



FACULTAD DE INGENIRÍA Y CIENCIAS APLICADAS

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

“DETERMINACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENOTÍPICA DE *Babesia* spp. POR SECUENCIACIÓN DE TERCERA GENERACIÓN A PARTIR DE VECTORES ARTRÓPODOS PROCEDENTES DE TRES PROVINCIAS DE LA AMAZONÍA ECUATORIANA”

Realizado por:

MARTINA ANABEL MUÑOZ LUZURIAGA

Director del proyecto:

PhD. José Rubén Ramírez Iglesias

Como requisito para la obtención del título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

Quito, 29 de marzo del 2023

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27

“DETERMINACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENOTÍPICA DE *Babesia* spp. POR SECUENCIACIÓN DE TERCERA GENERACIÓN A PARTIR DE VECTORES ARTRÓPODOS PROCEDENTES DE TRES PROVINCIAS DE LA AMAZONÍA ECUATORIANA”

“DETERMINACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENOTÍPICA DE *Babesia* spp. POR SECUENCIACIÓN DE TERCERA GENERACIÓN A PARTIR DE VECTORES ARTRÓPODOS PROCEDENTES DE TRES PROVINCIAS DE LA AMAZONÍA ECUATORIANA”

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, **MARTINA ANABEL MUÑOZ LUZURIAGA**, ecuatoriana, con cédula de ciudadanía N° 172703467-8, declaro bajo juramento que la tesis titulada:

Determinación de la variabilidad genotípica de *Babesia* spp. por secuenciación de tercera generación a partir de vectores artrópodos procedentes de tres provincias de la Amazonía ecuatoriana es de mi autoría, que no ha sido presentado anteriormente para ningún grado o calificación profesional, y se basa en las referencias bibliográficas descritas en este documento.

A través de esta declaración, cedo los derechos de propiedad intelectual a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido en la Ley de Propiedad Intelectual, reglamento y normativa institucional vigente.



Martina Muñoz Luzuriaga

C.I.: 172703467-8

“DETERMINACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENOTÍPICA DE *Babesia* spp. POR SECUENCIACIÓN DE TERCERA GENERACIÓN A PARTIR DE VECTORES ARTRÓPODOS PROCEDENTES DE TRES PROVINCIAS DE LA AMAZONÍA ECUATORIANA”

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.



José Rubén Ramírez Iglesias

C.I.: 3050666993

“DETERMINACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENOTÍPICA DE *Babesia* spp. POR SECUENCIACIÓN DE TERCERA GENERACIÓN A PARTIR DE VECTORES ARTRÓPODOS PROCEDENTES DE TRES PROVINCIAS DE LA AMAZONÍA ECUATORIANA”

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

ALBERTO ALEJANDRO AGUIRRE BRAVO

JUAN CARLOS NAVARRO

Después de revisar la tesis, la han calificado como apto para su defensa oral ante el tribunal examinador.



Alberto Aguirre Bravo



Juan Carlos Navarro

Quito, 29 de marzo del 2023

“DETERMINACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENOTÍPICA DE *Babesia* spp. POR SECUENCIACIÓN DE TERCERA GENERACIÓN A PARTIR DE VECTORES ARTRÓPODOS PROCEDENTES DE TRES PROVINCIAS DE LA AMAZONÍA ECUATORIANA”

DEDICATORIA

A mi familia que me apoyó en cada momento a lo largo de mi carrera, desde el momento de la elección de la misma hasta la culminación de este trabajo. A mis amigos que me recordaron mis capacidades y me motivaron para que no me diera por vencida. A mis profesores que me hicieron amar la ciencia y la investigación.

“DETERMINACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENOTÍPICA DE *Babesia* spp. POR SECUENCIACIÓN DE TERCERA GENERACIÓN A PARTIR DE VECTORES ARTRÓPODOS PROCEDENTES DE TRES PROVINCIAS DE LA AMAZONÍA ECUATORIANA”

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor José Rubén Ramírez por confiar en mí, guiarme, enseñarme y motivarme en cada etapa de este proyecto.

A Jorge Espinosa y Juan Carlos Navarro por los conocimientos, enseñanzas y apoyo brindado en la realización de esta tesis.

Al Centro de Investigación en Zoonosis (CIZ) de la Universidad Central del Ecuador.

Artículo de tesis

Determinación de la variabilidad genotípica de *Babesia* spp. por secuenciación de tercera generación a partir de vectores artrópodos procedentes de tres provincias de la Amazonía Ecuatoriana

Martina A. Muñoz Luzuriaga¹, José Rubén Ramírez-Iglesias*, Juan-Carlos Navarro², Jorge Espinosa³, Sandra Enriquez⁴

¹ Afiliación 1; mamunoz.bio@uisek.edu.ec

² Afiliación 2; juancarlos.navarro@uisek.edu.ec

³ Afiliación 3; jorpaes2@gmail.com

* Autor de Correspondencia: jose.ramirez@uisek.edu.ec; Tel.: +593 98 639 1273

Resumen: La babesiosis bovina es una enfermedad provocada por protozoarios intra-eritrocitarios del género *Babesia* que son transmitidos por garrapatas, está clasificada como un problema de economía y salud pública no atendido, ya que la infección de este parásito causa pérdidas en el sector pecuario, a nivel internacional. En el Ecuador se ha detectado *B. bigemina* y *B. bovis*, mas no existe información acerca de la variabilidad genotípica. En este territorio se han realizado únicamente 5 estudios que emplean técnicas moleculares a partir del ADN del vector para la detección de *Babesia*. Por ello, el objetivo de este trabajo fue determinar la variabilidad genotípica de *Babesia* spp. empleando una plataforma de tercera generación (STG). A partir de 66 pools de ADN de garrapata provenientes de Napo, Orellana y Sucumbíos, 48 muestras se determinaron como positivas por PCR para *Babesia* bovina; para ello se amplificaron dos regiones para diagnóstico de cada especie, SPE1-AVA1 para *B. bigemina* y RAP-1a para *B. bovis*. Estas muestras se normalizaron e identificaron por provincia con códigos de barra (BC) y se procedió a realizar la secuenciación por nanoporos de ONT por 48h, un algoritmo de basecalling de alta precisión y un Qscore = 9. El manejo de datos se procesó de manera *in silico*, se realizó un filtrado por tamaño, se alinearon las secuencias a los genomas de referencia de cada especie y dos bases de datos personalizadas (CDB y NDB) compuestas por secuencias de las regiones de interés obtenidas de Genbank, posteriormente se realizó la contabilización de secuencias alineadas y se hizo un análisis filogenético para determinar la variabilidad de la región conservada RAP-1a de *B. bovis*. La secuenciación generó 6.19 M de lecturas teniendo mayor cantidad de bases que pasaron el filtro de calidad que las fallidas. La cantidad de secuencias alineadas a los genomas indicaron que existe mayor frecuencia de detección de *B. bigemina* y los alineamientos con las CDB mostraron que las regiones secuenciadas son altamente conservadas. Por otro lado, con los árboles filogenéticos preliminares se pudo determinar que existe una variabilidad genotípica entre las secuencias de *B. bovis* en las diferentes regiones. Esta variación debe estudiarse en profundidad para buscar asociaciones con factores fenotípicos, los cuales se deben analizar en nuevas investigaciones. Para este fin se recomienda amplificar regiones más informativas que permitan establecer la causa de la diferenciación genotípica existente.

Palabras clave: *B.bovis*; *B. bigemina*; RAP-1a; Spe1-Ava1; variabilidad genotípica; secuenciación por nanoporos.

Abstract: Bovine babesiosis is a disease caused by intra-erythrocytic protozoa of the genus *Babesia* that are transmitted by ticks. It is classified as an overlooked issue in terms of economy and public health, as infection by this parasite causes losses in the livestock sector internationally. In Ecuador, *B. bigemina* and *B. bovis* have been detected, but there is no information about their genotypic variability. In this territory, only 5 studies have been conducted using molecular techniques based on tick DNA for *Babesia* detection. Therefore, the objective of this study was to determine the genotypic

variability of *Babesia* spp. using a third-generation platform (STG). Out of 66 DNA pools from ticks collected in Napo, Orellana, and Sucumbíos, 48 samples were determined to be positive for *Babesia bovis* by PCR. Two regions, SPE1-AVA1 for *B. bigemina* and RAP-1a for *B. bovis*, were amplified for species diagnosis. These samples were normalized and identified by province with barcodes (BC), and nanopore sequencing using ONT was performed for 48 hours, with high-precision basecalling algorithm and Qscore = 9. Data processing was performed in silico, including size filtering, alignment of sequences to reference genomes of each species, and two custom databases (CDB and NDB) composed of sequences from the obtained regions of interest from Genbank. Subsequently, the aligned sequence counts were tallied, and a phylogenetic analysis was conducted to determine the variability of the conserved RAP-1a region of *B. bovis*. Sequencing generated 6.19 M reads, with a higher number of bases passing the quality filter compared to failed reads. The counts of aligned sequences to the genomes indicated higher frequency of *B. bigemina* detection, and alignments with CDB showed that the sequenced regions are highly conserved. On the other hand, preliminary phylogenetic trees revealed genotypic variability among *B. bovis* sequences from different regions. This variability should be further investigated to explore associations with phenotypic factors, which should be analyzed in future research. For this purpose, it is recommended to amplify more informative regions that can help establish the cause of the existing genotypic differentiation.

Keywords: *B. bovis*; *B. bigemina*; RAP-1a; Spe1-Ava1; genotypic variability; nanopore sequencing.

1. Introducción

La babesiosis o piroplasmosis bovina es una enfermedad causada por parásitos del género *Babesia* transmitidos principalmente a través de la mordedura de garrapatas (Krause, 2019). Los organismos del género *Babesia* son protozoarios intraerocitarios, suelen tener una forma redonda u ovalada y miden entre 1 – 5 μm (Krause, 2019). Las especies más comunes que afectan al ganado vacuno son *B. bigemina*, *B. bovis* y *B. divergens* (Gohil, et al., 2013). La epidemiología de estas tres especies sugiere que las dos primeras circulan en las zonas subtropicales mientras que la última se distribuye en Europa y África del Norte (Spickler, 2018). Las garrapatas son ectoparásitos artrópodos que se alimentan de sangre de sus hospedadores y son considerados el segundo vector más importante transmisor de patógenos (Parola, Raoult, 2001). En zonas tropicales se ha reportado únicamente el género *Rhipicephalus* como vector portador de *Babesia* spp. (Alvarez, Rojas, Figueroa, 2019).

La patogénesis de la piroplasmosis bovina inicia por la infección de los eritrocitos, seguida de la multiplicación y liberación intermitente de merozoitos causando la lisis de glóbulos rojos (Krause, 2019). El cuadro clínico de vacunos asociado a infección de *Babesia* se caracteriza por presentar anemia hemolítica, fiebre sobre los 41°C, depresión, anorexia, deshidratación y en casos severos, síntomas respiratorios y neurológicos por secuestro de glóbulos rojos infectados en lechos capilares y hemoglobinuria, conduciendo a la muerte del animal (Alvarez, et al., 2019).

La babesiosis bovina representa un problema económico y de salud pública, dada la morbilidad y mortalidad de ganado que genera pérdidas importantes (Spickler, 2018). En países sudamericanos las pérdidas económicas que se deben al mal control del vector *Rhipicephalus microplus*, han superado los \$2 billones de USD anuales (Aguayo, 2018). En Ecuador la ganadería es una de las actividades económicas productivas más importantes (Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica, s.f.). El precio referencial de ganado bovino que produce leche o carne en Ecuador se encuentra en rangos promedio de \$324 - \$1136 y \$361 - \$871 USD correspondientemente (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2022). La piroplasmosis en ganado incide directamente en este tipo de pérdidas ya que la enfermedad causa mortalidad, abortos, reducción en producción de leche y carne, además de un aumento en el costo de manutención de animales enfermos (Laha, et al., 2015). Actualmente en Ecuador no se conocen datos de pérdida económica por la enfermedad babesiosis bovina ya que son pocos los estudios de la misma para poder determinar su estatus (Vasco, 2013 citado de Aguayo, 2018).

Las especies de *Babesia* bovina que han sido reportadas en Ecuador son *B. bovis* y *B. bigemina* (Chávez-Larrea, et al., 2021; Aguayo, 2018). En el presente trabajo se detectó inicialmente el parásito mediante PCR en la cual, para la identificación de la especie *B. bovis*, se amplifica la región del gen Rap-1a que es especie

específico, es una región altamente conservada, se ha empleado como blanco para vacunas y se ha observado que las proteínas de este gen participan en la invasión de eritrocitos (Niu, et al., 2013; Lira-Amaya, et al., 2022), con ello se obtiene un producto de 290 pb; por otro lado para la identificación de la especie *B. bigemina* se amplifica un producto de 170 pb, esta región de interés está delimitada por las enzimas de restricción Spe-1 Ava-1, la secuencia obtenida es altamente conservada y no se la ha detectado en otras especies (Souza, 2015; Lira-Amaya et al., 2022).

Para la detección de *Babesia* existen técnicas directas e indirectas dentro de las cuales las más comunes son las técnicas moleculares y serológicas como PCR, ELISA y frotis sanguíneo con tinción Giemsa; a pesar de que estas son efectivas, específicas y poseen una alta sensibilidad para diagnóstico clínico, detección de patógenos, monitoreo y manejo de enfermedades, la limitación que se presenta con estas técnicas es que no poseen la capacidad para detectar una gran variedad de genotipos de agentes infecciosos (Kiselev, et al., 2020). La STG (secuenciación de tercera generación) es una tecnología emergente que tiene como finalidad analizar la información genética de forma masiva y paralela con tiempos y costos reducidos (Rubio, et al., 2019), con ella es posible la lectura de fragmentos largos de ADN que han ayudado en la el alineamiento y construcción de regiones repetitivas en las secuencias (Kiselev, et al., 2020). Este tipo de secuenciación se ha empleado para la identificación y caracterización de nuevos organismos, detección de variantes en la información genética, para la prevención, diagnóstico, tratamiento, y seguimiento de enfermedades del exoma y del genoma (Rubio, et al., 2020; Wang, et al., 2021; Petersen, et al., 2019). Específicamente la secuenciación por nanoporos (ONT) fue desarrollada por Oxford Nanopore Technologies en el año 2014 y pertenece a la tercera generación de esta tecnología (Wang, et al., 2021). Este tipo de secuenciación puede realizar lecturas de fragmentos cortos (<300pb) que permiten la detección de variaciones de un solo nucleótido o mutaciones en baja abundancia y la identificación de variantes, estimación y corrección de errores empíricos (Lefterova, et al., 2015; van Dijk, et al., 2018); también se pueden ejecutar lecturas de fragmentos largos las cuales tienen la ventaja de abarcar regiones genómicas repetitivas, facilitar el ensamblaje de la información genética e identificar variaciones estructurales largas para la determinación de especies, subespecies o mutaciones importantes (Oxford Nanopore Technologies, 2017).

En Ecuador los estudios referentes a *Babesia* spp. han sido para detección y prevalencia con las técnicas mencionadas anteriormente, en 13 provincias diferentes (Aguayo, 2018; Chávez-Larrea et al., 2021) de los cuales 5 han empleado ADN de vectores (Herrera, 2017; Vasco, 2013; Maya-Delgado, 2020; Insuaste, 2020). Sin embargo, no se ha llevado a cabo ningún estudio que emplee STG para determinación de variabilidad genotípica por lo que en la presente investigación se desea determinar si existe una variabilidad y diferenciación genética entre *Babesia* spp. presentes en el territorio ecuatoriano. Con base en esto, el objetivo de este trabajo fue detectar y genotipificar *Babesia* spp. circulantes en la región norte amazónica ecuatoriana mediante STG empleando la plataforma de ONT para determinar si la variabilidad y diferenciación genotípica existente se encuentra asociada al piso climático y localidades geográficas de la Amazonía ecuatoriana.

2. Materiales and Métodos

2.1. Área de Estudio

Las muestras de ADN que se emplearon en esta investigación se obtuvieron de garrapatas *Rhipicephalus microplus* encontradas en ganado bovino en 3 provincias de la Amazonía ecuatoriana. De cada bovino de recolectaron de 1 a 5 artrópodos, se extrajo el ADN de las garrapatas según el procedimiento descrito por Insuaste (2020) y se hizo un total de 66 pools que corresponde a la cantidad de mamíferos del estudio. En la provincia de Napo, cantón El Chaco, parroquia Gonzalo Díaz de Pineda en las localidades El Vergel, Vía Moradillas, Rio Negro, La Nueva Esperanza, Pan de Azúcar, Moradillas, Las Balsas, Rio Blanco, Centro y S/N, se recolectaron garrapatas de 31 vacas. En Orellana, cantón Francisco de Orellana, parroquia García Moreno en las localidades de García Moreno, La Magdalena y S/N se tomaron garrapatas de 9 bovinos. En Sucumbíos, en el cantón Cuyabeno, en la parroquia Aguas Negras en las localidades de Aguas Negras, Dos de Diciembre, Comunidad IWIA, Rey de los Andes, Las Palmas, 26 de Junio, San Vicente y S/N se obtuvo vectores de 26 animales.

2.2. Preparación de muestras de ADN de productos de *Babesia* spp.

2.2.1. Detección molecular de *Babesia* spp. a partir de ADN de garrapatas de bovinos

En el estudio previo (Insuaste, 2020) se realizó una PCR a las 66 pools de ADN de garrapata para amplificar regiones específicas de *B. bigemina* y *B. bovis* de 170 pb y 290 pb de las regiones

Spe1-Ava1 y Rap1a respectivamente (Figuroa, et al., 1993; Souza, et al., 2014; Niu, et al., 2013). De esta PCR se obtuvieron un total de 48 muestras positivas para una o ambas especies de *Babesia*, las cuales se emplearon en la presente investigación.

2.3. Preparación de la librería

2.3.1. Ligación de adaptadores

A las 48 muestras positivas para *Babesia* spp. se les añadió adaptadores específicos (OXO) de Oxford Nanopore de 22 pb por PCR, siguiendo el protocolo SQK-LSK109. Las condiciones de la PCR para agregar los adaptadores fueron 3 minutos a 95°C, 30 segundos a 95°C, 45 segundos a 56°C, 40 segundos a 72°C por 25 ciclos y 10 minutos a 72°C. Para comprobar la existencia de ADN se corrieron las muestras en geles de agarosa al 2% por 1h.

Se purificaron las muestras con adaptadores OXO con el Kit PureLink PCR Purification Kit de Invitrogen según las instrucciones del proveedor y se determinó la concentración de ADN por Qubit, se normalizó cada muestra de manera que se encuentren en concentraciones de 1 ng/μl. Esto se realizó con el objetivo de poder realizar pools de muestras para poder añadir los códigos de barra.

2.3.2. Adaptación de códigos de barra (BC01-BC09) para clasificación de 48 muestras positivas para *Babesia* spp.

Se clasificaron las muestras según cada provincia (Tabla 1) de manera que la cantidad de fmoles por código de barra (BC) fuera entre 100_{fmoles} -200_{fmoles} según instrucciones de proveedor. Para añadir los BC se siguieron las instrucciones del proveedor utilizando el Kit PCR Barcoding 1-12 (EXP-PBC001), lo cual permitió la clasificación de muestras por piso climático. Los resultados obtenidos en el *output* del secuenciador (MinION Mk1C) se distribuyeron en carpetas pertenecientes a cada BC. Las condiciones para la adición de los BC vía PCR fueron las siguientes: 1 μl de cada BC, 24 μl de pool de muestra que tenga de 100_{fmoles} -200_{fmoles} del producto de PCR, 25 μl de DreamTaq Green PCR Master Mix, teniendo un volumen total de 50 μl. Las condiciones de la PCR se ajustaron de la siguiente manera: 3 minutos a 95°C, 15 segundos a 95°C, 15 segundos a 62°C, 1:45 minutos a 72°C por 15 ciclos y 2 minutos a 72°C.

2.3.3. Reparación de extremos, ligación de adaptadores y limpieza

Posterior a PCR en la cual se añadieron lo BC se cuantificó la concentración de ADN de las muestras por el Qubit. Se realizó un pool único de las muestras con los 9 códigos de barra de manera que se tuviera 1μg de librería. La reparación de extremos se realizó con NEBNext Companion Module de New Englnd BioLabs y se procedió a la ligación de adaptadores compatibles con el equipo con el Kit de ligación de ONT SQK-LSK109.

2.3.4. Carga de pool en celda de flujo y secuenciación por nanoporos con equipo ON MinION Mk1C

Se cargó la celda de flujo según instrucciones de Kit SQK-LSK109, se configuró el tiempo de corrido por 48h, con las siguientes condiciones: -180 mV *Bias Voltage*, 1.5h entre MUX scans, HAC (High-Accuracy) Basecalling, enabled barcoding, disabled alignment, FAST5 y FASTQ formatos de output, Qscore de 9 para el filtrado de lecturas por calidad y no se filtró lecturas por tamaño.

Tabla 1. Clasificación de muestras con códigos de barra por provincia

184	Provincia	Napo	Orellana	Sucumbíos
	No. de muestras	21	6	21
	Código de barras (BC)	1-3	4	5-8

Clasificación de lecturas por provincia con códigos de barra del kit EXP-PBC001 de ONT. Cada código de barras debe colocarse a un pool de muestras con 100-200fmoles. Las 21 muestras de Napo se las clasificó en 3 BC, del 1-3. Había menor cantidad de muestras de la provincia Orellana por lo que solo se empleó el BC 4 y la provincia de Sucumbíos se detectó mayor cantidad de muestras con confección del protozoario por lo que se las clasificó en 4 BC que van del 5-8. Autoría propia.

2.4. Manejo *in silico* de lecturas secuenciadas

Se siguió el flujo de manejo de información *in silico* "NanoRTax" propuesto por Rodríguez-Pérez, et al. (2022) con ciertas modificaciones para el presente estudio. El pipeline implementado inició por

la agrupación de todas las secuencias según provincia eliminando los BC de las lecturas y se aplicó el script Fastp para clasificarlas según calidad con un tamaño entre 150 pb y 330 pb.

2.4.1. Obtención de genomas y bases de datos

Para el alineamiento y comparación de las secuencias obtenidas se descargó el genoma de *B. bovis* en la base de datos PiroplasmaDB y el genoma de *B. bigemina* se lo obtuvo de NCBI, este último era un genoma de referencia no curado en el momento de la investigación está compuesto por 5 cromosomas. Además de los genomas se realizó una base de datos propia de las regiones de interés de cada especie, RAP-1a para *B. bovis* y Spe1-Ava1 para *B. bigemina*; para estas bases de datos de ingresaron las secuencias de los primers empleados para la detección de *Babesia* spp. en Blastn delimitando el alineamiento para el organismo Babesia (taxid: 5864); se descargó las secuencias de cada región armando dos bases de datos propias (Custom Data Base: CDB) teniendo un total de 93 y 192 secuencias respectivamente.

2.4.2. Alineamiento y contabilización de lecturas secuenciadas

Las lecturas obtenidas se alinearon a las dos CDB y a cada genoma respectivo. Este proceso se lo realizó con el programa minimap2. Posteriormente con la herramienta bioinformática, Samtools, se realizó el conteo de alineamientos de las lecturas secuenciadas con los genomas y las bases de datos.

El conteo de alineamientos con los genomas se realizó de dos maneras; un conteo general en el cual se obtuvo la cantidad de veces que se alineaban las lecturas en el genoma sin importar las diferentes regiones ni la rigurosidad de los alineamientos; y por otro lado un alineamiento de cada lectura una única vez en donde se presentaba mejor alineamiento con mayor rigurosidad predeterminado por el programa. En el caso del conteo de alineamientos de las lecturas con las CDB se realizó bajo la modalidad de alineamientos una única vez.

2.5. Árboles filogenéticos

Se armó una segunda base de datos (NDB) con mayor rigurosidad en tamaño de secuencias, porcentajes de identidad y cobertura. Para la nueva base de datos las secuencias seleccionadas tenían un rango de cobertura entre 75% y 100%, mientras que el porcentaje de identidad se encontraba entre 95% y 100%. Se escogió la región RAP-1a de *B. bovis* para el análisis filogenético dado que es la región más conservada y hubo mayor alineamiento con las bases de datos. La NDB de *B. bovis* se compone de 19 secuencias que se alinearon con las lecturas secuenciadas de este estudio con la herramienta minimap2, se realizó la contabilización de las secuencias alineadas una sola vez con la herramienta Samtools y se usó el programa Seqkit para extraer secuencias únicas con un tamaño determinado entre 280 y 300 pares de bases.

Se construyeron cuatro árboles filogenéticos con dos metodologías diferentes (Tabla 2) que permiten observar las relaciones de similitud entre las secuencias de la región RAP-1a de *B. bovis* en las tres provincias de estudio. Estos se realizaron a partir de 228 secuencias de *B. bovis* de las tres provincias alineadas con la NDB (Tabla 5). Para el primer árbol filogenético (Figura 3) se subieron las secuencias al programa en línea Clustal Omega con metodología NJ, para el segundo árbol (Figura 4) se empleó la misma metodología, pero tiene un enraizamiento en el punto medio, en el caso del tercer árbol (Figura 5) se usó la metodología NJ pero con secuencias de *B. bigemina* como outgroup y por último para armar el árbol de la Figura 6 se empleó el método MP teniendo como outgroup secuencias de *B. bigemina*.

Tabla 2. Condiciones para árboles filogenéticos.

Figura	Método	Secuencias	Outgroup
Figura 3	NJ	<i>B. bovis</i>	No
Figura 4	NJ	<i>B. bovis</i>	No
Figura 5	NJ	<i>B. bovis</i>	Si - <i>B. bigemina</i>
Figura 6	MP	<i>B. bovis</i>	Si - <i>B. bigemina</i>

*Autoría propia

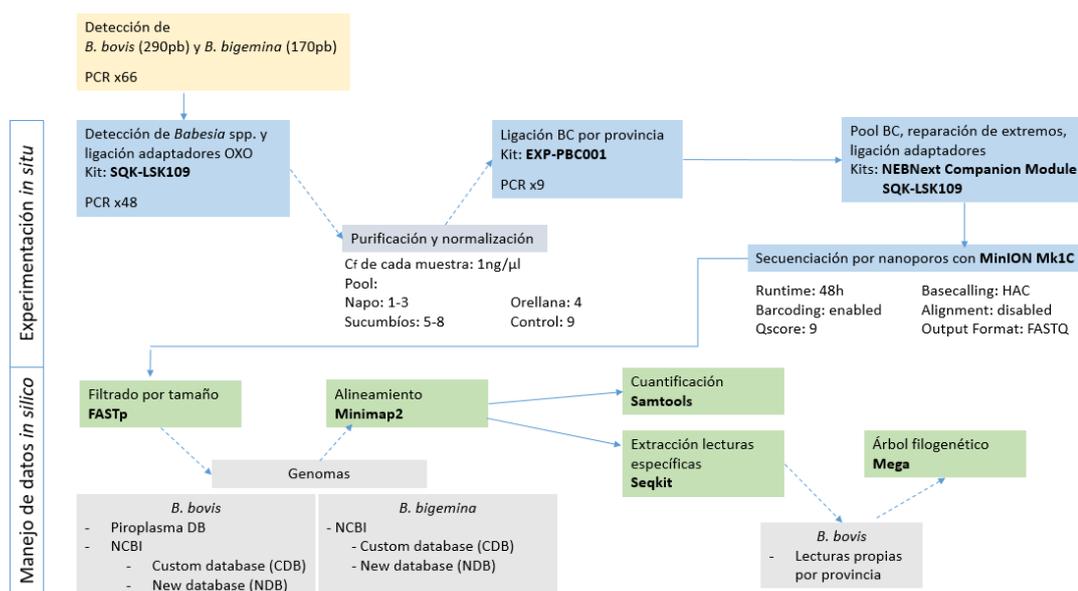


Figura 1. Pipeline *in situ* e *in silico* de estudio. Autoría propia. La metodología de este estudio se realizó de manera *in situ* para la obtención de datos, y el manejo de los mismos fue *in silico*. En la experimentación en laboratorio se detectó *B. bigemina* y *B. bovis* mediante una PCR en la cual se amplificaron dos regiones altamente conservadas. Posterior a la detección se realizó pools de muestras por cada provincia y se purificaron los mismos. Para añadir los BC se realizó una nueva PCR en la cual se empleó el kit de ONT EXP-PBC001. Para la secuenciación se siguió el protocolo del kit SQK-LSK109 y se establecieron las condiciones experimentales. Para el manejo de datos *in silico* se emplearon las herramientas bioinformáticas FASTp para depurar las lecturas por tamaño, se alineó las mismas con el programa Minimap2 contra genomas de referencia, y dos bases de datos propias (CDB y NDB) con secuencias de las regiones de interés. Se usó Samtools para la cuantificación de lecturas alineadas y a partir del alineamiento con NDB, se extrajo las lecturas de interés con tamaños específicos con las cuales se armó un árbol filogenético con el programa MEGA.

3. Resultados

3.1. Output de secuenciación

Durante las 48 horas de secuenciación se generaron 6.19 M de lecturas y un estimado de 2.37 Gb de pares de bases. La cantidad de bases que pasaron los filtros de calidad pesaron 1.05 Gb, lo que supera a las fallidas que fueron 833.59 Mb. A las veintiún horas de secuenciación ya se obtuvieron la mayor cantidad de lecturas y a partir de este tiempo ya no se mostraba una generación exponencial de lecturas. Los tamaños de las secuencias leídas obtenidas tenían un tamaño cercano a los productos esperados para ambas especies.

3.2. Alineamiento de lecturas obtenidas con genoma de *B. bovis* y *B. bigemina*

La contabilización de las lecturas alineadas muestra una mayor abundancia de *B. bigemina* lo cual coincide con los resultados obtenidos en detección por PCR. En la detección del protozooario por PCR, de 66 muestras, el 81,82% pertenecía a *B. bigemina*, y entre las 48 muestras positivas para *Babesia* spp. la frecuencia de *B. bigemina* fue del 100% (Tabla 3). Las muestras que dieron positivas para *B. bovis* presentaban coinfección con la otra especie, entre las 48 muestras positivas para *Babesia* spp., 18 resultaron positivas para *B. bovis* lo que equivale al 37,5%. Estas se encontraban distribuidas como se observa en la Tabla 3.

Tabla 3. Frecuencia de detección por especie de *Babesia* en cada provincia

Especie / Provincia	Napo	Orellana	Sucumbíos	Totales
<i>B. bigemina</i>	21/31	6/9	21/26	48/66
<i>B. bovis</i>	6/31	1/9	11/26	18/66
Totales	21/31	6/9	21/26	

*Muestras positivas para *B. bovis* mostraban coinfección

Con la herramienta bioinformática Samtools se calcularon todos los alineamientos posibles de las lecturas con los genomas correspondientes para cada especie. Al realizar un alineamiento de lecturas frente a un genoma, el número de alineamientos posibles es mayor que el conteo de alineamientos únicos, ya que no se está determinado y filtrando los alineamientos por calidad, si no solo por probabilidad, lo que ocasiona que una lectura puede pegarse en varias regiones del genoma (Figura 2. 1a, 2a y 3a).

Tras el alineamiento de lecturas con el genoma se puede evidenciar que existe una mayor cantidad de secuencias de *Babesia* spp. alineadas en Sucumbíos, seguido de Napo y teniendo la menor cantidad de alineamientos en Orellana (Tabla 4). En cuanto a la prevalencia de ambas especies, obtenida por los alineamientos en genoma, los resultados del porcentaje de prevalencia mostraron que Orellana tiene mayor prevalencia de *B. bigemina*, seguido por Napo y después Sucumbíos. De esta manera se sabe que la prevalencia de *B. bovis* es inversamente proporcional al porcentaje de prevalencia de *B. bigemina* en cada piso climático (Figura 2. 1a, 1b y 1c).

3.3. Alineamiento único de lecturas obtenidas genoma y base de datos de región de interés

La cantidad de alineamientos únicos de las lecturas a los genomas o las bases de datos correspondientes es más baja dado que se delimita la cantidad de alineamientos por lectura según condiciones. El número de alineamientos únicos de lecturas contra el genoma de referencia y con la base de datos no presenta una diferencia muy alta (Tabla 4). Como se observa en la figura 1, comparando las partes b y c de cada provincia, el porcentaje de alineamientos únicos es muy similar entre aquellos realizados contra el genoma y la base de datos de cada especie. Estas similitudes en porcentaje de alineamientos únicos indica que las regiones estudiadas, Spe1-Ava1 para *B. bigemina* y RAP1 para *B. bovis*, son muy conservadas.

3.4. Variabilidad genotípica de regiones conservadas

Al comparar los alineamientos únicos que hubo en los genomas y en las CDB específicas para cada región se observa una diferencia del 2% en el número de alineamientos de las secuencias de *B. bigemina* en Sucumbíos y Orellana (Figura 2. 1b y 2b); así mismo se observa este mismo porcentaje de diferencia entre los alineamientos únicos de las secuencias obtenidas con el genoma de referencia versus región en Napo solo que con la especie *B. bovis* (Figura 2. 3c).

Tabla 4. Conteo de lecturas alineadas a genomas y regiones específicas.

Especie	Provincia	Alineamientos en genoma	Alineamientos únicos en genoma	Alineamientos únicos en CDB con región Spe1- Ava1 / RAP1
<i>B. bigemina</i>	Napo	1 837 973	286 541	283 404
	Orellana	780 262	137 202	130 885
	Sucumbíos	2 046 366	292 542	279 843
<i>B. bovis</i>	Napo	834 686	48 996	47 963
	Orellana	296 713	13 307	13 234
	Sucumbíos	1 018 441	89 881	88 308

Autoría propia.

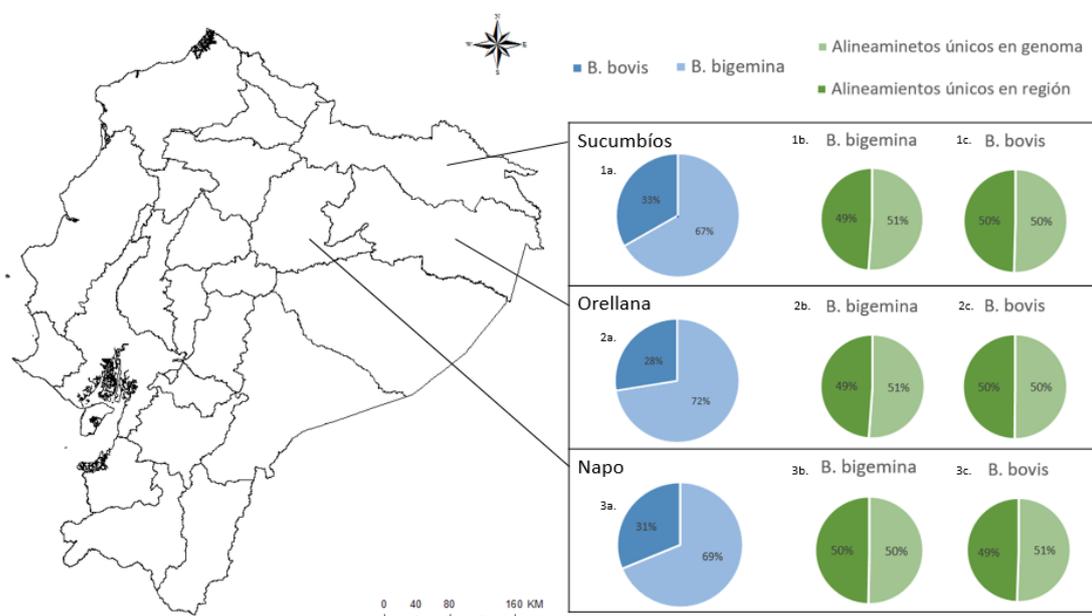


Figura 2. Comparación de prevalencia y variabilidad según alineamientos de secuencias de *B. bigemina* y *B. bovis* en Sucumbios, Orellana y Napo. Autoría propia. Alineamientos de lecturas de *B. bigemina* y *B. bovis* con el genoma de referencia respectivo en las tres provincias ecuatorianas (1a, 2a y 3a). Gráficos b y c de cada provincia se evidencian los alineamientos únicos de *B. bigemina* y *B. bovis*, respectivamente, contra el genoma de referencia y los alineamientos únicos de la cada especie identificados en la CDB.

Posterior a los alineamientos de las lecturas obtenidas con las NDB se pudo observar que el largo de las secuencias de *B. bigemina* de Napo y Orellana eran superiores a 170pb (datos no mostrados), que es el tamaño del producto amplificado establecido por la literatura. De esta manera para evitar sesgos en el análisis filogenético por diferencia en los tamaños de las secuencias y cantidad de las mismas, se los realizó únicamente con las de *B. bovis* las cuales tienen tamaños entre 280pb y 300pb

En los árboles filogenéticos (figuras 3, 4, 5 y 6) se puede observar que existen ciertas agrupaciones de secuencias por provincia. En el caso de Sucumbios se tiene un total de 134 secuencias que se distribuyen de manera amplia; se puede diferenciar que en todos los gráficos las ramificaciones más distantes pertenecen a secuencias de la provincia mencionada y a Napo. En las figuras 4, 5 y 6, en clado más distante en el cual hay mayor cantidad de secuencias pertenecientes a Sucumbios, se encuentra una secuencia de Orellana (*B. bovis*_Orellana_5cac8afe) y la secuencia más lejana de este mismo clado es *B. bovis*_Sucumbios_76c2ae20; se observa además que la ramificación distante en la cual se distribuyen secuencias de Napo, la más distante es *B. bovis*_Napo_e478fef8. A pesar de que hay clados que pertenecen a una provincia entera y se observa un patrón de divergencia entre las secuencias, no existe una clara diferenciación de genotipos entre provincias, es decir las secuencias de los tres pisos climáticos se encuentran en diferentes ramificaciones a diferentes distancias y no se distingue una divergencia que sea específica de un solo lugar pero sí entre las secuencias obtenidas.

Tabla 5. Lecturas alineadas con NDB para árbol filogenético.

Especie	Región de interés	Provincia	Nº. de secuencias de tamaño específico que alinearon con NDB
<i>B. bigemina</i>	Spe1-Ava1	Napo	67
		Orellana	23
		Sucumbíos	55
<i>B. bovis</i>	RAP-1a	Napo	67
		Orellana	27
		Sucumbíos	134

*Autoría propia

334

335

336

337

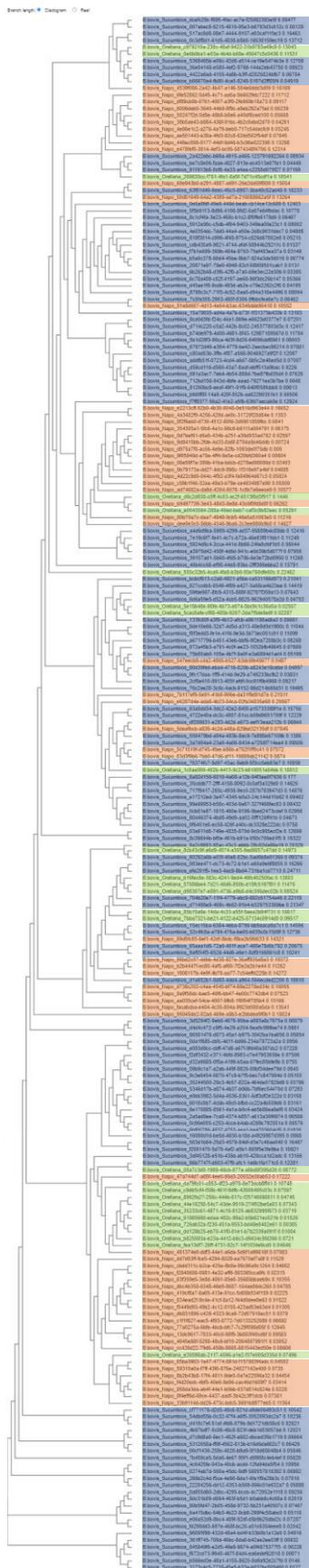


Figura 3. Análisis filogenético por método NJ de secuencias de *B. bovis* de Napo, Sucumbios y Orellana. Autoría propia. árbol filogenético de secuencias de Napo (rojo), Orellana (verde) y Sucumbios (azul) obtenido de Clustal Omega.

NJ tree

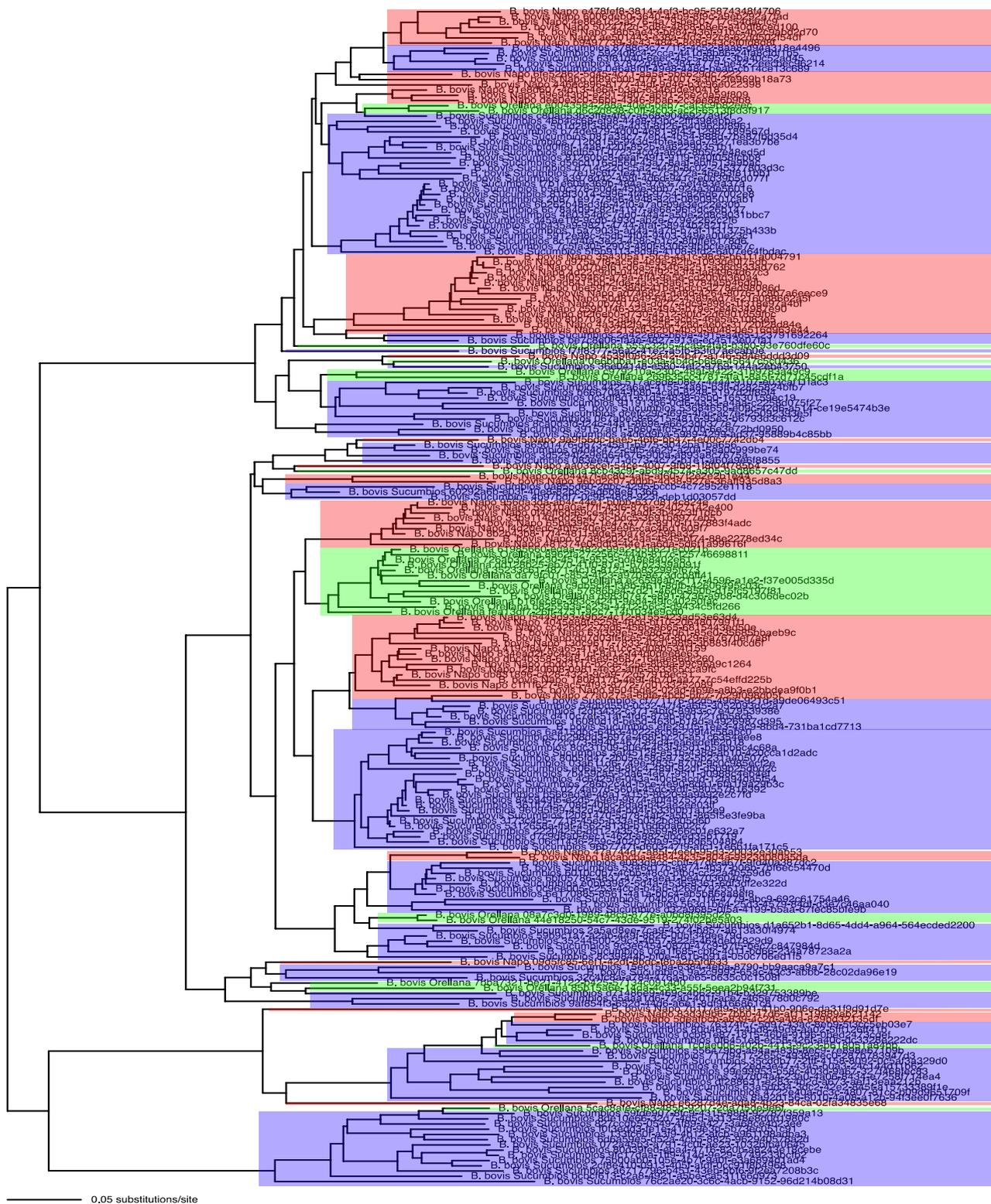


Figura 4. Árbol filogenético por método NJ de secuencias de *B. bovis* de Napo (rojo), Orellana (verde) y Sucumbios (azul). Autoría propia.

NJ tree

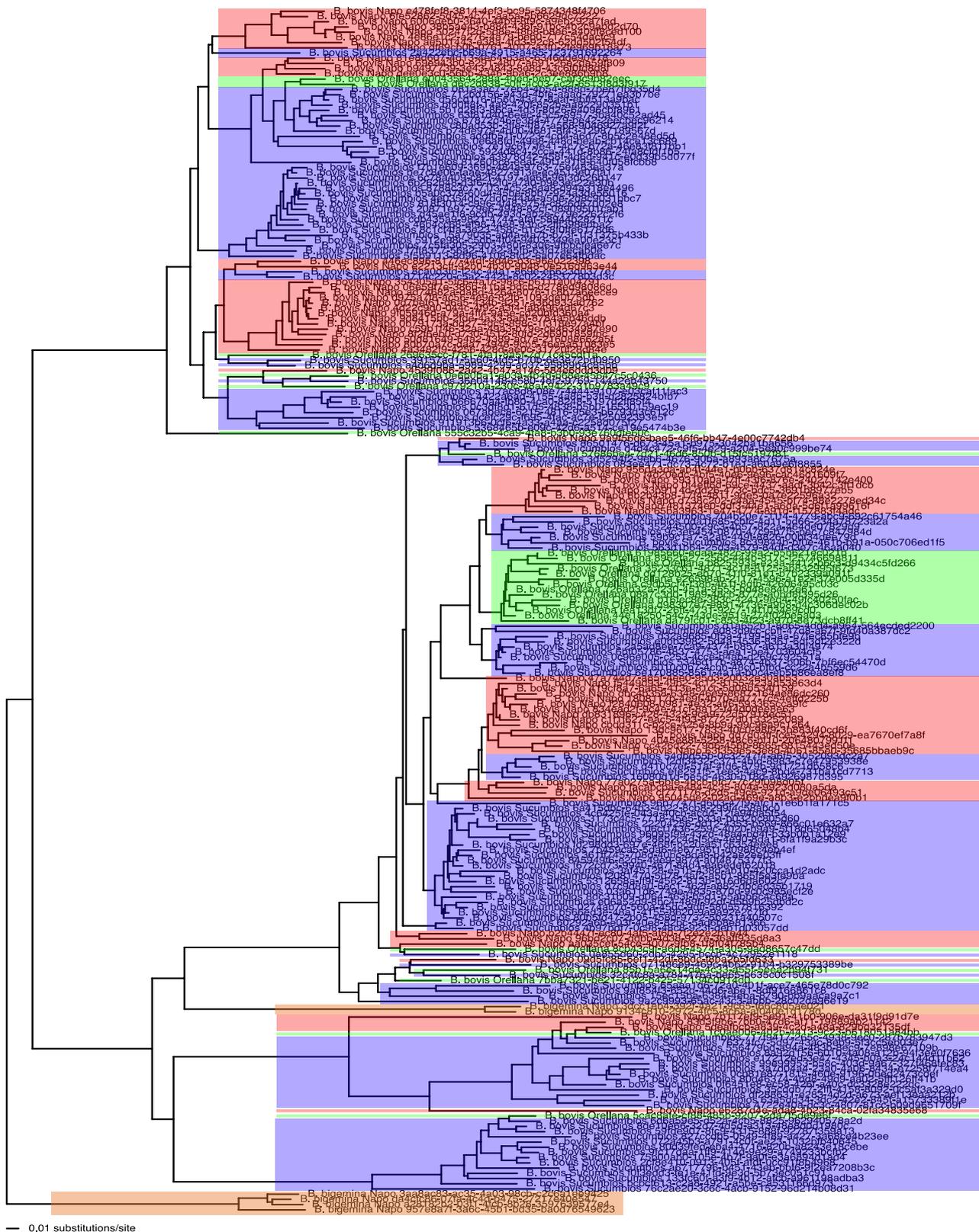


Figura 5. Árbol filogenético por método NJ de secuencias de *B. bovis* de Napo (rojo), Orellana (verde) y Sucumbios (azul) con *B. bigemina* como outgroup (naranja). Autoría propia.

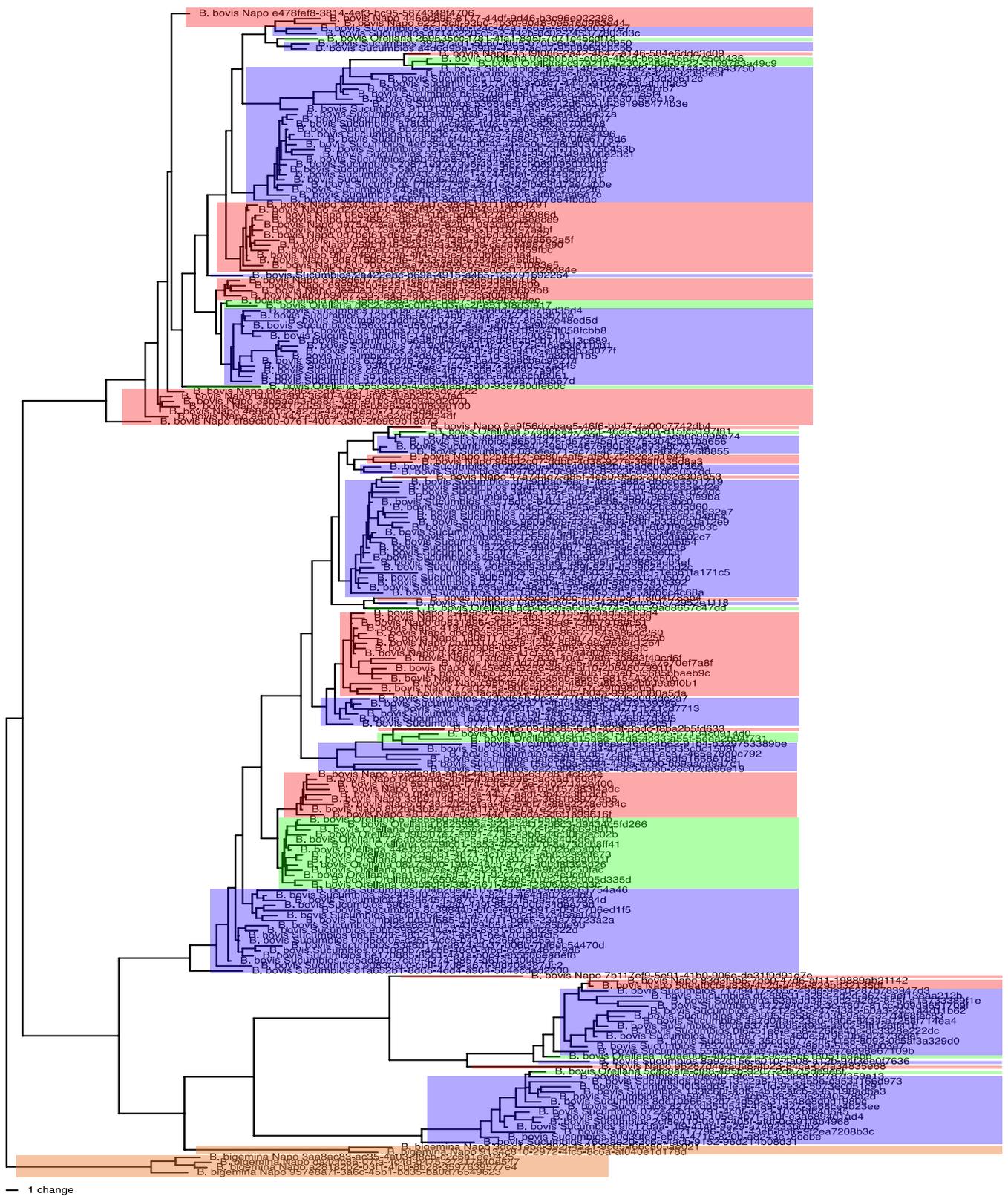


Figure 6. Árbol filogenético por método MP de secuencias de *B. bovis* de Napo (rojo), Orellana (verde) y Sucumbios (azul) con *B. bigemina* como outgroup (naranja). Autoría propia.

343

344

345

346

4. Discusión

Los resultados indican que en las tres provincias estudiadas hay presencia de *Babesia* spp. El output de la secuenciación muestra que, para detección de las especies, 24 horas de secuenciación serían suficientes, a pesar de esto, para estudios con objetivo de determinación y análisis de variabilidad genotípica, de haplotipos o mutaciones son necesarias 48 horas mínimo para obtención de todas las secuencias que puedan ser de interés. Como se observan en las gráficas, existe una mayor frecuencia de *B. bigemina* que coincide con los estudios de Vasco (2013) y Herrera (2017); esto además se le puede atribuir a la persistencia de la infección de este parásito en los hospedadores. Se conoce que los bovinos infectados con *B. bigemina* pueden ser portadores de este protozoo hasta por 22 meses y según la alteración parasitaria los vectores pueden volver a infectar a los mamíferos (Alvarez, et al., 2019). Por otro lado, la infección de *B. bovis* puede persistir de manera indefinida en el ganado (Alvarez, et al., 2019). De esta manera, en el caso de *B. bigemina*, la característica de ciclo viral más corto podría estar asociada a su mayor prevalencia de infección.

Al comparar el número de alineamientos que tuvieron las lecturas secuenciadas con los genomas de referencia y las CDB se observa que las regiones alineadas son bastante conservadas y por esa razón han sido blancos para detectar ambas especies (Herrera, 2017), esta similitud en número de alineamientos también se da ya que no se limitaron los tamaños, porcentaje de identidad ni porcentaje de cobertura de secuencias para el proceso, en las CDB se incluyeron secuencias cromosómicas y fueron obtenidas sin ningún filtro para porcentajes de identidad y cobertura.

Tanto en Sucumbíos como Orellana, la cantidad de secuencias alineadas de *B. bigemina* es mayor que la de *B. bovis*. Las muestras de Orellana se encuentran en menor proporción que las de Napo y Sucumbíos, de las cuales en ambas provincias se estudiaron 21 muestras, por lo que una comparación con esas 6 muestras podría interferir con las conclusiones. A pesar de esto, si se compara la cantidad de alineamientos y muestras de las provincias de Napo y Sucumbíos se puede inferir que existe una mayor variabilidad de *B. bovis* en Napo. Esta variabilidad entre las secuencias puede deberse a las distintas condiciones que se presentan en cada provincia. Según los datos del GAD de la parroquia Aguas Negras en Sucumbíos, esta localidad presenta un rango altitudinal entre 200 msnm – 300 msnm y una temperatura promedio de 24°C (GAD Parroquial Aguas Negras, 2015); el GAD de la parroquia García Moreno de Orellana una temperatura promedio de 24°C y el rango de altitudes de la provincia diverge entre 100 msnm y 3900 msnm (Endavant, 2015); mientras que en la parroquia Gonzalo Díaz de Pineda en Napo el rango altitudinal va desde los 600 msnm – 3000 msnm presentando una temperatura promedio de 16°C (Itecpo Consulting, 2014). La localidad de estudio en Napo tiene condiciones altitudinales más variables que en Sucumbíos y la temperatura promedio anual es más baja por lo que podrían estas condiciones ser factores importantes para la variabilidad o prevalencia de *B. bovis*, con los resultados obtenidos y una comparación con las condiciones de los pisos climáticos se podría suponer que *B. bigemina* tiende a tener una mayor variabilidad con temperaturas más altas, para ello se requeriría mayor estudio de localidades con esta variable; la altitud de las regiones podría influir de igual manera pero la falta de datos acerca de la parroquia García Moreno dificulta esta hipótesis.

El número de muestras secuenciadas en ambos pisos climáticos fue de 21 pools donde el 100% eran positivos para *B. bigemina* pero difieren en la cantidad de muestras positivas para *B. bovis*. En el caso de Napo, 6 muestras de las 21 (28,57%), se detectaron positivas para *B. bovis* mientras que en Sucumbíos fueron 11 de 21 (52,38%). No obstante, los resultados muestran que, en Napo, a pesar de haber menor cantidad de detección de *B. bovis*, existe una diferencia del 2% cuando se compara la cantidad de alineamientos de las lecturas secuenciadas con el genoma de referencia y la CDB lo que sugiere que existe una mínima variabilidad en las lecturas obtenidas, esto se puede deber de igual manera a sesgos en la CDB o la similitud de las secuencias obtenidas frente a otras cepas genotipificadas en diferentes localidades del mundo.

Como se ha mencionado existe un menor alineamiento de las secuencias obtenidas con el genoma que con la CDB, esto puede representar la explicada variabilidad de la especie *B. bigemina* en Sucumbíos y Orellana o puede deberse de igual manera a que para el alineamiento con genoma se está empleando un genoma de referencia no curado de la especie obtenido del NCBI; esto podría ser razón para una menor cantidad de alineamientos. A este resultado se lo compara de igual manera con el porcentaje de alineamientos de la especie en Napo, pero no se observa este patrón, es decir la cantidad de alineamientos con el genoma representativo y la base de datos con las lecturas de *B. bigemina* es muy similar y en porcentaje ambas son el 50% en Napo.

Los estudios en Ecuador de Chávez-Larrea, et al (2021), Vasco (2013), Vera (2018) y Herrera (2017) emplean el gen RAP-1a para determinar la similitud nucleotídica de secuencias de *B. bovis* con secuencias reportadas en otros países determinando que esta región es altamente conservada, estos estudios incluyen secuenciación de muestras en Institutos del exterior pero son por metodología Sanger y son comparadas con secuencias globales de manera que se pueda determinar la especie más no la variabilidad; en nuestro país no existen estudios de variabilidad genotípica de *Babesia* spp. mediante secuenciación de tercera generación. A nivel global no se ha realizado el estudio de variabilidad genotípica del protozoario de interés de manera puntual, se han obtenido árboles filogenéticos para la identificación de diferentes parásitos a partir del ADN de vectores en donde se encontró *Babesia* spp. (Brinkmann, et al., 2019 & Bonnet, et al., 2014). Únicamente en el estudio de Ghafar, et al. (2020), se emplea SNG de Illumina para establecer la composición de poblaciones de piroplasma (*Babesia* spp. y *Theileria* spp.) en Pakistán.

El presente estudio emplea el gen RAP-1a de *B. bovis* para determinar la variabilidad de secuencias entre las tres provincias de la Amazonía del norte de Ecuador de manera que se pueda establecer si existe una diferenciación o divergencia entre las mismas según la locación geográfica de cada provincia y sus condiciones climáticas. En los árboles filogenéticos obtenidos no se observa una divergencia específica por provincia, pero si secuencias muy similares entre sí que se agrupan y un patrón entre clados es visible lo que demuestra variabilidad entre las secuencias. Esta variabilidad entre las secuencias se puede deber a diferentes factores fenotípicos como mutaciones mínimas, mezclas de haplotipos, raza de bovinos, tiempo al tomar las muestras de garrapatas, aspectos clínicos asociados a la virulencia, e incluso movilidad de ganado que casa introducción de enfermedades a nuevas localidades. De esta manera se observa una estructura en los arboles que indica variabilidad genotípica en las diferentes zonas estudiadas.

Los resultados de este trabajo se deben complementar con el estudio de las variaciones nucleotídicas en las lecturas secuenciadas, comparándolas contra las bases de datos donde se incluyen secuencias externas al territorio con una identidad y cobertura superiores al 95% y amplificar otras regiones más informativas, como lo es el 18S del protozoario que se ha empleado en estudios en otros países (Bonnet, et al., 2014; Ghafar, et al., 2020 & Brinkmann, et al., 2019). En un futuro es necesario llevar a cabo una investigación que tenga por objetivo la determinación de una variabilidad genotípica de este parásito dado por los diferentes factores fenotípicos mencionados que permita establecer la razón de diferenciación de *Babesia* spp. en el Ecuador.

5. Conclusiones

Al alinear las lecturas secuenciadas detectadas para *B. bigemina* y *B. bovis*, se determina que los productos amplificados pertenecen a las regiones de interés perteneciente a *Babesia* spp. Los alineamientos con estos dos blancos se encuentran en proporciones similares lo que indica que las regiones, Spe1-Ava1 para *B. bigemina* y RAP1a en *B. bovis*, son muy conservadas.

Los datos obtenidos por la secuenciación de los amplicones de las regiones conservadas indican que las muestras detectadas por PCR pertenecen a *Babesia* spp, el flujo de trabajo permitió la extracción de 7 secuencias de *B. bigemina* y 228 de *B. bovis* que pertenecen al número de genotipos circulantes entre Sucumbíos, Napo y Orellana. Para la determinación de este protozoario en el Ecuador se ha mandado a secuenciar las muestras al exterior, pero no se lo ha hecho en nuestro territorio.

En el Ecuador existe una variabilidad genotípica propia de los diferentes pisos climáticos, aunque esta variabilidad permite generar una estructura a nivel de análisis filogenéticos. Otros factores fenotípicos como la raza de los hospedadores, la temporalidad en la toma de muestras, aspectos clínicos o la movilidad de ganado, podrían también influir a nivel de la presencia de genotipos detectados.

6. Recomendaciones

Se recomienda la amplificación de regiones más informativas, como el 18S, que permita determinar las variaciones genotípicas y otras especies, además correlacionar los genotipos circulantes con factores fenotípicos que permitan establecer la causa de divergencia de *Babesia* spp. en las regiones estudiadas. Para ello es importante familiarizarse con la plataforma de ONT y mejorar parámetros de calidad para el filtrado y extracción de secuencias únicas.

7. Reconocimientos

Las garrapatas de las cuales se extrajo el ADN para este estudio fueron facilitadas por el Centro de Investigación en Zoonosis (CIS) perteneciente a la Universidad Central del Ecuador mediante el convenio que existe entre las dos Instituciones.

Financiamiento/Fondos: Esta investigación recibió apoyo de la UISEK-Dii bajo el proyecto DII-P011617_2.

Agradecimientos: Centro de Investigación en Zoonosis (CIZ) perteneciente a la Universidad Central del Ecuador

Conflictos de Interés: Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Referencias citadas

1. Aguayo, G. P. (2018). *Seroprevalencia de Babesia bigemina en los cantones Río Verde, Quinindé y Eloy Alfaro de la provincia de Esmeraldas*. [Trabajo de Titulación para la obtención del título Médico Veterinario, Universidad San Francisco de Quito]. Repositorio Digital Universidad San Francisco de Quito. <https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/7284/1/138147.pdf>
2. Alvarez, J. A., Rojas, C., & Figueroa, J. V. (2019). Diagnostic Tools for the Identification of *Babesia* sp. in Persistently Infected Cattle. *Pathogens*, 8(3), 143. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030143>
3. Bonnet, S., Michelet, L., moutailler, S., Cheval, J., Hébert, C., Vayssier-Taussat, M., & Eloit, M. (2014). Identification of Parasitic Communities within European Ticks Using Next-Generation Sequencing. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 8(3). doi.org/ 10.1371/journal.pntd.0002753
4. Brinkmann, A., Hekimoğlu, O., Dinçer, E., Hagedorn, P., Nitsche, A., & Ergünay, K. (2019). A cross-sectional screening by next-generation sequencing reveals *Rickettsia*, *Coxiella*, *Francisella*, *Borrelia*, *Babesia*, *Theileria* and *Hemolivia* species in ticks from Anatolia. *Parasites Vectors*, 12(26). <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3277-7>
5. Chávez-Larrea, M. A., Cholota-Iza, C., Medina-Naranjo, V., Yugcha-Díaz, M., Ron-Román, J., Martín-Solano, Gómez-Mendoza, G., Saegerman, C., & Reyna-Bello, A. (2021). Detection of *Babesia* spp. in High Altitude Cattle in Ecuador, Possible Evidence of the Adaptation of Vectors and Diseases to New Climatic Conditions. *Pathogens*, 10(12), 1593. <https://doi.org/10.3390/pathogens10121593>
6. Endavant S.A. (2015). *Actualización del Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial 2014-2019*. Gobierno Autónomo Parroquial de García Moreno. https://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PORTAL_SNI/data_sigad_plus/sigadplusdocumentofinal/2260006660001_Consolidado%20GMoreno%20VersionFinal%2028oct15_30-10-2015_21-51-23.pdf
7. Figueroa, J. V., Chieves, L. P., Johnson, G. S., & Buening, G. M. (1993). Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Veterinary Parasitology*, 50, 69-81. <https://doi.org/10.1016/0304-4017>
8. Ghafar, A., Koehler, A. V., Hall, R. S., Gauci, C. G., Gasser, R. B., & Jabbar, A. (2020). Targeted Next-Generation Sequencing and Informatics as an Effective Tool to Establish the Composition of Bovine Piroplasm Populations in Endemic Regions. *Microorganisms*, 9(1). doi.org/10.3390/microorganisms9010021
9. Gioia, G.V., Vinueza, R. L., Marsot, M., Devillers, E., Cruz, M., Petit, E., Boulouis, H. J., Moutailler, S., Monroy, F., Coello, M. A., Gondard, M., Bournez, L., Haddad, N., & Zanella, G. (2018). Bovine anaplasmosis and tick-borne pathogens in cattle of the Galapagos Islands. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(5), 1262–1271. <https://doi.org/10.1111/tbed.12866>
10. GAD Parroquial Aguas Negras. (2015). *Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial 2014-2019*. Gobierno Autónomo Descentralizado Parroquial Aguas Negras. https://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PORTAL_SNI/data_sigad_plus/sigadplusdocumentofinal/2160058210001_PDOT%20AGUAS%20NEGRAS%20DEFINITIVO%20ULTIMO%20CAM-BIO_19-06-2016_09-37-21.pdf
11. Gohil, S., Herrmann, S., Günther, S., & Cooke, B. M. (2013). Bovine babesiosis in the 21st century: Advances in biology and functional genomics. *International Journal for Parasitology*, 43(2), 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.09.008>
12. Herrera, I. (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 Amazonía*. [Tesis de grado]. Universidad Central del Ecuador
13. Insuaste, E. (2021). *IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE Babesia bovis y B. bigemina EN GARRAPATAS Rhipicephalus (Boophilus) microplus DE LA REGIÓN NORTE AMAZÓNICA DEL ECUADOR*. [Tesis de maestría para optar por el título de Magíster en Biomedicina, Universidad Internacional SEK]. Repositorio Digital Universidad Internacional SEK. <https://repositorio.uisek.edu.ec/bitstream/123456789/4483/1/Insuaste%20Taipe%20Estefania%20Paola.pdf>
14. Itepro Consulting C.A. (2014). *Actualización del Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial de la Parroquia Gonzalo Díaz de Pineda*. <https://odsterritorioecuador.ec/wp-content/uploads/2019/04/PDOT-PARROQUIA-GONZALO-DIAZ-DE-PINEDA-2014-2019.pdf>
15. Kiselev, D., Matsvay, A., Abramov, I., Dedkov, V., Shipulin, G., & Khafizov, K. (2020). Current Trends in Diagnostics of Viral Infections of Unknown Etiology. *Viruses*, 12(2), 211. <https://doi.org/10.3390/v12020211>
16. Krause, P. J. (2019). Human babesiosis. *International Journal for Parasitology*, 49(2), 165–174. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.11.007>

17. Laha, R., Das, M., & Sen, A. (2015). Morphology, epidemiology, and phylogeny of *Babesia*: An overview. *Tropical Parasitology*, 5(2), 94. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.162490>
18. Lefterova, M. I., Suarez, C. J., Banaei, N., & Pinsky, B. A. (2015). Next-Generation Sequencing for Infectious Disease Diagnosis and Management. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 17(6), 623–634. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.07.004>
19. Lira-Amaya, J. J., Santamaria-Espinosa, R. M., Castañeda-Arriola, R. O., Martínez-García, G., Polanco-Martínez, D. J., Rojas-Martínez, C., Alvarez-Martínez, J. N., & Figueroa-Millán, J. V. (2022). Molecular Identification of *Babesia* spp. and *Anaplasma marginale* in Water Buffaloes in Veracruz and Tabasco, Mexico: A Retrospective Study. *Microorganisms*, 10(9), 1702. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091702>
20. Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2022). *Anexo 1 Seguro Ganadero de Acuerdo Ministerial No°095*. República del Ecuador. <https://www.agricultura.gov.ec/wp-content/uploads/2022/01/ANEXOS-123-SEGURO-GANADERO-3ENERO2022.pdf>
21. Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica. (s. f.). *MAE ejecuta proyecto sobre manejo de ganadería sostenible*. Gobierno de la República del Ecuador. Recuperado 14 de junio de 2022, de <https://www.ambiente.gov.ec/mae-ejecuta-proyecto-sobre-manejo-de-ganaderia-sostenible/#:%7E:text=En%20Ecuador%2C%20la%20ganader%3%ADa%20es,despu%3%A9s%20de%20la%20producci%3%B3n%20petrolera>
22. Niu, Q., Bonsergent, C., Guan, G., Yin, H., & Malandrín, L. (2013). Sequence and organization of the rhoptry-associated-protein-1 (rap-1) locus for the sheep hemoprotozoan *Babesia* sp. BQ1 Lintan (B. motasi phylogenetic group). *Veterinary Parasitology*, 198(1–2), 24–38. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.08.025>
23. Oxford Nanopore Technologies. (2016). *Nanopore sequencing. The advantages of long reads for genome assembly*. https://nanoporetech.com/sites/default/files/s3/white-papers/WGS_Assembly_white_paper.pdf
24. Oxford Nanopore Technologies. (2019). *Ligation sequencing amplicons - PCR barcoding (SQK-LSK109 with EXP-PBC001) Protocol*. https://id.customers.nanoporetech.com/app/nanoporetech-customers_myaccount_1/exk2kkmfwpBAaT3WI697/sso/saml?RelayState=https://community.nanoporetech.com/docs/prepare/library_prep_protocols/pcr-barcoding-amplicons/v/pbac12_9067_v109_rev14aug2019/pcr-barcoding-amplicons-cdna?devices=minion
25. Parola, P., & Raoult, D. (2001). Ticks and Tickborne Bacterial Diseases in Humans: An Emerging Infectious Threat. *Clinical Infectious Diseases*, 32(6), 897–928. <https://doi.org/10.1086/319347>
26. Petersen, L. M., Martin, I. W., Moschetti, W. E., Kershaw, C. M., & Tsongalis, G. J. (2019). Third-Generation Sequencing in the Clinical Laboratory: Exploring the Advantages and Challenges of Nanopore Sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(1). <https://doi.org/10.1128/jcm.01315-19>
27. Rodríguez-Pérez, H., Ciuffreda, L., & Flores, C. (2022). NanoRTax, a real-time pipeline for taxonomic and diversity analysis of nanopore 16S rRNA amplicon sequencing data. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 20, 5350–5354. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.09.024>
28. Rubio, S., Pacheco-Orozco, R. A., Gómez, A. M., Perdomo, S., & García-Robles, R. (2020). Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. *Universitas Médica*, 61(2). <https://doi.org/10.11144/javeriana.umed61-2.sngs>
29. Souza, L., Arias, A., Santos, F., Souza, P., & Rêgo, G. (2013). Bovine babesiosis and anaplasmosis complex: diagnosis and evaluation of the risk factors from Bahia, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 23(3), 328–336. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014064>
30. Spickler, A. (2018). Bovine Babesiosis. https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/bovine_babesiosis.pdf
31. van Dijk, E. L., Jaszczyszyn, Y., Naquin, D., & Thermes, C. (2018). The Third Revolution in Sequencing Technology. *Trends in Genetics*, 34(9), 666–681. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.05.008>
32. Vasco, K. (2012). *Estandarización de la técnica de análisis de fusión de alta resolución para la detección de Babesia en garrapatas utilizando polimorfismos de nucleótidos*. [Tesis de grado]. Universidad Central del Ecuador.
33. Vera, J. (2018). Prevalencia de Piroplasmosis (*Babesia bovis*) en bovinos de la parroquia Campozano del cantón Paján. [Tesis de grado]. Universidad estatal del Sur de Manabí.
34. Wang, Y., Zhao, Y., Bollas, A., Wang, Y., & Au, K. F. (2021). Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. *Nature Biotechnology*, 39(11), 1348–1365. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01108-x>