

UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Trabajo de Fin de Master Titulado:

“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Babesia bovis* y *B. bigemina* EN GARRAPATAS
Rhipicephalus (Boophilus) microplus DE LA REGIÓN NORTE AMAZONICA DEL
ECUADOR”

Realizado por:

ESTEFANIA PAOLA INSUASTE TAIPE

Director del Proyecto:

Juan Carlos Navarro, PhD

Como requisito para la obtención del título de:

MAGISTER EN BIOMEDICINA

Quito, 6 octubre, 2021

“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Babesia bovis* y *B. bigemina* EN GARRAPATAS
Rhipicephalus (Boophilus) microplus DE LA REGIÓN NORTE AMAZONICA DEL
ECUADOR”

“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Babesia bovis* y *B. bigemina* EN GARRAPATAS
Rhipicephalus (Boophilus) microplus DE LA REGIÓN NORTE AMAZONICA DEL
ECUADOR”

DECLARACION JURAMENTADA

Yo, ESTEFANIA PAOLA INSUASTE TAIPE, con cedula de identidad número 0604958629, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.



FIRMA

0604958629

“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Babesia bovis* y *B. bigemina* EN GARRAPATAS
Rhipicephalus (Boophilus) microplus DE LA REGIÓN NORTE AMAZONICA DEL
ECUADOR”

DECLARATORIA

El presenta trabajo de investigación titulado:

“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Babesia bovis* y *B. bigemina* EN GARRAPATAS
Rhipicephalus (Boophilus) microplus DE LA REGIÓN NORTE AMAZÓNICA DEL
ECUADOR “

Realizado por:

ESTEFANIA PAOLA INSUASTE TAIPE

Como Requisito para la Obtención del Título de:

MAGISTER EN BIOMEDICINA

Ha sido dirigido por el profesor:

JUAN CARLOS NAVARRO

Quien considera que constituye un trabajo original de su autor

FIRMA

“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Babesia bovis* y *B. bigemina* EN GARRAPATAS
Rhipicephalus (Boophilus) microplus DE LA REGIÓN NORTE AMAZONICA DEL
ECUADOR”

LOS PROFESORES INFORMANTES

LINO ARISQUETA HERRANZ

JOSÉ RUBÉN RAMÍREZ-IGLESIAS

Después de revisar el trabajo presentado,
lo han calificado como apto para su defensa oral ante
el tribunal examinador



FIRMA



FIRMA

Quito, 6 de octubre de 2021

“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Babesia bovis* y *B. bigemina* EN GARRAPATAS
Rhipicephalus (Boophilus) microplus DE LA REGIÓN NORTE AMAZONICA DEL
ECUADOR”

El presente Trabajo de Fin de Master ha sido realizado gracias al Convenio-Compromiso entre el Instituto de Investigación en Zoonosis-CIZ de la Universidad Central del Ecuador y la Universidad Internacional SEK con datos de la “Encuesta Nacional de Brucelosis, Tuberculosis bovina y Garrapatas.

y

Bajo el Marco del **Programa de Investigación en Salud Global de la Universidad Internacional SEK, Línea de Investigación en Entomología Médica y Biología de Vectores, Proyecto P011617-2 “Ecoepidemiología *in silico* de Enfermedades Emergentes (JC Navarro, J Salazar, S Enríquez et al.)**

“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Babesia bovis* y *B. bigemina* EN GARRAPATAS
Rhipicephalus (Boophilus) microplus DE LA REGIÓN NORTE AMAZONICA DEL
ECUADOR”

AGRADECIMIENTO

Le agradezco al profesor Juan Carlos Navarro por confiar en mí y permitirme entrar en el mundo de la ciencia en el área de entomología, al profesor Rubén Ramírez por ser partícipe de mi aprendizaje en el laboratorio, a mis compañeras de laboratorio por compartir sus conocimientos y acompañarme en el proceso del proyecto. Por último, a mis amigos y amigas que me han motivado para que no desistiera en el camino, especialmente a Diana Domínguez.

“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Babesia bovis* y *B. bigemina* EN GARRAPATAS
Rhipicephalus (Boophilus) microplus DE LA REGIÓN NORTE AMAZONICA DEL
ECUADOR”

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi padre Ángel Insuaste por creer en mis capacidades, a mi madre Laura Taipe por la paciencia y amor que me ha dado en el transcurso de este proyecto. A mi hermana Pamela Insuaste por la motivación que me brinda para que no desistiera y finalmente a mí mismo por la constancia y la perseverancia que entregué a este proyecto.

“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Babesia bovis* y *B. bigemina* EN
GARRAPATAS *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* DE LA REGIÓN NORTE
AMAZONICA DEL ECUADOR”

PROPUESTA DE IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *BABESIA BOVIS* Y *B.*
BIGEMINA EN GARRAPATAS *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* DE LA
REGIÓN NORTE AMAZÓNICA DEL ECUADOR

Estefanía Insuaste¹, Vanessa Herrera ² Sandra Enríquez ^{2*}

José Rubén Ramírez ¹ Juan Carlos Navarro^{1*}

¹Universidad Internacional SEK, Maestría en Biomedicina, Quito-Ecuador.

²Instituto de Investigación en Zoonosis, Universidad Central del Ecuador, Quito,
Ecuador

*Autor de correspondencia:

Sandra Enríquez, email: sandrabycid@gmail.com

Juan Carlos Navarro juancarlos.navarro@uisek.edu.ec

Título corto:

Identificación molecular de *Babesia bovis* y *B. bigemina* en garrapatas de la región norte
Amazónica del Ecuador

“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Babesia bovis* y *B. bigemina* EN
GARRAPATAS *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* DE LA REGIÓN NORTE
AMAZONICA DEL ECUADOR”

RESUMEN

Los artrópodos hematófagos como las garrapatas son vectores y reservorios de *Babesia* bovina causada por *B. bigemina* y *B. bovis*, que es de gran importancia para el sector ganadero por la pérdida económica que provoca esta enfermedad. *Babesia* bovina posee una amplia distribución en países tropicales y subtropicales, sin embargo, en Ecuador no existe muchos estudios por eso, el objetivo es determinar *Babesia* bovina a través de una PCR multiplex anidada en muestras recolectadas de garrapatas de las provincias de Napo, Orellana y Sucumbíos pertenecientes a la región Norte de la Amazonia donde los resultados preliminares nos reflejaron con el mayor porcentaje de positividad en *B. bigemina* en la provincia de Napo con el 48% y el menor en Orellana (12%) en cambio, el porcentaje de positivos para *B. bovis* por provincia es del 53% en Sucumbíos y el menor en Orellana 18%. Finalmente, la amplificación de *Babesia spp* en las provincias se presentó con 40% en Napo, 53% Sucumbíos y 7% en Orellana.

Palabras clave: Babesiosis, Ixodidae, Ecuador, Amazonia

“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Babesia bovis* y *B. bigemina* EN
GARRAPATAS *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* DE LA REGIÓN NORTE
AMAZONICA DEL ECUADOR”

Abstract:

Hematophagous arthropods such as ticks are vectors and reservoirs of bovine Babesia caused by *B. bigemina* and *B. bovis*, which is of great importance for the livestock sector due to the economic loss caused by this disease. Bovine Babesia has a wide distribution in tropical and subtropical countries, however, in Ecuador there are not many studies, so the objective is to determine bovine Babesia through a multiplex PCR nested in samples collected from ticks from the Napo, Orellana and Sucumbíos belonging to the northern region of the Amazon where the preliminary results showed us with the highest percentage of positivity in *B. bigemina* in the province of Napo with 48% and the lowest in Orellana (12%), on the other hand, the percentage of positives for *B. bovis* by province it is 53% in Sucumbíos and the lowest in Orellana 18%. Finally, the amplification of Babesia spp in the provinces was presented with 40% in Napo, 53% Sucumbíos and 7% in Orellana.

Keywords: Babesiosis, Ixodidae, Ecuador, Amazonia

“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Babesia bovis* y *B. bigemina* EN
GARRAPATAS *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* DE LA REGIÓN NORTE
AMAZONICA DEL ECUADOR”

INTRODUCCIÓN

La babesiosis es una enfermedad de gran importancia que afectan a la salud humana y animal dado por protozoos intraeritocitarios del género *Babesia*, perteneciente a la familia Babesiidae, del orden Piroplasmida, clase Aconoidasida, filo Apicomplexa (Levine, 1971; Mehlhorn et al., 1984; Gordon et al., 2005). Causante de la enfermedad Babesiosis bovina que se presenta por distintas especies, sin embargo, las particulares son: *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* y *Babesia divergens* (Levine, 1971; Homer et al., 2000).

La Babesiosis bovina es transmitida por artrópodos hematófagos, como las garrapatas de la especie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, denominada “la garrapata común del ganado” que son vectores y reservorios de parásitos, bacterias y virus (Guimarães, 2001). Que se han beneficiado de los constantes cambios climáticos para la incidencia y prevalencia de las enfermedades que transmiten, de igual manera, se considera que la emergencia o re-emergencia de las enfermedades transmitidas por estos vectores es a causa de la urbanización, el desarrollo económico, el desarrollo de recursos hídricos, la deforestación, entre otros (Molyneux, 1998; Telford et al., 2004; Caminade et al., 2018).

Babesia bigemina es moderadamente patógena y se asocia principalmente con la masiva destrucción de eritrocitos, que conlleva el desarrollo para tener anemia, temperaturas altas de 41 grados centígrados, anorexia, debilidad, depresión, frecuencia cardiaca alta, frecuencia respiratoria elevada, aborto en hembras gestantes, en cambio, en machos hay disminución en la fertilidad (Schnittger et al., 2012). Por otro lado, las infecciones con *Babesia bovis* que es una bacteria altamente patógena a bajos niveles de parasitemia

“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Babesia bovis* y *B. bigemina* EN
GARRAPATAS *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* DE LA REGIÓN NORTE
AMAZONICA DEL ECUADOR”

periférica, provoca que los eritrocitos infectados se queden secuestrados en los capilares cerebrales y del pulmón dado por la citoadherencia, lo cual ocasiona en el animal falta de coordinación, delirio y movimientos involuntarios en las piernas (Bock et al., 2004; Everitt et al., 1986; Uilenberg, 1995). Las técnicas de diagnóstico para babesiosis bovina de forma directa son, frotis sanguíneo, necropsia o capa leucocitaria cuantitativa, en cambio, para las técnicas de forma indirecta son, inmunofluorescencia indirecta, LAMP, PCR o fijación de complemento. Tanto la técnica de forma indirecta y directa detecta al parásito en su fase temprana y crónica de la enfermedad (Bal et al., 2016; Beugnet et al., 2015; Jiao et al., 2020)

Babesiosis bovina posee una amplia distribución en países tropicales y subtropicales, siendo endémica en la mayoría de países latinoamericanos como, Argentina, Uruguay, Brasil, Colombia, México y Venezuela, dejando grandes pérdidas para el sector económico ganadero, por la producción de leche y sus derivados (quesos y yogurt) además por la comercialización de su carne en el comercio nacional e internacional, sin embargo, en Ecuador no existe datos suficientes de su distribución, ecología y su dinámica poblacional (Montenegro, 1992; Reyna, 2014). Por estas razones, en este estudio se determinará *B. bovis* y *B. bigemina* a través de una PCR multiplex anidada

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en el oriente ecuatoriano, en las provincias de Napo (Gonzalo Díaz de Pineda), Orellana (Parroquia García Moreno) y Sucumbíos (Parroquia Aguas

“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Babesia bovis* y *B. bigemina* EN
GARRAPATAS *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* DE LA REGIÓN NORTE
AMAZONICA DEL ECUADOR”

Negra), donde se recolectaron garrapatas de la especie *R. (B.) microplus*, aisladas a partir de bovinos y caninos de fincas ganaderas. Las muestras fueron conservadas en etanol absoluto y almacenadas por el Instituto de Investigación en Salud Pública y Zoonosis (CIZ)

Muestras biológicas

A partir de 57 bovinos y 2 caninos, se aislaron de 1 a 7 garrapatas por cada animal, obteniéndose un total de 23 garrapatas de la provincia de Orellana, 60 de Sucumbíos y 124 de Napo, correspondientes a adultos (hembras) y ninfas, dando un total 207 especímenes.

Extracción de glándulas salivales y purificación de ADN

Para obtener las glándulas salivales se procedió a diseccionar cada garrapata sobre una caja petri con plastilina, en donde la garrapata debía estar en posición dorsal para después hacer una sujeción en la porción anterior del escudo con una aguja de disección. Luego de ser sujeta, se procedió a hacer un corte lateral con el bisturí en el lado derecho anterior del escudo hacia abajo y luego en el lado izquierdo, después de haber sido abierta la garrapata, utilizamos las pinzas entomológicas para extraer las glándulas salivales y colocar lo extraído en tubos con 50 ul de buffer de hidratación y se dejó al ambiente.

“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Babesia bovis* y *B. bigemina* EN
GARRAPATAS *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* DE LA REGIÓN NORTE
AMAZONICA DEL ECUADOR”

La purificación del ADN se llevó a cabo mediante el método descrito de Golczer et al., (2008) con modificaciones. De manera breve, las muestras se cortaron y trituraron empleando tijeras y un micro-mortero. Luego se añadieron 50 uL de buffer de lisis y se incubó en un bloque de calentamiento a 65 °C por 10 minutos. Posteriormente, se añadió 100 ul de buffer de lisis, se incubó de nuevo a 65 °C por 50 minutos, se añadió 14 ul de acetato de potasio y se dejaron las muestras en la nevera a – 4 °C por 1 hora. A continuación, se centrifugó a máxima velocidad por 15 minutos para recuperar el sobrenadante y pasar a un tubo nuevo, se añadió 200ul de etanol absoluto frío, se dejó a temperatura ambiente por 5 minutos, se centrifugó por 15 minutos a máxima velocidad, se descartó el sobrenadante, se agregó 100ul de etanol al 70% frío, se centrifugó por 5 minutos a velocidad máxima para descartar el sobrenadante, se agregó 100 ul de etanol absoluto frío, se añadió 1 ul de PROMEGARNase, se centrifugó por 15 minutos a velocidad máxima, se descartó el sobrenadante y se puso a secar por 24 horas. Al siguiente día las muestras que se dejaron secando y se les coloca agua.

PCR anidada para la detección de *B. bigemina* y *B. bovis*.

Los cebadores que se utilizaron en la primera etapa de la PCR multiplex (PCR1) para *B. bigemina* fueron BigF (5' CATCTAATTTCTCTCCATACCCCTCC 3') y BigR (5'CCTCGGCTTCAACTCTGATGCCAAAG3'), que amplificaron un fragmento de ADN de 278 pb del gen Spe I Ava I. Al mismo tiempo, se usaron cebadores para la detección de *B. bovis* los cuales fueron BovF (5' CACGAGGAAGGAAGTACCATGTTGA 3') y BovR (5'

“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Babesia bovis* y *B. bigemina* EN
GARRAPATAS *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* DE LA REGIÓN NORTE
AMAZONICA DEL ECUADOR”

CCAAGGAGCTTCAACGTACGAGGTCA 3’) para amplificar un fragmento de 350 pb del gen Rap-1 (Ríos et al., 2011; Souza et al., 2014).

En la segunda etapa de la PCR multiplex (PCR₂), los cebadores para *B. bigemina* fueron BigNF (5’ CGCAAGCCCAGCACGCCCCGGTGC 3’) y BigNR (5’CCGACCTGGATAGGCTGTGTGATG3’) que amplificaron un fragmento de 170 pb del gen Spe I Ava I y los cebadores para *B. bovis* fueron BovnNF (5’ TCAACAAGGTACTCTATATGGCTACC 3’) y BovnNR (5’ CTACCGAGCAGAACCTTCTTCACCAT 3’), que amplificaron un fragmento de 290 pb del gen Rap-1 (Souza et al., 2014).

La mezcla de reacción para la PCR₁ constó de las siguientes concentraciones en un volumen final de 25 µl: 12,5 µl Master mix de Promega 0,4uM del Primer1 (Big F), 0.4uM del Primer2 (Big R) 0,4uM del Primer3 (Bov F), 0,4uM del Primer4 (Bov R), H₂O y 5ul de ADN muestra (Mtshali et al., 2013; Mera, 2015). Asimismo, para la PCR₂ se emplearon las mismas condiciones de reacción de la PCR₁, sin embargo, aquí se usaron nuevos cebadores (BigNF, BigNR, BovNF, BovNR) para la amplificación y 3 ul del producto resultante de la PCR₁, para un volumen final de 25 ul por reacción de PCR. Las condiciones en el termociclador fueron: un ciclo de tres minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 45 segundos a 56 °C y 1 min a 72 °C, finalmente un ciclo de 10 min a 72 °C (Mtshali et al., 2013). Como controles positivos se utilizaron muestras de sangre de bovinos que fueron donados por el Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia.

“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Babesia bovis* y *B. bigemina* EN GARRAPATAS *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* DE LA REGIÓN NORTE AMAZONICA DEL ECUADOR”

La electroforesis de los productos se realizó en geles de agarosa al 2% en buffer TAE 1X y teñidos con bromuro de etidio a una concentración de 2 mg/ml. Se utilizó un marcador molecular de 100 pb, colocando 5 µl de la reacción por cada pocillo y se sometieron a 100 voltios por una hora, para luego observar los productos de amplificación en un transluminador con luz ultravioleta.

RESULTADOS PRELIMINARES

Diagnóstico molecular de *Babesia bigemina* y *B. bovis* por PCR

En la Fig. 1 se presentan los productos de amplificación obtenidos por PCR2 cada animal, donde podemos observar una amplificación satisfactoria de la región Spe I Ava I con una banda de 170 pb en 49 animales y una banda tenue del mismo tamaño en 7 animales, en cambio, en el gen Rap-1 se puede observar una banda clara de 290 pb en 16 animales.

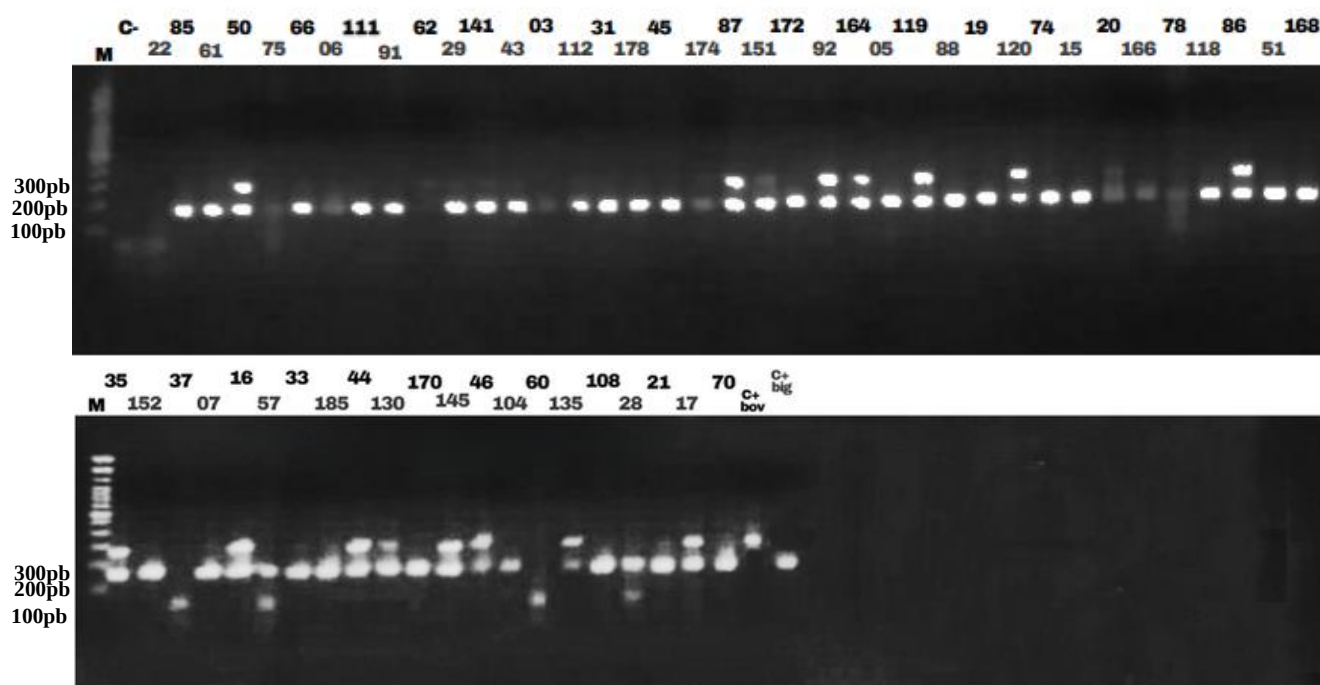


Figura 1. Detección molecular de *B. bigemina* y *B. bovis* se realizó a través de una PCR multiplex anidada, donde los primers para la PCR 1 fueron BigF, BigR (*B. bigemina*) y BovF, BovR (*B. bovis*). En la PCR2 se emplearon las mismas condiciones de reacción de la PCR1, sin embargo, aquí se colocó nuevos primers (BigNF, BigNR, BovNF, BovNR) y se usó 3 µl del producto resultante de la PCR1, para un volumen final de 25 µl por reacción de PCR. Mediante la electroforesis se observó los resultados de la PCR 2 de la amplificación del gen Spe I Ava I (85, 61, 50, 66, 11, 91, 29, 141, 43, 112, 31, 178, 45, 87, 151, 172, 92, 164, 05, 119, 88, 19, 120, 74, 15, 118, 86, 51, 168, 35, 152, 07, 16, 57, 33, 185, 44, 130, 170, 145, 46, 104, 135, 108, 28, 21, 17, 70) y del gen Rap I (50, 87, 92, 164, 119, 120, 86, 35, 16, 44, 130, 145, 46, 135 y 17)

“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Babesia bovis* y *B. bigemina* EN GARRAPATAS *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* DE LA REGIÓN NORTE AMAZONICA DEL ECUADOR”

Porcentaje de *B. bigemina* por provincia

B. bigemina se presentó en las provincias de Napo con el 48% en 23 animales, el 12 % en Orellana con 6 animales y en Sucumbíos con 19 animales un 40%. En cambio, el porcentaje de negativos para *B. bigemina* por provincia es del 82% de 9 animales en Napo y un 18% para Orellana de 2 animales.

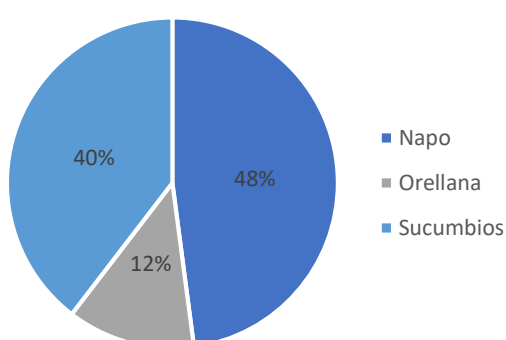


Figura 1. Porcentaje de positivo a *B. bigemina* por provincias

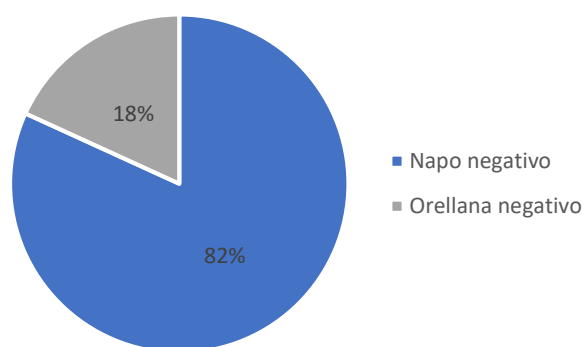


Figura 2. Porcentaje de negativo a *B. bigemina* por provincias

Porcentaje de *B. bovis* por provincia

Se observó positividad para *B. Bovis* en las provincias de: Napo con 6 animales (40%), Orellana en 1 animal (7%) y Sucumbíos en 8 animales (53%) en cambio, El porcentaje de animales que dieron negativo por provincia son Napo con 59% de 26 animales, 16 % en Orellana en 7 animales y 25% en Sucumbíos

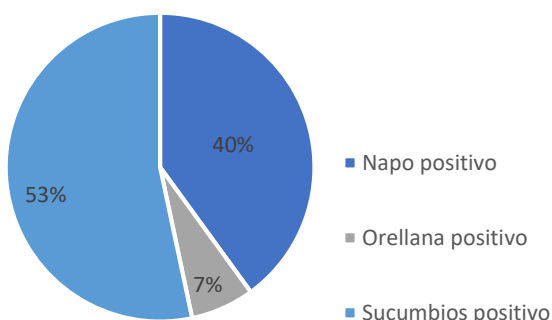


Figura 3. Porcentaje de negativo a *B. bovis* por provincias

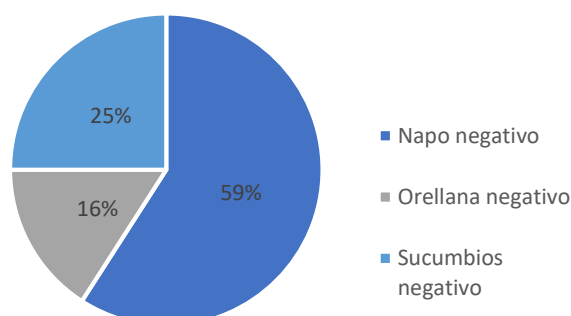


Figura 4. Porcentaje de positivo a *B. bovis* por provincias

“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Babesia bovis* y *B. bigemina* EN
GARRAPATAS *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* DE LA REGIÓN NORTE
AMAZONICA DEL ECUADOR”

Porcentaje de positividad de *Babesia spp.* por provincia

Babesia spp es un parásito causante de la enfermedad babesiosis que se presentó con 40% en Napo, 53% Sucumbíos y 7% en Orellana.

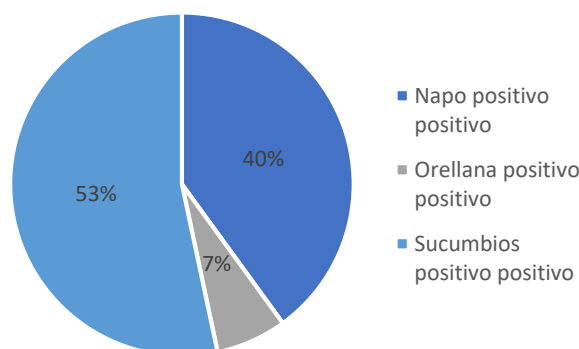


Figura 5. Porcentaje de positividad a *Babesiosis* por provincias

DISCUSIÓN PRELIMINAR DE RESULTADOS

La provincia con mayor porcentaje en presentar *B. bigemina* es del 48% en Napo, seguida de Sucumbíos con 40% de animales positivos, por otro lado, en Napo 9 animales (82%) y 2 animales de Orellana no se infectaron de *B. bigemina*. Todas las provincias estudiadas dieron positivo a *Babesia Bigemina* de algún animal que se estudió, a diferencia, de los casos negativos para *B. bigemina* donde solo Napo y Orellana presentaron resultados negativos, esto quiere decir, que en Sucumbíos todos los animales están enfermos de Babesiosis. Las provincias que no evidenciaron en algún animal ningún tipo de Babesiosis es Napo en 9 animales (82%) y Orellana con 2 animales (18%), en cambio, Sucumbíos no arrojo ningún porcentaje, esto quiere decir que todos los animales estudiados dieron positivo para alguna *Babesia spp.*

Babesia spp es un parásito causante de la enfermedad babesiosis donde Sucumbíos (53%) obtuvo el mayor porcentaje y Orellana (7%) el menor valor. Estos valores concuerdan con el estudio de Pazmiño et al. (2016) para la determinación de la

**“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Babesia bovis* y *B. bigemina* EN
GARRAPATAS *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* DE LA REGIÓN NORTE
AMAZONICA DEL ECUADOR”**

prevalencia de *B. bovis* en la carne faenada de ganado bovino realizado por la Empresa Metropolitano de Quito, que se realizaron a través de las técnicas de microscópicas y serológicas en sangre de bovinos, en donde Sucumbíos obtuvo el mayor porcentaje con 7,32 % y en Orellana el menor porcentaje con 2,44 %. Asimismo, en el estudio para la detección molecular de *B. bovis* y *B. bigemina* de Herrera V, (2017), realizado en la parroquia rural Aguas Negras de la provincia de Sucumbíos y la parroquia rural García moreno de la provincia de Orellana, donde se mostró mayor porcentaje de positividad a *Babesia* spp. con 38,63 % (17/44) en la provincia de Sucumbíos, a comparación de Orellana con un menor porcentaje 29,54 % (13/44).

CONCLUSIONES

Se llego a concluir que la provincia con mayor porcentaje de casos positivos para *B. bigemina* es Napo con el 48% y en *B. bovis* es Sucumbios con el 53%. Las tres provincias estudiadas (Napo, Orellana y Sucumbíos) presentaron por lo menos una garrapata infectada con *B. Bigemina* y *B. bovis*. Por otro lado, Babesiosis obtuvo un mayor porcentaje en Sucumbíos (53%) y un 7% en Orellana con el menor porcentaje.

RECOMENDACIONES

Se recomienda continuar con estudios donde se determine más parásitos que trasmitan las garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* para tener mayor información de otras enfermedades presentes. Además, se podría sacar por cada garrapata de cada provincia la tasa mínima de infección natural.

“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Babesia bovis* y *B. bigemina* EN
GARRAPATAS *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* DE LA REGIÓN NORTE
AMAZONICA DEL ECUADOR”

BIBLIOGRAFIA

Bal, M. S., Mahajan, V., Folia, G., Kaur, P., & Singh, A. (2016). Diagnosis and management of bovine babesiosis outbreaks in cattle in Punjab state. *Veterinary world*, 9(12), 1370.

Beugnet, F., & Moreau, Y. (2015). Babesiosis. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 34(2), 627-639.

Bock, R., Jackson, L., De Vos, A., & Jorgensen, W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology* 129 (Suppl): S247–S269.

Caminade, C., McIntyre, K. M., & Jones, A. E. (2019). Impact of recent and future climate change on vector-borne diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1436(1), 157.

Everitt, J. I., Shadduck, J. A., Steinkamp, C., & Clabaugh, G. (1986). Experimental *Babesia bovis* infection in Holstein calves. *Veterinary pathology*, 23(5), 556-562.

FAO, 2003. Resistencia a los antiparasitarios: estado actual con énfasis en América Latina. Estudio FAO, Producción y Sanidad Animal 157. pp. 55.

Goethert, H. K., Shani, I., & Telford III, S. R. (2004). Genotypic diversity of *Francisella tularensis* infecting *Dermacentor variabilis* ticks on Martha's Vineyard, Massachusetts.

Golczer, G., & Arrivillaga, J. (2008). Modificación de un protocolo estándar de extracción de ADN para flebotominos pequeños (Phlebotominae: Lutzomyia). *Rev Colomb Entomol*, 34, 199-202.

“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Babesia bovis* y *B. bigemina* EN
GARRAPATAS *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* DE LA REGIÓN NORTE
AMAZONICA DEL ECUADOR”

Gordon, J. L., & Sibley, L. D. (2005). Comparative genome analysis reveals a conserved family of actin-like proteins in apicomplexan parasites. *BMC genomics*, 6(1), 1-13.

Guimarães, J. H. (2001). Ectoparasitos de importância veterinária. In *Ectoparasitos de importância veterinária*.

Herrera Mosquera, I. V. (2017). Detección molecular de infección natural por *Babesia bovis* (Babes, 1888) y *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893), en garrapatas y tres grupos de mamíferos domésticos asociados a fincas en dos parroquias rurales de la Amazonía (Bachelor's thesis, Quito: UCE).

Homer, M. J., Aguilar-Delfin, I., Telford III, S. R., Krause, P. J., & Persing, D. H. (2000). Babesiosis. *Clinical microbiology reviews*, 13(3), 451-469.

Jiao, Z., Chen, L., Xia, L., Yang, Y., Zheng, Y., Chen, H., & Yang, H. (2020). Harnessing multiplex polymerase chain reaction assay for convenient and simultaneous differentiation of testudinis carapax et plastrum from trionycis carapax. *Pharmacognosy Magazine*, 16(69), 393.

Levine, N. D. (1971). Taxonomy of the piroplasms. *Transactions of the American Microscopical Society*, 2-33.

Mackenstedt, U., Gauer, M., Fuchs, P., Zapf, F., Schein, E., & Mehlhorn, H. (1995). DNA measurements reveal differences in the life cycles of *Babesia bigemina* and *B. canis*, two typical members of the genus *Babesia*. *Parasitology research*, 81(7), 595-6

Mera, A. (2015). Protocolo de Nested PCR. Proyecto: *Artrópodos vectores silvestres y reservorios domésticos como indicadores de vulnerabilidad a enfermedades re-emergentes zoonóticas en la amazonía ecuatoriana*. Quito: Centro Internacional de Zoonosis.

“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Babesia bovis* y *B. bigemina* EN
GARRAPATAS *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* DE LA REGIÓN NORTE
AMAZONICA DEL ECUADOR”

Molyneux, D. H. (1998). Vector-borne parasitic diseases—an overview of recent changes. *International Journal for Parasitology*, 28(6), 927-934.

Montenegro-James, S. (1992). Prevalence and control of babesiosis in the Americas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87, 27-36.

Mtshali, P. S., Tsotetsi, A. M., Thekiso, M. M. O., & Mtshali, M. S. (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*, 13-0197.

Pazmiño, M., K. Soto, P. Romero y M. Chávez. (2016). 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. *ResearchGate*, 6.

Reyna-Bello, A. (2014). Anaplasmosis bovina: logros y retos inmediatos. *Logros & Desafíos de la Ganadería Doble Propósito. Volume Cap LXXIV, edn. Edited by C González-Stagnaro NM, E Soto Belloso: Fundación GIRARZ. Ediciones Astro Data SA Maracaibo, Venezuela*, 703-710.

Ríos, S., & Ríos, L. (2011). Principales marcadores moleculares utilizados para la identificación de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*. *Revista MVZ Córdoba*, 16(2), 2470-2483.

Schnittger, L., Rodriguez, A. E., Florin-Christensen, M., & Morrison, D. A. (2012). Babesia: a world emerging. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(8), 1788-1809.

Souza Amorim, L., Arias Wenceslau, A., Santos Carvalho, F., Luíz Souza Carneiro, P., & Rêgo Albuquerque, G. (2014). Bovine babesiosis and anaplasmosis complex: diagnosis and evaluation of the risk factors from Bahia, Brazil. *R. bras. Parasitol. Vet.*

“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Babesia bovis* y *B. bigemina* EN
GARRAPATAS *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* DE LA REGIÓN NORTE
AMAZONICA DEL ECUADOR”

Uilenberg, G. (1995). International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. *Veterinary parasitology*, 57(1-3), 19-41.