



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

AREA BIOLÓGICA

TÍTULO DE BIÓLOGO

“Determinación de *Babesia bigemina* mediante PCR en ganado bovino del Sur del Ecuador”

TRABAJO DE TITULACIÓN.

Autora: Abarca Gualán, Lizbeth Michelle

Directora: Guzmán Ordoñez, Lucía Teresa, Dra.

LOJA – ECUADOR

2015

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Doctora.

Lucía Teresa Guzmán Ordoñez

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: '**Determinación de *Babesia bigemina* mediante PCR en ganado bovino del Sur del Ecuador**' realizado por Abarca Gualán Lizbeth Michelle ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, septiembre de 2015

f)

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Lizbeth Michelle Abarca Gualán declaro ser autora del presente trabajo de titulación: **‘Determinación de *Babesia bigemina* mediante PCR en ganado bovino del Sur del Ecuador**’, de la Titulación Biología, siendo Lucía Teresa Guzmán Ordoñez directora del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f.....

Autora: Lizbeth Michelle Abarca Gualán

Cédula: 1900574870

DEDICATORIA

El presente trabajo va dedicado con todo mi amor cariño y respeto, a Nancy, mi madre quien ha sido mi inspiración y fortaleza para poder culminar este sueño, a mis hermanos Jonathan y Fabricio por ser mi alegría y mi apoyo.

A la Dra. Catalina Rey y la Dra. Lucía Guzmán por su paciencia, por compartir conmigo sus conocimientos, y por permitirme trabajar a su lado a lo largo de esta investigación.

Liz

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme culminar este sueño

A mi madre por brindarme la oportunidad de estudiar y llegar a ser una profesional, por ayudarme a lograrlo gracias a su amor y apoyo. A mis hermanos por su amor.

Al Laboratorio de Sanidad Animal y Zoonosis de la Universidad Técnica Particular de Loja por darme la oportunidad de realizar mí trabajo de fin de titulación ahí, a la Dra. Catalina Rey, Dra. Lucía Guzmán, y al Dr. Rodrigo Saa por sus sabias enseñanzas y por saberme guiar, gracias también por tantas risas y buenos momentos, este viaje llamado Tesis fue más llevadero por personas como ustedes.

A mis amigos quienes se convirtieron en familia y me apoyaron en cada momento.

Liz

INDICE	Página
CARÁTULA	I
CERTIFICACIÓN	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS	6
INDICE DE FIGURAS Y TABLAS	8
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	11
MARCO TEORICO	13
1.1. <i>Babesia bigemina</i>	14
1.1.2. Características generales	14
1.2. Características	16
1.2.1. Morfológicas	16
1.2.2. Proteínas de <i>Babesia bigemina</i>	16
1.2.2.1. Proteínas de superficie	16
1.2.2.2. Proteínas somáticas	17
1.3. Ciclo de vida	18
1.4. Epizootiología	20
1.5. Diagnóstico	21
1.5.1. Diagnóstico clínico	21
1.5.2. Extendido sanguíneo	21
1.5.3. Métodos serológicos	22
1.5.4. PCR	23
1.5.4.1. Tipos de PCR	25
1.5.4.1.1. Tiempo real	25
1.5.4.1.2. Tiempo final	26
1.5.4.1.3. Anidada	26
1.6. Objetivos	27
2. MATERIALES Y MÉTODOS	28
2.1. Área de estudio	29

2.2. Criterios de selección de los animales	30
2.3. Metodología	31
2.3.1. Toma de muestras	31
2.3.2. Tratamiento de muestra	31
2.3.2.1. Campo	31
2.3.2.2. Laboratorio	31
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
3.1. Evaluación de los extendidos sanguíneos y valores de hematocrito	35
3.2. Extracción de ADN	36
3.3. PCR anidada	39
3.3.1. Sensibilidad del fluorocromo	42
3.3.2. Comparación de los resultados de PCR con los obtenidos por extendidos sanguíneos	43
3.3.3. Secuenciación	44
CONCLUSIONES	45
RECOMENDACIONES	46
BIBLIOGRAFÍA	47
Anexos	51

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Diagrama de un merozoíto de apicomplexa	15
Figura 2. Extendido sanguíneo teñido con coloración de Romanovsky. Se observa <i>Babesia bigemina</i> en el interior de dos eritrocitos	16
Figura 3. Mecanismo de RAP-1 en la invasión de <i>Babesia</i> en un eritrocito	17
Figura 4. Ciclo de vida de <i>B. bigemina</i> en el transmisor biológico y el hospedador vertebrado	19
Figura 5. Ciclo de amplificación en la reacción en cadena de la polimerasa	24
Figura 6. Amplificación exponencial de una PCR	25
Figura 7. Diagrama de una PCR nested	27
Figura 8. Mapa de los cantones donde se realizó el muestreo	29
Figura 9. Muestras de ADN genómico extraído de muestras sanguíneas bovinas en gel de agarosa al 0,8% teñido con Diamond®.	39
Figura 10. Bandas inespecíficas de amplificación en la PCR anidada para diagnóstico de <i>Babesia bigemina</i> .	39
Figura 11. Muestras positivas a <i>Babesia bigemina</i> obtenidas en PCR anidada utilizando cebadores específicos RAP1a	40
Figura 12. Muestra positiva a <i>Babesia bigemina</i> , amplificada por PCR anidada con cebadores específicos en gel de agarosa al 1,5%	42
Tabla 1. Criterios de interpretación diagnóstica para confirmar la etiología de casos agudos de enfermedad hemoparasitaria de bovino adultos en regiones enzoóticas.	22
Tabla 2. Número de muestras extraídas clasificadas por provincia y cantón	30
Tabla 3. Resultados de los extendidos sanguíneos, porcentaje de positividad y de hematocrito de las muestras analizadas por cantón y provincia	36
Tabla 4. Concentración de algunas de las muestras de ADN que se extrajeron, con los códigos correspondientes a cada provincia	38
Tabla 5. Resultados de los análisis mediante nPCR para el diagnóstico de <i>Babesia bigemina</i>	40
Tabla 6. Valores de positividad de <i>Babesia bigemina</i> mediante PCR reportados por otros autores	42
Tabla 7. Comparación entre los resultados de extendido sanguíneo con los obtenidos por nPCR	43
Tabla 8. Listado de algunos de los números de acceso en el GenBank con los cuales se comparó la secuencia obtenida en el presente trabajo	44

RESUMEN

Babesiosis bovina es una enfermedad causada por los protozoarios *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*. En virtud de los escasos reportes sobre su existencia en Ecuador y la presencia de su transmisor biológico, la garrapata *Rhipicephalus microplus*, el objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de *Babesia bigemina* en ganado bovino del sur de Ecuador, a través de un ensayo de PCR anidada (nPCR). Se extrajeron 249 muestras de sangre en tubos con anticoagulante a bovinos de camales y fincas de las provincias de El Oro, Zamora Chinchipe y Loja. Se realizaron extendidos sanguíneos, determinación de hematocrito y extracción de ADN. Para la nPCR se utilizó cebadores específicos para amplificar una región parcial del gen que codifica para la proteína RAP-1a de *B. bigemina*. Se determinó 35,29% de positividad en nPCR mientras que en extendidos sanguíneos fue 4.09%. Estos resultados indican que aunque los extendidos sanguíneos son útiles en casos agudos y no deben ser descartados en el diagnóstico, la técnica de PCR es muy útil en la detección de animales portadores y debería ser implementada en laboratorios de diagnóstico.

Palabras clave: *Babesia bigemina*, Ecuador, PCR anidada

ABSTRACT

Bovine babesiosis is disease caused by protozoa *Babesia bigemina* and *B. bovis*. Due to few reports about its existence in Ecuador and the presence of its biological transmissor, the tick *Rhipicephalus microplus*, the aim of this study was to determine the presence of *Babesia bigemina* in cattle from Southern Ecuador, by means of nested PCR (nPCR). Blood samples were taken in tubes with anticoagulant from 249 bovines of slaughterhouses and cattle farms in the provinces of El Oro, Loja and Zamora Chinchipe. Blood smears stained with Giemsa, PCV determination and DNA extraction were carried out with the blood samples. nPCR was prepared using specific primers to amplify a partial region of *RAP-1a* gen. A positivity of 35.29% for *Babesia bigemina* was determined in nPCR but a 4.09% was observed in stained blood smears. The obtained results suggest the usefulness of blood smears in acute cases and should not be discarded in the diagnosis. However, PCR should be used in those cases with low levels of parasitemia as are present in carrier animals and should be implemented in diagnostic laboratories.

Keywords: Babesiosis, nPCR, protozoan

INTRODUCCIÓN

El presente trabajo “Determinación de *Babesia bigemina* mediante PCR en ganado bovino del Sur del Ecuador”, se realizó con el fin de evidenciar *B. bigemina* en tres provincias de la región 7 del Ecuador, así como también estandarizar el método de diagnóstico indirecto nPCR, el cual es mucho más sensible que los métodos directos y que un PCR convencional.

La estructura del presente trabajo de fin de titulación se encuentra dividido en 4 capítulos, los cuales detallan cada uno de los aspectos de la investigación. El capítulo 1 comprende el marco teórico. En éste se encuentra toda la información correspondiente a investigaciones previamente ejecutadas y que hoy permiten entender la etiología, epidemiología y comportamiento de *B. bigemina*. En el segundo capítulo, se expone la metodología usada, que permitió cumplir con los objetivos planteados. En el capítulo 3 se muestran los resultados obtenidos y la discusión de los mismos. Finalmente, se encuentran conclusiones, recomendaciones y la bibliografía.

La babesiosis bovina es una enfermedad transmitida por garrapatas y causada por protozoarios del género *Babesia*. Este protozooario invade los eritrocitos, se multiplica en su interior y finalmente los destruye en su proceso de salida liberando masivamente hemoglobina a la corriente sanguínea. Este proceso origina anemia hemolítica y hemoglobinuria. Dependiendo del grado de infección, el animal puede presentar abortos, disminución en la producción de carne e incluso la muerte, lo que significa, pérdidas económicas para el ganadero. Aunque el método tradicional de detección del parásito es el extendido sanguíneo, se requiere un mínimo de 10^6 parásitos/mL para su detección. Esto significa que se requiere un método más sensible para detectar animales con niveles menores de parasitemia que pueden ser portadores del parásito y que en casos de estrés la inmunidad pueda ser subvertida y por ende enfermar o morir.

La región 7 del país tiene una alta producción de ganado bovino. Una enfermedad como babesiosis bovina representa un gran riesgo de pérdida para los productores de la zona; cabe mencionar que no se tienen registros de presencia o ausencia de esta enfermedad en la región sur del Ecuador. Es por todo esto, que realizar este proyecto es fundamental para el sector ganadero de todo el país, ya que así, estamos asegurando la soberanía alimentaria para Ecuador, se promueve la investigación y el desarrollo de la región 7, ya que el diagnóstico de este tipo de enfermedades se le podrá llevar a cabo en el sur del país.

Para llevar a cabo la presente investigación se planteó un objetivo general: Establecer la existencia de *Babesia bigemina* en ganado bovino en la zona sur del Ecuador, se desarrollaron dos objetivos específicos **1)** Estandarizar la técnica de nPCR para la determinación de *Babesia bigemina* en sangre bovina; **2)** Evaluar la presencia de *Babesia bigemina* en sangre bovina mediante nPCR en tiempo final utilizando cebadores específicos.

Los laboratorios e instalaciones de la Universidad Técnica Particular de Loja están adecuados de la mejor manera, y por ello se pudo cumplir a cabalidad con los objetivos planteados; las facilidades brindadas por la Universidad permiten desarrollar investigaciones y proyectos de esta índole y muchas otras.

La metodología usada constó de una fase de campo y una de laboratorio. La fase de campo consistió en la obtención de sangre bovina, la realización de extendidos sanguíneos y la determinación de hematocrito. En la fase de laboratorio se realizó la extracción de ADN, la PCR anidada y la electroforesis en gel de agarosa para detección de los amplicones.

CAPITULO I
MARCO TEÓRICO

1.1. *Babesia bigemina*

1.1.2. Características generales

Babesia bigemina es un protozooario perteneciente al phylum Apicomplexa, clase Aconoidasida, orden Piroplasmida y familia Babesiidae. En la actualidad el phylum Apicomplexa está conformado por más de 300 géneros, que a su vez incluyen cerca de 4600 especies de organismos. Algunas de las enfermedades más relevantes, causadas por estos organismos son: malaria (*Plasmodium*), babesiosis (*Babesia*), coccidiosis (*Eimeria* e *Isospora*); criptosporidiosis (*Cryptosporidium parvum*, *C. hominis*) ciclosporiasis (*Cyclospora cayetanensis*), toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*).

Los apicomplexas poseen un orgánulo característico, terminado en punta en un extremo de su membrana externa denominado complejo apical (Petrigh, 2010). Este incluye los anillos polares, cuerpos esféricos, micronemas y roptrias. El anillo polar está formado por una doble membrana debajo de la membrana plasmática del extremo anterior. Las roptrias son estructuras electro-densas en forma de gota ubicadas en el extremo anterior de la célula. Los micronemas son pequeñas estructuras que se presentan alrededor de las roptrias en la región anterior del merozoíto. Las roptrias y los micronemas poseen enzimas proteolíticas que juegan un rol importante en la invasión del merozoíto al eritrocito (Fitzpatrick et al., 1968). Una de las organelas características de los integrantes del phylum Apicomplexa es el apicoplasto. Esta es una característica ancestral del phylum adquirida por un proceso de endosimbiosis. Esta organela multi-membranas es homóloga a los cloroplastos de las plantas y como tal poseen una cierta autonomía por poseer su propio genoma circular y su propia maquinaria de expresión. El rol exacto de esta organela no se conoce completamente pero se cree que está involucrada en la síntesis de lípidos e isoprenoides (Waller y. McFadden, 2005). Algunos miembros del phylum poseen conoide, una estructura funcional en la invasión a la célula (Fig. 1). El orden Piroplasmida y dentro de él, la familia Babesiidae, pertenece a la clase Aconoidasida porque sus miembros carecen de conoide.

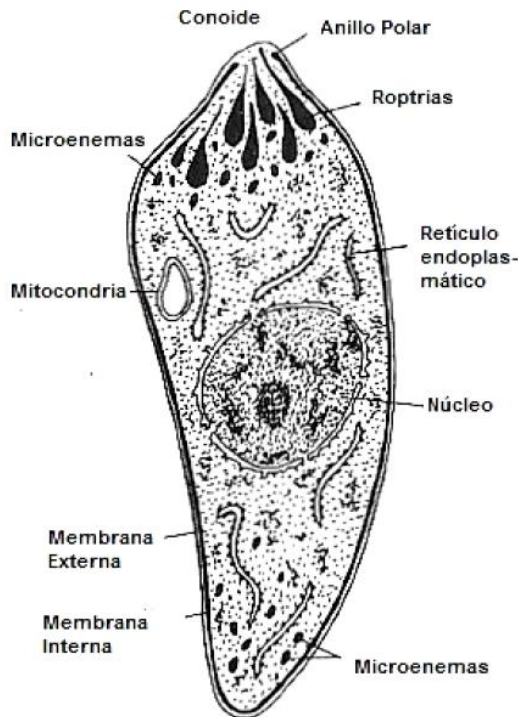


Figura 1. Diagrama de un merozoíto de apicomplexa.

Fuente: (Cordero del Campillo M., 1999)

Los parásitos del orden Piroplasmida son transmitidos por vectores como las garrapatas e infectan células sanguíneas de hospedadores vertebrados (Levine, 1973). Las etapas de reproducción sexual se da en hospedadores invertebrados, mientras que las etapas de reproducción asexual se lleva a cabo en hospedadores vertebrados (Lee et al., 2000). La supervivencia del parásito depende en gran medida de la interacción entre sus vectores invertebrados y sus hospedadores vertebrados, ya que no hay etapas ambientales en su ciclo de vida (Moller y Arriero, 2008; Svensson y Ricklefs, 2009). *Babesia* y *Theileria* son los géneros de mayor importancia y significancia dentro de la medicina veterinaria y humana (Levine, 1973). *Babesia* es uno de los géneros más representativos de los piroplasmida, ya que tiene un gran impacto en la comunidad veterinaria.

El género en la actualidad contiene más de 120 especies, con una distribución cosmopolita, que infecta a mamíferos como los bovinos (*B. bigemina*, *B. bovis*, *B. divergens* y *B. major*), pequeños rumiantes como ovejas y cabras (*B. ovis*, *B. motasi*, *B. crassa* y *B. taylori*), caballos y burros (*B. caballi* y *B. equi* transferido recientemente en el género *Theileria*), cerdos (*B. perronciti*, *B. trautmanni*), perros (*B. canis*), gatos y otros felinos (*B. herpailuri*, *B. panthera*, y *B. felis* con la posición poco clara y nombres como *Theileria felis* o *Cytauxzoon felis*) y roedores (*Babesia microti*). Los seres

humanos también pueden ser infectados accidentalmente con varias especies (principalmente *B. divergens* o *B. microti* de los roedores). Los casos de babesiosis humana son escasos y están distribuidos principalmente en Norteamérica donde predomina *B. microti* y, en Europa los casos son menos y son transmitidos por *B. divergens*, donde se trata de una enfermedad grave, especialmente en personas inmunocomprometidas y esplenectomizados (Hernandez, 2006)

1.2. Características

1.2.1 Morfológicas.

Babesia bigemina es un piroplasma grande, de 4 a 5 µm de longitud por 2 a 3 µm de ancho; las formas redondeadas miden de 2 a 3 µm de diámetro. Tienen forma de pera y se encuentran en parejas, formando un ángulo agudo en el interior de los glóbulos rojos. Pueden aparecer formas redondeadas, ovaladas o irregulares, según la fase de desarrollo del parásito en los glóbulos rojos. La forma típica reconocida a la observación microscópica es un corpúsculo único o en pares, con forma redondeada u ovalada (Soulsby, 1987). Es por esta razón que a *B. bigemina* se la incluye dentro de las *Babesias* “grandes” (Fig. 2)

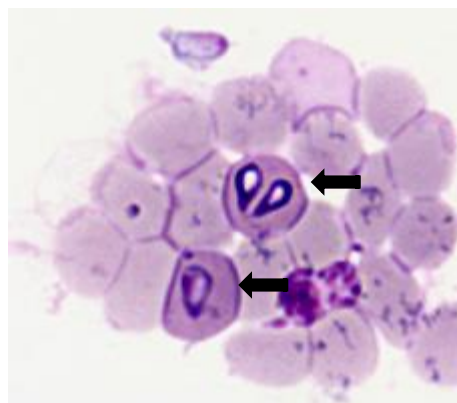


Figura 2. Extendido sanguíneo teñido con coloración de Romanovsky.

Se observa *Babesia bigemina* en el interior de dos eritrocitos.

Fuente: <http://www.afrivip.org/sites/default/files/BovBab/diagnosis.html>

1.2.2. Proteínas de *Babesia bigemina*.

1.2.2.1. Proteínas de superficie.

De las proteínas más estudiadas en *Babesia* son aquellas que se encuentran relacionadas con las roptrias. Una de ellas es RAP-1, la cual está constituida por una familia de seis genes polimórficos (Brown y Palmer, 1999). El locus del gen *rap-1* posee una organización compleja conteniendo al menos tres clases diferentes de genes relacionados. La organización básica del locus *rap-1* en la cepa JG-29 consiste

en cinco repeticiones en tándem de los arreglos de los genes rap-1a y rap-1b, con una sola copia del gen rap-1c en el extremo 3' del locus (Suarez et al., 2003). El gen rap1 posee cuatro variantes con una región central conservada en todas: rap-1a α 1 (dos copias), rap-1a β 1, rap-1a β 2 y rap-1a β 3 (Mishra et al., 1991,1992).

Se ha demostrado en numerosos trabajos que la proteína RAP-1 de 58 kDa (se la denomina también p58) es altamente inmunogénica para las células T y B y además, posee epítopes conservados entre diferentes cepas de *B. bigemina* (McElwain et al., 1987; 1991; Rodriguez et al., 1996). Los estudios realizados con su ortóloga en *B. bovis* demostraron que anticuerpos contra RAP-1 inhiben la entrada del parásito al eritrocito (Mosqueda et al., 2002). Todos estos descubrimientos permiten sugerir que las proteínas RAP-1 cumplen un rol fundamental en la invasión del parásito, siendo estas el blanco de la respuesta inmune protectora (Petrih, 2010) (Fig. 3)

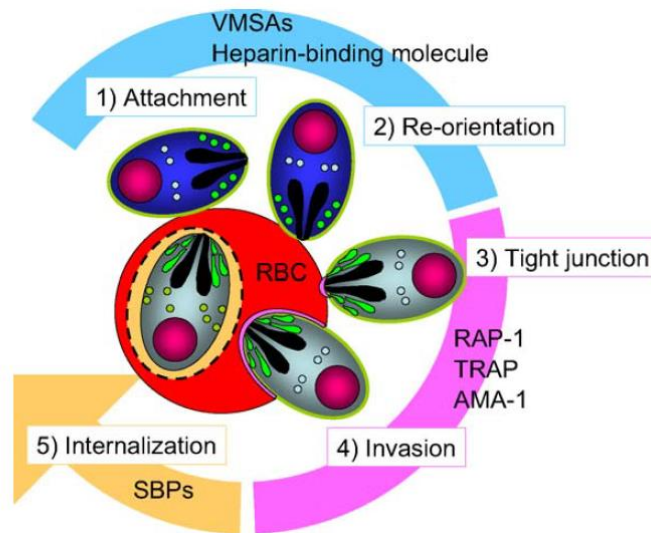


Figura 3. Mecanismo de RAP-1 en la invasión de *Babesia* en un eritrocito
Fuente: (Yokoyama et al., 2006)

1.2.2.2. Somáticas

De las proteínas menos caracterizadas son p200 y Hsp20. La proteína de 200 kDa se localiza en el citoplasma y en los cuerpos esféricos del merozoíto. Esta proteína posee sus epítopes en *B. bovis*.

Otro antígeno de *B. bigemina* descrito es la proteína de choque térmico de 20 kDa: Hsp20. Esta es homóloga a la proteína de superficie de 20 kDa de *B. bovis* y se encuentra conservada en distintas especies de apicomplejos. Se ha confirmado la

presencia de epítopes B y T conservados en distintos aislamientos de estos parásitos (Rodríguez et al., 1996)

1.3. Ciclo de vida

Se desarrolla en el vector invertebrado y en el hospedador vertebrado. Hace más de 70 años que Koch estudió el ciclo biológico de *B. bigemina* en garrapatas de los géneros *Boophilus*, *Rhipicephalus* y *Myalomma* (Smith, 1978)

Los hospedadores vertebrados más comunes son el ganado vacuno. Según Levine 1973, también son hospedadores cérvidos como (*Mazama americana*) y (*Odocoelicus virginianus chiriquensis*). Las garrapatas que actúan como vectores son aquellas pertenecientes a la especie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. En el caso de *B. bigemina*, las fases transmisoras son las ninfas y los adultos, con un periodo de incubación que oscila entre 12 a 18 días (Bishop y Adams, 1973; Friedhoff, 1988). Los machos de *R. (B) microplus* transmiten *B. bigemina* y este mecanismo de trasmisión es altamente favorecido por la longevidad de este estadio y por la facilidad que tienen de pasar de un bovino a otro (Benavides et al., 2012)

Desarrollo en hospedadores vertebrados: la infección del bovino se da tras la mordedura del ixódido el cual inyecta mediante su saliva los esporozoitos de *Babesia bigemina*. La multiplicación de los parásitos tiene lugar en los eritrocitos, mediante un proceso de fisión binaria, obteniéndose dos, cuatro o más trofozoítos. Estas formas lisan a las células e invaden otras. Este proceso se repite sucesivamente hasta que se encuentre parasitado un gran número de eritrocitos. La división del parásito es asíncrona, es por esta razón que en el torrente sanguíneo se puede encontrar varias etapas de la división del parásito (Chauvin et al. 2009). (Fig. 4).

Desarrollo en el transmisor invertebrado: En 1893, Smith y Kilborne demostraron que *B. bigemina* era responsable de la Fiebre de Texas y que su transmisión se daba por ixódidos; el desarrollo y la transmisión de *Babesia* en las garrapatas se realiza por vía transovárica cuando *Babesia* es transmitida por los estadios de la siguiente generación de garrapatas, esto puede ser por larvas, ninfas, estados adultos o incluso por las tres; cuando la infección persiste de un estado al siguiente en dos o tres hospedadores y las garrapatas se alimentan en diferentes individuos, la transmisión se denomina transestadial. Después de que una garrapata ha ingerido sangre infectada de bovino, hay destrucción rápida de los eritrocitos liberando así las formas intracelulares de *Babesia* en el lumen del intestino de la garrapata, y aunque pueden detectarse

eritrocitos intactos hasta 72 horas después de la ingestión ninguna *Babesia* queda reconocible.

Ciclo biológico de *Babesia bigemina*

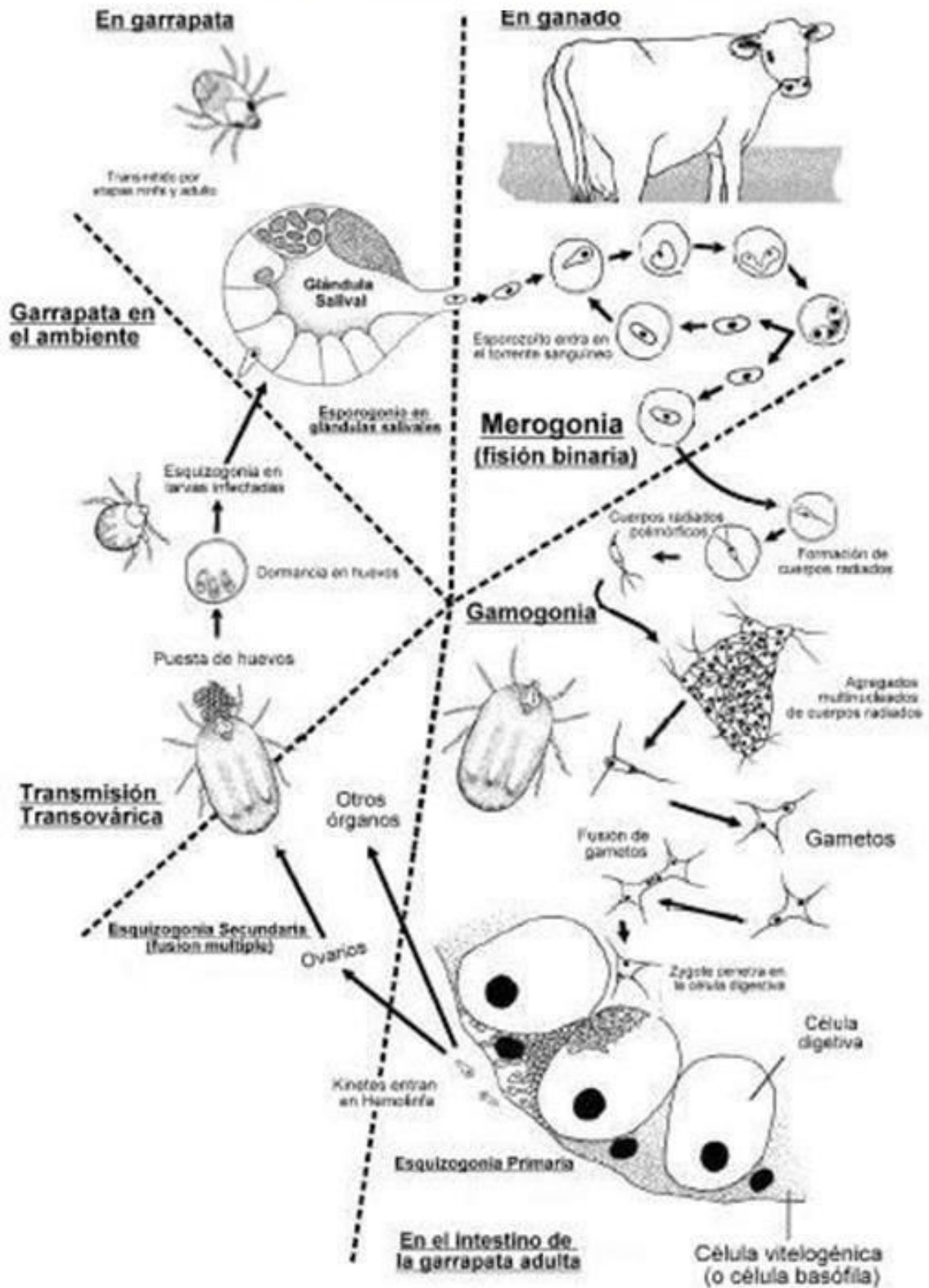


Figura 4. Ciclo de vida de *B. bigemina* en el transmisor biológico y el hospedador vertebrado

Fuente: Bock et al., 2004.

1.4. Epizootiología

Los climas subtropicales favorecen la aparición de brotes de babesiosis, así mismo, en climas templados la posibilidad de encontrar *Babesia spp.* se reduce, haciendo casi imposible su aparición en zonas muy frías.

Las condiciones ambientales pueden ejercer un efecto indirecto sobre el desarrollo y la transmisión de las especies de *Babesia* en la garrapata mediante su efecto sobre la viabilidad del vector. Uno de los factores que condicionan la aparición de la enfermedad es el hospedador: entre más adulto el individuo la patogenia será más grave; así también, la raza *Bos taurus* es más susceptible frente a *Bos indicus*; el estado físico, la alimentación y la sanidad de animales y corrales son factores fundamentales para determinar presencia o ausencia de *Babesia*. Dentro de las condiciones que contribuyen a la aparición de babesiosis se encuentra el movimiento de ganado de una manada con baja prevalencia de infección a uno de alta, la introducción de ganado infectado con *Babesia* o de garrapatas infectadas dentro de una zona libre de garrapatas (Ramírez et al., 1997) Cabe mencionar también, que *B. bovis* es más patógena que *B. bigemina*.

Mtshali y otros (2013) llevaron a cabo un estudio para determinar la presencia de *B. bovis* y *B. bigemina* en Sudáfrica, y concluyeron que los animales infectados con *B. bovis* y *B. bigemina* se distribuyeron en todas las 14 zonas periurbanas encuestados. La prevalencia global de ambos parásitos en muestras de sangre analizadas fue 35,5% y 76,1% para *B. bovis* y *B. bigemina* respectivamente.

Silva y otros (2009) mediante un estudio desarrollado en regiones centrales y del sur de Portugal, determinaron la presencia de *B. bovis* y *B. bigemina* en un porcentaje de 45.3% y 8.1% respectivamente. En el año 2012 Terkawi y otros definieron una prevalencia de 9.18% para *B. bovis* y 15.46% para *B. bigemina* en la región central de Siria.

En Sudamérica se han realizado varios estudios en diferentes países, demostrando así, que *Babesia* se encuentra ampliamente distribuido en nuestra región; en Brasil se reportó una prevalencia 34% para *Babesia bigemina* y 20.4% para *Babesia bovis* (Souza et al., 2014). Toro (1990) determinó para Guárico-Venezuela, una seroprevalencia por IFI de 81,8% para *B. bigemina* y 73,4% para *B. bovis*. En Colombia en 2003 se reportaron casos de babesiosis en seres humanos.

En Ecuador se han realizado algunos estudios referentes a la determinación de la prevalencia de esta enfermedad en algunas zonas de la costa ecuatoriana, en un trabajo realizado en el Camal Metropolitano de Quito se determinó la presencia de babesiosis bovina (Pazmiño, 2011), mediante la utilización de técnicas de diagnóstico microscópicas y serológicas dando como resultado un 29,29% de muestras positivas por IFI y de 0,71% a frotis sanguíneo.

1.5. Diagnóstico

1.5.1. Diagnóstico clínico

La infección se manifiesta entre 2 y 3 semanas después de la infección, por lo general los terneros son bastantes resistentes a la enfermedad y por ende no presentan signos clínicos.

Generalmente la infección con *B. bigemina* produce en primera instancia fiebre alta, con temperaturas de hasta 41.5 °C, ictericia, inapetencia y apatía, es decir el animal se aleja del resto del conjunto; todo esto asociado con hemólisis intravascular masiva en exceso de parasitemia, la que conduce a hemoglobinuria (Bock et al. ,2004). (Benavides et al., 2012) Si no hay casos febriles, posiblemente el problema primario no se trate de hemoparásitos (Guglielmone, 1995; Benavides, 2002). El aspecto patogénico más importante de estos hemoparásitos es la anemia la cual puede presentarse en pocos días destruyendo el 75% de glóbulos rojos, esta es la razón de los altos porcentajes de mortalidad en hatos de bovinos no inmunes, y en aquellos animales que sobreviven es notable la perdida de condición, haciendo difícil su recuperación por completo (Bock et al.,2004). Así, cuando se tienen casos de enfermedad clínica aguda, es fundamental realizar un diagnóstico de laboratorio para orientar las medidas de control.

1.5.2. Extendido sanguíneo (capa fina)

Una de las forma de observar el parásito directamente es mediante la observación en el microscopio de un extendido sanguíneo de capa fina. La sangre se obtiene en combinación con un anticoagulante y se ubica en un portaobjetos de vidrio, se seca al aire, se fija con metanol, y se tiñe con colorantes de Romanovsky (Giemsa, Diff-Quick®, Hemacolor®, May-Grunwald, entre otros). Los parásitos pueden ser detectados habiendo hasta un eritrocito infectado por cada diez mil células. Este método es fácil de hacer y barato pero es necesario un microscopista con experiencia para diferenciar las especies. Generalmente, esta técnica es la indicada para la detección de infecciones agudas pero no para la detección de los portadores donde

los niveles de parasitemias son muy bajos. El diagnóstico por extendido sanguíneo es fiable sólo si la cantidad de parásitos en la sangre es lo suficientemente alto como para ser detectado, que por lo general se da sólo en casos agudos. Debido a que los eritrocitos parasitados por *Babesia bigemina* se encuentran distribuidos uniformemente por los vasos sanguíneos, no deberían realizarse extensiones de sangre tomada de capilares, sino de la yugular o de la vena coccígea, en un tubo con anticoagulante como heparina, sal sódica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o citrato de sodio. La interpretación de los resultados utilizando estos métodos, está fundamentada en criterios de diagnóstico de laboratorio por medio de los cuales se diferencian animales que sufren infección clínica (casos agudos) de aquellos que son portadores. Dichos criterios van a variar dependiendo del parásito, para el caso de babesiosis por *Babesia bigemina* la parasitemia debe ser mayor del 0,5% y el hematocrito menor de 20% (Guillén et al., 2002) (Tabla 1).

Tabla 1. Criterios de interpretación diagnóstica para confirmar la etiología de casos agudos de enfermedad hemoparasitaria de bovino adultos en regiones enzoóticas.

Fuente de la muestra	Hemoparásito	Criterio diagnóstico
Animales vivos	<i>Anaplasma marginale</i>	Parasitemia > 1% Hematocrito <20%
	<i>Babesia bigemina</i>	Parasitemia > 0,5% Hematocrito <20%
	<i>Babesia bovis</i>	Presencia del organismo en frotis sanguíneo

Fuente: Benavides et al., 2012

1.5.3. Métodos serológicos

Durante la etapa aguda de la enfermedad el número de parásitos dentro de los eritrocitos aumenta en una forma tal que pueden ser detectados microscópicamente, sin embargo, en los animales donde la infección es crónica se produce una forma subclínica de la enfermedad, este método es inútil y es necesario emplear otros métodos (Mosqueda et al., 2012). Entre los métodos serológicos se utiliza la inmunofluorescencia indirecta las misma que ha sido establecida como una excelente prueba diagnóstica para bovinos portadores asintomáticos por su alta sensibilidad y especificidad (>90.0%). Cuando el número de muestras de suero a procesar es mayor, la prueba de IFAT pierde eficacia por el tiempo de análisis que esta representa; el enzimoimmunoensayo (ELISA) ha sustituido a IFAT como prueba de diagnóstico para

Babesia spp., debido a la objetividad en la interpretación de los resultados y a la capacidad de procesar grandes cantidades de muestra por día. A pesar de los esfuerzos realizados por varios investigadores, aun no se dispone de un ELISA bien validado para *B. bigemina*. Los ELISA para la detección de anticuerpos contra el antígeno crudo de *B. bigemina* suelen tener poca especificidad (OIE, 2010)

1.5.4. PCR

Los métodos inmunológicos para detectar *Babesia* tienen como inconveniente depender de la presencia de anticuerpos específicos contra esos parásitos, estos anticuerpos pueden tardar días o semanas para desarrollarse en un animal infectado, además están presentes durante meses después de que la infección haya desaparecido, por ello su utilidad es muy limitada en los casos de enfermedades agudas, animales vacunados y animales en recuperación luego de haber sido tratados con medicamentos (Mosqueda et al., 2012). Es por ello que la detección basada en reconocimientos de ácidos nucleicos se ha convertido en una gran alternativa de diagnóstico hoy en día.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) inventado por el científico Kary Mullis a principios de 1980, y por la que ganó el Premio Nobel en 1993, permite amplificar fragmentos de ADN. Los componentes necesarios para una reacción de PCR incluyen un ADN molde, cebadores, nucleótidos, ADN polimerasa y un buffer que contiene $MgCl_2$. El ADN molde es el ADN de la muestra, el cual contiene la región de ADN que se va a amplificar. Los cebadores son oligonucleótidos cortos de ADN (típicamente 15-25 nucleótidos) con una secuencia específica. La ADN polimerasa puede tolerar altas temperaturas (95 °C), la temperatura necesaria para separar dos cadenas complementarias de ADN en un tubo de ensayo. Generalmente, en una reacción de PCR se utiliza la Taq polimerasa; purificada a partir de *Thermus aquaticus*, una cepa de bacterias que viven en una fuente termal en condiciones extremófilas, puede sobrevivir cerca de temperaturas de ebullición, convirtiéndola en la indicada para resistir a las temperatura empleadas en una PCR. En reacciones de PCR, se agrega una mezcla de cuatro tipos de nucleótidos (ATP, CTP, GTP, TTP conocidos como dNTPs).

Uno de los factores que se debe tomar en cuenta y que contribuye a la sensibilidad de la PCR es la correcta selección de secuencias diana y el diseño de cebadores específicos. Hay al menos dos parámetros a considerar: (1) La similitud entre los cebadores y la secuencia diana, teniendo en cuenta la complementariedad de las bases y la conservación de secuencias en la evolución entre organismos. Cuanto más

conservadas estén las secuencias, mayor será la probabilidad de los cebadores para reconocer la secuencia diana en diferentes organismos del mismo género. (2) El número de copias de la secuencia diana presente en el genoma del parásito. Entre más número de copias presentes en el genoma, aumentan las probabilidades de obtener un producto de amplificación por PCR (Fernández et al., 2009)

Un procedimiento típico de PCR se lleva a cabo en una máquina de ciclador térmico automatizado que consiste en una serie de 20-40 ciclos repetidos con los cambios de temperatura consistentes. En cada ciclo hay tres pasos: la etapa de desnaturalización en la cual se separan las cadenas de ADN a una temperatura de (94°C - 98°C); la etapa de anillamiento en donde el cebador se une a su secuencia complementaria de ADN a una temperatura inferior (50°C - 65°C), y la etapa de elongación (72°C) en la que ocurre 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 (OIE, 2010). Una etapa de elongación final (70°C - 74°C) para asegurar que la amplificación se haya llevado a cabo correctamente y al final un paso de conservación (4 °C) después de que termine el ciclo. (Fig. 5) (Fig. 6)

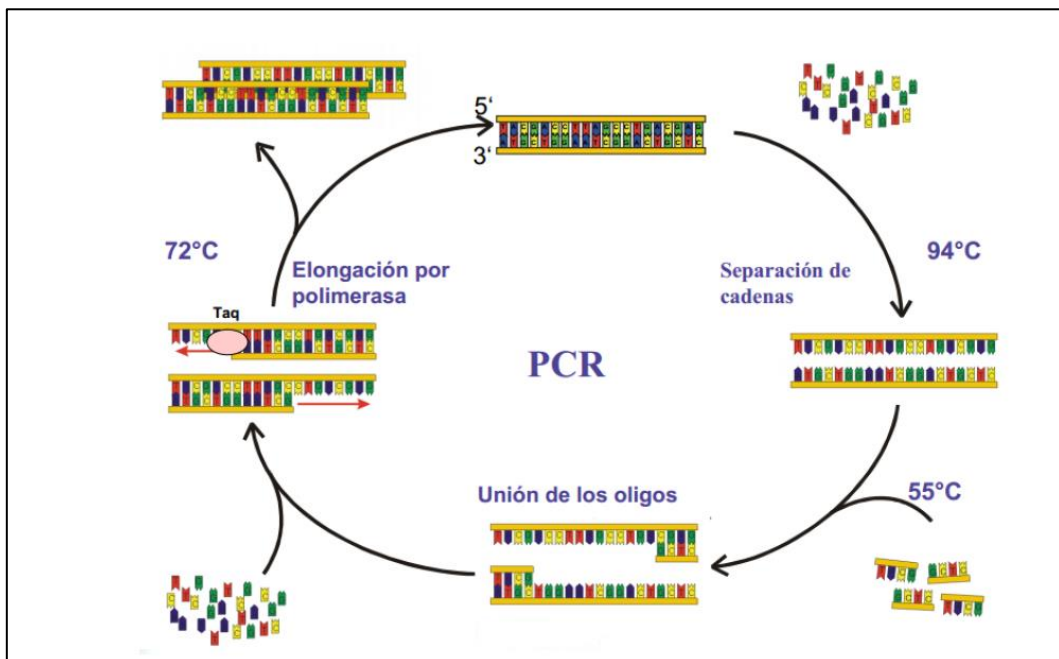


Figura 5: Ciclo de amplificación en la reacción en cadena de la polimerasa

Fuente: de Padro E., 2010

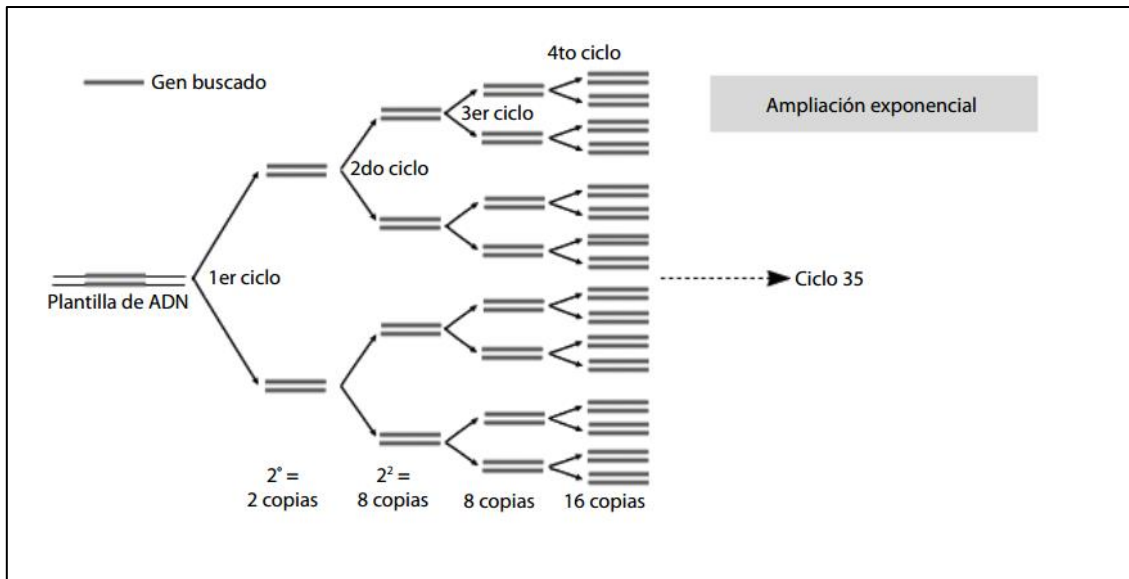


Figura 6. Amplificación exponencial de una PCR

Fuente: Vierstraete, 2001

Se ha observado que las técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son incluso 1.000 veces más sensibles que la microscopía para la detección de *Babesia* spp., y que permiten detectar el parásito a parasitemias de entre el 0,001% y el 0,0000001% (1 parásito cada 10^9 RBC) (Rey-Valeirón et al., 2007)

1.5.4.1. Tipos de PCR

1.5.4.1.1. Tiempo real

La PCR en tiempo real es una técnica que combina la amplificación y la detección en un mismo paso, al correlacionar el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia. El principio de la técnica se basa en la PCR punto final, la diferencia está en la forma en que se detectan y analizan los productos de la amplificación. El término en 'tiempo real' hace referencia a que en cada ciclo de la reacción se pueden detectar los productos amplificados. A su vez, el término cuantitativo se refiere a que es posible cuantificar la cantidad de ADN en la muestra (Tamay de Dios et al., 2013). Esta técnica tiene importantes características como alta especificidad, amplio rango de detección (de 1 a 10^7 equivalentes genómicos de la secuencia molde) (Brechtbuehl et al., 2001) y rapidez en la visualización del producto ya que no es necesario realizar una electroforesis posterior. Las pruebas de la PCR en tiempo real son entre 10000 y 100000 veces más sensibles que las pruebas de protección por ARNasa, 1000 veces más sensibles que la hibridación por Dot blot y pueden detectar diferencias de una sola copia del ADN (Wong y Medrano, 2005).

1.5.4.1.2. Tiempo final

PCR en tiempo final, punto final o convencional, es una técnica cualitativa que permite medir la calidad de amplificación, más no cuantificar el ADN. La lectura de resultados de este tipo de PCR es posible solo hasta el final de toda la reacción y se requiere una lectura mediante electroforesis. Existen algunos tipos de PCR en tiempo final, algunos de ellos son: Nested PCR, Multiplex PCR, PCR in situ, RT-PCR, entre otros.

1.5.4.1.3. Nested

La nPCR (Reacción en cadena de la polimerasa anidada) es la adaptación de una PCR en tiempo final. Su formato comprende dos pares de cebadores los cuales se utilizan en dos rondas de amplificación sucesivas de PCR, donde el segundo par tiene como objetivo amplificar un objetivo secundario que se encuentra dentro del primer producto amplificado. Primero se realiza una reacción con los cebadores externos para amplificar una región de ADN más extensa, que contiene el segmento diana. Después, este producto de amplificación se utiliza como molde de una segunda PCR con los cebadores internos para amplificar la región específica (Analytical Biotech) (Figura 7) Este método puede aumentar espectacularmente la sensibilidad y la especificidad de la amplificación del ADN. Mejora la especificidad porque la nested PCR elimina casi siempre los eventuales productos de amplificación inespecíficos que perturban el proceso. Esto se debe a que tras la primera ronda de PCR es poco probable que los eventuales productos inespecíficos sean suficientemente complementarios de los cebadores anidados y puedan servir de ADN molde para la amplificación posterior, y así lo que se amplifica de preferencia, es la secuencia diana. Debido a la alta sensibilidad de esta técnica, el riesgo de contaminación es mayor y por lo tanto deben extremarse las precauciones cuando se realiza esta PCR, sobre todo en un laboratorio de diagnóstico.

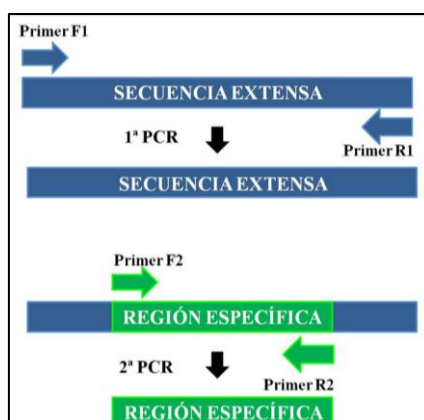


Figura 7 Diagrama de una PCR nested

Fuente: (Tomada de: <https://analyticalbiotech.wordpress.com/pcr-anidada/>)

La PCR anidada ha sido eficaz para la detección de animales portadores infectados con *B. bigemina* y *B. microti* y los resultados han mostrado una sensibilidad muy alta ya que es posible la detección con uno y tres eritrocitos infectados, respectivamente (Obregón et al., 2012)

1.6. Objetivos

1.6.1. Objetivo general

Establecer la existencia de *Babesia bigemina* en ganado bovino en la zona sur del Ecuador.

1.6.2. Objetivos específicos

Estandarizar la técnica de nPCR para la determinación de *Babesia bigemina* en sangre bovina.

Evaluar la presencia de *Babesia bigemina* en sangre bovina mediante nPCR en tiempo final utilizando cebadores específicos.

CAPITULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Área de Estudio

La presente investigación se llevó a cabo en la región Sur o 7, integrada por las provincias de El Oro, Loja y Zamora Chinchipe. Los cantones donde se realizó el muestreo se señalan en la figura 8. Estas provincias abarcan tres diferentes regiones: Sierra, Costa y Oriente. Se caracterizan por su variedad de climas que van desde páramo hasta bosque seco. La zona Sur tiene una extensión aproximada de 27.491 Km², situada entre las coordenadas 3°30' y 5°00' de latitud sur y 78°20' y 80°30' de longitud oeste. Posee alturas que alcanzan hasta 3.800 msnm y su principal red hidrográfica está formada por 5 cuencas fundamentales: Río Jubones, Puyango, Catamayo, Zamora y Chinchipe.

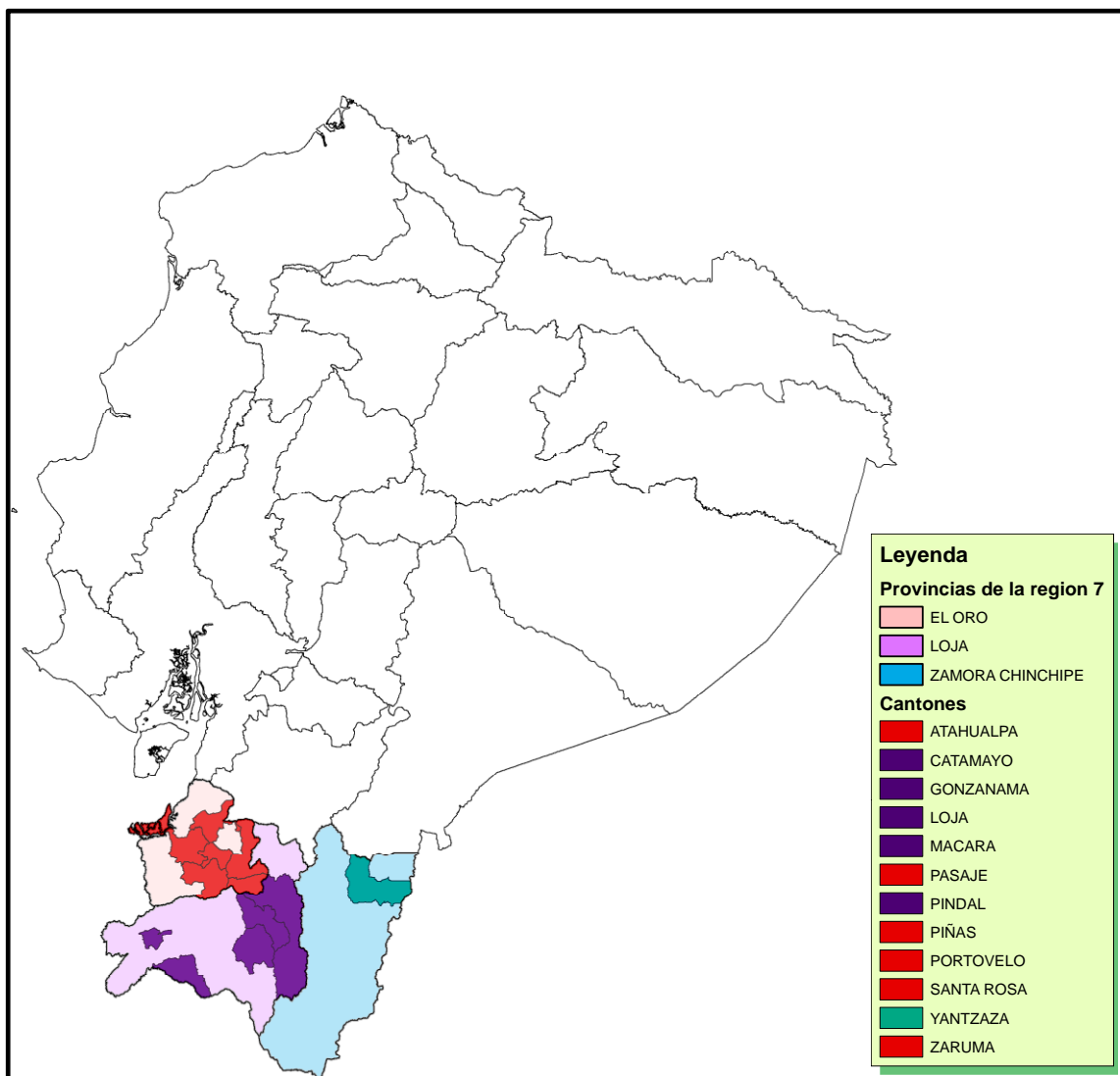


Figura 8 Mapa de los cantones donde se realizó el muestreo.

2.2. Criterios de selección de los animales

Se seleccionaron bovinos de un año de edad en adelante, tanto en fincas como en camales ubicados en las tres provincias que conforman la Región 7; se solicitó el respectivo permiso de autoridades y dueños de fincas. La mayoría de animales muestreados pertenecían a la raza mestizo Holstein (*Bos Taurus*), en la provincia de El Oro se muestrearon animales mestizos *Bos indicus* (Tabla 2). En total, se seleccionaron 244 bovinos de acuerdo a las facilidades otorgadas por los directivos de los camales y los dueños de las fincas.

Tabla 2. Número de muestras extraídas clasificadas por provincia y cantón

Provincia	Cantón	Nro. Muestras
Loja	Loja	59
	Catamayo	33
	Gonzanamá	8
	Macará	6
	Pindal	19
	Total	125
Zamora Chinchipe	Yantzaza	38
	Total	38
El Oro	Sta. Rosa	39
	Pasaje	12
	Zaruma	3
	Atahualpa	20
	Piñas	5
	Portovelo	2
	Total	81
Total		244

Elaboración: La autora

2.3. Metodología

2.3.1. Toma de muestras

Las muestras sanguíneas bovinas fueron extraídas de la vena yugular o de la vena coccígea en tubos Vacutainer® con EDTA identificados con el número de muestra, en condiciones asépticas y se trasladaron posteriormente en envases refrigerados al laboratorio hasta su análisis. Cada número tuvo homólogo en la planilla de muestreo en la que se registró el sexo del animal, el número de arete o nombre (Anexo 2)

2.3.2. Tratamiento de muestras:

2.3.2.1. Campo

En la primera fase del procesamiento de las muestras se realizaron extendidos sanguíneos en sitios habilitados para el laboratorio de campo, debido a que *B. bigemina* abandona los glóbulos rojos si las muestras se procesan tardíamente una vez realizada la extracción. Se realizó el extendido sanguíneo y la fijación con metanol según el protocolo estándar (Gonzatti, et al., 2012) Simultáneamente, se determinó el valor de hematocrito de cada una de las muestras como parámetro paraclínico del grado de anemia (Foreyt, 2001). La lectura se efectuó con tablas estándar. Se estableció como valor normal de hematocrito en bovino un rango de 24-46% (Manual Merck, 2007)

2.3.2.2. Laboratorio

Una vez obtenidas las muestras en el campo se trasladaron al laboratorio en frío.

Tinción con Giemsa

Después de haber realizado la fijación en campo, los extendidos sanguíneos fueron teñidos con colorante de Giemsa según técnicas estándar (Rey-Valeirón, 2014). Los extendidos así coloreados fueron visualizados en microscopio de luz (Zeiss, Alemania) con objetivo de inmersión. El porcentaje de parasitemia (%) de *Babesia*, se calculó como el número de eritrocitos parasitados entre un mínimo de 500 eritrocitos contados, según la fórmula:

$$\% \text{parasitemia} = (\text{eritrocitos parasitados} / \text{eritrocitos contados}) * 100.$$

Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN se realizó mediante un kit comercial (Wizard® Genomic DNA Purification, Promega, USA) para muestras de 300 µL. La concentración de ADN en las muestras se estimó en Nanodrop® (Thermo Scientific, USA). A fin de evaluar la

integridad del ADN extraído, las muestras se sometieron a electroforesis con geles de agarosa al 0,8%. Las muestras se diluyeron en buffer de muestra 10X (50% glicerol, 0.25% azul de bromofenol y 0.25% xileno cianol) y se sometieron a 120V en una cámara horizontal de electroforesis (Sub-cell®, BioRad, USA).

Estandarización y condiciones finales de la reacción en cadena de la polimerasa anidada (nPCR)

Para la amplificación con fines de diagnóstico se utilizaron dos pares de cebadores diseñados para amplificar específicamente el gen BbigRAP-1a. En la primera etapa (PCR1) se emplearon BbigRAP-1a (sentido 5'-GAGTCTGCCAATCCTTAC-3'; contrasentido: 5'-TCCTCTACAGCTGCTTGG-3'); y en la PCR anidada se emplearon los cebadores internos BbigRAP-1a(n): (sentido 5'-AGCTTGCTTTCACAACTCGCC-3'; contrasentido: 5'-TTGGTGCTTTGACCGACGACAT-3') (Terkawi et al., 2012). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Veriti® o GeneAmp® (Applied Biosystems, USA). Además de las muestras problema, se incluyeron controles negativos de amplificación (agua/ADN negativo a *Babesia bigemina*) y control positivo (muestra positiva a *B. bigemina* mediante extendido sanguíneo con 3,2% de parasitemia). Fue utilizado como control negativo de amplificación una muestra de ADN de sangre caprina infectada experimentalmente con *Trypanosoma vivax*.

Algunas de las bandas fueron recogidas de geles de agarosa al 1,5% con un kit comercial (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega, USA) para posterior secuenciación.

PCR1: Este ensayo debería producir fragmentos de 879pb (Terkawi et al., 2012). La mezcla de amplificación utilizada fue GoTaq® Green MasterMix (Promega, USA) 2x 12,5 µL, 0.25 µM de cada cebador y 1µl de ADN en un volumen final de 25 µl. Las condiciones originales de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial: 95°C, 5 minutos; 35 ciclos de: 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 1 minuto de anillamiento a 56°C, y 1 minuto de extensión a 72°C; con una extensión final de 72°C durante 10 minutos.

nPCR: El fragmento amplificado debería ser de 412pb. La mezcla de amplificación utilizada fue GoTaq® Green MasterMix (Promega, USA) 2x, 0.25 µM de cada cebador, 2µl de ADN y 1µl de DMSO en un volumen final de 25 µl. Las condiciones originales de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial: 95°C, 5 minutos; 30

ciclos de: 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 1 minuto de anillamiento a 56°C, y 1 minuto de extensión a 72°C; con una extensión final de 72°C durante 10 minutos.

Debido a la aparición de bandas inespecíficas, las condiciones para esta segunda PCR fueron modificadas y utilizadas posteriormente así: desnaturalización inicial: 95°C, 5 minutos; 30 ciclos de: 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 50 segundos de anillamiento a 56°C, y 1 minuto de extensión a 72°C; con una extensión final de 72°C durante 10 minutos.

Electroforesis en gel de agarosa

La amplificación se verificó en electroforesis en geles de agarosa (Sub-cell® GT, BioRad, USA) al 1% para la PCR1 y al 1,5% para la anidada en solución tampón TAE (Tris acetato EDTA 1X), 110 V 30 minutos. Se utilizó un estándar de peso molecular de 100-1100 pb (Promega®, USA).

Los geles se tiñeron con Diamond® dye (Promega, USA) en dilución 1:10000 durante 20 min. La visualización de geles se llevó a cabo en un transiluminador Enduro® GDS Touch (Labnet International, Inc USA)

Sensibilidad del Diamond® dye

Para evaluar la sensibilidad del fluorocromo, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% de volúmenes decrecientes del producto de amplificación de una muestra positiva (9µl, 8µl, 7µl, 6µl, 5µl, 4µl, 3µl, 2µl, 1µl, 0.5µl) y se coloreó con Diamond® por 20 minutos.

Secuenciación

Los productos de amplificación de 400 pb en geles de agarosa fueron cortados con una hojilla de bisturí estéril bajo luz ultravioleta. Los pedazos de agarosa fueron introducidos en tubos eppendorf de 1,5 mL estériles previamente pesados. Los amplicones fueron extraídos con un kit comercial (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega, USA) para su secuenciación.

CAPITULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Evaluación de los extendidos sanguíneos y valores de hematocrito

La observación de los extendidos sanguíneos determinó un 4.09% de positividad de las 244 muestras analizadas. El mayor nivel de positividad se encontró en la provincia de El Oro (6.1%) (Tabla 3). Los valores de hematocrito muestran valores dentro del rango normal (Tabla 3).

El diagnóstico de hemoparásitos en rumiantes requiere de una evaluación de la condición clínica de los animales y compararlo con los resultados de laboratorio, específicamente la positividad en extendidos sanguíneos, el grado de parasitemia y el nivel de hematocrito (Benavides et al., 2012). El problema a nivel de campo se suscita cuando los signos clínicos de tres hemoparasitosis (anaplasmosis, babesiosis y tripanosomosis) se presentan de igual manera; por lo tanto, el diagnóstico clínico no es totalmente adecuado. El método tradicional de identificación de *Babesia bigemina* en animales infectados es el examen microscópico de gotas finas teñidas con tinción de Giemsa, Romanowsky (tinción de Giemsa al 10% con solución salina tamponada con fosfato (PBS) o tampón de Sorenson a un pH de 7,4). La sensibilidad de la gota fina es tal que permite detectar parasitemias de incluso 1 parásito en 10^6 hematíes. Normalmente, esta técnica es adecuada para la detección de las infecciones agudas, pero no para la detección de los portadores donde las parasitemias son en su mayoría muy bajas. La identificación y diferenciación del parásito puede mejorarse empleando un colorante fluorescente, como el naranja de acridina, en lugar del Giemsa (OIE, 2010).

En el estado Zulia, Venezuela, Basalo et al. (1995) identificaron 4% de muestras positivas en extendidos sanguíneos teñidos con Diff Quick® en 74 muestras analizadas. Sin embargo, 100% de las muestras dieron positivas a *B. bigemina*, cuando los sueros sanguíneos de esos animales fueron evaluados por inmunofluorescencia indirecta. Esto indica que los extendidos sanguíneos no son la técnica adecuada para el diagnóstico de babesiosis bovina cuando las parasitemias son inferiores a 10^6 parásitos/mL de sangre.

Tabla 3. Resultados de los extendidos sanguíneos, porcentaje de positividad y de hematocrito de las muestras analizadas por cantón y provincia.

Provincia	Cantón	Muestras (n)	Extendido sanguíneo	Positividad (%)	HTO (%) □ (± de)
Loja	Loja	59	5	8.4	29.6 ±5.19
	Catamayo	33	0	0	29.6 ± 5.10
	Gonzanamá	8	0	0	30.75±4.13
	Macará	6	0	0	30.6±9.2
	Pindal	19	0	0	29.4±4.14
	Total	125	5	4	29.4±4.14
Zamora Chinchipe	Yantzaza	38	0	0	29.8± 5.9
	Total	38	0	0	
El Oro	Sta. Rosa	39	3	7.6	29.05±5.26
	Pasaje	12	0	0	28 ± 5.55
	Zaruma	3	0	0	28.3± 8.5
	Atahualpa	20	2	10	28.31± 3.86
	Piñas	5	0	0	28.31±5.4
	Portovelo	2	0	0	30.5±0.70
	Total	81	5	6.1	

*Valores normales de hematocrito en bovinos: 24-46% (Manual Merck, 2007)

Los valores de hematocrito se alteran en infecciones agudas, pero en animales portadores con menos del 1% de parasitemia el hematocrito suele estar ligeramente subnormal o dentro del rango establecido para la especie. En este trabajo, un animal con 3,20% de parasitemia presentó un valor de hematocrito de 8%; sin embargo, el resto de los animales presentaron valores de hematocrito dentro del rango normal ya que sus niveles de parasitemia fueron inferiores al 1%.

3.2. Extracción de ADN

La concentración de ADN genómico después de la extracción con el kit comercial (tal como se indicó en Materiales y Métodos) de algunas muestras analizadas se presenta en la tabla 4. La integridad de las muestras se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. (Figura 9). El promedio de concentración de ADN genómico de las muestras evaluadas fue de 39.88 ng/μl. El promedio de la relación 260/280 fue de 1,437 ± 0,265.

El valor de una relación ideal debe ser entre 1.80 y 2.00. Este rango es una indicación de pureza y está basado en el coeficiente de extinción de los ácidos nucleicos a 260 nm y 280 nm. Como el ADN utilizado en este trabajo proviene de la sangre, esta medida fue muy útil para evaluar contaminación con proteínas, que se encuentran en

mayor cantidad que el ADN en este tejido (http://www.biotek.com/resources/docs/PowerWave200_Nucleic_Acid_Purity_Assessment.pdf).

Varios factores pueden afectar el ratio A260/A280, como el tipo de proteína presente en una mezcla de ADN o la contaminación con reactivos utilizados en la extracción. La absorbancia en el rango UV de las proteínas se debe principalmente a estructuras con anillos aromáticos. De los 22 aminoácidos conocidos, solo tres tienen este tipo de anillos (fenilalanina, tirosina y triptófano). Por tanto, la contaminación con una proteína con un alto contenido de estos anillos, puede tener un alto coeficiente de extinción. Una muestra con muy poca cantidad de ADN puede asimismo presentar una muy baja relación A260/A280. Es posible que el hecho de extraer ADN de las muestras previamente congeladas haya disminuido la eficacia de la extracción.

Tabla 4. Concentración de algunas de las muestras de ADN que se extrajeron, con los códigos correspondientes a cada provincia.

Nº de muestra	Concentración ng/µl	Relación 260/280
L2	14.6	1.20
L9	43.6	1.72
L27	33.2	1.55
L36	12.8	1.06
L42	7.1	1.05
L45	26.0	1.42
L52	21.9	1.52
L64	12.2	1.26
L70	7.3	1.04
L77	5.7	1.12
L78	71.1	1.58
Z4	52.4	1.80
Z6	255.4	1.70
Z12	16.8	1.67
Z15	7.8	1.17
Z25	55.4	1.85
Z32	42.5	1.48
EO64	8.0	0.89
EO5	26.7	1.45
EO26	N/D	N/D
EO32	18.1	1.07
L86	83.5	1.38
L89	28.2	1.42
L96	14.9	1.80
L104	40.2	1.66
L112	94.5	1.84
L118	13.8	1.47
EO41	6.3	1.26
EO45	25.2	1.53
EO55	35.7	1.55
EO62	42.5	1.73
EO74	134.5	1.37

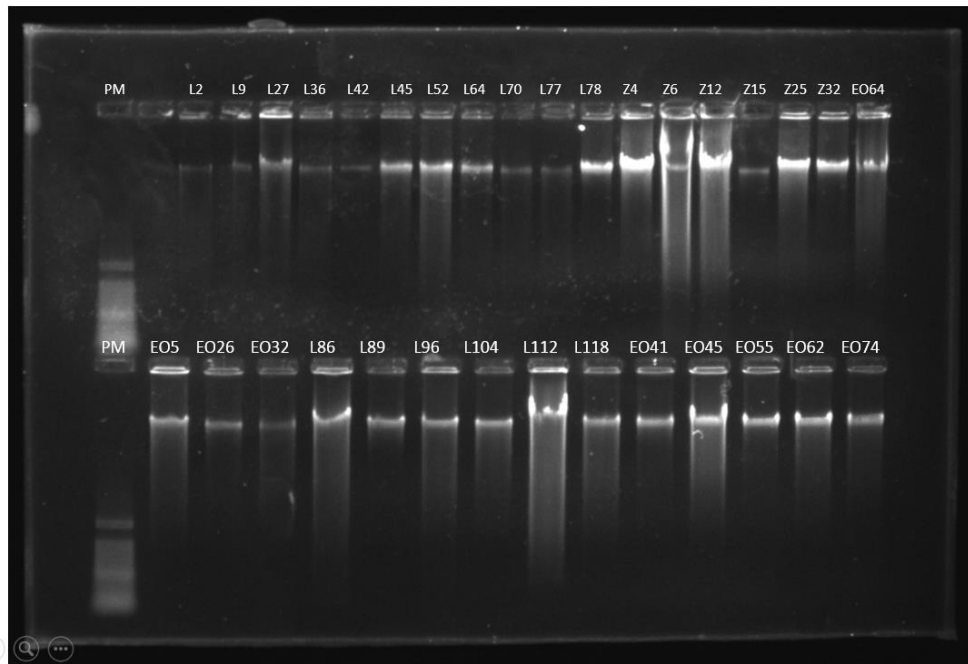


Figura 9. Muestras de ADN genómico extraído de muestras sanguíneas bovinas en gel de agarosa al 0,8% teñido con Diamond®. Volumen de muestra: 5 μ L en 1 μ L de buffer de corrida

3.3. PCR anidada

La amplificación bajo las condiciones originales reportadas por Terkawi et al., (2012) dio origen a bandas inespecíficas (Figura 10). Se disminuyó el tiempo de anillamiento de 1 minuto a 50 segundos. .

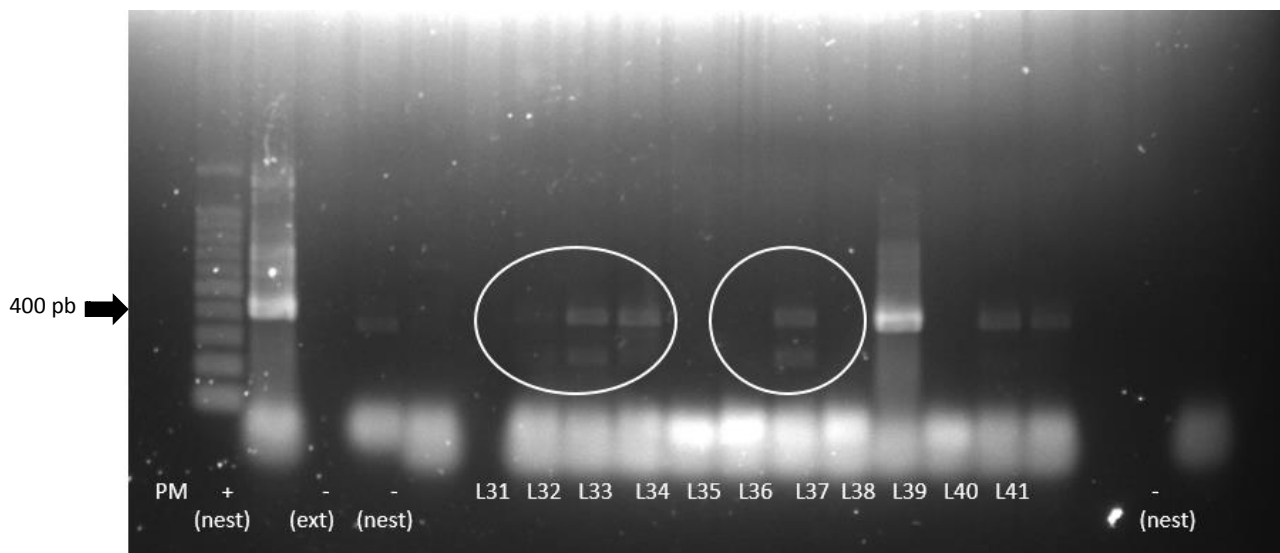


Figura 10.- Bandas inespecíficas de amplificación en la PCR anidada para diagnóstico de *Babesia bigemina*.

Los amplicones positivos a *Babesia bigemina* se evidenciaron en geles de agarosa (Fig.11).

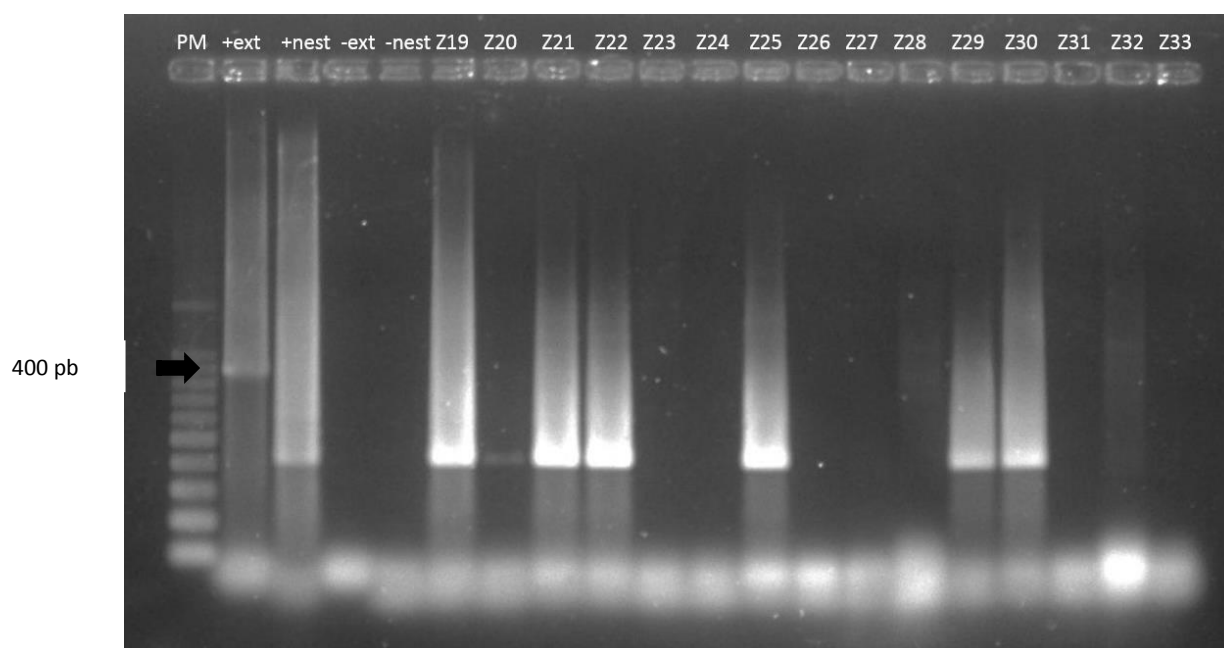


Figura 11.- Muestras positivas a *Babesia bigemina* obtenidas en PCR anidada utilizando cebadores específicos RAP1a. Gel de agarosa al 1,5% teñido con Diamond®. +Ext, Control positivo *Babesia bigemina* amplificado con el primer par de cebadores RAP1a; +Nest, control positivo *B. bigemina* amplificado con el segundo par de cebadores RAP-1a(n). –Ext, -nest, controles negativos. Muestras positivas: Z19, 21, 22, 25, 29, 30. Muestras negativas: Z20, 23, 24, 26, 27, 28, 31, 32, 33. Peso molecular 100-1100 pb.

De las 238 muestras evaluadas, se obtuvo un 35.29% de positividad a *Babesia bigemina*; el mayor número de muestras positivas se presentó en la provincia de Zamora Chinchipe (48.6%) (Tabla 5). Estos resultados constituyen el primer reporte de este protozoario en la región Sur de Ecuador. Con excepción de un bovino del cantón Macará, el resto de los animales positivos en PCR presentaron valores de hematocrito dentro del rango normal.

Tabla 5.- Resultados de los análisis mediante nPCR para el diagnóstico de *Babesia bigemina*.

Provincia	Cantón	Muestras analizadas (n)	PCR + (n)	Positividad (%)	Hto (%)* ¹
Loja	Loja	57	24	42.1	31.1
	Catamayo	33	8	24.2	29.4
	Gonzanamá	8	1	12.5	36
	Macará	6	1	16.6	14
	Pindal	19	5	26.3	29.6

	Total	123	39	31.7	29.9
Zamora					
Ch.	Yantzaza	37	18	48.6	29.75
	Total	37	18	48.6	29.75
El Oro	Sta. Rosa	37	14	37.8	29.3
	Pasaje	11	3	27.2	28.5
	Zaruma	3	0	0	0
	Atahualpa	20	5	25	27.1
	Piñas	5	5	100	33.8
	Portovelo	2	0	0	0
	Total	78	27	34.31	28.8

¹Valores de hematocrito de los animales positivos por PCR

En la tabla 6 se indican los valores de positividad encontrados en varias partes del mundo con técnicas de reacción en cadena de la polimerasa. Los valores encontrados en este trabajo se comparan a los reportados por Souza-Amourin et al. (2014) y Silva et al. (2009) con la misma técnica, aun cuando éstos no señalan el gen amplificado.

Tabla 6. Valores de positividad de *Babesia bigemina* mediante PCR reportados por otros autores

Región	Positividad (%)	Técnica	Gen amplificado	Referencia
Brasil	34	nPCR	n/d	Souza-Amourin et al. (2014)
	84	nPCR	n/d	Oliveira-Sequeira et al. (2005)
	52.1	RT-PCR	18S rRNA	Khim et al. (2007)
Portugal	34	nPCR	n/d	Silva et al. (2009)
Siria	15.46	nPCR	RAP1 β -3	Terkawi et al. (2012)
Mongolia	9.4 – 33.8	nPCR	RAP-1	Sivakumar et al. (2012)
Gauteng-Sudáfrica	76.1	nPCR	RAP-1	Mtshali et al. (2013)

3.3.1. Sensibilidad del fluorocromo

Se llevó a cabo un gel de agarosa al 1.5% para determinar la sensibilidad del fluorocromo Diamond® 1:10000 (Figura 12). El fluorocromo permitió visualizar una banda con un volumen de 0,5 μ L/carril de un amplicon positivo a *B. bigemina*. El análisis mediante Nanodrop® de la concentración de la banda rindió 16.6 ng/ μ L.

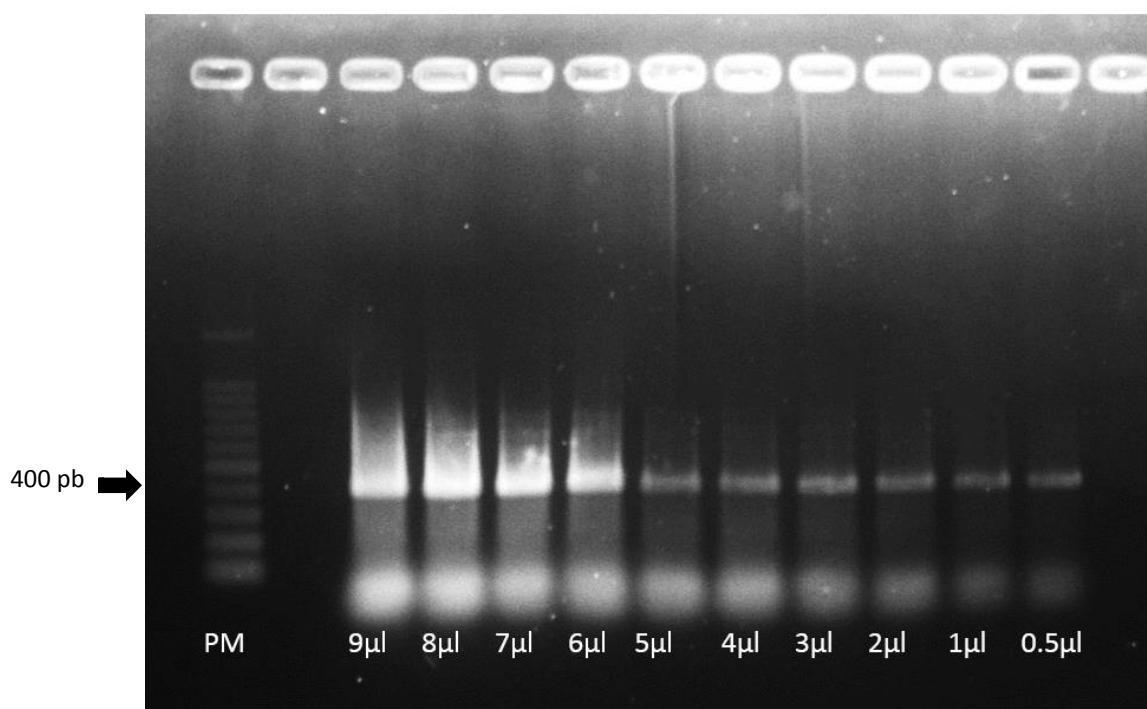


Figura 12.- Muestra positiva a *Babesia bigemina*, amplificada por PCR anidada con cebadores específicos en gel de agarosa al 1,5%. Se indican los volúmenes servidos en cada carril.

3.3.2. Comparación de los resultados de PCR con los obtenidos por extendidos sanguíneos

La tabla 7 muestra los resultados de hematocrito, extendido sanguíneo y nPCR. Mediante extendido sanguíneo se obtuvo una positividad del 4.09% mientras que con nPCR se demostró un 39.91% de positividad. Estos resultados confirman la baja sensibilidad de los extendidos sanguíneos para detectar casos portadores. Las técnicas microscópicas son las más adecuadas para el diagnóstico de los casos agudos como ocurrió con una de las muestras de este trabajo que permitió poseer un control positivo para la PCR. Sin embargo, su baja sensibilidad no las hace adecuadas para los estudios epidemiológicos en los que es necesario identificar los animales portadores. Las técnicas serológicas tienen como inconveniente la reacción cruzada entre *B. bigemina* y *B. bovis*, así como la falta de discriminación entre una exposición previa y una infección presente (Oliveira-Sequeira et al., 2005), por lo que la PCR permanece como la técnica de elección para el diagnóstico de animales portadores y/o estudios epizootiológicos.

Tabla 7.- Comparación entre los resultados de extendido sanguíneo con los obtenidos por nPCR.

Provincia	Cantón	+PCR (n)	Positividad %	+Extendido sanguíneo (n)	Positividad (%)
Loja	Loja	24 (57)	42.1	5 (59)	8.4
	Catamayo	8 (33)	24.2	0 (33)	0
	Gonzanamá	1 (8)	12.5	0 (8)	0
	Macará	1 (6)	16.6	0 (6)	0
	Pindal	5 (19)	26.3	0 (19)	0
	Total		39(123)	31.7	5 (125)
Zamora Ch.	Yantzaza	18 (37)	48.6	0 (38)	0
	Total	18 (37)	48.6	0 (38)	0
El Oro	Sta. Rosa	14 (37)	37.8	3 (39)	7.6
	Pasaje	3 (11)	27.2	0 (12)	0
	Zaruma	0 (3)	0	0 (3)	0
	Atahualpa	5 (20)	25	2 (20)	10
	Piñas	5 (5)	100	0 (5)	0
	Portovelo	0 (2)	0	0 (2)	0
	Total		27 (78)	34.31	5 (81)

3.3.3. Secuenciación

Los amplicones secuenciados presentaron 98% de identidad con 43 secuencias de *Babesia bigemina* obtenidas del GenBank. (Tabla 8)

Tabla 8. Listado de algunos de los números de acceso en el GenBank con los cuales se comparó la secuencia obtenida en el presente trabajo.

% de similitud	Número de acceso	País	Referencia
98	KF192811.1	Egipto	Ibrahim et al., 2013
98	KF192809.1	Egipto	Ibrahim et al., 2013
98	KC515388.1	Turquía	Inci et al., 2013
98	JX648554.1	Filipinas	Yu et al., 2013
98	AB617644.1	Siria	Terkawi et al., 2012
98	AB617643.1	Siria	Terkawi et al., 2012
98	AB594817.1	Tailandia	Terkawi et al., 2011
98	AB594816.1	Tailandia	Terkawi et al., 2011
98	AB586126.1	Tailandia	Terkawi et al., 2011
98	AF017291.1	Puerto Rico	Hötzel et al., 1997
98	AF017289.1	Puerto Rico	Hötzel et al., 1997
98	AF017288.1	Mexico	Hötzel et al., 1997

CONCLUSIONES

Este estudio muestra el primer reporte de la presencia de *Babesia bigemina* en las tres provincias de la región 7 de Ecuador.

Los porcentajes de positividad observados ameritan la implementación de las técnicas moleculares en laboratorios de diagnóstico oficiales.

Dado que la baja parasitemia en un animal portador puede convertirse en un caso agudo bajo situaciones de estrés, es necesario identificar los animales portadores.

RECOMENDACIONES

Al finalizar la presente investigación y una vez determinada la presencia de *Babesia bigemina* se plantea como recomendaciones:

- Utilizar esta técnica para el diagnóstico epizootiológico de la enfermedad en animales portadores.
- Realizar estudios moleculares similares en el transmisor biológico (garrapatas) para de esa manera desarrollar programas de control del transmisor.
- Desarrollar las condiciones necesarias en los laboratorios autorizados para el diagnóstico de enfermedades en bovinos, para evitar contaminación en el diagnóstico molecular.
- Realizar estudios que determinen las pérdidas económicas causadas por garrapatas y las enfermedades que transmiten.

BIBLIOGRAFÍA

- BENAVIDES, E. 2002. Epidemiología y control de los hematozoarios y parásitos tisulares que afectan al ganado. *Carta Fedegan*, 72(Anexo coleccionable 9)112–134. Available at: <http://www.produccion-animal.com.ar/>.
- BENAVIDES, E. POLANCO, N. VIZCAINO, O. BETANCUR, O. 2012. Criterios y protocolos para el diagnóstico de hemoparásitos en bovinos. *Revista Colombiana de Ciencia Animal* 5: 31–49.
- BISHOP, JP. ADAMS, L. 1973. Combination thick and thin blood films for the detection of Babesia parasitemia. *American Journal of Veterinary Research* 34: 1213–1214.
- BOCK, R. JACKSON, L. DE VOS, A. JORGENSEN, W. 2004. Babesiosis of cattle. *Parasitology* 129: S247–S269.
- BRECHTBUEHL, K. WHALLEY, S. DUSHEIKO, G. SAUNDERS, N. 2001. A rapid real-time quantitative polymerase chain reaction for hepatitis B virus. *Journal of Virological Methods* 93: 105–113.
- BROWN, WC. PALMER, G. 1999. Designing blood-stage vaccines against Babesia bovis and B. bigemina. *Parasitology Today* 15: 275–81.
- CHAUVIN, 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. *Veterinary Research* 40:37: . Available at: DOI: 10.1051/vetres/2009020.
- FERNÁNDEZ, D. GONZÁLEZ-BARADAT, B. ELEIZALDE, M. GONZÁLEZ-MARCANO, E. PERRONE, T. MENDOZA, M. 2009. Trypanosoma evansi: A comparison of PCR and parasitological diagnostic tests in experimentally infected mice. *Experimental Parasitology* 121: 1–7.
- FITZPATRICK, JE. KENNEDY, CC. MCGEOWN, MG. OREOPOULOS, DG. ROBERTSON, JH. SOYANNWO, M. 1968. Human case of piroplasmiasis (babesiosis). *Nature* 217: 861–862.
- FOREYT, W. 2001. Veterinary Parasitology. Fifth Edit. Blackwell Publishing Company, Iowa- EE-UU.
- FRIEDHOFF, K. 1988. Transmission of Babesia. *In Babesiosis of Domestic Animals and Man*, 23–52. crc Press, Boca-Raton Florida.
- GUGLIELMONE, A. 1995. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Veterinary Parasitology* 57: 109–119.
- GUILLÉN, ANA. LEÓN, EDGAR. ARAGORT, WALKIRIA. SILVA, M. 2002. Diagnóstico de hemoparásitos en el Instituto de Investigaciones Veterinarias. *Veterinaria Tropical* 26: 47–62.
- HERNANDEZ, J. 2006. Babesiosis Humana. *Medicina UPB* 25, núm. 2: 135–145.
- KAHN, C. 2007. Manual Merck de Veterinaria. Sexta. Oceano/Centrum, España.

- LEE, J. LEEDALE, G. BRADBURY, P. 2000. An illustrated guide to the Protozoa, Kansas: Society of Protozoologists. Second edi. Society of Protozoologists, Lawrence, Kansas, U.S.A, Kasas.
- LEVINE, N. 1973. Protozoan parasites of domestics animals and man. second edi. Burgess Pub. Co.
- MCCELWAIN, T. PERRYMAN, L. DAVIS, W. MCGUIRE, T. 1987. Antibodies define multiple proteins with epitopes exposed on the surface of live Babesia bigemina merozoites. *Journal of Immunology* 138: 2298–2304.
- MCCELWAIN, TF. PERRYMAN, LE. MUSOKE, AJ. MCGUIRE, T. 1991. Molecular characterization and immunogenicity of neutralization-sensitive Babesia bigemina merozoite surface proteins. *Molecular and Biochemical Parasitology* 47: 213–222.
- MISHRA, VS. MCCELWAIN, TF. DAME, JB. STEPHENS, E. 1992. Isolation, sequence, and differential expression of the p58 gene family of Babesia bigemina. *Molecular and Biochemical Parasitology* 53: 149–158.
- MISHRA, VS. STEPHENS, EB. DAME, JB. PERRYMAN, LE. MCGUIRE, TC. MCCELWAIN, T. 1991. Immunogenicity and sequence analysis of recombinant p58: a neutralization-sensitive, antigenically conserved Babesia bigemina merozoite surface protein. *Molecular and Biochemical Parasitology* 47: 207–212.
- MOLLER, A. ARRIERO, E. 2008. Host ecology and life-history traits associated with blood parasite species richness in birds. *Journal of Evolutionary Biology*. 21: 1504–1513.
- MOSQUEDA, J. MCCELWAIN, TF. STILLER, D. PALMER, G. 2002. Babesia bovis merozoite surface antigen 1 and rhoptry-associated protein 1 are expressed in sporozoites, and specific antibodies inhibit sporozoite attachment to erythrocytes. *Infection and Immunity* 70: 1599–603.
- MOSQUEDA, J. OLVERA-RAMIREZ, A. AGUILAR-TIPACAMU, G. J. CANTO, G. 2012. Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis. *Current Medicinal Chemistry* 19: 1504–1518.
- MTSHALI, P. TSOTETSI, A. THEKISOE, M. MTSHALI, M. 2013. Nested PCR Detection and Phylogenetic Analysis of Babesia bovis and Babesia bigemina in Cattle from Peri-Urban Localities in Gauteng Province, South Africa. *Journal of Veterinary Medical Science* 76: 145–150.
- OBREGÓN, D. DE SENA, M. TIZIOTO, P. FUNNES, M. MARTÍNEZ, S. ROQUE, E. FONSECA, H. CORONA, B. 2012. Diagnóstico de Babesia bovis en búfalos de la región occidental de Cuba a través de un ensayo de nPCR. *Revista Salud Animal* 34: 101–108.
- OIE. 2010. Bovine Babesiosis. *Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2010. OIE Terrestrial Manual 2010 Chapter 2.4.2*. Available at: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.02_bovine_babesiosis.pdf.

- PAZMIÑO, M. 2011. Determinación de la prevalencia de Babesia bovis en el ganado bovino faenado en la Empresa Metropolitana de Rastro de Quito, mediante la utilización de técnicas microscópicas y serológicas.
- PETRIGH, R. 2010. Identificación y caracterización de antígenos de Babesia bigemina. Universidad de Buenos Aires.
- RAMÍREZ, G. DOMÍNGUEZ, J. SIERRA, E. 1997. La inmunización contra Babesia bovis y Babesia bigemina como método de control de la babesiosis bovina. *Revista Biomedica* 8: 240–246.
- REY-VALEIRÓN, C. CRIADO-FORNELIO, A. ZAVALA, E. GRANADOS, R. 2007. Parasitological and molecular characterization of a Venezuelan isolate of Babesia canis. *Revista Científica [en línea]* 17: 21–27.
- RODRIGUEZ, SD. PALMER, GH. MCELWAIN, TF. MCGUIRE, TC. RUEF, BJ. CHITKO-MCKOWN, C.G. BROWN, W.C. 1996. CD4+ T-helper lymphocyte responses against Babesia bigemina rhoptry-associated protein I. *Infection and Immunity* 64: 2079–2087.
- SMITH, R. 1978. Ciclo biológico de Babesia en la garrapata. *Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias*. 234–260.
- SOULSBY, E.J.L. 1987. Parasitología y enfermedades parasitarias. Séptima Ed. Interamericana, México.
- SOUZA, L. ARIAS, A. SANTOS, F. SOUZA, P. RÊGO, G. 2014. Bovine babesiosis and anaplasmosis complex: diagnosis and evaluation of the risk factors from Bahia, Brazil. *Veterinary Parasitology* 23: 328–336.
- SUAREZ, CE. PALMER, GH. FLORIN-CHRISTENSEN, M. HINES, SA. HÖTZEL, I. MCELWAIN, T. 2003. Organization, transcription, and expression of rhoptry associated protein genes in the Babesia bigemina rap-1 locus. *Molecular and Biochemical Parasitology* 127: 101–112.
- SVENSSON, L. RICKLEFS, R. 2009. Low diversity and high intra-island variation in prevalence of avian Haemoproteus parasites on Barbados, Lesser Antilles. *Parasitology* 136: 1121–1131.
- TAMAY DE DIOS, L. IBARRA, C. VELASQUILLO, C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. México.
- TERKAWI, M.A., H. ALHASAN, N.X. HUYEN, A. SABAGH, K. AWIER, S. CAO, Y.K. GOO, ET AL. 2012. Molecular and serological prevalence of Babesia bovis and Babesia bigemina in cattle from central region of Syria. *Veterinary Parasitology* 187: 307–311.
- TORO, M. 1990. Seroepidemiología de las hemoparasitosis en Venezuela. En: Hemoparásitos: biología y diagnóstico. *In Hemoparásitos: Biología y Diagnóstico*, Maracay-Aragua.
- WALLER, R. MCFADDEN, G. 2005. The picoplast: a review of the derived plastid of apicomplexan parasites. *Current Issues in Molecular Biology* 7: 57–80.

WONG, M. MEDRANO, J. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* 39: 75–85.

YOKOYAMA, N. OKAMURA, M. IGARASHI, I. 2006. Erythrocyte invasion by Babesia parasites: Current advances in the elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage. *Veterinary Parasitology* 138: 22–32.

ANEXOS

