

Análisis epidemiológico y molecular de la Babesiosis por *Babesia bigemina* en bovinos del municipio Girón, Azuay, Ecuador

Molecular and epidemiological analysis of Babesiosis by *Babesia bigemina* in cattle from the Giron Municipality, Azuay, Ecuador

Jorge Gualberto Bustamante-Ordóñez^{1,3*} , Diego Andrés Bustamante-Guzmán² , Sergio Emiro Rivera-Pirela³ 

¹Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Cuenca, Ecuador.

²Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Químicas. Cuenca, Ecuador.

³Universidad del Zulia, Facultad de Ciencias Veterinarias. Zulia, Venezuela.

*Autor para correspondencia: jorge.bustamante@ucuenca.edu.ec

RESUMEN

La babesiosis, es una enfermedad causada por un protozoo intraeritrocitario del Phylum Apicomplexa, clase Sporozoea, subclase Piroplasmae, superfamilia Babesioidea, familia Babesidae, género *Babesia* dentro de las cuales destacan las especies *Babesia bovis* y *B. bigemina* en bovinos. Se presenta en los trópicos y sub trópicos del mundo y es transmitida por garrapatas *Rhipicephalus microplus*, principalmente. Las muestras de sangre completa se analizaron mediante frotis sanguíneos coloreados con Giemsa, PCR convencional para detectar, a partir del ADN en regiones variables del gen 18S rARN, la banda de 393 pb correspondiente a *B. bigemina*, sometida luego a la enzima de restricción Alu I (secuencia de reconocimiento 5'AG↓CT3'), capaz de cortar el amplicon ADN ribosomal de *B. bigemina* generando tres fragmentos de 38, 144 y 211 pb. Para la amplificación qPCR-RT, se utilizó el kit qPCR Primer Design específico para *B. bigemina*. Por punción en la vena yugular se obtuvieron 100 muestras de bovinos pertenecientes a las Unidades de Producción Agropecuaria (UPA) de dos niveles geomorfológicos menor a 2.200 msnm (bajo) y mayor a 2.200 msnm (alto), municipio Girón, callejón interandino de la República del Ecuador con ganado bovino Mestizo Holstein y Criollo, productores de leche. Se detectó la garrapata *R. microplus* en el 100 % de los animales evaluados. Con encuestas epidemiológicas se analizaron diferentes factores de riesgo locales asociados con la babesiosis bovina, según resultados obtenidos con cada una de las técnicas. Utilizando frotis sanguíneos se identificaron 16 muestras positivas a *B. bigemina*, 7,54 % en bajo y 25,53 % en alto. Por PCR-RFLP resultaron 11 positivas con 9,43 en bajo y 12,76 % en alto. La qPCR-RT mostró una prevalencia superior, del 43 % de *B. bigemina* con un 54,72 bajo y 29,79 % alto. La altitud se asoció significativamente con parasitemias en zonas altas según la técnica de Frotis coloreado con Giemsa. Diferentes resultados se obtuvieron con el kit qPCR, revelando parasitemias superiores en las zonas bajas, con carga baja de vectores, baños garrapaticidas con menos de 60 días y en la época de invierno, cuando se incrementó significativamente la presencia de *B. bigemina*.

Palabras clave: Epidemiología; niveles geomorfológicos; qPCR-RT; PCR-RFLP; babesiosis; factores de riesgo

ABSTRACT

Babesiosis is a disease caused by an intraerythrocytic protozoan Phylum Apicomplexa, class Sporozoea, subclass Piroplasmae, superfamily Babesioidea, family Babesidae, genus *Babesia* within which the species *Babesia bovis* and *B. bigemina* in cattle stand out. It occurs in the tropics and subtropics of the World and is transmitted mainly by *Rhipicephalus microplus* ticks. Whole blood samples were analyzed using Giemsa stained blood smears, conventional PCR to detect, from the DNA in variable regions of the 18S rRNA gene, the 393 bp band corresponding to *B. bigemina*, then subjected to the restriction enzyme Alu. I (5'AG↓CT3' recognition sequence), capable of cutting the ribosomal DNA amplicon of *B. bigemina*, generating three fragments of 38, 144 and 211 bp. For qPCR-RT amplification, the *B. bigemina*-specific Primer design qPCR kit was used. By jugular vein puncture, 100 samples of bovines belonging to the Agricultural Production Units (UPA) of two geomorphological levels less-than 2,200 masl (low) and greater-than 2,200 masl (high) were obtained, Girón Municipality, inter-Andean alley of the Republic from Ecuador with Holstein and Criollo Mestizo cattle that produce milk. The *R. microplus* tick was detected in 100% of the animals evaluated. With epidemiological surveys, different local risk factors associated with bovine babesiosis were analyzed, according to the results obtained with each of the techniques. Using blood smears, 16 of samples positive for *B. bigemina* were identified, 7.54% in low and 25.53% in high. By PCR-RFLP 11 with 9.43% low and 12.76% high. The qPCR-RT showed a higher prevalence of 43% of *B. bigemina* with 54.72% low and 29.79% high. Altitude was significantly associated with parasitemia in high areas according to the Giemsa-stained smear technique. Different results were obtained with the qPCR kit, which revealed higher parasitemia in low-lying areas, with low vector load, tick-killing baths less-than 60 days, and in the winter season, when the presence of *B. bigemina* increased significantly.

Key words: Epidemiology; geomorphological levels; qPCR-RT; PCR-RFLP; babesiosis; prevalence; risk factors

INTRODUCCIÓN

La babesiosis, es una enfermedad causada por un protozoo intraeritrocitario del Phylum *Apicomplexa*, clase *Sporozoa*, subclase *Piroplasma*, superfamilia *Babesioidae*, familia *Babesidae*, género *Babesia* dentro de las cuales destacan las especies *Babesia bovis* y *B. bigemina* en bovinos (Bos), como principales responsables de la enfermedad. Se presenta en los trópicos y sub trópicos del mundo y es transmitida principalmente por garrapatas *Rhipicephalus microplus* [1]. Sin embargo, algunos investigadores han identificado *Babesia* spp. en altitudes sobre 1.200 msnm. Para garrapatas *Ixodes* spp., se tienen registros de su presencia hasta 2.410 msnm. en Venezuela [2]. El cambio climático pudiera ser un elemento determinante en la distribución de las garrapatas. Otros factores, como el cambio de uso del suelo, así como la movilidad del ganado, pueden jugar un papel importante en la introducción de garrapatas a nuevas áreas y, por lo tanto, facilitar la introducción de la babesiosis bovina entre otras enfermedades [3, 4].

La provincia del Azuay, tiene 3 pisos altitudinales: 1) zona sierra, 2) zona de estribación y 3) zona costanera. En cada geomorfología, los tipos y objetivos de explotación bovina no son iguales debido a la presencia de climas y microclimas en cada uno de los niveles, con zonas de estabilidad enzoótica para babesiosis bovina [5]. En el municipio Girón, existen niveles que se consideran marginales o inhóspitos para la supervivencia de la garrapata, agente transmisor de la babesiosis [6]. Sin embargo, un estudio piloto realizado en esta zona, mostró casos de babesiosis producida por *B. bigemina* y la presencia del vector a 2.790 msnm.

La Babesiosis es una enfermedad que presenta considerables implicaciones patológicas en los animales domésticos y silvestres, donde quiera que existan las garrapatas, pero especialmente en los trópicos donde pueden llegar a causar grandes pérdidas económicas. *B. bigemina* y *B. bovis* son parásitos intraeritrocitarios obligados [7]. La transmisión es exclusivamente por garrapatas. *B. bovis* es transmitida únicamente por las larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, mientras que, *B. bigemina* es transmitido por las ninfas y los adultos y, posiblemente por machos. Por este motivo, el período de incubación de la babesiosis por *B. bovis* es más corto que en el caso de *B. bigemina* [7]. En América Latina, las pérdidas económicas registradas en zonas tropicales y sub tropicales están asociadas, principalmente a la infección del ganado bovino por *B. bovis* y *B. bigemina* [8]. En Brasil, los gastos por el control de las garrapatas y las enfermedades que transmiten, llegan a más de 2 billones USD anuales. En Colombia superan los 76.713 millones de pesos por año [9].

Los factores del hospedador asociados con la enfermedad incluyen la edad, la raza y el estado inmunitario [10]. Las razas de ganado *Bos indicus* suelen ser más resistentes a la babesiosis que las *Bos taurus*. Este es un resultado de la relación evolutiva entre el ganado *B. indicus*, la garrapata del género *B. microplus* y la babesia [11]. Así mismo, se ha reportado una relación, entre la época del año o la estación y la prevalencia de la babesiosis clínica, citándose una mayor incidencia ocurre poco después del pico de la población de garrapatas que suele ocurrir en la época de verano o más cálida [9]. De los factores climáticos, aire y temperatura son los más importantes por su efecto sobre la actividad de las garrapatas. Las temperaturas más altas aumentan su aparición. Las mayores pérdidas ocurren en áreas marginales donde la población de garrapatas es muy variable dependiendo de las condiciones ambientales [11]. La infección por babesia en el ganado mayormente alcanza su punto máximo en verano [12].

Se han descrito diferentes técnicas diagnósticas para babesiosis bovina. Generalmente, la primera opción es el frotis de sangre con tinción de Giemsa para demostrar microscópicamente la presencia y morfología del parásito [13]. Otra lo constituye los ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección diagnóstica de *Babesia* spp. La cual posee el potencial de proporcionar rápidamente resultados cualitativos con alta sensibilidad. La PCR-RFLP, con ayuda de cortes del ADN con enzimas de restricción (endonucleasas), permite diferenciar bandas características que permiten diferenciar claramente la *B. bovis* de la *B. bigemina* [1, 14]. Estos ensayos de PCR, tienen varias ventajas sobre las pruebas diagnósticas microscópicas y serológicas, dado que, se ha demostrado que la sensibilidad de estos ensayos para detectar babesiosis bovina es mayor que la de los métodos de detección microscópicas [15].

Otra técnica más novedosa la constituye la qPCR-RT o PCR en tiempo real cuantitativa, está es capaz de detectar parasitemias, cuando estas son extremadamente bajas, como ocurre en animales portadores y aislamientos diferenciadores [16, 17].

Los principales marcadores moleculares utilizados en la identificación de *B. bovis* y *B. bigemina* son: el gen BNMK, Bv80 Citocromo, BvVA1, gen citocromo b, Factor de elongación 1 α , msa-1, msa-2, RAP-1, CT-SPR, rARN y SBP 1-2-3. Su utilización en la detección de las babesias bovinas varía dependiendo de la región geográfica de estudio, el grado de conservación del gen y los resultados de estudios previos que concluyen su utilidad diagnóstica [18]. El gen ribosomal 18S rARN, denominado subunidad pequeña o SSU (del inglés "small ribosomal subunit"), es ampliamente utilizado para realizar estudios moleculares y filogenéticos entre miembros del phylum *Apicomplexa*, debido a que poseen regiones muy conservadas [19, 20, 21]. Tiene un alto nivel de sensibilidad, y reportes de identidad cercanos al 100 % [22, 23, 24, 25, 26]. Debido a la mayor sensibilidad, la qPCR-RT puede detectar parasitemias bajas o intermitentes que pueden escapar a la detección por otros métodos [27]. Actualmente en el mercado se encuentra a disposición un kit comercial qPCR TaqMan® para la detección y cuantificación de *B. bigemina* diseñado en base a los genes 18S rRNA de cepas americanas y asiáticas [15].

Con esta investigación esperamos obtener la prevalencia de la babesiosis por *B. bigemina* en bovinos de varios estratos geomorfológicos en el municipio Girón-Ecuador, utilizando tres métodos de diagnóstico (FROTIS, PCR-RFLP y qPCR-RT), determinar los factores de riesgo locales asociados con la presencia de *B. bigemina* y elaborar un mapa georreferenciado del Municipio con la distribución del parásito en los diversos pisos de altitud.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tamaño de la muestra y Características del rebaño a evaluar:

La población bovina del Cantón Girón, Ecuador, en la zona alta (más de 2.200 msnm) resulto ser de 4.900 animales, mientras en la zona baja (menos de 2.200 msnm), la cantidad de animales fue de 922; para un total de 5.822 cabezas de raza Holstein - Mestizo y Criollo de varias edades y grupos etarios para la fecha de la evaluación. Las fincas a ser evaluadas poseían un total de 798 animales, distribuidos de la manera siguiente: 103 toros, 286 vacas, 101 terneras, 99 terneros, 62 toretes y 147 novillas, ubicadas en la zona de influencia de la Universidad de Cuenca en el Municipio Girón, facilitando de esa manera el acceso al área y la toma de las muestras. La siguiente fórmula determinó la cantidad de muestras requeridas para establecer una prevalencia:

$$n = \frac{N \times Z_{\alpha}^2 \times p \times q}{d^2 \times (N - 1) + Z_{\alpha}^2 \times p \times q}$$

Donde:

n = tamaño de la muestra

Z = nivel de confianza (1,96)

p = probabilidad de éxito, o proporción esperada (0,0637)

q = probabilidad de fracaso (1 - 0,0637)

d = precisión del 5 %

El resultado de la muestra requerida considerando un nivel de confianza del 95 % y asumiendo un error del 5 % fue de 91, sin embargo, se trabajó con un total de 100 muestras.

$$n = \frac{5.822 \times 1,96^2 \times 0,0637 \times 0,9363}{0,05^2 \times (5.822 - 1) + 1,96^2 \times 0,0637 \times 0,9363} = 91$$

Por lo tanto, del total de los 798 animales antes descritos, se tomaron al azar 100 animales para ser sometidos a las pruebas diagnósticas de la *B. bigemina* (frotis coloreado con Giemsa, PCR convencional, PCR-RFLP y qPCR-RT).

Toma de la muestra

Por punción en la vena yugular se tomaron 5 mL de sangre en tubos impregnados con ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), a 100 bovinos pertenecientes a las Unidades de Producción Agropecuaria (UPA) de dos niveles geomorfológicos, menor a 2.200 msnm (bajo) y mayor a 2.200 msnm (alto), en el municipio Girón, localizado en el callejón interandino de la República del Ecuador. Los animales estudiados tenían características fenotípicas de ganado bovino Mestizo - Holstein (MH) y Criollo (C) productores de leche, FIG.1.

Las muestras de sangre completa se analizaron mediante frotis sanguíneos coloreados con Giemsa (tinción de Giemsa al 10 %



FIGURA 1. Bovino Criollo, positivo a *Babesia bigemina*, animal macho de 16 meses de edad, ubicado a 2.790 m.s.n.m., en el municipio de Girón en Ecuador, con signos compatibles a babesiosis bovina: fiebre alta (42,1°C), grados variables de hemólisis, anemia, inapetencia, debilidad, letargo, aumento de la frecuencia respiratoria y cardíaca. Movilidad: Diferencia de altitud 95 m

con solución salina tamponada con fosfato (PBS) a un pH 7,4). Se hicieron extensiones de sangre fresca obtenida por punción en la cola agujas estériles de doble bisel y ayuda de campana Vacutainer (BD Vacutainer®) y colocada en un tubo con anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). La sangre se mantuvo refrigerada a 5°C (Nevera Indurama, Dos P, Indurama, Ecuador), hasta que se envió al laboratorio. Las extensiones de sangre se secaron al aire, se fijaron en metanol absoluto durante 10-60 s, y se tiñeron con el colorante Giemsa al 10 % durante 15-30 min. Las extensiones de sangre se prepararon depositando una gota de sangre de unos 50 µL, sobre un porta objeto de vidrio limpio, extendiéndola sobre una pequeña área mediante un movimiento circular con la esquina de otro portaobjeto. Esta gota no se fijó con calor a 80°C durante 5 min. Luego se tiñó con tinción de Giemsa al 10 % [28].

Prueba PCR convencional

Protocolo de extracción de ADN de las muestras de sangre

A partir de sangre periférica, se realizó la extracción de ADN, según la metodología descrita por Martínez-Mercado y col. [29]. Extraído el ADN de las muestras, se cuantificó por espectrofotometría con el equipo Nano Drop 2000 (Thermo® Scientific, USA), se programó el equipo para cuantificación de ácidos nucleicos, se añadió la solución blanca y finalmente se pipeteó 2 µL de la muestra para medir la concentración y pureza de ADN. La verificación de la calidad e integridad del ADN se evaluó mediante electroforesis en geles al 1.2 % de agarosa, teñido con Bromuro de Etidio (MP biomedical®). Finalmente se digitalizó la foto con la ayuda de un foto-documentador (Transiluminador Bio Doc-It System®, Alemania).

Para la detección de babesias se realizó una PCR convencional utilizando como cebadores específicos: PIRO A (5'-TACCCAATCCTGACACACAGGG-3') y PIRO B (5'-TTAAATACACGAATGCCCCCAAC-3') [21, 28]. Estos amplifican parcialmente el gen 18S rARN de *Babesia* spp., mostrando una banda de aproximadamente 400 pb del ácido ribonucleico ribosómico de subunidad pequeña (SSU-rARN) de la mayoría de especies de *Babesia* [30]. La capacidad de los cebadores combinados PIRO-A y PIROB para discriminar especies de *Babesia* se analizó mediante un ensayo de PCR con el cual es posible distinguir *B. bovis*, *B. bigemina* y *B. microti* debido a que los productos amplificados muestran un polimorfismo de tamaño diferente de 390, 395 y 408 pb, respectivamente [31].

Se utilizó PCR convencional para detectar, a partir del ADN en regiones variables del gen 18S rARN, la banda de 395 pb correspondiente a la *B. bigemina*. Los reactivos y volúmenes de reacción utilizados y los ciclos de temperatura empleados en la amplificación PCR convencional se describen en la TABLA I. Luego de la desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, se aplicaron 40 ciclos (Desnaturalización: 94°C por 30 s, Alineación: 52°C por 40 s y Extensión final: 68°C por 5 min).

Ensayo PCR-RFLP de los productos PCR y visualización

Para este ensayo se utilizaron los productos amplificados PCR de 395 pb (almacenados a -20°C). Se adicionó a los productos PCR 1,5 µL de la enzima de digestión Alu I (Thermo Scientific 10 U·µL⁻¹) y 4 µL de Buffer Tango 10× con BSA (Thermo Scientific 1mL: 33 mM Tris-acetato (pH 7,9 a 37°C), 10 mM acetato de magnesio, 66 mM acetato de potasio, 0.1 mg·mL⁻¹ BSA). Mezclando con vortex por 6 a 7 s. Y para

TABLA I
Reactivos y volúmenes por reacción empleados para el proceso de amplificación

Reactivo	Concentración	Volumen por reacción
Agua grado molecular	No aplica	79,5 µL
Buffer de amplificación	10×	12,5 µL
Solución enhancer	10×	12,5 µL
MgSO ₄	50 mM	5 µL
dNTP's	10 mM c/u	2,5 µL
Oligonucleótido Bspp 18s For	µM	1 µL
Oligonucleótido Bspp 18s Rev	µM	1 µL
Enzima Pfx ADN polimerasa	2,5 U·µL ⁻¹	1 µL
Muestra de ADN total	ng·µL ⁻¹	10 µL

el control negativo se adicionó 5 µL de agua grado biología molecular en un tubo para PCR.

Se colocó en la incubadora bacteriológica (Selecta, 3000957, Selecta, España) para la reacción de ligación por 1 a 2 horas a 37°C. Concluido el proceso de digestión, se procedió a realizar la electroforesis en gel de agarosa al 1,2 % (Invitrogen, N° cat; 16500-500), siguiendo el procedimiento descrito en el punto anterior. En cada muestra se añadieron 3 µL de buffer de carga (40 mM de Tris-acetato, 1 mM de EDTA)(Sigma, N° cat: T4661, A6283, EDS, S8045) y se mezcló mediante vortex por 6 s. En los pocillos del gel se colocaron 18 µL de cada muestra, 5 µL de control negativo y 5 µL de marcador de peso molecular para ADN. Sellada correctamente, la cámara de electroforesis se conectó a la fuente de poder ajustando el voltaje a 80V por 1 hora. Una vez terminado el proceso se realizó la visualización correspondiente. En el caso del ensayo PCR-RFLP, la enzima de restricción Alu I con su secuencia de reconocimiento 5' AG↓CT 3'; 3' TC↑GA 5', corta los amplicones de ADN de *B. bigemina* en fragmentos aproximadamente de 38, 144 y 211 pb, [31] FIG.2.

La técnica PCR en tiempo real (qPCR-RT)

Amplifica y cuantifica un fragmento de ADN específico. El ADN amplificado se cuantifica a medida que se genera (en "tiempo real"), por lo que determina si una secuencia específica presente en la muestra y también determina el número de copias de esa secuencia. No se requiere análisis post-PCR, por lo tanto, es más rápida y no

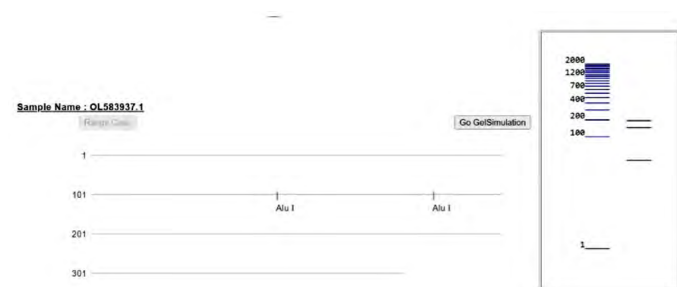


FIGURA 2. Fragmentos resultantes de la digestión enzimática con Alu I del ADN ribosomal de Babesia: A. Babesia bigemina; fragmentos de 38, 144 y 211 pb. Reporte cepa OL583937.1 de la U Cuenca; Lab. Biogen, Ecuador

genera gastos por análisis electroforéticos o fotodocumentación (Bio Rad, Model: Gel Doc XR+, USA)[17, 32].

Para la amplificación en tiempo real (qPCR-RT) se utilizó el kit comercial qPCR Primerdesign para *B. bigemina* [16]. Con la introducción del método de qPCR se ha logrado la detección de ganado portador infectado con *B. bovis* y *B. bigemina*, especialmente con un límite inferior de detección de 0,0000001 % de glóbulos rojos infectados circulantes por mililitro (IRBC·mL⁻¹) [33], mejorando el diagnóstico de la babesiosis bovina y permitiendo cuantificar los niveles de infección en animales portadores, con una alta sensibilidad, especificidad y precisión analítica [15, 16, 25].

Factores de riesgo

Con encuestas epidemiológicas se determinaron los factores de riesgo (FR) siendo las más importantes: altitud (msnm.): menos de 2.200 y mas de 2.200 msnm, movilidad (mts): menos de 350 y más de 350 mts, raza: criollo o mestizo, sexo: macho o hembra, edad: menos de 12 o mayor a 12 meses, carga del vector: Baja (menor a 50·animal⁻¹) o alta (mayor a 50·animal⁻¹), frecuencia de baños garrapaticidas: menor a 60 o mayor a 60 días y época de año: verano e invierno. Para identificar el número de garrapatas se revisó el lado izquierdo de los animales utilizando los métodos visuales indirecto, palpatorio y visual directo de forma secuencial en cada animal [9].

Georreferenciación

La distribución de los casos positivos por intervalos de altitud se calculó aplicando la regla de Sturges creada en 1926 por el estadístico alemán Herbert Sturges según la fórmula $c = 1 + \log_2(N)$, donde c es el número de clases o intervalos y N es el número total de observaciones de la muestra [34].

Finalmente se diseñó y se elaboró un mapa georreferenciado del municipio Girón, Azuay, Ecuador en el cual se reseñaron gráficamente los casos de animales positivos a *B. bigemina* por niveles geomorfológicos, fundamentados en resultados con las técnicas de Frotis coloreado con Giemsa, PCR-RFLP y qPCR-RT.

Análisis estadísticos

Se utilizó un diseño no experimental en el cual la presencia de *Babesia* spp. fue evidenciada en un total de 100 animales, cada uno monitoreado mediante frotis coloreados con Giemsa, PCR convencional, PCR-RFLP (variables cualitativas) y qPCR-RT (Variables cuali-cuantitativas), de acuerdo al cálculo estadístico del tamaño de la muestra. Los resultados positivos para *Babesia* spp. obtenidos por pruebas moleculares fueron discriminados mediante la presencia de bandas amplificadas, mientras que los resultados negativos por la ausencia de bandas. Se utilizaron pruebas no paramétricas para variable de respuesta cualitativas. La prueba estadística para determinar si existía asociación entre los factores de riesgo fue el Ji cuadrado. Como variables se obtuvieron la presencia y prevalencia del agente patógeno en cuestión. Los errores generados en la investigación fueron generados únicamente por los factores ambientales y/o errores del operador.

Los análisis realizados en la investigación fueron analizados mediante el software estadístico Microsoft Excel y SPSS. Los datos generados en los registros y encuestas, además de los datos obtenidos en el laboratorio arrojaron distribuciones de frecuencias y

medidas de tendencia central. Los datos de prevalencia se calcularon con la fórmula:

$$Prevalencia\ puntual = Ct/Nt$$

De dónde: *Ct* = número de casos positivos para *Babesia* spp. y *Nt* = número total de animales muestreados en la población.

La prevalencia de los patógenos en esta investigación se la calculó mediante los resultados de cada una de las técnicas utilizadas para el diagnóstico. Gracias a los datos que arrojó la estadística descriptiva se llevaron a cabo pruebas de Ji cuadrado (nivel de significancia $P < 0,05$) para comparar la prevalencia de *Babesia* spp. con los factores de riesgo evaluados.

Para los FR se utilizó la medida epidemiológica Odds Ratio (OR) en función de los registros y encuestas realizadas cotejadas con las pruebas de laboratorio, donde se detallaron ciertos FR que podrían influir en la presencia o no de *Babesia* spp. La presente investigación es un estudio de tipo transversal. la fuerza de asociación entre el factor de riesgo y la presentación del evento (OR) se calculó mediante la fórmula siguiente: $OR = A \times d/b \times C$ (Asociación con daño o riesgo de infección cuando $OR > 1$). Se utilizó el modelo logístico de regresión para determinar los intervalos de confianza para los OR. La oportunidad de riesgo del factor aumenta o disminuye en función de que el intervalo de confianza sea mayor o menor a 1, respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las garrapatas encontradas en este estudio presentaron características taxonómicas de *R. microplus*, según se reseña en el catálogo de garrapatas publicado por Universidad de El Salvador, Facultad de Ciencias Agronómicas, Departamento de Medicina Veterinaria. Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) y la Red de Laboratorios Veterinarios de ese país [35] FIG. 3.

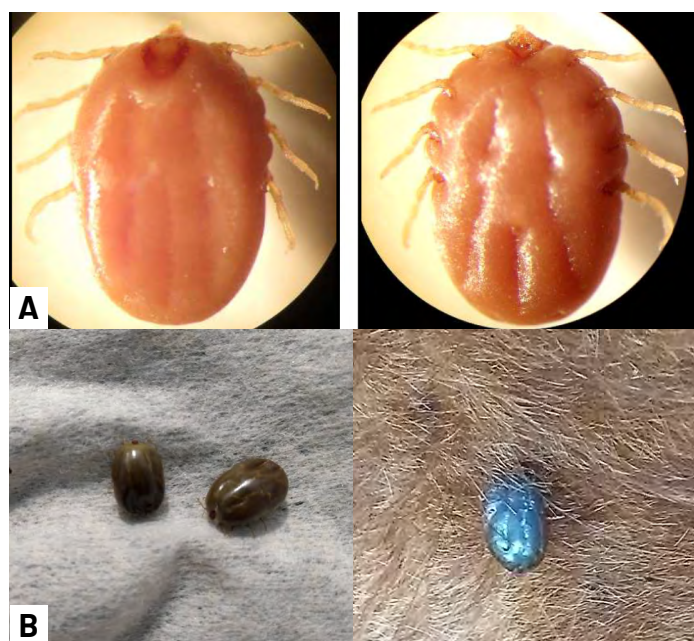


FIGURA 3. A: *Rhipicephalus microplus*. Vista dorsal; FUENTE: Universidad de El Salvador, adaptado de Canestrini, 1877. B: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Vista dorsal de garrapatas tomadas de bovinos ubicados a 2.810 msnm en el municipio de Girón en Ecuador

Las garrapatas estuvieron presentes en todos los animales evaluados con recuentos de menos de 50 a más de 50 ejemplares por animal, En las zonas baja (menor a 2.200 msnm), no hubo diferencias entre ambos intervalos. En la zona alta (mayor a 2.200 msnm), por el contrario, prevalecieron los recuentos menores a 50 ejemplares por animal, TABLA II.

TABLA II
Recuento de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestando bovinos del municipio Girón, Azuay en intervalos bajos y altos

	Intervalo (msnm)	Recuento de garrapatas		Total
		(< 50-animal ⁻¹)	(> 50-animal ⁻¹)	
Número de animales	< 2.200	29	24	53
	> 2.200	43	4	47
Total		72	28	100
		72,0%	28,0%	100,0%

Se pudo corroborar la presencia de la garrapata *R. microplus* en altitudes mayores a 2.200 msnm [35]. Posiblemente en esta zona alta la temperatura ambiental influyó en el proceso de adaptación de la garrapata donde la fase de desarrollo puede extenderse (120 días) a temperaturas de 18°C [35].

Benavides-Ortiz y col. [36], reportó recientemente la primera caracterización molecular de *B. bigemina* y *B. bovis* en Ecuador. Siendo está también la primera evidencia de *Babesia* spp. en bovinos de la zona de Quito a una altitud de 2.469 msnm., siendo la mayor altitud reportada para animales con babesiosis y para la garrapata *R. microplus* en este país. Estos Autores, indicaron que los factores climáticos, así como la movilidad de los animales portadores de garrapatas, sin ningún tipo de control, permitieron la presencia de brotes de Babesiosis en esas nuevas áreas geográficas. A la ciudad de Quito llegan bovinos provenientes de diversas regiones del país para ser faenados en centros de sacrificio, muchos de ellos portadores de ectoparásitos. Esta movilidad sin control puede introducir garrapatas a los pastos ocasionalmente, provocando una inestabilidad enzoótica para estos hemoparásitos.

Utilizando frotis sanguíneos coloreados con Giemsa se identificaron en promedio 16 % de muestras positivas a *B. bigemina*, 7,54 %, ubicación menor a 2.200 msnm y 25,53 %, ubicación mayor a 2.200 msnm. El mayor número de positivos se ubicó entre los niveles 2.083-2.350 msnm, FIG. 4, TABLA III.

Por PCR-RFLP, la prevalencia se ubicó en un 11 % TABLA III. En la FIG.5 se observan los resultados de la electroforesis en gel agarosa al 1,2 %, en los pocillos 40 y 61 mostrando la banda en 393 pb correspondiente a la *B. bigemina*. En el extremo derecho de la misma figura se encuentra el marcador de peso molecular, mismo que sirve de guía para determinar el sitio de amplificación, siendo las bandas más intensas consideradas como positivas.

Mediante el ensayo RFLP se realizó la digestión enzimática empleando la enzima de restricción Alu I del fragmento de 393 bp obtenido por PCR convencional, confirmando así, como positivas las 11 muestras reaccionante con el PCR convencional, mostrando dos de los tres fragmentos esperados de 144 pb y 211 pb para *B. bigemina*. En

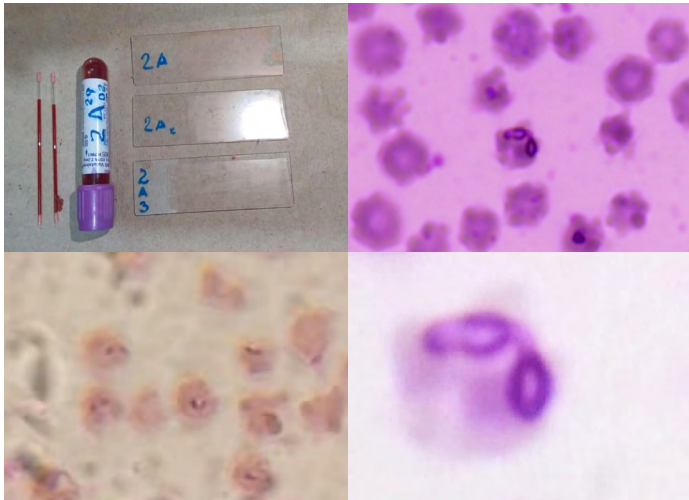


FIGURA 4. Frotis sanguíneo coloreado con Giemsa mostrando glóbulos rojos infectados con *B. bigemina*

TABLA III

Prevalencias de *Babesia bigemina* por niveles altitudinales establecidas con las técnicas de frotis Giemsa, PCR-RFLP y qPCR-RT

Técnicas	Frotis Giemsa		PRC-RFLP		qPCR-RT		Número de muestras
	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	
Intervalos (msnm)							
< 2.200	4 (7,54%)	49 (92,45%)	5 (9,43%)	48 (90,56%)	29 (54,72%)	24 (45,28%)	53
> 2.200	12 (25,53%)	35 (74,46%)	6 (12,76%)	41 (87,23%)	14 (29,79%)	33 (70,21%)	47
Total	16	84	11	89	53	47	100
%	16%	84%	11%	89%	53%	47%	100%

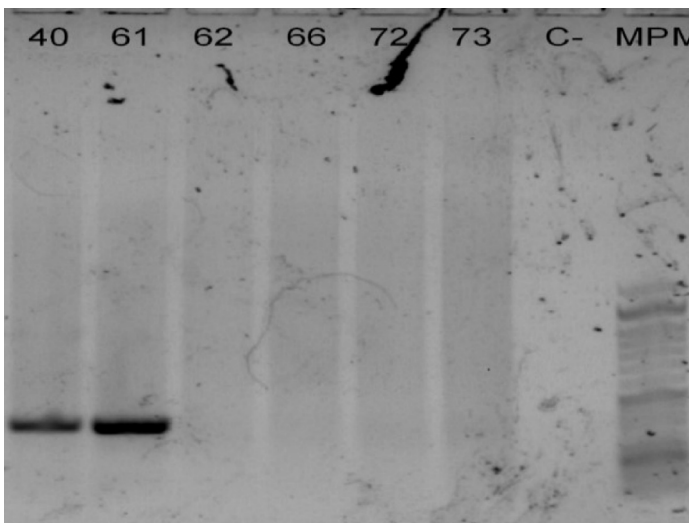


FIGURA 5. Electroforesis de los productos PCR para *Babesia bigemina* 393pb. Carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7; muestras 40 (positiva), 61(positiva), 62, 66, 72, 73 (negativas); respectivamente. Carril C- control negativo. Carril MPM Marcador de peso molecular de 100pb

la FIG.6 se muestran los resultados de la electroforesis en gel agarosa al 1,2 %, en los pocillos 46, 54 y 82 revelando las bandas de 211 pb y 144 pb, confirmatorias de la *B. bigemina*. En el extremo derecho de la misma figura se encuentra el marcador de peso molecular, mismo que sirve de guía para determinar el sitio de amplificación, siendo las bandas más intensas consideradas como positivas.

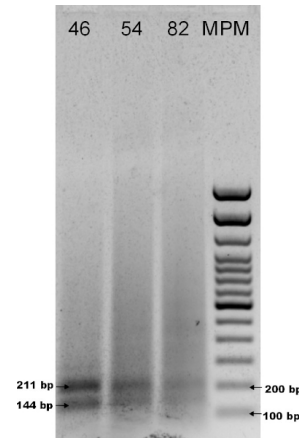


FIGURA 6. Digestión enzimática con la enzima Alu I. Se indica los fragmentos 144 pb y 211 pb para *Babesia bigemina*. Carriles 1, 2, 3 muestras 46, 54 y 82, respectivamente. Carril MPM marcador de peso molecular de 100 pb. *El fragmento de 38 pb esperado no se observó en el gel

Con el diagnóstico molecular PCR-RFLP, la prevalencia total se ubicó igualmente en 11%. En 53 animales en el nivel menor a 2200 msnm, se obtuvo una prevalencia de 9,43% y en 47 animales del nivel mayor a 2.200 msnm, la prevalencia se ubicó en 12,76%, TABLA III. Mientras que con el método qPCR-RT se obtuvo una prevalencia del 43% de *B. bigemina* con un 54,72% en el nivel menor a 2.200 msnm y 29,79% en el nivel mayor a 2.200 msnm., la cual superó en mucho los resultados obtenidos con las técnicas de frotis directo en sangre coloreado con Giemsa y PCR-RFLP, TABLA III.

En la FIG. 7 y TABLA IV se muestran las curvas de amplificación de las muestras y sus respectivos valores Cq oscilando entre 15,7 y 34,5, dando como resultado un total de 43 positivas, y cuyos valores individuales se detallan en la TABLA V.

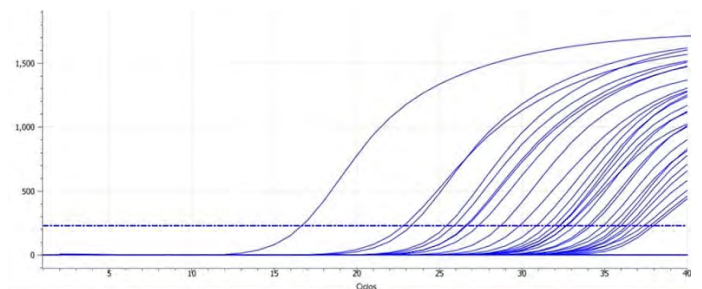


FIGURA 7. Nivel de umbral y valor de Cq en una curva de amplificación por muestra donde se indica cuantos ciclos se necesitaron para detectar el aumento de la fluorescencia. Los valores más bajos de Cq indican cantidades altas de la secuencia, mientras que los valores más altos significan cantidades bajas del ácido nucleico. De acuerdo con las instrucciones del kit Primer Design, una curva de tipo S con Cq \leq 35 representa un resultado positivo.

TABLA IV
Resultado de la Técnica qPCR-RT para diagnóstico *Babesia bigemina* (Intervalo Positividad Cq: 15-35) y Parasitemia

N° Muestra	2	7	9	10	11	14	15	22	23	24	25	27	28	30	31
Cq	34,5	27,0	30,9	34,2	32,0	34,3	26,6	31,5	31,0	22,8	27,0	25,4	32,2	31,6	32,1
Copias:µL ⁻¹	10 ²	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ³	10 ²	10 ⁵	10 ³	10 ³	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁵	10 ³	10 ³	10 ³
N° Muestra	32	33	34	35	42	43	46	47	53	55	56	57	58	59	60
Cq	26,7	27,3	33,2	29,1	30,6	33,2	15,7	31,9	29	31,9	30,6	28,7	32	25	28,9
Copias:µL ⁻¹	10 ⁵	10 ⁴	10 ²	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ⁷	10 ³	10 ⁴	10 ³	10 ³	10 ⁴	10 ³	10 ⁵	10 ⁴
N° Muestra	64	66	67	68	71	74	77	78	79	80	90	92	96		
Cq	32,4	29,2	27,3	32,2	23,3	32,6	30,9	25,9	32,3	29,9	32,7	33,9	25,3		
Copias:µL ⁻¹	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ³	10 ⁵	10 ³	10 ³	10 ⁴	10 ³	10 ³	10 ²	10 ²	10 ⁴		

Las muestras positivas a *B. bigemina* presentaron un Cq entre 15,7 y 34,5, con un mayor rango de valores de parasitemia estimado entre 10² y 10⁷ copias·µL⁻¹, TABLA IV, ubicándose la mayoría de las muestras (18 muestras) en parasitemias de 10³ copias·µL⁻¹, TABLA V, su mayoría ubicadas a menos de 2.200 msnm, TABLA VI.

(OR > 1 y P<0,05) relacionadas con daño, con las altitudes mayores a 2.200 msnm, las cuales coincidieron con mayor número de animales con parasitemias bajas en esas zonas. Otros factores asociados a daño fueron la carga alta de vectores (más de 50 garrapatas por animal) frecuencias de baños garrapaticidas menos de 60 días y en la época de verano, los cuales propiciaron incremento significativo de la presencia de *B. bigemina* en las zonas bajas del municipio Girón, TABLA VII.

TABLA V
Grado de parasitemia a *Babesia bigemina* según cantidad de muestras evaluadas

Copias·µL ⁻¹	N° de muestras positivas
10 ²	7
10 ³	18
10 ⁴	9
10 ⁵	7
10 ⁶	1
10 ⁷	1
Total	43

TABLA VII
Asociación de la infección con *Babesia bigemina* y diversos factores de riesgo en el municipio Girón, Azuay, Ecuador evaluados con la técnica qPCR-RT

Factores Asociados	Intervalos	Intervalo de confianza al 95%		gl	P-value	Odds Ratio	
		Inferior	Superior				
Altitud	< 2.200 msnm	1,096	2,885	1	0,015	2,65	Sig.
Carga Vector Alta	> 50 garrapatas / animal	1,016	1,754	1	0,023	1,21	Sig.
Época del Año	Verano	1,081	3,410	1	0,014	2,81	Sig.
Frecuencia - Baños	> 60 días	1,539	7,488	1	0,010	5,55	Sig.

Estos niveles de parasitemia son característicos de bovinos portadores de estos hemoparásitos en áreas endémicas [26, 37, 38], por lo que pueden ser suficientes para la infección de las garrapatas que se alimentan de estos animales infectados, permitiendo así la transmisión biológica de estos protozoos desde los animales portadores, sin embargo, la infecciosidad de estos huéspedes debe analizarse, según los autores, en futuras investigaciones [39].

Solo la técnica de qPCR-RT permitió asociar los factores de riesgo a la infección con *B. bigemina*, mostrando asociaciones significativas

Estos factores deben ser tomados en cuenta por el Médico Veterinario y el productor, en el momento de plantearse un programa de control de la babesiosis bovina que incluya monitoreo para el diagnóstico de *B. bigemina* en las zonas bajas del municipio, donde se ubican la mayor cantidad de animales positivos con bajas parasitemias, característica de las zonas con estabilidad enzootica. La alta carga de vectores debe ser controlada una frecuencia de baños garrapaticidas mayor a 60 días de intervalo para evitar la esterilización del vector, especialmente en la época de verano cuando se incrementan las cifras de animales positivos a *Babesia*.

TABLA VI
Resultado de la técnica qPCR-RT para diagnóstico *Babesia bigemina* según niveles de altitud

Altitud	Parasitemia (N° copias·µL ⁻¹)					
	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷
< 2.200 msnm	4	12	6	5	2	1
> 2.200 msnm	3	6	3	2	0	0

Las técnicas moleculares se utilizan cada vez más para diagnosticar enfermedades, principalmente por su alta sensibilidad y especificidad [16, 30, 33]. Sin embargo, las pruebas de PCR convencionales solo permiten la detección cualitativa de la infección y requieren concentraciones importantes del ADN parasitario. Por el contrario, la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real supera estos límites;

además de ofrecer una opción diagnóstica más sencilla y eficiente, permitiendo cuantificar el número de copias de fragmentos de ADN de *Babesia* spp., detectando concentraciones de hasta 10^2 copias- μL^{-1} , partiendo de muestras extraídas directamente de sangre bovina. Utilizando esta técnica, se reportaron diferencias significativas en los niveles de infección por *B. bovis* en animales de diferentes edades y grupos genéticos (*Bos taurus* y *Bos indicus*) [40].

La FIG. 8 muestra en un mapa georreferenciado del municipio Girón, Azuay, Ecuador, la ubicación de los casos de *B. bigemina* detectados a partir de 100 muestras de bovinos en varios niveles de explotación pudiéndose apreciar que la mayoría de los animales infectados se encuentran por debajo de los 2.200 msnm. Para la elaboración de este mapa georreferenciado se utilizaron los resultados obtenidos según las reglas de Sturges de la distribución de muestras positivas a *B. bigemina* por técnica e intervalos de altitud. La mayoría de las técnicas coinciden en que el mayor número de animales positivos a *B. bigemina* se encuentran en el intervalo 2.083–2.350 msnm, TABLA VIII.

TABLA VIII
Muestras positivas a *Babesia bigemina* detectadas por las técnicas de frotis Giemsa, PCR-RFLP y qPCR-RT según intervalos de altitud calculados bajo reglas Sturges

Técnicas	Frotis con Giemsa		PCR-RFLP		qPCR-RT		Total muestras
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	
Intervalos (msnm)							
1.010–1.278	4	0	4	0	2	2	4
1.547–1.814	2	0	2	0	0	2	2
1.815–2.082	11	2	11	2	7	6	13
2.083–2.350	42	9	43	8	29	22	51
2.351–2.618	12	2	13	1	11	3	14
2.619–2.886	13	2	15	0	7	8	15
2.887–3.154	0	1	1	0	2	2	1
Total	84	16	89	11	57	43	100
	84%	16%	89%	11%	57%	43%	100%

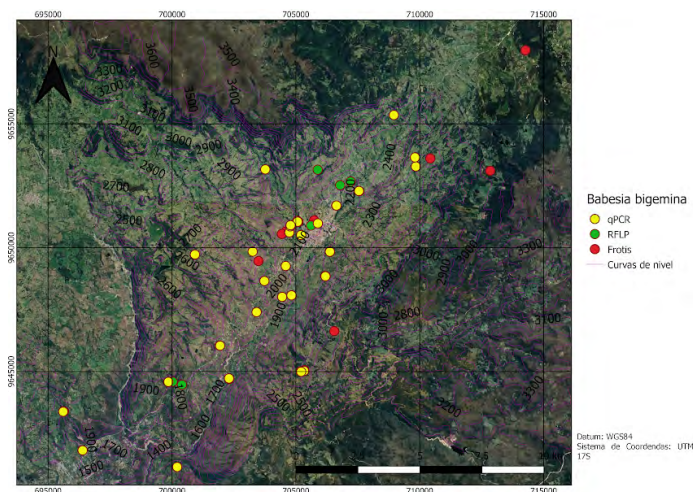


FIGURA 8. Georreferenciación municipio Girón, Ecuador. Casos *Babesia bigemina* en bovinos confirmados por Frotis coloreados con Giemsa, PCR-RFLP y RT-PCR

CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

Fue confirmada la ubicación de garrapatas *R. microplus* infestando bovinos en altitudes mayores a 2.200 msnm en el municipio Girón de la provincia de Azuay Ecuador, provenientes de zonas bajas con infestaciones mayor a 50 y menor a 50 garrapatas por animal. Las zonas altas muestran mayor cantidad de animales con baja carga de garrapatas característico de zonas con inestabilidad enzoótica.

Con las técnicas de frotis sanguíneo coloreado con Giemsa y PCR-RFLP no fue posible diagnosticar un alto porcentaje de animales infectados con *B. bigemina* en las zonas bajas con relativa estabilidad enzoótica. Utilizando qPCR-RT, por el contrario, se lograron diagnosticar en la zona baja, un mayor número de animales positivos a *B. bigemina*, aunque con una baja parasitemia ($10^2 - 10^3$ copia- μL^{-1}). La presencia de *B. bigemina* se asoció además con carga alta de vectores de más de 50 garrapatas por animal, frecuencia de baños garrapaticidas menor a 60 días y en la época de verano, cuando se incrementó significativamente la presencia de *B. bigemina*, ubicándose la prevalencia general real del municipio Girón en 43 %.

Queda demostrado que la técnica qPCR-RT amplifica y cuantifica fragmentos de ADN específicos de *B. bigemina*. Es más rápida, directa y no se requieren análisis electroforéticos o fotodocumentación posteriores, simplificando el trabajo de laboratorio con un análisis más sensible y específico.

La presencia de la *B. bigemina* y su trasmisor la garrapata *R. microplus*, se encuentran presentes a todos los niveles del territorio ocupado por el municipio Girón de la provincia de Azuay en Ecuador en sus diferentes niveles geomorfológicos.

Se recomienda aplicar las técnicas moleculares de qPCR-RT para reevaluar las prevalencias de animales infectados con *Babesia* con técnicas tradicionales, como frotis sanguíneo e inclusive PCR-RFLP, previamente publicadas para otras regiones del Ecuador, con el fin de poder ajustar los números de pérdidas y lograr así tomar las medidas necesarias de control en los bovinos afectados con babesias. Igualmente, se hace necesario genotipificar las cepas de *B. bigemina* aisladas de la zona y hacer los estudios epidemiológicos moleculares comparativos con el resto de las cepas ya secuenciadas y registradas en el Ecuador.

Conflictos de interés

Los autores declaran, que no existe conflicto de intereses, en el presente trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] Carter PD, Rolls P. Babesiosis in Animals. En: MSD Veterinary Manual [Internet]. Rahway, NJ, EUA: Merck & Co; 2022 [Consultado 24 Jun. 2023]. Disponible en: <https://goo.su/Cn9YzT>
- [2] Durden LA, Keirans JE. Description of the Larva, Diagnosis of the Nymph and Female Based on Scanning Electron Microscopy, Hosts, and Distribution of Ixodes (Ixodes) venezuelensis. Med. Vet. Entomol. [Internet]. 1994; 8(4):310–316. doi: <https://doi.org/bw7d8x>
- [3] Ogden NH, Ben-Beard C, Ginsberg HS, Tsao JI. Possible Effects of Climate Change on Ixodid Ticks and the Pathogens They Transmit: Predictions and Observations. J. Med. Entomol. [Internet]. 2021; 58(4):1536–1545. doi: <https://doi.org/gm662q>

- [4] Yang W, Kang X, Yang Q, Lin Y, Fang M. Review on the development of genotyping methods for assessing farm animal diversity. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* [Internet]. 2013; 4(2):1-6. doi: <https://doi.org/gh2thx>
- [5] Ministerio de Agricultura y Ganadería, III Censo Nacional Agropecuario. Volumen 1 [Internet] Quito: Instituto Nacional de Estadística y Censos; 2002 [Consultado 28 Sep. 2022]; 57 p. Disponible en: <https://goo.su/A6vH>
- [6] Universidad de Cuenca, GAD Municipal de Girón. Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial del Cantón Girón (2015–2019). Tomo I. Diagnóstico medio físico [Internet]. 2021 [Consultado 3 Ago. 2021]; Cap. 2.1. p. 2.1.1–2.1.96. Disponible en: <https://goo.su/5UdkAjT>
- [7] Organización Mundial de Sanidad Animal. Babesiosis bovina. En: OMSA, editor. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres [Internet]. Paris: OMSA; 2023 [Consultado 3 Abr. 2023]. 18 p. Disponible en: <https://goo.su/rNE3ij>
- [8] El-Ashker M, Hotzel H, Gwida M, El-Beskawy M, Silaghi C, Tomaso H. Molecular biological identification of *Babesia*, *Theileria*, and *Anaplasma* species in cattle in Egypt using PCR assays, gene sequence analysis and a novel DNA microarray. *Vet. Parasitol.* [Internet]. 2015; 207(3–4):329–334. doi: <https://doi.org/f6zhvv>
- [9] Cortés-Vecino JA, Betancourt-Echeverri JA, Argüelles-Cárdenas J, Pulido-Herrera LA. Distribución de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en bovinos y fincas del Altiplano Cundiboyacense (Colombia). *Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu.* [Internet]. 2010; 11(1):73–84. doi: <https://doi.org/mrg9>
- [10] Jabbar MA, Deekshatulu BL, Chandra P. En: Snášel V, Abraham A, Krömer P, Pant M, Muda A, editors. Innovations in Bio-Inspired Computing and Applications. Advances in Intelligent Systems and Computing [Internet]. Vol. 424. New York: Springer International Publishing; 2016. p 187–196. doi: <https://doi.org/mrh9>
- [11] Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. *Veterinary Medicine: A textbook of Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats.* Philadelphia: Saunders LTD; 2007. 2180 p.
- [12] Hazem EM, Ebied MH, Mohamed GA, Amr Abdel AE. Epidemiological studies on bovine Babesiosis and Theileriosis in Qalubia Governorate. *Benha Vet. Med. J.* [Internet]. 2014 [consultado 28 Ago. 2023]; 27(1):36–48. Disponible en: <https://goo.su/M3R230>
- [13] Altay K, Aydin MF, Dumanli N, Aktas M. Molecular detection of *Theileria* and *Babesia* infections in cattle. *Vet. Parasitol.* [Internet]. 2008; 158(4):295–301. doi: <https://doi.org/bftwc8>
- [14] Kadry K. Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. En: Nagpal ML, Boldura OM, Baltă C, Enany S, editors. *Synthetic Biology – New Interdisciplinary Science* [Internet]. Londres: IntechOpen; 2019. 17 p. doi: <https://doi.org/mrj9>
- [15] Kim C, Iseki H, Herbas MS, Yokoyama N, Suzuki H, Xuan X, Fujisaki K, Igarashi I. Development of TaqMan-based real-time PCR assays for diagnostic detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* [Internet]. 2007; 77(5):837–841. doi: <https://doi.org/mrj9>
- [16] Buling A, Criado-Fornelio A, Asenzo G, Benitez D, Barba-Carretero JC, Florin-Christensen MA. A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Vet. Parasitol.* [Internet]. 2007; 147(1–2):16–25. doi: <https://doi.org/dmg6wd>
- [17] Giglioti R, Oliveira HN, Santana CH, Ibelli AMG, Néo TA, Bilhassi TB, Rabelo MD, Machado RZ, Brito LG, Oliveira MCS. *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection levels estimated by qPCR in Angus cattle from an endemic area of São Paulo state, Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.* [Internet]. 2016; 7(5):657–662. doi: <https://doi.org/f8xt3c>
- [18] Ríos S, Ríos LA. Principales marcadores moleculares utilizados para la identificación de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*. *Rev. MVZ Córdoba.* [Internet]. 2011; 16(2):2470–2483. doi: <https://doi.org/mrjq>
- [19] Allsopp MTEP, Visser ES, du Plessis JL, Vogel SW, Allsopp BA. Different organisms associated with heartwater as shown by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. *Vet. Parasitol.* [Internet]. 1997; 71(4):283–300. <https://doi.org/dv9b5v>
- [20] Allsopp MT, Allsopp BA. Molecular sequence evidence for the reclassification of some *Babesia* species. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* [Internet]. 2006; 1081(1):509–517. doi: <https://doi.org/ctkv9t>
- [21] Carret C, Walas F, Carcy B, Grande N, Précigout É, Moubri K, Schettters TP, Gorenflot A. *Babesia canis canis*, *Babesia canis voaeli*, *Babesia canis rossi*: Differentiation of the Three Subspecies By A Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis On Amplified Small Subunit Ribosomal Rna Genes. *J. Eukaryot. Microbiol.* [Internet]. 1999; 46(3):298–303. doi: <https://doi.org/drjrcd>
- [22] Adham FK, Abd-El-Samie EM, Gabre RM, Hussein HE. Detection of tick blood parasites in Egypt using PCR assay I—*Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Parasitol. Res.* [Internet]. 2009; 105:721–730. doi: <https://doi.org/c2nnhs>
- [23] Durrani AZ, Kamal N. Identification of ticks and detection of blood protozoa in friesian cattle by polmerase chain reacton test and estimation of blood parameters in district Kasur, Pakistan. *Trop. Anim. Health Prod.* [Internet]. 2008; 40:441–447. doi: <https://doi.org/bwxhft>
- [24] Luo J, Yin H, Liu Z, Yang D, Guan G, Liu A, Ma M, Dang S, Lu B, Sun C, Bai Q, Lu W, Chen P. Molecular phylogenetic studies on an unnamed bovine *Babesia* sp. based on small subunit ribosomal RNA gene sequences. *Vet. Parasitol.* [Internet]. 2005; 133(1):1–6. doi: <https://doi.org/b3wvfg>
- [25] Ramos CA, Araújo FR, Souza I I, Bacanelli G, Luiz HL, Russi LS, Oliveira RHM, Soare CO, Rosinha G, Alves LC. Real-time polymerase chain reaction based on *msa2c* gene for detection of *Babesia bovis*. *Vet. Parasitol.* [Internet]. 2011; 176(1):79–83. doi: <https://doi.org/b7njgm>
- [26] Schnittger L, Ganzinelli S, Bhoora R, Omondi D, Nijhof AM, Florin-Christensen M. The Piroplasmida *Babesia*, *Cytauxzoon*, and *Theileria* in farm and companion animals: Species compilation, molecular phylogeny, and evolutionary insights. *Parasitol. Res.* [Internet]. 2022; 121(5):1207–1245. doi: <https://doi.org/gpc8b6>
- [27] Néo TA, Giglioti R, Obregón D, Bilhassi TB, Oliveira HN, Machado RZ, Anibal FF, Brito LG, Malagó W Jr, Bressani FA, Oliveira MCS. Detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in endemic areas of São Paulo state, Brazil. *Open J. Vet. Med.* [Internet]. 2016; 6:75–84. doi: <https://doi.org/mrjr>
- [28] Olmeda AS, Armstrong PM, Rosentha BM, Valladares B, Del Castillo A, De Armas F, Miguelez M, González A, Rodríguez JA, Spielman A, Telford III SR. A subtropical case of human babesiosis. *Acta Trop.* [Internet]. 1997; 67(3):229–234. doi: <https://doi.org/bs6x45>

- [29] Martínez-Mercado MR, Caraballo-Blanco LE, Blanco-Tuirán PJ. *Babesia bigemina* en bovinos del municipio Los Palmitos (Sucre, Colombia). Cienc. Tecnol. Agropecuaria. [Internet]. 2019; 20(1):29-40. doi: <https://doi.org/mrkc>
- [30] Figueroa-Millán JV, Lira-Amaya JJ, Castañeda-Arriola R, Álvarez-Martínez JA, Rojas-Martínez C, Bautista-Garfias CR. Optimización de una prueba de PCR-RFLP para detección y diferenciación de *Babesia* sp. en garrapatas *Rhipicephalus microplus*. Entomol. Mex. [Internet]. 2014 [consultado 12 agosto 2023]; 1:978-983. Disponible en: <https://goo.su/8fkJ8r>
- [31] Arboleda-García MA. Diagnóstico molecular y prevalencia de *Babesia* spp. mediante PCR-RFLP en ganado bovino de la provincia de Manabí - Ecuador. [tesis de maestría en Internet]. Sangolquí, Ecuador: Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE; 2019 [consultada 12 febrero 2023]. 72 p. Disponible en: <https://goo.su/x7jE>
- [32] Mosqueda J, Olvera-Ramírez A, Aguilar-Tipacamu G, Canto GJ. Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis. Curr. Med. Chem. [Internet]. 2012; 19(10):1504-1518. doi: <https://doi.org/mrkg>
- [33] Oliveira-Sequeira TCG, Oliveira MCS, Araujo JP, Amarante FT. PCR-based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. Int. J. Parasitol. [Internet]. 2005; 35(1):105-111. doi: <https://doi.org/fmrpwj>
- [34] Romero-Pérez LE. Registros de garrapatas en El Salvador. Agrociencia [Internet]. 2021; 20(5):60-64. doi: <https://doi.org/mrkh>
- [35] Sturges HA. The Choice of a Class-Interval. J. Am. Stat. Assoc. [Internet]. 1926; 21(153):65-66. doi: <https://doi.org/gfpnzj>
- [36] Chávez-Larrea MA, Cholota-Iza, C, Medina-Naranjo, V, Yugcha-Díaz M, Ron-Román J, Martín-Solano S, Gómez-Mendoza G, Saegerman C, Reyna-Bello A. Detection of *Babesia* spp. in High Altitude Cattle in Ecuador, Possible Evidence of the Adaptation of Vectors and Diseases to New Climatic Conditions. Pathogens. [Internet]. 2021; 10(12):1593. doi: <https://doi.org/mrkj>
- [37] Benavides-Ortiz E, Polanco-Palencia N, Vizcaino-Gerdtz O, Betancur-Hurtado O. Criterios y protocolos para el diagnóstico de hemoparásitos en bovinos. Revista Ciencia Animal. 2012 [consultado 20 Ene. 2023]; 1(5):31-49. Disponible en: <https://goo.su/elcd0>
- [38] Chauvin A, Moreau E, Bonnet S, Plantard O, Malandrin L. Babesia and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. Vet. Res. [Internet]. 2009; 40(2):37. doi: <https://doi.org/fgg3gb>
- [39] Obregón D, Rabelo MD, Giglioti R, Bilhassi TB, Néo TA, Corona B, Alfonso P, Machado RZ, Oliveira MCS. Standardization of a SYBR green based real-time PCR system for detection and molecular quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). J. Buffalo Sci. [Internet]. 2016; 5(2):44-52. doi: <https://doi.org/mrkk>
- [40] Bilhassi TB, Oliveira HN, Ibelli AM, Giglioti R, Regitano LC, Oliveira-Sequeira TCG, Bressani FA, Malagó W Jr, Resende FD, Oliveira MCS. Quantitative study of *Babesia bovis* infection in beef cattle from São Paulo state, Brazil. Ticks Tick Borne Dis. [Internet]. 2014; 5(3):234-238. doi: <https://doi.org/f685sz>