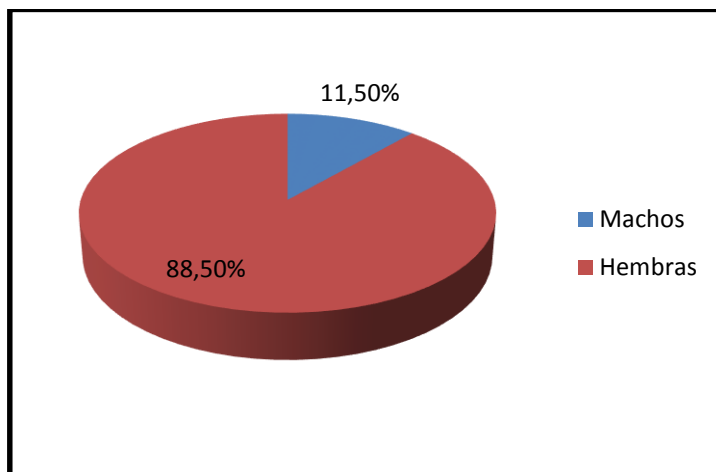


Figura 18. Composición de la muestra de acuerdo al sexo

4.3.4. Tipo de Explotación Ganadera

De un total de 19 ganaderos entrevistados en este estudio, el 5,2 %, se dedica a la producción de carne, el 26,3 % posee animales de doble propósito y el 68,4 % se dedica a la producción de leche.

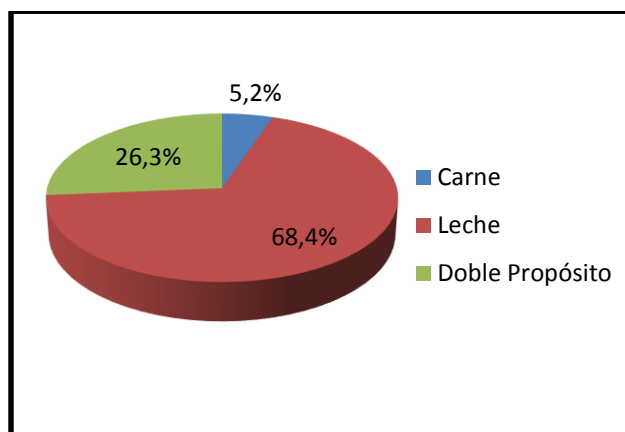


Figura 19. Tipo de explotación

4.3.5. Procedencia del Ganado

De las 19 fincas seleccionadas para el estudio, en 14 el ganado es producido por ellos mismo esto representa el 73,7 % del total, 7 fincas compra ganado a sus vecinos lo que equivale al 36,8 % y 11 fincas compra el ganado en otras provincias lo que representa el 57,9 % del total.

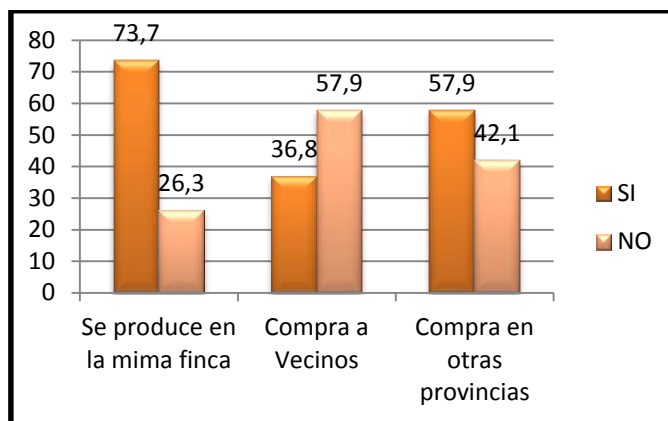


Figura 20. Procedencia del ganado

a. Práctica de Cuarentena

De las 19 ganaderos entrevistados para el presente estudio 16 ponen en cuarentena a sus animales lo que representa el 84,2 %, mientras que el 15,8 % de ganaderos no practican medida de cuarentena.

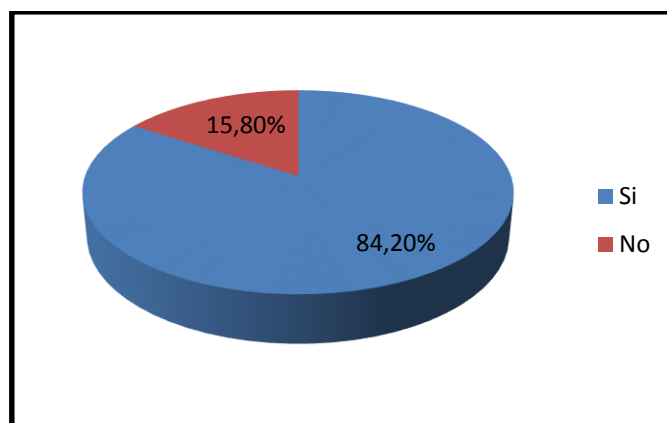


Figura 21. Fincas que practican cuarentena

4.3.6. Presencia de la Enfermedad

a. Conocimiento de la Enfermedad

El 100% de los ganaderos entrevistados para este estudio manifestaron conocer la enfermedad.

b. Presencia de la Enfermedad

De los ganaderos entrevistados para este estudio seis manifestaron que en sus fincas ha estado presente la enfermedad lo que representa el 31,6 % del total, en tanto que 13 ganaderos manifestaron que en sus fincas no ha estado presente la enfermedad con 68,4 %.

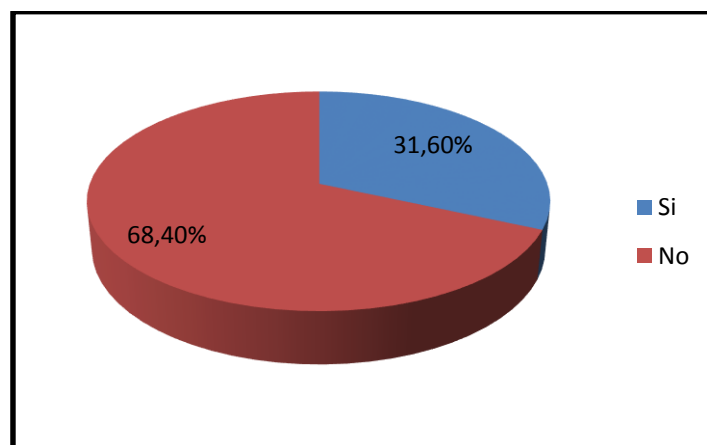


Figura 22. Presencia de la enfermedad en las fincas del sector Oeste

c. Época del año en que se presenta la enfermedad

De los 19 ganaderos seleccionados para este estudio, 12 mencionaron que es en el invierno en donde se presenta con mayor frecuencia la enfermedad, esto representa el 63,2 %, mientras que siete mencionaron que es en verano la

época en la que la enfermedad se presenta con mayor frecuencia, esto equivale al 36,8 %.

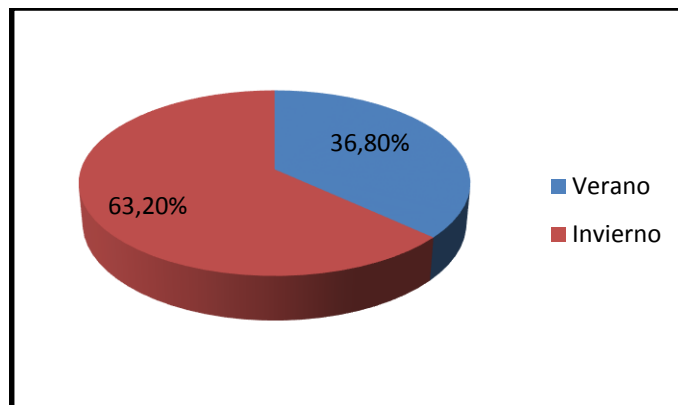


Figura 23. Época en la que aparece la enfermedad

d. Persistencia de la Enfermedad

De los 19 ganaderos seleccionados para este estudio, el 36,8 % mencionaron que la enfermedad está presente hace 10 años; el 31,6 % manifestaron que la enfermedad está presente desde hace 20 años; el 10,5 % manifestaron que está presente desde hace 2 años y también otro 10,5 % manifestaron que desde siempre ha estado presente la enfermedad esto representa en ambos casos; finalmente el 5,3 % nos hizo saber que la enfermedad está presente desde hace 15 años y otro 5,3 % mencionó que nunca ha estado presente la enfermedad.

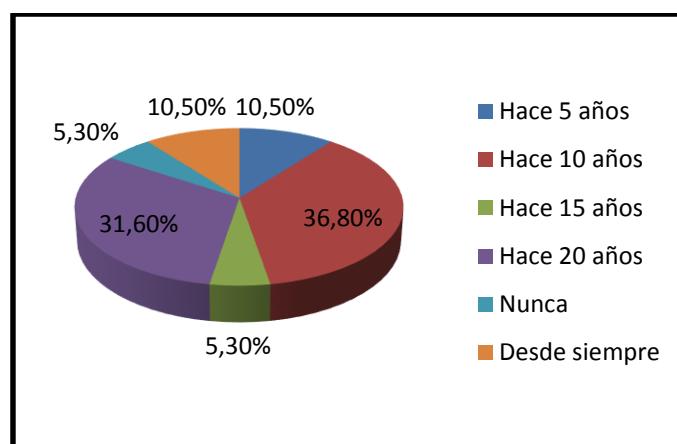


Figura 24. Persistencia de la enfermedad

e. Síntomas que se Presentan en la Enfermedad

Un total de 11 vacas mostraron tristeza como síntoma de la enfermedad, lo que representa el 19 % del total, así también 11 tuvieron como principal sistema a la fiebre, lo que representa también el 19 %. En 9 fincas se determinó a la diarrea como principal síntoma; y en otras nueve la inapetencia fue el síntoma más común, siendo su equivalencia a 15,5 % para cada una. En 8 fincas se determinó que el síntoma más común es la orina con sangre, lo que representa el 13,8 %. En 5 fincas se mostró a la postración como el síntomas común lo que representa el 8,6 % de la población, finalmente 3 ganaderos dijeron que hay otros síntomas que aparecen como los más comunes lo que representa el 5,2 % del total, y en 2 vacas del total se presentó como principal síntoma a la finca nos dijeron.

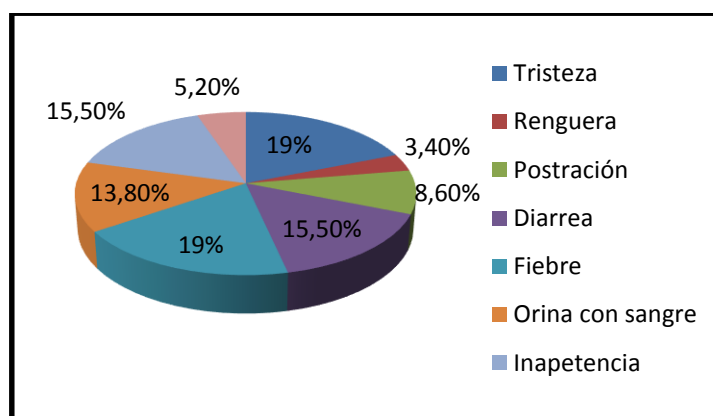


Figura 25. Síntomas que se presentan en la enfermedad

4.3.7. Diagnóstico y Control de la Enfermedad

a. Uso de Servicios Veterinarios

Un total de 17 ganaderos hacen uso de servicios veterinarios, lo que representa el 89,5 % del total, tan solo 2 ganaderos no usan servicios veterinarios lo que equivale al 10,5 %.

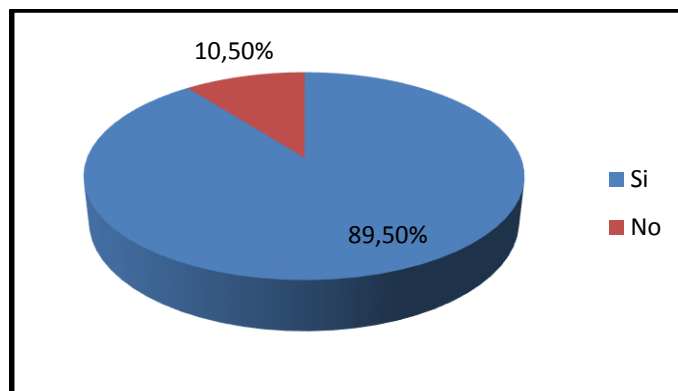


Figura 26. Uso de servicios veterinarios

b. Toma de Muestras Para el Diagnóstico

Solamente en 2 fincas los veterinarios han tomado muestras para ser analizadas en el laboratorio lo que representa el 10,5 % del total, en tanto que en 17 fincas no se han tomado muestras, lo que equivale al 89,5 %.

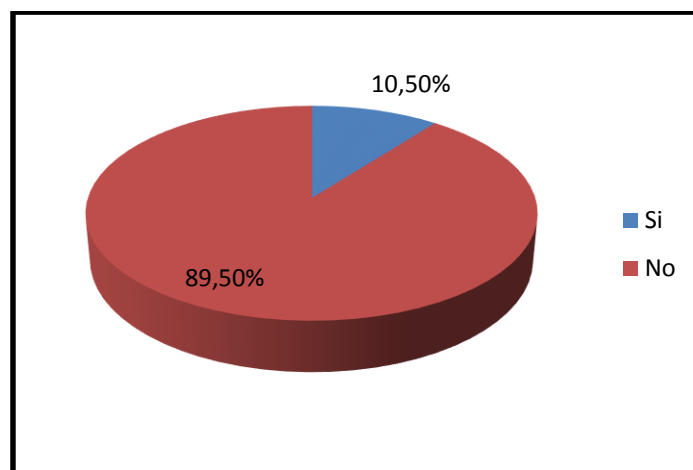


Figura 27. Toma de muestras para laboratorio

c. Edades en que se Enferman los Animales

De los 19 ganaderos del sector, el 47,5 % mencionaron que los animales de enferman después de los 2 años de edad; el 26,3 % mencionaron que los

animales se enferman entre 1 y 2 años de edad; el 15,8 % mencionaron que los animales se enferman entre los 6 y 12 meses; finalmente el 10,5 % mencionaron que los animales se enferman en los primeros 6 meses.

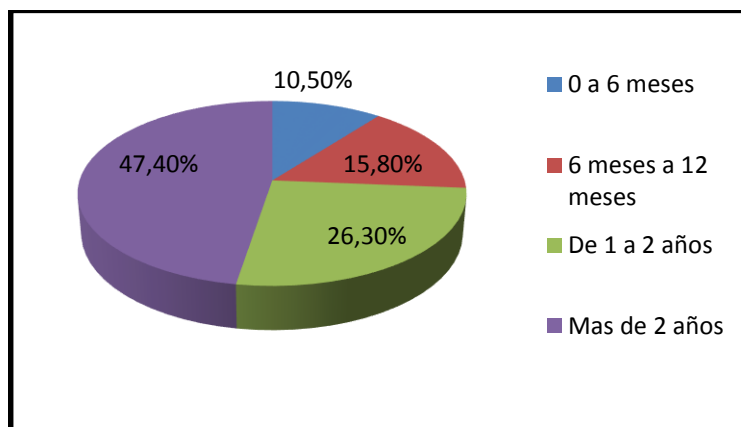


Figura 28. Edades en las que se enferman los animales

d. Morbilidad Anual

De las respuestas de los ganaderos tenemos que en 12 fincas no hay animales que se hayan enfermado de Babesiosis bovina, esto representa el 63,2 % del total, en 3 fincas mencionaron que ha habido entre 4 y 5 animales enfermos representando esto el 15,8 %, en otras 3 fincas en cambio mencionaron que de 3 a 4 animales se enfermaron lo que representa el 15,8 %, finalmente solo en 1 finca se han encontrado entre 1 y 2 animales enfermos, esto representa el 5,3%.

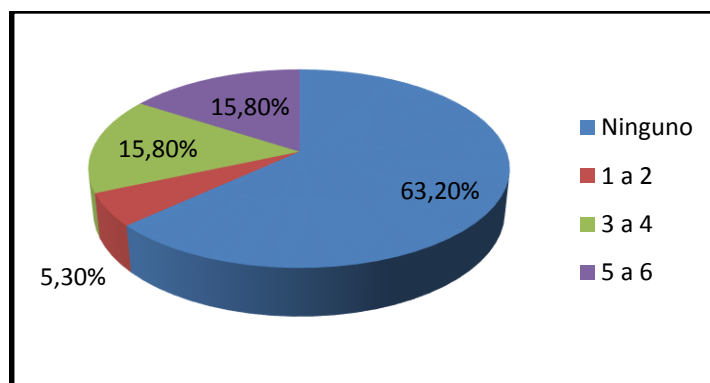


Figura 29. Morbilidad anual de Babesiosis en el sector oeste

e. Mortalidad Anual

De un total de 19 ganaderos entrevistados, 17 mencionaron que se ha presentado muerte de animales por causa de Babesiosis bovina, lo que representa el 89,5 % del total; mientras que tan solo 2 ganaderos mencionaron que hubo entre 1 y 2 muertes de animales, esto representa el 10,5 %.

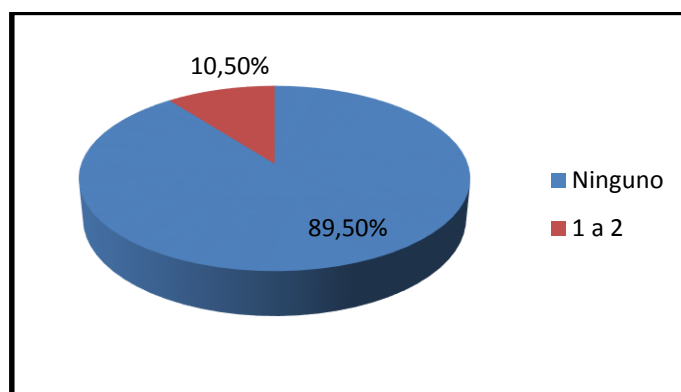


Figura 30. Mortalidad anual en el sector

f. Reporte de la Enfermedad en la Finca

El 52,6 % de las fincas reportaron la enfermedad hace más de 1 año, el 26,3 % nunca la han reportado, el 15,8 % la ha reportado entre los últimos 6 meses a 1 año y solo el 5,3 % la ha reportado hace menos de 6 meses.

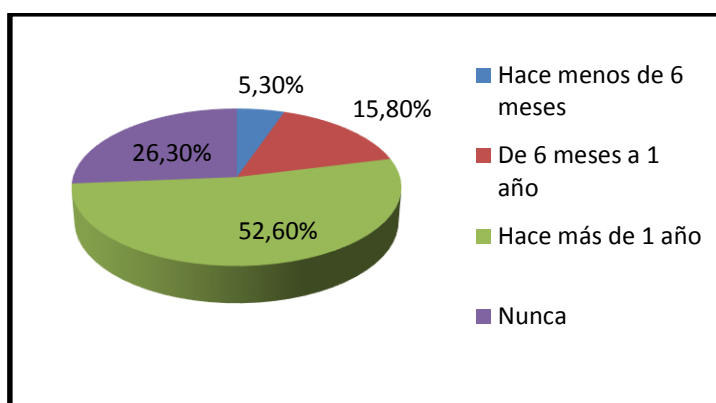


Figura 31. Reporte de Babesiosis bovina en el sector

g. Tratamiento de la Enfermedad

El 36,8 % de los encuestados manifestaron que han usado Revevet (Tetraciclina + Diminaceno) para el control de Babesiosis, el 26,3 % han usado Verenil (Aceturato de diminaceno), el 15,8 % mencionaron utilizar Anaplus (Oxitetraciclina Clorhidrato) y otro 15,8 % Ganaseg (Diaceturato de dibenzamidina), finalmente solo el 5,3 % han utilizado Imidogan (Imidocarb).

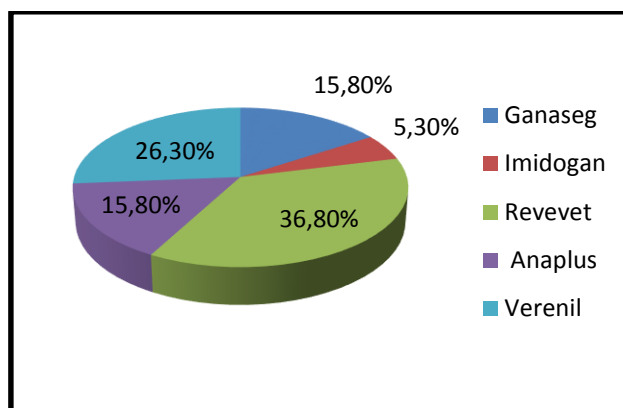


Figura 32. Control farmacológico de la enfermedad

4.3.8. Vías de Transmisión

a. Conocimiento de la Transmisión de la Enfermedad

De 19 ganaderos entrevistados el 68,4 % conoce cómo se transmite la enfermedad y el restante 31,6 % no conoce la manera en que se transmite la enfermedad.

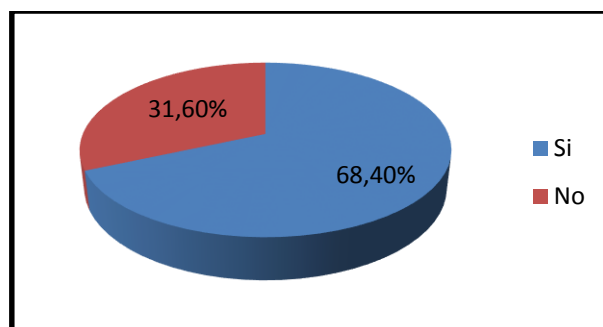


Figura 33. Conoce cómo se transmite la enfermedad

b. Vacunación de los Animales

El 100 % de los ganaderos encuestados manifestaron que no usan ningún tipo de vacunas para el control de Babesiosis en el sector oeste de la provincia de Zamora Chinchipe.

c. Animales que Entran en Contacto con Animales Silvestres

El 100 % de los ganaderos encuestadas mencionaron que sus animales entran en contacto con algún tipo de animales silvestres en el sector oeste de la provincia de Zamora Chinchipe.

4.3.9. Control de Garrapatas**a. Presencia de Garrapatas en el Ganado**

El 100 % de las fincas seleccionadas para el estudio en el sector oeste de la provincia de Zamora Chinchipe tienen presencia de garrapatas en sus animales.

b. Grado de Infestación

El 52,6 % de las fincas del sector oeste de la provincia de Zamora Chinchipe presentan un alto grado de infestación de garrapatas, el 26,3 % presentan un grado infestación medio y el 21,1 % de las fincas presenta un grado de infestación bajo.

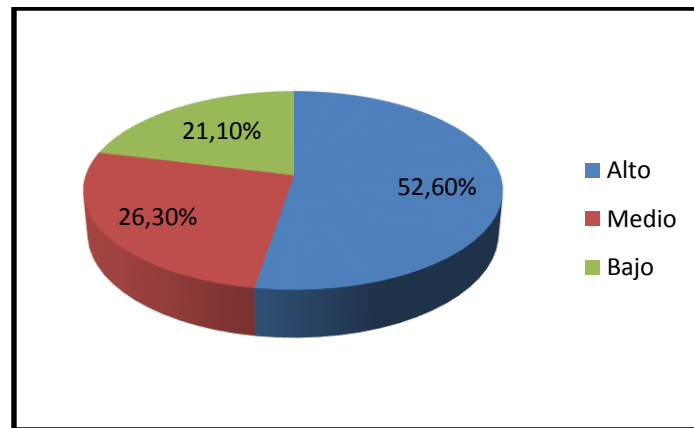


Figura 34. Grado de infestación por garrapatas en el sector

c. Control de Garrapatas

De la información obtenida se establece que el 31,6 % de las fincas seleccionadas para este estudio utilizan Toril (Diamidina + Amitraz) para el control de garrapatas, el 21,1 % utilizan el patentado Revevet (Tetraciclina + Diminaceno), otro 21,1 % utilizan Fulminado (Amitraz), el 15,8 % de los encuestados utilizan Neguvon (2,2,2, tricoro del Ac. Fosfórico) y el 10,5 % utilizan el patentado Ivomec (Ivermectina).

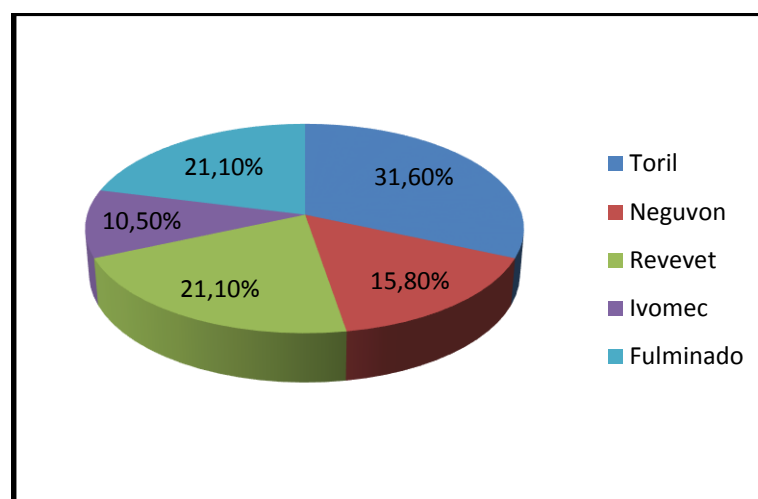


Figura 35. Productos patentados para el control de garrapatas

d. Frecuencia de Control

El 42,1 % de los ganaderos entrevistados mencionaron que cada tres meses realizan el control de garrapatas, el 31,6 % lo realizan cada seis meses, el 15,8% lo realiza mes y solo el 10,5 % cada año.

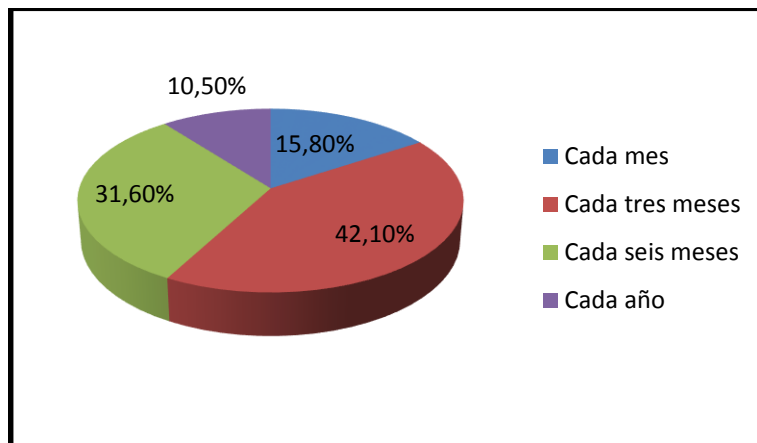


Figura 36. Frecuencia de control de garrapatas.

e. Alternabilidad de Productos

El 73,7 % de los ganaderos entrevistados para este estudio mencionaron que si practican la alternabilidad de productos para el control de garrapatas en el sector oeste de la provincia de Zamora Chinchipe.

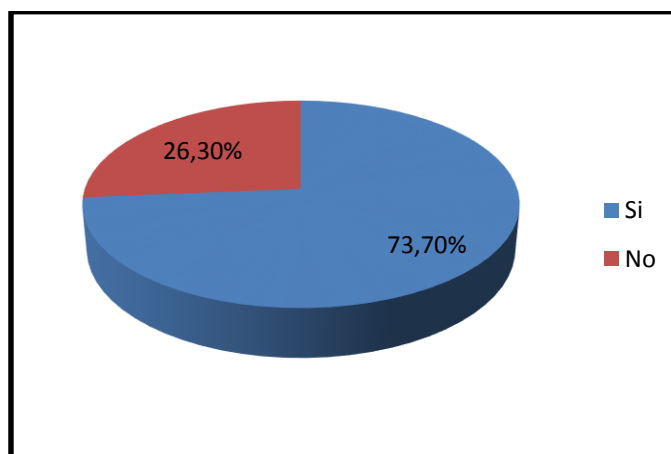


Figura 37. Alternabilidad de Productos

4.3.10. Salubridad

a. Periodo de Retiro de la Leche

De las ganaderos encuestados en el sector oeste de la provincia de Zamora Chinchipe el 63,2 % realizan el retiro de la leche de los animales tratados para Babesiosis, en tanto que el restante 36,8 % no lo realizan.

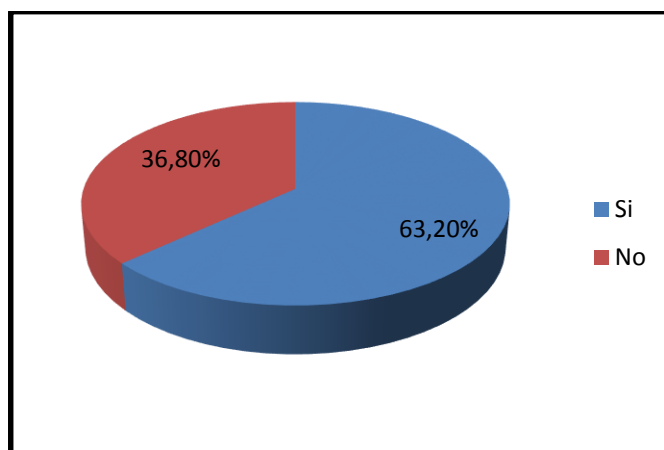


Figura 38. Periodo de retiro de la leche

a. Consumo de Carne

El 73,7 % de los ganaderos consumen la carne de los animales tratados para Babesiosis, en tanto que tan solo el 26,3 % no consumen la carne.

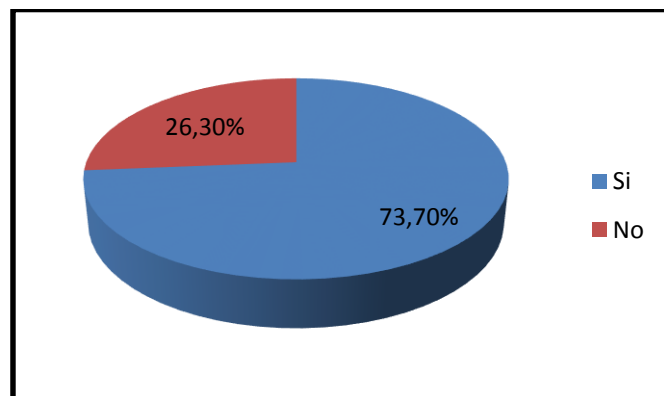


Figura 39. Consumo de carne de animales tratados para Babesiosis en el sector

5. DISCUSIÓN

5.1. PREVALENCIA DE *BABESIA Ssp.*

5.1.1. Prevalencia General

En el presente estudio se analizaron 96 muestras de sangre bovina a la que se les realizó la tinción de Giemsa dando como resultado una prevalencia del 36,4%, esto difiere a lo descrito en estudios independientes realizados en el país por Lalama (2004) en la provincia de Esmeraldas y Mina (2004) en la provincia de Guayas, quienes obtuvieron resultados del 4,67 % y 14 % respectivamente mediante la técnica de frotis sanguíneo. Sin embargo, Terkawi (2011) señala que la especificidad y sensibilidad de la prueba alcanzan valores de 80 % y 28 % lo cual no se ha podido comprobar en los estudios realizados.

Tizar (2002), señala que las limitaciones del frotis sanguíneo para el diagnóstico de *B. bovis*, responde a la tendencia vicerotrópica del parásito, que generalmente se localiza en la circulación capilar de órganos centrales, donde producen el secuestro de eritrocitos parasitados, retirándolos de la circulación general. En casos agudos se estima que la parasitemia de *B. bovis* rara vez alcanza el 1 % (medido a la circulación general), diferente de *B. bigemina*, que llega a registrarse hasta en un 30 % Rey, (2004). Por lo que podemos asegurar que este método es eficaz para la detección de *Babesia spp.*

Considerando lo anteriormente expuesto, de las 96 muestras se tomaron 70 al azar para ser analizadas por la técnica de nPCR de las cuales 61 fueron positivas a *Babesia spp.* lo que representa el 87,1 % del total, esto difiere de lo expuesto por Alvarez, et al., (1998) en un estudio realizado en Campeche donde se determinó una prevalencia del 53,8 %.

La alta especificidad de la prueba de PCR según Kim, (2000) muestra un alto límite de detección permitiendo detectar muestras de sangre con parasitemia

de 0,00002 % de eritrocitos parasitados, indetectable al microscopio óptico, según Surzycki, (2000), 0,01 ng de ADN es equivalente a 6000 organismos y según Goff, et al., (1988) cada eritrocito parasitado contiene un promedio de 6 – 12 organismos de *B. bovis* esto es equivalente a 1000 eritrocitos parasitados por ml de sangre bovina.

5.1.2. Prevalencia Total por nPCR de *Babesia spp.*

De las 70 muestras analizadas por la técnica de nPCR 43 resultaron positivas a *B. Bovis*, esto representa el 61,4 % y 48 resultaron positivas a *B. bigemina*, lo que representa el 68,5 %; similar a lo descrito por Figueroa, (1993), en un estudio realizado en Yucatán y Campeche en donde de 421 muestras de sangre analizadas mediante la prueba de PCR se determinó una prevalencia del 66,7 % para *B. bigemina* y del 60,1 % para *b. bovis*. En otro estudio realizado por Castañeda et al, (2015), en el Campo Experimental “La Posta”, del Centro de Investigación Regional Golfo Control-NIFAP en Veracruz, México donde se obtuvo como resultado una prevalencia del 92 % para *B. bovis* y 86 % para *B. bigemina*

En estudios realizados en nuestro país Hernández, (2012), reportó que en 350 muestras de sangre de 17 fincas de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas mediante las técnicas de frotis sanguíneo y PCR convencional no se detectó muestras positivas para *B. Bovis*, diferente a lo establecido en el presente estudio.

5.1.3. Prevalencia Total por Sexo

El cuanto a la prevalencia por sexo el 28,6 % de los animales machos resultaron positivos a la tinción de Giemsa, mientras que 37,8 % de las hembras resultaron positivas; en tanto que mediante el uso de la técnica de nPCR el 80% de los machos fueron positivos y el 88,3 % de las hembras así mismo lo

fueron, estos resultados fueron sometidos a la prueba estadística de X^2 la misma que establece que no hay diferencia estadística ($P>0,05$). Esto concuerda con lo descrito por Alfaro et al., (1998), señala que en los animales machos y hembras no se observan diferencias significativas entre los valores de prevalencia.

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

5.1.4. Prevalencia Total por Cantón

La prevalencia de Babesiosis en el cantón Centinela del Cóndor por la técnica de Giemsa fue del 21,6 %, mientras que en el cantón Zamora la prevalencia fue del 39,7 %, esto ratifica lo establecido. Mediante el uso de la técnica de nPCR la prevalencia fue del 75 % en el cantón centinela del Cóndor, en tanto que en el cantón Zamora la prevalencia fue del 90,7 %. A la prueba estadística X^2 en cuanto a la prevalencia entre cantones no hay diferencia estadística ($P>0,05$).

Es importante mencionar que los animales de las fincas seleccionadas en el cantón Centinela del Cóndor se encontraban entre los 846 – 1104 m.s.n.m., mientras que los animales seleccionados en el cantón Zamora se encontraban entre los 835 – 1648 m.s.n.m., ya que el clima y la altitud se relacionan directamente con el desarrollo de la enfermedad.

Los resultados obtenidos por Guillen y Muñoz, (2013), en su estudio realizado en la parroquia Alluriquín - Santo Domingo de los Tsáchilas, mediante el análisis de Kruskal – Wallis y el índice de valor de importancia (IVP) determinó la relación entre la altitud y la presencia de garrapatas, identificando al género *Boophilus* desde 663 -1905 m.s.n.m. situándose en el tren posterior y ubre de los bovinos seleccionados, mientras que Cortés et al., (2010) indican que el género *Boophilus* se encuentra a alturas desde 0 msnm a 2400 msnm, lo cual concuerda con los resultados del presente estudio.

5.1.5. Prevalencia Total por Edad

Para un mejor estudio en la presente investigación se dividió a los animales en cuatro grupos etarios y se obtuvo los siguientes resultados.

Los animales menores a 1 año presentan una prevalencia del 22,7 %; los animales entre 1 y 2 años tuvieron una prevalencia del 47,4 %; los animales entre 3 y 4 años fueron prevalentes en un 29 %; finalmente los animales mayores a 4 años mostraron una prevalencia del 50 %, esto en lo que respecta a la tinción de Giemsa.

Con respecto a la técnica de nPRC los animales menores a 1 año fueron prevalentes en un 86,7 %; los mismos que a *B. bovis* 86,7% y a *B. bigemina* 47,1 %; los animales entre 1 y 2 años mostraron una prevalencia del 83,3 %, de los cuales el 44,4 % fueron positivos a *B. bovis* y el 76,5 % fueron positivos a *B. bigemina*; de los animales de 3 a 4 años resultaron prevalentes el 95,2 % de estos 61,6 fueron positivos a *B. bovis* y 80 % a *B. bigemina*; en los animales mayores a 4 años la prevalencia fue del 81,3 % de estos el 56,3 % fueron positivos a *B. bovis* y 68,8 % a *B. bigemina*. A la prueba estadística de X^2 en cuanto a *Babesia spp.* si se encuentra diferencia estadística, en edad y en relación a los géneros de *Babesia* ($P>0,05$).

Los animales jóvenes presentan una resistencia o tolerancia a la infección asociada principalmente a la inmunidad materna, la misma que se va perdiendo con el paso de los años haciendo más vulnerables a los animales en edad adulta. A decir de Uilenberg, (1995), los animales jóvenes son más resistentes en comparación a los de mayor edad, o bien puede ser que sean susceptibles a la infección pero la presentación de la enfermedad es menos grave. Mientras que Madruga et al., (1984) menciona que en los casos que se presentan en terneros puede explicarse en parte por la caída de la inmunidad pasiva a partir del día 28 después del nacimiento, cuando los anticuerpos del calostro comienzan a ser reemplazados por los producidos por el propio animal.

5.1.6. Prevalencia Total por Razas

Los resultados obtenidos por la tinción de Giemsa indican que la raza Gyr tuvo una prevalencia del 66,7 %; los animales considerados mestizos un 44,2 %; la raza Holstein un 32,4 %; la raza Brown swiss un 22,2 % y la raza Charolais un 14,3 %. En cuanto a la prueba de nPCR la prevalencia en la raza Charolais encontramos una prevalencia del 100%, de las cuales el 66,7 % fueron positivas a *B. bovis* y el 88,3 % a *B. bigemina*; los animales mestizos indican una prevalencia del 94,6 % siendo positivos a *B. bovis* el 73 % y a *B. bigemina* el 73,7 %; la raza Holstein fue del 88,9 %, de estos 50% fueron a *B. bovis* y 70 % a *B. bigemina*; la raza Brown swiss fue prevalente en un 66,7%, de los cuales 50 % a *B. bovis* y 33,3 % a *B. bigemina*; la raza Gyr reportó una prevalencia del 33,3 %, todas, o sea el 33,3 % fueron positivas a *B. bigemina*; finalmente en A la prueba estadística de X^2 no existe diferencia estadística entre las diferentes razas, ni entre los géneros de Babesia.

Según Mora, (1993), las razas cebuinas tienen menor cantidad de garrapatas. Por tanto reducen las posibilidades de infección, sin embargo en las mismas condiciones son igualmente susceptibles.

5.1.7. Coinfección

Mediante el uso de la técnica de nPCR se obtuvo como resultado que el 40% de las muestras seleccionadas para este estudio fueron positivas tanto a *B. bovis* como a *B. bigemina*, esto difiere de lo expuesto por Vasco, (2013) quien en su estudio realizado en diferentes sectores de la costa, sierra y amazonia ecuatoriana determinó una coinfección del 8% usando la técnica de PCR convencional.

5.2. GÉNEROS DE GARRAPARAS EXISTENTES EN EL SECTOR OESTE

Los datos obtenidos en este estudio determinaron que el 100 % de las garrapatas que se encontraron en el sector Oeste de la provincia de Zamora Chinchipe pertenecen al género *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, esto se determinó observando al estereoscopio las características morfológicas de los ejemplares seleccionados. Esto concuerda con lo señalado por Chamba, (2011), quien en su estudio realizado en el cantón Centinela del Cóndor también reportó el 100 % de garrapatas perteneciente al género *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Es preciso mencionar que los animales del sector Oeste de la provincia de Zamora Chinchipe se encuentran infestados de garrapatas durante todo el año ya que el sector presenta condiciones de vida aptas para la proliferación de la garrapata.

5.3. FACTORES ASOCIADOS A LA PRESENCIA DE BABESIOSIS

De un total de las fincas seleccionadas la muestra se conformó de la siguiente manera: el 31,2 % de los animales tienen de 3 a 4 años, el 25 % son mayores a 4 años y los animales menores a 1 año y entre 1 a 2 años representan el 21,9 % del total, esto en lo que respecta a la edad.

Así mismo en cuanto a la composición de la muestra con respecto a la raza de 96 muestras tomadas en el sector oeste, mestizas fueron el 50 % del total; de raza Holstein fueron el 34,4 %; de raza Brown swiss, fueron el 9,4 %, mientras que de la raza Charoláis y Gyr cada una representan el 3,2 %; de todas estas el 11,5 %, fueron machos mientras que hembras fueron el 88,5 %.

En el sector oeste de la provincia de Zamora Chinchipe predomina la ganadería que se dedican a la producción de leche ya que un 68,4 % del total de las ganaderías se dedican a esta actividad; las ganaderías de doble propósito representan el 26,3 %, y las ganaderías de carne tan solo el 5,2 %. La mayoría del ganado es producido por ellos mismos esto representa el 73,7 % también

hay aquellos que compran ganado a sus vecinos lo que equivale al 36,8 % y en otras fincas compran el ganado en otras provincias lo que representa el 57,9 % del total.

El 84,2 % del total de las fincas practican cuarentena mientras que el restante 15,8 % no la practican, Camargo et. al., (1974), señala que la Babesiosis y Anaplasmosis son enfermedades de fuerte impacto que se constituyen en un gran problema para el asentamiento del ganado proveniente de otras latitudes, y que es requerido ejecutar trabajos de cuarentena tendientes a su control.

Por otro lado, el 100 % de los ganaderos mencionaron que conocen la enfermedad, y en el 31,6 % del total de las fincas está presente la enfermedad, siendo la época de mayor presencia en el invierno, con un 63,2 % aunque el 36,8 % de los ganaderos en cambio menciona que es verano la época en donde aparece la enfermedad, García y col., (2003), señala que en cuanto a los aspectos eco-epidemiológicos, se ha observado que a pesar de existir condiciones adversas para el desarrollo de los vectores, su número aumenta en época de mínima precipitación, debido a la disminución de la inmunidad de los bovinos que se hace evidente como consecuencia de los factores ambientales y nutricionales de esta época del año, lo que conlleva al resurgimiento del proceso infeccioso en los animales. Por lo tanto, la época del año es un factor importante dentro de la prevalencia de la enfermedad.

El 36,8 % de los ganaderos mencionaron que la enfermedad está presente desde hace 10 años; el 31,6 % manifestaron que la enfermedad está presente desde hace 20 años; el 10,5 % manifestaron que está presente y el 5,3 % menciono que está presente desde hace 15 años, también manifestaron que tristeza y la fiebre son los síntomas más comunes en esta enfermedad ambas con el 19 %, mientras que otros manifestaron que la diarrea en un 15,5 % es el síntoma más común, la orina con sangre se reporta en el 13,8 %, y la postración con el 8,6 %, finalmente otros síntomas como el estreñimiento, la inapetencia e incluso la anemia aparecen en un 5,2 %. El IICAB, (2008), en una de sus publicaciones menciona que, en general, los animales infectados por *B. bigemina* desarrollan anorexia y fiebre alta, la pueden presentar antes de que aparezcan otros signos clínicos, menciona también que los signos clínicos

característicos son causados por hemolisis y anemia; y, que la fiebre puede producir abortos en vacas gestantes. Los ganaderos también mencionaron que el 89,5 % de ellos hacen uso de servicios veterinarios, y tan solo el 10,5 % no lo hacen; de estos solo el 10,5 % del total toman muestras para ser analizadas en el laboratorio.

En el 47,5 % de las fincas del sector los animales se enferman después de los 2 años de edad; en el 26,3 % los animales se enferman entre 1 y 2 años de edad; en el 15,8 % de las fincas los animales enferman entre los 6 y 12 meses finalmente tan solo el 10,5 % de los animales se enferman en los primeros 6 meses de vida. Rhades, (2008) menciona que todos los bovinos se enferman de “tristeza”, los animales jóvenes son más resistentes, pero causas asociadas al manejo, deficiencias nutricionales, enfermedades y la excesiva carga de garrapatas, pueden contraer la enfermedad. Madruga et al., (1984), menciona que la aparición de casos clínicos en terneros puede explicarse en parte por la caída de la inmunidad pasiva a partir del día 28 después del nacimiento, cuando los anticuerpos del calostro comienzan a ser reemplazados por los producidos por el propio animal.

De las respuestas obtenidas de los ganaderos tenemos que no hay animales que se hayan enfermado de Babesiosis bovina, esto representa el 63,2 % del total, en el 15,8 % de las fincas ha habido entre 4 y 5 animales enfermos; en otras fincas en cambio mencionaron que de 3 a 4 animales se enfermaron lo que también representa el 15,8 %, finalmente solo en 1 finca se han encontrado entre 1 y 2 animales enfermos, esto representa el 5,3 %, pese a esto los ganaderos mencionaron que en el 89,5 % de las fincas no se han reportado muertes por esta enfermedad. El 52,6 % de las fincas reportaron la presencia de la enfermedad hace más de 1 año, el 26,3 % nunca la han reportado, el 15,8 % la ha reportado entre los últimos 6 meses a 1 año y solo el 5,3 % la ha reportado hace menos de 6 meses. Olguín, (2013), señala que en la babesiosis la morbilidad es alta y la mortalidad depende de la receptividad y susceptibilidad del ganado y puede ser de hasta el 30 %.

El 36,8 % de los encuestados manifestaron que han usado Revevet (Tetraciclina + Diminaceno) para el control de Babesiosis, el 26,3 % han usado Verenil (Aceturato de diminaceno), el 15,8 % mencionaron utilizar Anaplus (Oxitetraciclina Clorhidrato) y otro 15,8 % Ganaseg (Diaceturato de dibenzamidina), y solo el 5,3 % han utilizado Imidogan (Imidocarb). Según SENASA, (2015) la dosis de oxitetraciclina indicada es de 10 - 15 mg/kg cuando se utilizan fórmulas al 5 % - 10 %. La aparición de formulaciones de acción prolongada (LA) permiten administrar toda la droga en una sola aplicación a razón de 20 mg/kg. El imidocarbo es otro fármaco de utilidad en el tratamiento de Babesiosis, se indica una dosis de 2,5 mg/kg a 3,5 mg/kg. De las soluciones al 12 %.

El 68,4 % de los ganaderos conoce cómo se transmite la enfermedad y el 100% de los ganaderos encuestados manifestaron que no usan ningún tipo de vacunas para el control de Babesiosis en el sector oeste de la provincia de Zamora Chinchipe, así también el 100 % de las ganaderías encuestadas mencionaron que sus animales entran en contacto con algún tipo de animal silvestre.

El 100 % de las fincas seleccionadas para el estudio en el sector oeste de la provincia de Zamora Chinchipe tienen presencia de garrapatas en sus animales. las condiciones ecológicas del trópico sudamericano proveen un hábitat adecuado para la multiplicación de artrópodos vectores (garrapatas, moscas, tábanos y mosquitos) de una serie de enfermedades tropicales, dentro de las cuales está la Babesiosis (Benavides, 2008).

El 52,6 % de las fincas presentan un alto grado de infestación de garrapatas, el 26,3 % presentan un grado infestación medio y el 21,1 % de las fincas presenta un grado de infestación bajo. De la información obtenida se establece que el 31,6 % de las fincas seleccionadas para este estudio utilizan Toril (Diamidina + Amitraz) para el control de garrapatas, el 21,1 % utilizan el patentado Revevet (Tetraciclina + Diminaceno), otro 21,1 % utilizan Fulminado (Amitraz), el 15,8% de los ganaderos utilizan Neguvon (2,2,2, tricoloro del Ac. Fosfórico), el 10,5 % utilizan el patentado Ivomec (Ivermectina), y el 42,1% de las fincas encuestadas mencionaron que cada tres meses realizan el control de

garrapatas, el 31,6 % lo realizan cada seis meses, el 15,8 % lo realiza mes y solo el 10,5 % cada año. El 73,7 % de las fincas seleccionadas para este estudio mencionaron que si practican la alternabilidad de productos para el control de garrapatas. El uso de productos acaricidas que matan a la garrapata en la etapa de vida parasitaria es el medio de lucha más difundido en el mundo. Está basado en el conocimiento del ciclo biológico del parásito y tratar de evitar que las formas parasitarias lleguen al estado de teleógina, previniendo su caída al suelo, y de esa manera evitar que haya reinfestación de la pastura por larvas. El ciclo biológico en el vacuno se completa en un periodo promedio de 22 a 23 días. Teóricamente, utilizando una acaricida eficaz (99 %) cada 21 días, evitaríamos la presencia del *B.microplus* con capacidad reproductiva, logrando un control adecuado con tratamientos de rutina (Cardozo y Franchi, 1995).

De los ganaderos entrevistados el 63,2 % realizan el retiro de la leche de los animales tratados para Babesiosis, en tanto que el restante 36,8 % no lo realizan y el 73,7 % consumen la carne de los animales tratados para Babesiosis, mientras que tan solo el 26,3 % restante no consumen la carne de los animales tratados. Existen restricciones en el uso de las oxitetraciclinas en animales de carne, los cuales no deben faenarse para consumo humano hasta transcurridos 10 días si son tratados con soluciones al 5 %, 14 días con soluciones al 15 % y 28 días si se utilizó una LA. En leche las restricciones al consumo son 3 días posteriores al tratamiento en soluciones al 5 % y 10 %, para las soluciones 5 días (SENASA, 2008).

6. CONCLUSIONES

- La prueba de nPCR es más sensible para la determinación de *Babesia Ssp.* ya que por este método se pudo determinar que el 87,1 % de las muestras resultaron positivas, frente a la tinción de Giemsa en donde solo se pudo determinar la presencia de *Babesia Spp.* en un 36,4 %.
- La presencia de *B. bigemina* en este es de 68,5 %; y de *B. bovis* es de 61,4 %.
- Los ensayos de nPCR demostraron que los machos presentaron mayor prevalencia de *Babesia spp.*, con un 70 %, mientras que por la tinción de Giemsa en las hembras se evidenció mayor prevalencia con un 37.8 %.
- De los datos obtenidos por cada cantón podemos concluir que tanto por la técnica de nPCR con un 90,7 % y en tinción de Giemsa con un 39,7%, en el cantón Zamora existe mayor prevalencia de *Babesia spp.*
- Por edad se debe mencionar que en la técnica de tinción de Giemsa se encontró una mayor prevalencia en los animales que se encuentran en el rango de edad > a 4 años con un porcentaje del 50 % de las muestras. Mientras que la técnica de nPCR arrojó como resultado una prevalencia mayor en los animales comprendidos en el rango de edad de 3 a 4 años con un 90,5 % del total estudiado en este rango.
- En lo que respecta a razas la mayor prevalencia con la tinción de Giemsa se encontró en la raza Gyr con un 66,7 %, en tanto que con la técnica de nPCR la mayor prevalencia se estableció en los animales mestizos con un 94,6 %.
- Se determinó que el 100 % de las garrapatas pertenecen al género *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

7. RECOMENDACIONES

- Para determinar la presencia de microorganismos es necesario complementar la prueba tradicional de tinción de Giemsa con una técnica más sensible como la prueba de nPCR ya que esta nos permitirá conocer con mayor exactitud las muestras positivas.
- El manejo del ganado se debe realizar bajo todos los procedimientos recomendados para evitar el contagio de esta enfermedad.
- Es sumamente importante realizar el control de garrapatas para de esta manera limitar las posibilidades de contagio.
- Es importante realizar la difusión de resultados en el sector, con la intención de hacer conocer la situación del sector en cuanto a la presencia de *Babesia Spp.*
- Implementar medidas preventivas como, el uso del pedio de cuarentena en animales que ingresan a las ganaderías, el uso contante de garrapaticidas, junto con la alternabilidad de productos, etc.

8. BIBLIOGRAFIA

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

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

ALVAREZ JA, FIGUEROA JV, ROJAS EE, RAMOS JA, MOSQUEDA JJ, CANTÓ GJ, VEGA CA, BUENING GM. (1998). Use of a duplex PCR/DNA probe assay to monitor *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle during a vaccination trial, Revista Latinoamericana de Microbiología, 40: 39-44.

BARKER S., MURRELL A. (2008). Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. Parasitology. 129:15-36.

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

BAZAN, T.M. (2002). Efecto de *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) en el control biológico de *Boophilus microplus* Canestrini (Acari: Ixodidae) en ganado bovino estabulado. Tesis de Maestría en Ciencias: área de biotecnología. Universidad de Colima. Tecomán, Colima. pp. 15- 25.

BENAVIDES M., SACCO M. (2007). Differential *Bos Taurus* cattle response to *Babesia bovis* infection. Vet parasite (150), 54 – 64.

BHOORA R., QUAN M., FRANSSEN L., et. al. (2010). Development and evaluation of real-time PCR assays for the quantitative detection of *Babesia*

caballi and *Theileria equi* infections in horses from South Africa. *Veterinary parasitology*, 168, (3-4), 201-211.

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

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

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

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

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

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

CAMARGO A., SERRATE H., SAAVEDRA A. (1974). *II Reunion Nacional de Investigadores en Ganadera. Bolivia.* (177).

CAMILO J. (2010). Garrapata *Amblyomma*. Disponible en: <http://pecuariaecologica7305.blogspot.com/2010/03/garrapatas-amblyomma.html>.

CARDOZO, H. Y FRANCHI, M. (1995) Garrapata. Epidemiología y control de *Boophilus microplus*. En: Enfermedades Parasitarias de importancia económica en bovinos. Bases epidemiológicas para su prevención. Ed Nari, A. y Fiel, C. Editorial Hemisferio Sur. p 369 – 402.

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

CASTAÑEDA R., ÁLVAREZ J., ROJAS C., FIGUEROA J., BAUTISTA C., LIRA J., VARGAS P., POLANCO D. (2015). Diagnóstico molecular de *Babesia spp.* y *Anaplasma marginale* en el vector *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

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

CENTRO PARA LA SEGURIDAD ALIMENTARIA Y LA SALUD PÚBLICA (CFSPH), (2008). Bovine Babesiosis. Food Security and Public Health. Institute for Internal Cooperation in Animal Biologics. Recuperado el 15 de diciembre de 2011. Disponible en: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/bovine_babesiosis.pdf

CHAUVIN, MOREAU E., BONNET S., PLANTARD O. & MALANDRIN L. (2009). Review article Babesia and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. Vet. Res. 40:37 DOI: 10.1051/vetres/2009020.

CHIANG P., SONG W., WU K., et. al. (1996). Use of a fluorescent-PCR reaction to detect genomic sequence copy number and transcriptional abundance. Genome research, 6, (10), 1013-1026.

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

CORTÉS J., BETANCOURT J. et. al (2010). Distribución de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en bovinos y fincas del Altiplano cundiboyacense (Colombia). *Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu.* 11(1), 73-84.

CRIADO-FORNELIO A., BULING A., ASENZO G., BENITEZ D., FLORIN-CHRISTENSEN M., GONZALEZ-OLIVA A., HENRIQUES G., SILVA M., ALONGI A., AGNONE A., TORINA A. & MADRUGA C.R. (2007). Development of fluorogenic probe-based PCR assays for the detection and quantification of bovine piroplasmids. *Vet. Parasitol.*, 162, 200–206.

FIGEROA J. (1993). Multiplex Polymerase Chain Reaction based assay for detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Veterinary Parasitology.* (50). 69 – 81.

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

GARCIA T. ALVAREZ M. FIGUEROA M. VEGA M. (2003). Babesiosis bovina: características relevantes de la respuesta inmune. *Cienc. Veterin.* 9. 105 – 122.

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

GOFF, W. L., W. C. DAVIS, G. H. PALMER, T. F. MCELWAIN, W. C. JOHNSON, J. F. BAILEY, AND T. C. MCGUIRE. (1988). Identification of *Babesia bovis* merozoite surface antigens by using immune bovine sera and monoclonal antibodies. *Infect. Immun.*56:2363-2368.

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

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

GRAY JS. (2006). Identify of de causal agents of human Babesiosis in Europe. *Int J Med Microbiol*, 131 – 136.

GRAY JS. VON STREDINGK L.V. GRANSTROM M. (2006). Identify of de causal agents of human Babesiosis in Europe. *Int J Med Microbiol*, 108 – 111.

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

GUBBELS J., DE VOS A., WEIDE M. et. al. (1999). Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. *Journal of clinical microbiology*, 37, (6), 1782-1789

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

GUILLÉN N., MUÑOZ L., (2013). Estudio taxonómico a nivel de género de garrapatas en ganado bovino de la Parroquia Alluriquín - Santo Domingo de los Tsáchilas. Carrera de Ingeniería Agropecuaria. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Sede Santo Domingo: 14.

HERNANDEZ A. (2012), Estimación de la prevalencia de Babesiosis bovina en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas mediante microscopia de frotis sanguíneo y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). 78.

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

HOMER M. (2000), Babesiosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 451 – 469.

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

ISEKI H., ALHASSAN A., OHTA N., et. al (2007) Development of a multiplex loopmediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine *Babesia* parasites. *Journal of microbiological methods*, 71, (3), 281-287.

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

JUNQUERA P. (2013). Garrapatas dermacentor en el Ganado, en el perro y el gato: Biología, Prevención y Control.

KIM C. (2007) Development of Taqman – Based Real – Time PCR, Assays for Diagnostic Detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 837 – 841.

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

LALAMA I. (2004). Determinación de Piroplasmosis bovina en el cantón General Antonio Elizalde (Bucay). Tesis de grado de la facultad de medicina Veterinaria, Universidad Agraria del Ecuador, 38.

LUO Y., JIA H., TERKAWI M. et. al. (2011). Identification and characterization of a novel secreted antigen 1 of *Babesia microti* and evaluation of its potential

use in enzymelinked immunosorbent assay and immunochromatographic test. *Parasitology international*, 60, (2), 119-125

MADRUGA, C. R.; AYCARDI, E.; KESLLER, R. H.; SCHENK, M. A. M.; FIGUEIREDO, G. R.; CURVO, J. B. E. (1984). Níveis de anticorpos anti-Babesia bigemina e Babesia bovis em bezerras da raça Nelore, Ibagé e cruzamentos de Nelore. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.19, p.1163-1168.

MINA J. (2004). Babesiosis bovina en el cantón Esmeraldas. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Agraria del Ecuador.

MOSCOSO A. M. (2000). Pruebas serológicas en el diagnóstico de Babesiosis y Anaplasmosis bovina. Tesis de Grado. Santa Cruz, Bolivia. U.A.G.R.M. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 56.

MOSQUEDA G., FALCÓN N., RAMOS A., CANTO A AND CAMACHO (2012). Estrategias genimicas y moleculares para el control de la Babesiosis bovina. *Rev Mwx Ciencias pecuarias*. 3: 51-59.

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

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL (OIE) (2009). Bovine Babesiosis. Technical Disease Cards. Recuperado el 10 de septiembre del 2012. Recuperado de:

http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/BOVINE_BABESIOSIS_FINAL.pdf.

OLGUIN A. (2013). Anaplasmosis. Universidad nacional Autónoma de México. Facultad de medicina Veterinaria y Zootecnia. Disponible en: <https://es.slideshare.net/cuencamvz24/anaplasmosis-16600480>.

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

PAZMIÑO M. (2011), Determinación de la prevalencia de *Babesia bovis* en el ganado bovino faenado en la Empresa metropolitana de Rastro de Quito, mediante la utilización de técnica microscópicas y serológicas.

PURNELL R, BROCKLESBY D. (1977), *Babesia divergens* in splenectomised calves: immunogenicity of lyophilized plasma from an infected animal. *Res Vet Sci.* 255 – 256.

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

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

RAMOS C., ARAUJO F., SOUZA II; et. al. (2011). Real-time polymerase chain reaction based on *msa2c* gene for detection of *Babesia bovis*. *Veterinary parasitology*, 176, (1), 79-83

REY C. (2004), Hemoparásitos en América Latina: El caso de Venezuela. Red electrónica de garrapatas y enfermedades transmitidas por garrapatas para América Latina y El Caribe, RedEctopar. 1 - 5.

RHADES, LC. (2005). Tristeza bovina: Babesiosis y Anaplasmosis bovina (en línea). San Salvador. Consultado el 12 dic. 2012. Disponible en http://www.veterinaria.org/asociaciones/vet-uy/articulos/artic_bov/052/bov052.htm.

RIEK, R. F. (1966). The life cycle of *Babesia argentina* (Lignières, 1903) (Sporozoa: Piroplasmidea) in the vector *Boophilus microplus* (Canestrini). *Australian Journal of Agricultural Research* 17, 247–254

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

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

SENASA. (2015). Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, Ministerio de Agroindustria, República de Argentina.

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

SOLARI M. et al. (2006). Impact of Babesia bovis and Babesia bigemina on the production of beef cattle in Uruguay. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. Vol 87, Suppl III. 143-149.

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

SUÁREZ C. & NOH S. (2011). Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. Veterinary parasitology, 109-125.

SURZYCKI S. (2000). Basic techniques in molecular biology. Springer Lab. Manuals.

TERKAWI M. (2011). Serological survey of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle in South Africa. Veterinary Parasitology.

TIZAR I. (2002). Inmunología Veterinaria. México: McGraw Hill. Brasileña de Parasitología Veterinaria. 169 – 173.

ULLENBERG C. (1995). Babesia - A historical overview, Veterinary parasitology Vol. 138, 1-2. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.035>.

VASCO K. (2013). Estandarización de la técnica de análisis de fusión de alta resolución para la detección de Babesia en garrapatas utilizando polimorfismos de nucleótidos. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia. (xiv).

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

VIAL H. & GORENFLOT A. (2006). Chemotherapy against babesiosis. *Veterinary parasitology*, 138, (1-2), 147-160.

VOLTZIT VO. (2007). A review of Neotropical *Amblyomma* species (Acari: Ixodidae). *Acarina*;15 1):3–134.

WALTISBUHL D., GOODGER B., WRIGHT I., et. al. (1987). An enzyme linked immunosorbent assay to diagnose *Babesia bovis* infection in cattle. *Parasitology research*, 73, (2), 126-131.

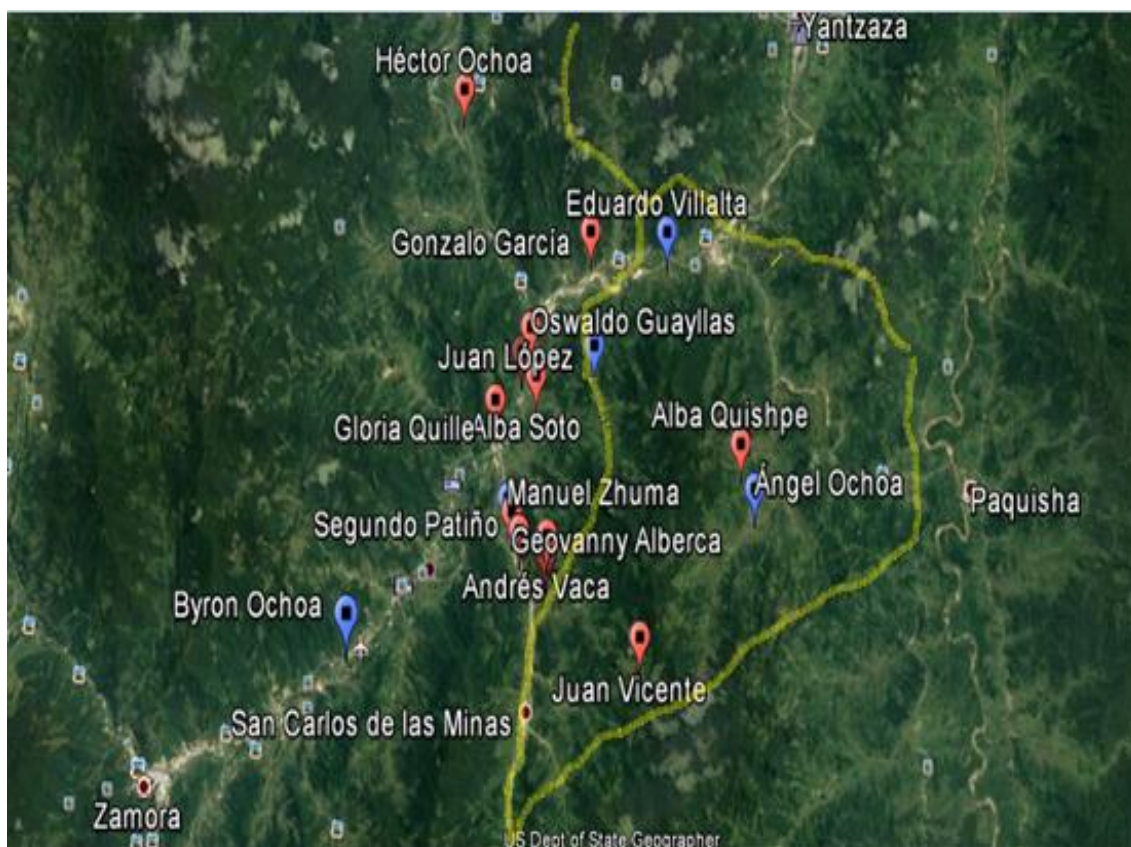
WEILAND G. (1986). Species-specific serodiagnosis of equine piroplasma infections by means of complement fixation test (CFT), immunofluorescence (IIF), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Veterinary parasitology*, 20, (1-3), 43-48

YANEZ C. (2013). Determinación de la Incidencia de Anaplasmosis y Babesiosis en el ganado bovino sometido a explotación en la parroquia Huigra, cantón Alausí, provincia de Chimborazo. 73.

ZINTL A., MULCAHY G., SKERRETT H.E., TAYLOR S.M. & GRAY J.S. (2003). *Babesia divergens*: A Bovine Blood Parasite of Veterinary and Zoonotic Importance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 16, 622–636.

9. ANEXOS

ANEXO 1. Ubicación geográfica de las fincas seleccionadas en el sector Oeste de la provincia de Zamora Chinchipe



ANEXO 2. Registro de fincas seleccionadas

SECTOR	PROPIETARIO	GEORREFERENCIA	ALTITUD (msnm)	CODIGO DE SECTOR
Zamora	Héctor Ochoa	Lat. 3°53'06'' Long. 78°52'37''	861	Z1
				Z2
				Z3
				Z4
				Z5
				Z6
Zamora	Alba Quishpe	Lat. 3°56'55'' Long. 78°45'32	866	Z7
				Z8
				Z9
				Z10

				Z11
Zamora	Gonzalo García	Lat. 3°54'30'' Long. 78°49'26''	835	Z12
				Z13
				Z14
				Z15
				Z16
				Z17
Zamora	Geovanny Alberca	Lat. 3°58'59' Long. 78°50'14''	895	Z18
				Z19
				Z20
				Z21
				Z22
Zamora	Segundo Patiño	Lat. 3°59'13 Long. 78°50'01''	924	Z23
				Z24
				Z25
				Z26
				Z27
Zamora	Luis Salinas	Lat. 3°59'27'' Long. 78°49'24''	969	Z28
				Z29
				Z30
				Z31
				Z32
				Z33
Zamora	Pedro Calva	Lat. 3°59'26'' Long. 78°49'21''	960	Z34
				Z35
				Z36
				Z37
				Z38
Zamora	Andrés Vaca	Lat. 3°59'09'' Long. 78°49'24''	1021	Z39
				Z40
				Z41
				Z42
				Z43
Zamora	Gloria Quille	Lat. 3°57'25'' Long. 78°50'57''	848	Z44
				Z45
				Z46
Zamora	Juan Vicente	Lat. 4°00'11 Long. 78°47'05''	1648	Z47
				Z48
Zamora	Franklin Cuenca			Z49
				Z50
				Z51
				Z52
				Z53
				Z54
				Z55
				Z56
				Z57
				Z58
				Z59
				Z60
Zamora	Alba Soto	Lat. 3°56'52''	859	Z60

		Long. 78°50'09''		Z61
				Z62
				Z63
				Z64
				Z65
Zamora	José Calva	Lat. 3°56'35'' Long. 78°50'32''	844	Z66
				Z67
				Z68
				Z69
Zamora	Oswaldo Guayllas	Lat. 3°56'11'' Long. 78°50'25''	855	Z70
				Z71
				Z72
				Z73

Centinela del Cóndor	Byron Ochoa	Lat 4°01'21'' Long. 78°53'27''	871	C1
				C2
				C3
				C4
Centinela del Cóndor	Manuel Zhuma	Lat. 3°58'48'' Long. 78°50'24''	889	C5
				C6
				C7
				C8
Centinela del Cóndor	Eduardo Villalta	Lat. 3°54'09'' Long. 78°47'47''	846	C9
				C10
				C11
				C12
				C13
Centinela del Cóndor	Juan López	Lat. 3°56'10'' Long. 78°48'59''	1011	C14
				C15
				C16
				C17
Centinela del Cóndor	Ángel Ochoa	Lat. 3°57'30'' Long. 78°45'05''	1104	C18
				C19
				C20
				C21
				C22
				C23

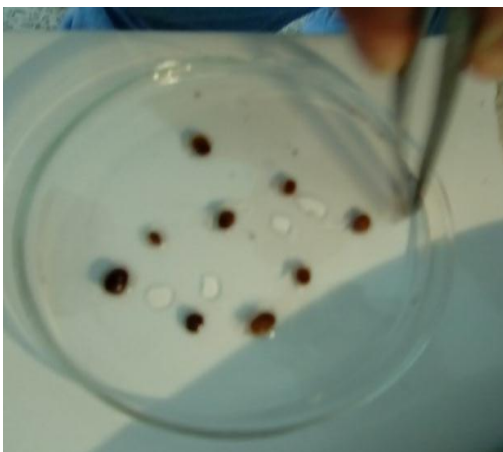
ANEXO 3. Resultados de las técnicas empleadas.

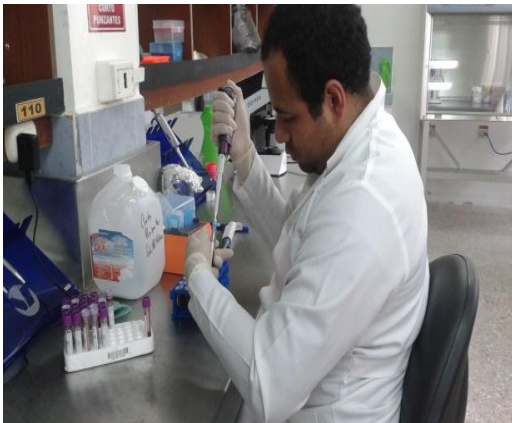
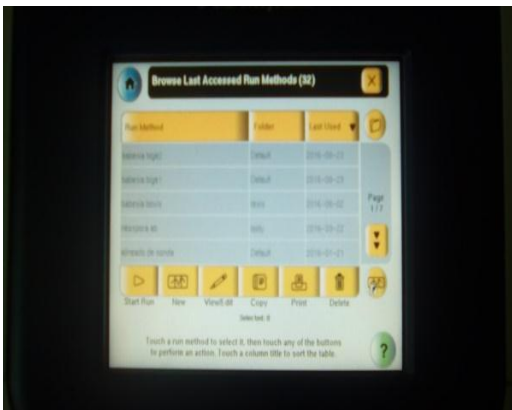
CODIGO DE SECTOR	GIEMSA	B. bigemina	B. bovis	SEXO	EDAD	RAZA
Z1	+	+	+	H	5 años	Holstein F.
Z2	-			H	5 años	Holstein F.
Z3	++	+	+	H	5 años	Brown Suis

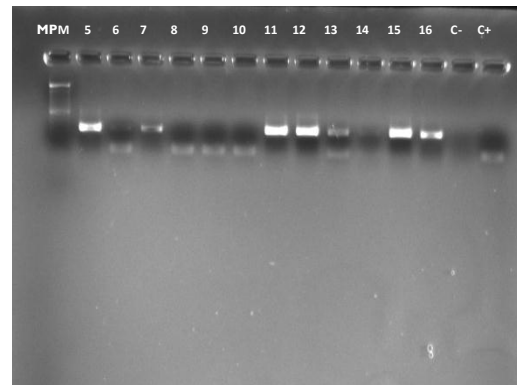
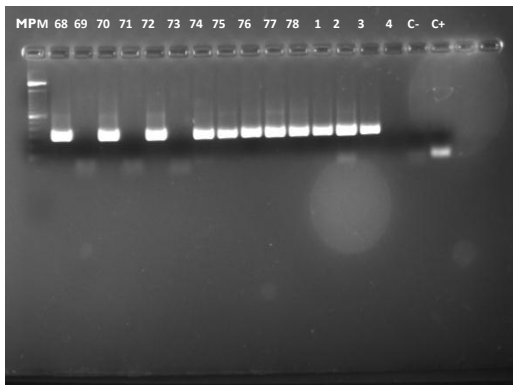
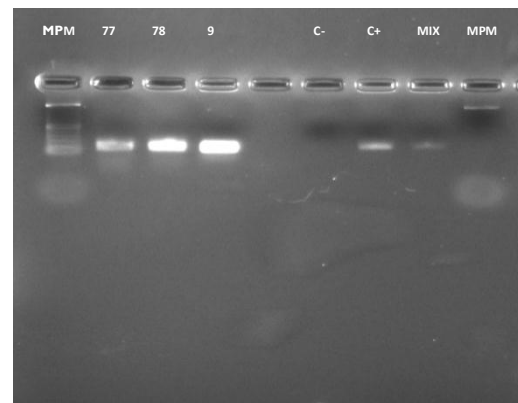
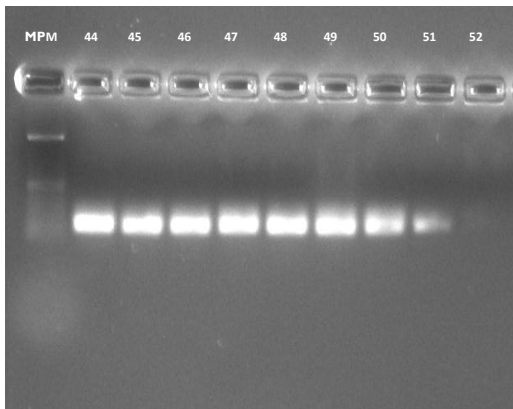
Z4	--			H	2 años	Holstein F.
Z5	-			M	4 meses	Brown Suis
Z6	-			H	3 meses	Brown Suis
Z7	+	-	+	H	5 años	Holstein F
Z8	-	-	+	H	3 años	Charolais
Z9	-			H	6 años	Holstein
Z10	-			H	4 años	Mestizo
Z11	-	+	-	H	6 años	Holstein
Z12	-	+	-	H	4 años	Mestiza
Z13	-	+	-	H	5 años	Holstein
Z14	+	+	-	H	7 años	Holstein
Z15	+	+	+	H	6 años	Holstein
Z16	-	-	-	H	2 meses	Brown Suis
Z17	+	+	+	H	2 años	Mestiza
Z18	+	-	+	H	5 años	Mestiza
Z19	-			H	5 años	Mestiza
Z20	+	-	-	H	2 años	Mestiza
Z21	+	-	+	H	4 meses	Mestiza
Z22	-			H	6 años	Holstein
Z23	-			H	5 años	Holstein
Z24	-			H	4 años	Holstein
Z25	-			H	6 años	Holstein
Z26	-			H	7 meses	Holstein
Z27	-	+	+	M	3 años	Charoláis
Z28	-	+	+	H	1 año	Mestizo
Z29	-			H	4 años	Mestizo
Z30	+	+	+	M	2 meses	Charolais
Z31	-	+	+	H	2 años	Mestiza
Z32	-	-	+	H	2 meses	Mestiza
Z33	-	+	+	M	2 años	Mestizo
Z34	+	+	+	H	2 años	Mestizo
Z35	-			H	4 años	Mestizo
Z36	+	+	-	H	5 años	Mestizo
Z37	+	+	+	H	2 años	Mestizo
Z38	-	+	-	M	2 años	Mestizo
Z39	+	+	+	H	5 años	Holstein
Z40	+	+	+	H	4 años	Mestizo
Z41	+	+	+	H	3 años	Mestizo
Z42	+	-	+	H	4 años	Mestizo
Z43	+	+	-	H	3 años	Mestizo
Z44	-	+	+	M	6 meses	Mestizo
Z45	+	-	-	H	6 años	Mestizo
Z46	+	+	-	H	2 años	Holstein
Z47	-			H	4 años	Holstein
Z48	-	+	+	H	11 meses	Angus
Z49	-	+	-	H	1 año	Mestizo
Z50	+	-	-	M	1,5 años	Gyr
Z51	+	+	+	H	3 años	Holstein
Z52	-			H	3 años	Holstein
Z53	+	+	-	H	3 años	Holstein

Z54	-	+	+	H	5 años	Holstein
Z55	-	+	-	H	2 años	Holstein
Z56	-	+	+	M	3 años	Mestizo
Z57	+	-	+	H	5 meses	Mestizo
Z58	+	+	+	H	7 meses	Mestizo
Z59	-			H	4 años	Mestizo
Z60	-	-	-	H	3 años	Mestizo
Z61	-	+	+	H	3 años	Mestizo
Z62	-	+	+	H	9 meses	Mestizo
Z63	-			H	4 años	Mestizo
Z64	-	+	-	H	3 años	Mestizo
Z65	+	+	+	H	1.5 años	Mestizo
Z66	-	+	+	H	3 años	Mestizo
Z67	+	-	+	H	1 año	Mestizo
Z68	+	+	+	H	8 años	Mestizo
Z69	+	+	+	H	4 años	Mestizo
Z70	-			H	2 años	Charolais
Z71	-	+	+	H	4 años	Charolais
Z72	-	+	-	H	3 años	Charolais
Z73	-	+	-	H	4 años	Charolais

CODIGO DE SECTOR	GIEMSA	B. bigemina	B. bovis	SEXO	EDAD	RAZA
C1	-	-	+	H	6 meses	BrownSuis
C2	-	-	-	H	8 meses	Holstein
C3	+	-	+	H	5 meses	Holstein
C4	--	-	+	H	5 meses	Hostein
C5	+			M	8 años	Holstein
C6	+	-	+	H	4 años	Brownsuis
C7	+	-	-	M	1 año	Gyr
C8	-	-	-	M	1 año	Brown suis
C9	-	+	-	H	9 meses	Brown suis
C10	-	-	+	M	9 meses	Holstein
C11	-	+	-	H	10 meses	Brown suis
C12	-	+	+	H	8 meses	Simental
C13	-	+	-	H	1 año	Gyr
C14	-	+	-	H	2 años	Holstein
C15	++	+	-	H	4 años	Mestizo
C16	-	-	+	H	4 años	Mestizo
C17	-	+	+	H	7 años	Mestizo
C18	-			H	4 años	Holstein
C19	-			H	7 años	Holstein
C20	-	-	-	H	4 años	Holstein
C21	+	-	-	H	6 años	Holstein
C22	-	-	-	H	6 años	Holstein
C23	-			M	6 meses	Holstein

ANEXO 4. Fotografías toma de muestras.**ANEXO 5. Fotografías frotis sanguíneos****ANEXO 6. Fotografías identificación de garrapatas**

ANEXO 7. Fotografías extracción de ADN**ANEXO 8. Fotografías realización de técnica de nPCR****ANEXO 9. Fotografías electroforesis**

ANEXO 10. Resultados electroforesis *B. bovis*.**ANEXO 11. Resultados electroforesis *B. bigemina*.****ANEXO 12. Equipo de trabajo y personal de laboratorio.**