

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Valoración de dos métodos para identificación molecular (PCR - RFLP y qPCR) de *Babesia bigemina* en bovinos de zonas endémicas para babesiosis

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Médico Veterinario Zootecnista

Autores:

María Gabriela Ruiz Sumba

Damián Alberto Quinde Piña

Director:

Jorge Gualberto Bustamante Ordóñez

Cuenca, Ecuador

2023-01-25

Resumen

La babesiosis bovina es una enfermedad causada por parásitos protozoarios intraeritrocíticos del género *Babesia*, distribuidos en áreas tropicales y subtropicales del mundo, que ocasionan enfermedades anémicas en los animales y son transmitidas por las garrapatas. Ecuador tiene un clima tropical que permite el desarrollo del vector *Rhipicephalus microplus*, por tanto, favorece la transmisión de *Babesia spp* en ganado. Los factores climáticos, así como la movilidad de los animales portadores de garrapatas sin ningún tipo de control permiten la presencia de brotes en nuevas áreas geográficas. Las infecciones por babesiosis son difíciles de detectar debido al bajo número de parásitos en sangre periférica. Por lo tanto, se han empleado métodos moleculares basados en el ADN para el diagnóstico debido a su alta sensibilidad y especificidad, siendo esta técnica la PCR. El presente estudio se realizó en el cantón Girón perteneciente a la provincia del Azuay donde se tomaron un total de 100 muestras de sangre de bovinos, ubicados en zonas endémicas para babesiosis, en el cual se identificó la presencia de material genético de *B. bigemina* mediante dos técnicas de biología molecular. Los resultados obtenidos mostraron el 43% de muestras positivas en el ensayo qPCR y para PCR-RFLP el 11%, en el análisis estadístico aplicado se determinó que si hay significancia estadística entre los dos ensayos; lo que sugiere que la efectividad del método molecular convencional PCR-RFLP es menor frente a qPCR al momento de detectar ADN de *Babesia bigemina*.

Palabras clave: *Babesia bigemina*, PCR, tiempo real, RFLP

Abstract

Bovine babesiosis is a disease caused by intraerythrocytic protozoan parasites of the genus *Babesia*, distributed in tropical and subtropical areas of the world, which cause anemic diseases in animals and are transmitted by ticks. Ecuador has a tropical climate that allows the development of the vector *Rhipicephalus microplus*, and therefore favors the transmission of *Babesia* spp in cattle. Climatic factors, as well as the mobility of tick-carrying animals without any type of control, allow the presence of outbreaks in new geographical areas. Babesiosis infections are difficult to detect due to the low number of parasites in peripheral blood. Therefore, DNA-based molecular methods have been used for diagnosis due to their high sensitivity and specificity, this technique being PCR. The present study was carried out in the Girón canton belonging to the province of Azuay where a total of 100 blood samples were taken from cattle, located in endemic areas for babesiosis, in which the presence of genetic material of *B. bigemina* was identified by means of two molecular biology techniques. The results obtained showed 43% of positive samples in the qPCR assay and 11% for PCR-RFLP, in the statistical analysis applied it was determined that there is statistical significance between the two assays, suggesting that the effectiveness of the conventional molecular method PCR-RFLP is lower compared to qPCR when detecting *Babesia bigemina* DNA.

Keywords: *Babesia bigemina*, PCR, real-time, RFLP

Índice

Resumen.....	2
Abstract.....	3
Índice.....	4
Índice de figuras	7
Índice de tablas.....	8
Índice de anexos.....	9
Agradecimiento.....	10
Dedicatoria.....	11
Abreviaturas.....	12
Capítulo 1: Introducción.....	13
1.2. Objetivos.....	15
1.2.1 Objetivo general	15
1.2.2 Objetivos específicos.....	15
1.3. Pregunta de investigación.....	15
Capítulo 2: Revisión de Literatura	16
2.1. Babesiosis Bovina.....	16
2.1.1. Antecedentes	16
2.1.2. Importancia	16
2.1.4. Morfología	17
2.1.5. Transmisión.....	17
2.1.6. Ciclo de vida del parásito	17
2.1.6. Invasión eritrocitaria.....	18
2.1.7. Presentación.....	18
2.1.8. Signos Clínicos.....	18
2.1.9. Diagnóstico	18
2.1.10. Prevención y control	19

2.2. Métodos de diagnóstico PCR	19
2.2.1. PCR en Tiempo Real.....	20
2.2.2. PCR Convencional.....	20
2.2.3. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción RFLP.....	21
2.2.4. Enzimas de Restricción.....	22
Capítulo 3: Materiales Y Métodos	23
3.1. Toma de muestras de sangre.....	23
3.1.1. Materiales de trabajo	23
3.1.2. Materiales químicos	23
3.1.3. Protocolo de trabajo de campo para la obtención, transporte y conservación de muestras de sangre de bovinos.....	23
3.2. Extracción de ADN	24
3.2.1. Materiales biológicos	24
3.2.2. Soluciones.....	24
3.2.3. Equipos.....	24
3.2.4. Procedimiento para la extracción del ADN de las muestras de sangre.	24
3.3. Amplificación de ADN	25
3.3.1. Materiales Biológicos.....	25
3.3.2. Reactivos.....	25
3.3.3. Equipos.....	26
3.3.4. Procedimiento para amplificación de PCR convencional	26
3.4. Electroforesis en gel de agarosa.....	27
3.4.1. Material Biológico.....	27
3.4.2. Reactivos.....	27
3.4.3. Materiales de laboratorio y Equipos	27
3.4.4. Procedimiento de electroforesis de los amplicones de ADN en gel de agarosa al 1.2%.....	28
3.5. PCR en tiempo Real	29

3.5.1. Especificidad del Kit comercial.....	29
3.5.2 Contenido del kit.....	29
3.5.3 Principio de la prueba	29
3.5.4. Material Biológico	30
3.5.5. Reactivos	30
3.5.7 Protocolo qPCR.....	31
3.5.8. Protocolo de detección qPCR	31
3.5.9. Protocolo de amplificación qPCR	32
3.5.10 Interpretación de resultados	33
3.6. Ensayo RFLP de los productos PCR y visualización de los mismos	33
3.6.1. Material Biológico.....	33
3.6.2. Reactivos.....	33
3.6.3. Materiales y equipos.....	34
3.6.4. Procedimiento técnica PCR-RFLP.....	35
3.7. Criterios de selección e instrumentos de medición.	35
6.8. Análisis estadístico.....	36
Capítulo 4. Resultados	37
4.1. Ensayo PCR convencional.....	37
4.2. Ensayo qPCR	38
4.3. Ensayo PCR-RFLP para detección de material genético de <i>B. bigemina</i>	39
4.4. Comparación mediante tablas de contingencia entre los ensayos qPCR y PCR- RFLP	40
Capítulo 5. Discusión.....	42
Capítulo 6: Conclusiones.....	45
Capítulo 7: Recomendaciones	46
Referencias.....	47
Anexos	53

Índice de figuras

- Figura 1.** Electroforesis de los productos PCR para B. bigemina 393pb. Carriles 1,2,3,4,5,6,7; muestras 37, 40(positiva), 61(positiva), 62, 66, 72, 73 (*negativas*); respectivamente. Carril C-control negativo. Carril MPM Marcador de peso molecular de 100pb.37
- Figura 2.** Validación de la prueba. Control positivo con un Cq 18 y control negativo.....38
- Figura 3.** 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.38

Índice de tablas

Tabla 1. Reactivos y volúmenes por reacción empleados para el proceso de amplificación.	26
Tabla 2. Ciclos de temperatura empleados en el proceso de amplificación.....	27
Tabla 3. Volumen de resuspención cebador/sonda	31
Tabla 4. Volumen de resuspención control positivo.....	31
Tabla 5. Reactivos y volúmenes por reacción empleados para el Premix 2X.....	32
Tabla 6. Volumen de cada componente para detección qPCR.	32
Tabla 7. Curva de amplificación empleando.	33
Tabla 8. Interpretación de resultados.	33
Tabla 9. Muestras positivas, Cq inferior a 35.	39
.....	39
Tabla 10. Tabla de contingencia. Prueba de McNemar.	40

Índice de anexos

Anexo 1. Fotografías del trabajo de laboratorio	53
--	----

Agradecimiento

Nuestro Agradecimiento a todos los docentes de la Universidad de Cuenca que, durante nuestros años de estudio, contribuyeron a la formación, intelectual, cultural y moral; de manera especial al Dr. Jorge Bustamante tutor de tesis; Dr. Antonio Vallecillo que nos acompañó y guio durante todo el proceso. De igual manera, al Econ. Carlos Torres, Dr. Ángel y Dra. Paola por su apoyo, motivación y de manera especial por la amistad brindada.

Finalmente, un agradecimiento especial a la Universidad del Azuay en persona del Dr. Rodrigo Coroca por su valiosa colaboración para que este trabajo se lleve a cabo.

Gabriela y Damián

Dedicatoria

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por la vida y haberme permitido llegar hasta este momento importante.

Para mis padres Marco y María que me han permitido alcanzar este sueño, acompañándome en mis alegrías y tristezas, por la motivación, enseñanzas, consejos y valores brindados a lo largo de toda mi vida. A mis hermanos Belén y David por su cariño, apoyo incondicional, por estar siempre dispuestos a escucharme y ayudarme cuando más lo necesitaba.

A mi familia y a los verdaderos amigos que me acompañaron de un modo u otro, les dedico este logro en señal de amor y gratitud.

María Gabriela

Quiero dedicar este trabajo a mi madre Ana, y a mi hermana Verónica, que en paz descansen, por siempre creer en mí y darme esa fortaleza y ejemplo para no dejarme vencer por las adversidades de la vida.

A las personas más importantes en mi vida, a mis hermanos Santiago, Mateo y Diego, a mi padre Marcelo, a mi cuñada Jenny, a mis sobrinos David, Josué e Isabella y a mi pareja Andrea Sáenz, quienes jamás dudaron de mí y han sido parte importante de mis logros.

Desde lo más profundo de mi corazón, este logro lleno de esfuerzo, dedicación y sacrificio es por ustedes y para ustedes.

Damián

Abreviaturas

Bp:	Pares de bases
BSA:	Seroalbúmina bovina
Cq:	Ciclo de cuantificación o umbral
CTAB:	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
dNTPs:	Desoxirribonucleótidos trifosfato
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
For:	Forward (directo)
FAM:	Amidita de fluoresceína (de fluorescein amidite)
HCl:	Ácido clorhídrico
mg:	Miligramo
MgCl ₂ :	Cloruro de Magnesio
MgSO ₄ :	Sulfato de Magnesio
ml:	Mililitro
mM:	Milimolar
NaCl:	Cloruro de sodio
PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa
qPCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real
rcf/min:	fuerza centrífuga relativa por minuto
Rev:	Reverse (Inverso)
RFLP:	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (del inglés: Restriction Fragment Length Polymorphism)
RFU:	Unidades de fluorescencia
μl:	Microlitro
μm:	Micra

Capítulo 1: Introducción

La babesiosis bovina es una enfermedad parasitaria causada por un protozoario intraeritrocitario de género *Babesia*. Entre las especies más importantes que afectan al ganado bovino se encuentran *Babesia bovis*, *B. bigemina* y *B. divergens*. Actualmente las especies que se encuentran ampliamente distribuidas en África, Australia, América Central y del sur son *B. bovis* y *B. bigemina* (Álvarez et al., 2019). Estos parásitos han desarrollado un ciclo de vida complejo que involucra garrapatas duras como huéspedes definitivos y vertebrados como huéspedes intermediarios. Así, *Babesia spp* invade y se multiplica asexualmente por fisión binaria dentro de los glóbulos rojos de sus huéspedes vertebrados infectados y producen formas sexuales en el intestino medio de los vectores de garrapatas ixodidas, sus huéspedes definitivos, donde se multiplican sexualmente (Suárez et al., 2019).

La babesiosis se caracteriza por fiebre alta, grados variables de hemólisis y anemia. La anemia puede desarrollarse rápidamente y provocar signos clínicos, que incluyen inapetencia, debilidad, letargo, aumento de la frecuencia respiratoria y cardíaca. Además, el aborto en vacas preñadas y la disminución temporal de la fertilidad en toros son otros signos relacionados con la anemia o la fiebre. La ictericia a veces es evidente, especialmente cuando los signos clínicos son menos agudos, la hemoglobinuria es común en animales infectados con *B. bigemina* (Fesseha et al., 2022).

El método principal para diagnosticar la babesiosis es la observación de parásitos dentro de los eritrocitos mediante frotis de sangre delgados teñidos con Giemsa o Wright. Los casos agudos suelen diagnosticarse de manera más sencilla con este método porque a menudo se observa una gran cantidad de parásitos; sin embargo, en casos crónicos este método carece de sensibilidad. Además, pocos caracteres morfológicos son útiles para distinguir las especies de *Babesia*. El criterio más común es el tamaño, pero incluso entre los pequeños (típicamente 1-2.5 µm) o grandes (normalmente de 3 a 5 µm), la mayoría de las especies son morfológicamente indistinguibles, por lo que los métodos moleculares son importantes para la identificación de especies (Yabsley & Shock, 2013).

Los métodos moleculares basados en el ADN se han desarrollado con grandes ventajas, como: altas tasas de sensibilidad; especificidad analíticas y diagnósticas. Una de estas técnicas moleculares es la PCR, utilizada para amplificar, a partir de un solo fragmento de ADN, millones de copias in vitro. Cuya finalidad es detectar la presencia o ausencia de una pequeña secuencia de ADN (Criado, 2007).

PCR en tiempo real (qPCR) es una técnica que 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 está presente en la muestra y también determina el número de copias de esa secuencia. No requiere análisis post-PCR por lo tanto, es más rápido y no genera gastos por análisis electroforéticos o fotodocumentación (Mosqueda *et al.*, 2012).

La técnica de Análisis de Polimorfismos de longitud o PCR-RFLP (por sus siglas en inglés Restriction Fragment Length Polymorphism) se utiliza para análisis de patrones únicos en fragmentos de ADN que permiten la diferenciación mediante enzimas de restricción que reconocen secuencias específicas, obteniendo como resultado diferentes patrones de digestión en base a los sitios de reconocimiento (Cheriyedath, 2019).

La finalidad de este estudio se centra en la evaluación de dos métodos diagnósticos qPCR como ensayo de referencia y PCR- RFLP como una alternativa al ensayo en tiempo real para identificar material genético de *B. bigemina* en sangre de bovinos pertenecientes al cantón Girón, determinando cuál de estas dos técnicas es la más confiable al momento de asistir en el diagnóstico de babesiosis, puesto que la adquisición de un kit representa altos costos mientras que el método convencional requiere de un menor financiamiento.

1.2. Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Evaluar la aplicación de dos ensayos que permiten la identificación de material genético de *Babesia bigemina* en muestra de sangre de bovinos residentes en zonas endémicas con inestabilidad enzootica para babesiosis.

1.2.2 Objetivos específicos

- Aplicar el método qPCR para la cuantificación de ADN de *B. bigemina* en muestras de sangre de ganado bovino.
- Detectar la presencia de material genético de *B. bigemina* mediante la aplicación del ensayo PCR-RFLP.
- Comparar la capacidad de detección de material genético de *Babessia bigemina* del ensayo RFLP frente a qPCR.

1.3. Pregunta de investigación

¿Existe diferencia en la capacidad de detección de material genético de *Babesia bigemina* entre pruebas aplicadas (PCR - RFLP y qPCR)?

Capítulo 2: Revisión de Literatura

2.1. Babesiosis Bovina

2.1.1. Antecedentes

La primera especie de babesia fue descrita en 1888 por el patólogo húngaro Víctor Babes, en cuyo honor se nombraron posteriormente los organismos. Babes investigó sobre brotes de enfermedades con síntomas de hemoglobinuria en ganado de Rumania. Denominándola por primera vez *Hematococeus bovis* para posteriormente nombrarla como *Babesia bovis* (Laha *et al.*, 2015).

Años más tarde los estadounidenses Theobald Smith epidemiólogo-patólogo y Frederick Kilborne médico veterinario, demostraron que la fiebre de Texas (babesiosis) se transmitía al ganado por medio de garrapatas, parásito intraeritrocitario al que Smith designó *Pyrosoma bigeminum*. Siendo los primeros en demostrar la transmisión de un organismo patógeno de un artrópodo a un huésped mamífero (Assadian & Stanek, 2002; Bock *et al.*, 2004).

2.1.2. Importancia

La babesiosis bovina es una enfermedad parasitaria transmitida por garrapatas que provoca una morbilidad y mortalidad significativas en el ganado bovino. Las pérdidas económicas pueden ser considerables, especialmente cuando los animales sin inmunidad se trasladan a un área endémica. Tres especies de Babesia causan la mayoría de los casos clínicos en el ganado: *B. bovis* y *B. bigemina* están muy extendidas en las regiones tropicales y subtropicales, mientras que *B. divergens* circula en partes de Europa y posiblemente en el norte de África. La babesiosis bovina puede manejarse y tratarse, pero los organismos causantes son difíciles de erradicar (CFSPH, 2018).

2.1.3. Etiología

El género Babesia pertenece al filo Apicomplexa, clase Sporozoasida, orden Eucoccidiorida, suborden Piroplasmorina y familia Babesiidae. Los agentes causantes de la Babesiosis son específicos para especies particulares de animales. *B. bovis* y *B. bigemina* son las especies comunes que afectan al ganado, *B. bigemina* es un parásito mucho más largo y, a menudo, se encuentra en pares en un ángulo agudo entre sí, tiene típicamente forma de pera, pero se encuentran en formas diversas. Tiene de 3 a 3,5 µm de largo y de 1 a 1,5 µm de ancho, y las formas emparejadas a menudo tienen dos puntos discretos de tinción roja en cada parásito (*B. bovis* y *B. divergens* siempre tienen solo uno), (Jabir, 2017).

2.1.4. Morfología

Sobre la base de la morfología, las babesias se dividen en dos grupos: babesias pequeñas (1,0–2,5 μm de largo) que incluyen *B. bovis*, *B. microti*, entre otras y babesias grandes (2,5–5,0 μm de largo). Mismas que incluyen: *B. bigemina*, *caballi*, y *canis*. La orientación del parásito en los glóbulos rojos depende de su tamaño debido a que los parásitos piriformes grandes se encuentran en sus extremos puntiagudos en un ángulo agudo entre sí. Más de 100 especies de *Babesia* que están infectando a muchas especies de mamíferos y algunas aves han sido identificadas (Laha *et al.*, 2015).

B. bigemina se puede presentar con diversas formas redondeadas, ovaladas o de manera irregular dependiendo del desarrollo del parásito en los hematíes. Identificándose principalmente por dos corpúsculos con forma de pera, incorporados a manera de ángulo de noventa grados dentro del eritrocito, tienen una longitud entre entre 4 y 5 μm ; y un diámetro de 2 a 3 μm (Gasque, 2008).

2.1.5. Transmisión

Las babesias viables están presentes sólo en el torrente sanguíneo de los animales en estado activo de la infección. Las garrapatas son el vector natural; el parásito causante persiste y pasa su ciclo de vida en el huésped vertebrado. Las agujas, instrumentos quirúrgicos contaminados, la inoculación directa de sangre, fómites contaminados con sangre y los animales portadores o recuperados también pueden ser fuente de infección y ayudar a la transmisión de la enfermedad. Dentro de las garrapatas, los cigotos de babesia se multiplican como vermiculus que invaden muchos de los órganos de las garrapatas, incluidos los ovarios. Los parásitos de *Babesia bovis* generalmente se vuelven infecciosos dentro de los 2-3 días posteriores a la adherencia de las etapas larvales de las garrapatas. *Babesia bigemina* madura en aproximadamente 9 días después de que se adhieren las garrapatas larvales y solo se transmite por ninfa y adulto. *Babesia spp* en las garrapatas se transmite por transmisión transovárica o etapa a etapa (Menegesha, 2020).

2.1.6. Ciclo de vida del parásito

El ciclo de vida de *Babesia spp* es complejo e involucra al menos tres etapas de reproducción: gamogonia (formación y fusión de gametos dentro del intestino de la garrapata), esporogonia (reproducción asexual en las glándulas salivales de la garrapata) y merogonia (reproducción asexual en el huésped vertebrado). Cuando una garrapata infectada se alimenta de un huésped susceptible, los esporozoítos presentes en las glándulas salivales se depositan en la dermis del huésped vertebrado. Los esporozoítos invaden los eritrocitos y se diferencian en trofozoítos. Se dividen asexualmente por fisión binaria

(merogonia) y producen dos, cuatro, ocho o más merozoítos. Después de una intensa multiplicación, se produce la ruptura de los eritrocitos y los merozoítos libres invaden otros eritrocitos (Dantas *et al.*, 2016).

2.1.6. Invasión eritrocitaria

Después de que el parásito reconoce y se adhiere a la superficie del eritrocito, se reorienta para que su región apical quede adyacente a la membrana del eritrocito. Se libera el contenido de los orgánulos apicales y se forma una invaginación de la membrana del eritrocito, envolviendo al parásito en lo que se conoce como vacuola parasitófora. Esta vacuola luego se desintegra; por lo tanto, el parásito está directamente incrustado en el citoplasma de los eritrocitos, un rasgo distintivo de *Babesia spp* (Rodríguez *et al.*, 2013).

2.1.7. Presentación

Babesiosis bovina se observa predominantemente en adultos, siendo *B. bovis* generalmente más patógena que *B. bigemina* o *B. divergens*. Los animales infectados desarrollan una inmunidad de por vida contra la reinfección con la misma especie y es evidente cierta protección cruzada en los animales inmunes a *B. bigemina* contra infecciones posteriores por *B. bovis* (OIE, 2021). La presentación de la babesiosis bovina causada por *B. bigemina* es de 12-16 días después de que las garrapatas se alimentan del bovino, coincidiendo con la presencia del parásito intraeritrocítico en la sangre periférica (Sachman *et al.*, 2021).

2.1.8. Signos Clínicos

Los primeros signos clínicos son letargo, debilidad, depresión y fiebre (con frecuencia $\geq 41^{\circ}\text{C}$), mismos que persisten durante todo el tiempo y se acompañan más tarde de inapetencia, anemia, ictericia y pérdida de peso; la hemoglobinemia y la hemoglobinuria ocurren en las etapas finales (Carter & Rolls, 2022). En casos avanzados se desarrollan atrofia muscular, temblores y decúbito, seguidos por coma. La fiebre durante las infecciones puede causar abortos y una fertilidad reducida en toros con una duración de seis a ocho semanas (Bock *et al.*, 2004).

2.1.9. Diagnóstico

Se han descrito diferentes técnicas para el diagnóstico de la babesiosis bovina, generalmente la primera opción es el frotis de sangre con tinción de Giemsa para demostrar microscópicamente la presencia de parásitos. Para investigar la exposición del ganado a babesias la transferencia pasiva de anticuerpos por el calostro en terneros, se han utilizado ensayos serológicos, como la prueba de anticuerpos fluorescentes indirectos (IFAT), el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y la prueba de inmunocromatografía

(ICT), debido a que estas pruebas brindan información sobre la respuesta inmune humoral. Siendo estos procedimientos descritos generalmente como pruebas diagnósticas que carecen de especificidad además que requieren mucho tiempo y son difíciles de realizar. Pudiendo presentarse la aparición de reacciones cruzadas y dificultades con respecto a la discriminación entre exposiciones anteriores y actuales (Álvarez *et al.*, 2019).

Los ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección diagnóstica de parásitos de Babesia tienen el potencial de proporcionar rápidamente resultados cualitativos con alta sensibilidad, se han descrito ensayos de PCR y PCR en tiempo real capaces de detectar parasitemias extremadamente bajas, como ocurre en animales portadores y aislamientos diferenciadores (Carter & Rolls, 2022). Estos ensayos de PCR tienen varias ventajas sobre las pruebas diagnósticas microscópicas y serológicas. También, se ha demostrado que la sensibilidad de estos ensayos para detectar babesiosis bovina es mayor que la de los métodos de detección microscópicos (Kim *et al.*, 2007).

2.1.10. Prevención y control

La erradicación de garrapatas vectores de *Babesia spp.* constituye una solución adecuada y permanente, tratando con acaricidas, minimizando la exposición del ganado. En muchas de las ocasiones no es posible debido principalmente a problemas prácticos y económicos. Otra alternativa es la destrucción de los hábitats de las garrapatas modificando el entorno, si se dispone de espacio suficiente. A medida que el ganado desarrolla inmunidad después de una infección con *Babesia spp.*, se utiliza la vacunación para inmunizar a los animales. La vacunación con antígenos de garrapatas puede ser una alternativa segura a la aplicación de acaricidas. Sin embargo, esta estrategia solo funciona con unas pocas especies de garrapatas (Bock *et al.*, 2004).

Durante un brote de enfermedad, los procedimientos dependen de la cantidad de animales afectados, la disponibilidad y los costos de medicamentos, vacunas, acaricidas y pruebas. Para limitar las pérdidas, se recomiendan algunas acciones: separación de los animales enfermos del rebaño y tratamiento, confirmación del diagnóstico, prevención de la exposición a garrapatas de bovinos no infectados (Pfeffer *et al.*, 2018).

2.2. Métodos de diagnóstico PCR

Las muchas limitaciones de la microscopía y los ensayos basados en serología han influido en el uso de métodos de amplificación de genes que fueron posibles con la implementación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los enfoques moleculares basados en ácidos nucleicos ofrecen una mayor sensibilidad y especificidad sobre las pruebas de

diagnóstico existentes. Permiten la detección de infecciones a partir de muestras muy poco parasitadas, incluidas las de muestras de pacientes sin sinología clínica (Ndao, 2009).

La técnica PCR se desarrolló en 1986, constituyendo una herramienta eficaz en investigaciones del ADN recombinante, esta técnica permite la amplificación directa de fragmentos de ADN específicos y hace posible obtener gran número de copias de fragmentos, aun a partir de una pequeña cantidad de muestra. Esta técnica utiliza la enzima ADN polimerasa, iniciadores o primers que hibridan con la cadena complementaria a la secuencia que se quiere amplificar (Stanchi, 2007). Existen variantes de PCR como la PCR en tiempo real (qPCR), PCR multiplex, RT-PCR (transcripción inversa), PCR-RFLP (Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción), entre otras (Kadri, 2019).

2.2.1. PCR en Tiempo Real.

La detección en tiempo real del ADN amplificado ha evolucionado rápidamente y normalmente implica la utilización de marcadores de colorantes fluorescentes. Un marcador fluorescente está diseñado de tal manera que los cambios en su salida fluorescente están en relación directa con el progreso de la reacción, es decir la cantidad de ADN que se sintetiza. Esto, a su vez, se combina con instrumentos de PCR desarrollados con el fin de detectar cambios en la fluorescencia en tiempo real. La expansión de la técnica de PCR convencional para incluir qPCR ha simplificado el análisis y expuesto otras aplicaciones potenciales. Como resultado, la qPCR se ha establecido como una técnica clave en biología molecular (Nolan et al., 2013).

Se puede utilizar para determinar la concentración inicial del ADN objetivo, lo que elimina la necesidad de electroforesis en gel en muchos casos. Esto se logra gracias a la inclusión de colorantes intercalados fluorescentes no específicos, como SYBR Green, que emiten fluorescencia cuando se unen a ADN de doble cadena, o sondas fluorescentes específicas de secuencia de oligonucleótidos de ADN. Tanto para los tintes fluorescentes como para las sondas (TaqMan), a medida que aumenta el número de copias del ADN objetivo, el nivel de fluorescencia aumenta proporcionalmente, lo que permite la cuantificación en tiempo real de la amplificación con referencia a estándares que contienen números de copias conocidos; qPCR utiliza termocicladores especializados equipados con sistemas de detección fluorescente que monitorean la señal fluorescente a medida que se produce la amplificación (Ferrini, 2021).

2.2.2. PCR Convencional.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que ha revolucionado el mundo de la biología molecular y más allá, permitiendo la amplificación de secuencias de

nucleótidos. Una reacción de PCR necesita un par de cebadores que sean complementarios a la secuencia de interés. Los cebadores son extendidos por la ADN polimerasa. Las copias producidas después de la extensión, los llamados amplicones, se vuelven a amplificar con los mismos cebadores, lo que lleva a una amplificación exponencial de las moléculas de ADN. Después se utiliza la electroforesis en gel para analizar los productos de PCR amplificados y esto hace que la PCR convencional consuma mucho tiempo, ya que la reacción debe finalizar antes de continuar con el análisis posterior a la PCR (Pestana *et al.*, 2010).

2.2.3. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción RFLP.

El polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción se define como un método de identificación de ADN por el tamaño de los fragmentos obtenidos tras la escisión por enzimas de restricción (Euzéby, 2008). RFLP es un método establecido por Grodzicker *et al.* en 1974, se utiliza para identificar polimorfismos de ADN entre diferentes individuos, mismo que tiene tres principios básicos: primero, el ADN genómico de diferentes individuos se digiere en fragmentos de ADN de tamaño variable, utilizando enzimas de restricción. En segundo lugar, los fragmentos digeridos se separan mediante análisis electroforético. Finalmente, los fragmentos separados se hibridan con sondas homólogas radiactivas o quimioluminiscentes y se exponen a una película de rayos X; los diferentes fragmentos son visibles por autorradiografía. La base molecular de RFLP es que las sustituciones, inserciones, eliminaciones, duplicaciones e inversiones de bases de nucleótidos dentro de todo el genoma pueden eliminar o crear nuevos sitios de restricción (Yang *et al.*, 2013)

PCR-RFLP se considera un método altamente discriminatorio, confiable y reproducible, la ventaja de la PCR-RFLP basada en análisis de ADN, se deriva del hecho de que hay muchas mitocondrias por célula y muchas moléculas de ADN mitocondrial dentro de cada mitocondria, lo que hace que el mtADN sea naturalmente fuente amplificada de variación genética (Guan *et al.*, 2018).

Las ventajas importantes de la técnica incluyen el bajo costo, no se requiere el empleo de instrumentos avanzados y el diseño es generalmente fácil. Las desventajas incluyen el requerimiento de endonucleasas específicas, dificultades al momento de identificar la variación exacta en el caso de varios polimorfismos afecten el sitio de reconocimiento de enzimas de restricción y se requiere una cantidad relativamente grande de tiempo práctico. A continuación, se describe brevemente esta técnica: PCR-RFLP consta de varios pasos que incluyen el diseño de cebadores, identificación de una enzima de restricción adecuada, amplificación, tratamiento con enzimas de restricción de los productos amplificados y la electroforesis (Rasmussen, 2012).

2.2.4. Enzimas de Restricción

Las enzimas de restricción (RE) son endonucleasas que reconocen secuencias de ADN específicas de entre cuatro y ocho pb de longitud y, por lo general, separan las hebras en una posición específica y constante dentro o antes del sitio de reconocimiento. Las RE están presentes de forma natural en las bacterias y se cree que han evolucionado como un mecanismo de defensa contra las infecciones virales. Cientos de estas enzimas se han convertido en herramientas importantes en la tecnología del ADN, particularmente para la reducción de grandes porciones de ADN, incluidos los genomas completos, en unidades más pequeñas. El proceso de “fragmentación” es la base del método del polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (RFLP), una técnica de genética de poblaciones que permite una cobertura relativamente amplia de un genoma sin ningún conocimiento previo sobre la variabilidad del ADN de las especies consideradas (Mariani & Bekkevold, 2013).

Las enzimas individuales se nombran de la siguiente manera: Brevemente, tres letras en cursiva se derivan de la primera letra del género y las dos primeras letras de la especie microbiana de la que se deriva la enzima. Se puede usar una letra adicional sin cursiva para designar una cepa en particular. A esto le sigue un número romano para indicar la primera, la segunda, y así sucesivamente, enzimas descubiertas en el organismo. Y se clasifican según su estructura, sitio de reconocimiento, sitio de escisión, cofactores y activadores (Williams, 2003).

Capítulo 3: Materiales Y Métodos

3.1. Toma de muestras de sangre

3.1.1. Materiales de trabajo

Mandil

Guantes de látex descartables

Mascarillas

Torniquete

Gorros

Marcador rotulador de muestras

Cinta para rotular

Tubos con anticoagulante (EDTA)

Tijeras

Torundas de algodón

Agujas vacutainer

Gel refrigerante

Cooler

3.1.2. Materiales químicos

Alcohol étilico al 70%

3.1.3. Protocolo de trabajo de campo para la obtención, transporte y conservación de muestras de sangre de bovinos.

Paso 1. Se tomó 4,5 ml de sangre periférica mediante el método de venopunción empleando agujas para extracción de sangre venosa por sistema de vacío calibre 20G.

Paso 2. Las muestras fueron transportadas en un cooler con gel refrigerante, para una adecuada conservación.

Paso 3. Las muestras fueron trasladadas, y se almacenaron en congelación a -20°C en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, hasta su procesamiento.

3.2. Extracción de ADN

A partir de sangre periférica, se realiza la extracción de ADN, siguiendo el protocolo del Centro de Terapia Génica, Brno, República Checa con modificaciones mencionado por Arboleda, 2019.

3.2.1. Materiales biológicos

Sangre de bovinos

3.2.2. Soluciones

Buffer de lisis: **PBS** (100 mM Tris-HCl, pH 7.5; 1,4 mM NaCl; 20mM EDTA; 2% CTAB) (Sigma, N° cat: T4661; Fisher Scientific, N° cat: 10112640; EDS; y H6269).

Agua destilada grado biología molecular (Sigma, N° cat: w4502).

Proteinasa k 20 mg/ml (Sigma, N° cat: P2308).

Cloroformo (Merk, N° cat: 1.02445.2500).

Isopropanol (Sigma, N° cat: 278475).

Etanol al 70% (Sigma, N° cat: E7148).

3.2.3. Equipos

Refrigeradora

Vortex

Centrífuga Eppendorf 5430 R de alta velocidad

Baño María Memmert wb7 manual

3.2.4. Procedimiento para la extracción del ADN de las muestras de sangre.

Paso 1. Se colocaron 500 µl de sangre, en tubos de 1,5 ml debidamente identificados y se mantuvo en congelación hasta procesar las mismas.

Paso 2. Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente, posteriormente se agregó 10 µl de agua destilada grado biología molecular y se agitaron en vortex por 7 segundos.

Paso 3. Se comprobó la lisis de los eritrocitos y se procedió a centrifugar a 12000 rcf por 10 minutos a 4°C.

Paso 4. El sobrenadante fue retirado y los pasos 2 y 3 se repitieron.

Paso 5. Se resuspendió la muestra en 5 µl de PBS, mezclando por 5 a 7 segundos en vortex.

Paso 6. La mezcla fue centrifugada a 12.000 rcf por 10 minutos a 4ºC y se descartó el sobrenadante.

Paso 7. Los pasos 5 y 6 se repitieron.

Paso 8. Se adicionó 1 mL de buffer de lisis, 10 µl de proteinasa K homogenizando mediante vortex, para incubar a 70ºC por 1 hora.

Paso 9. Nuevamente se homogenizó por agitación; para inactivar la proteinasa K se incubó a 95ºC por 10 minutos.

Paso 10. La mezcla fue centrifugada a 12000 rcf por 10 minutos a 4ºC. El sobrenadante (1ml) se colocó en un microtubo de 2 ml.

Paso 11. Se colocó 500 µL de cloroformo homogenizando apropiadamente mediante vortex. Para posteriormente centrifugar a 12000 rcf por 10 minutos a 4ºC.

Paso 12. El sobrenadante fue retirado y se colocó en un microtubo de 1,5ml. Se completo el volumen del tubo con isopropanol mezclando suavemente invirtiendo los mismos.

Paso 13. Por centrifugación a 12000 rcf por 10 minutos a 4º C se colectó las cadenas de ácidos nucleicos y el sobrenadante se descartó con ayuda de una pipeta.

Paso 14. Se agregó 500 µL de etanol frío al 70% y se centrifugó a 12000 rcf por 5 minutos a 4ºC.

Paso 15. El sobrenadante fue descartado y se dejó secar hasta que el etanol se evapore.

Paso 16. Se suspendió en 20 µl de agua destilada. Para, almacenar las cadenas de ácidos nucleicos a -20 °C.

3.3. Amplificación de ADN

3.3.1. Materiales Biológicos

ADN total extraído de las muestras.

3.3.2. Reactivos

Agua grado biología molecular (Sigma, N° cat: w4502).

Buffer de amplificación 10X (Invitrogen, N° cat: 11708-039).

Solución enhancer 10X (Invitrogen, N° cat: 11708-039).

Solución de MgSO₄ (Invitrogen, N° cat: 11708-039).

Solución de dNTP's (Bio basic, N° cat: DD0058.4 X 0,5ml).

Oligonucleótidos (Invitrogen): Bspp 18S AATACCCAATCCTGACACAGGG

Bspp 18S TAAATACGAATGCCCAAC

Enzima Pfx ADN polimerasa (Invitrogen, N° cat: 11708-039).

3.3.3. Equipos

Micropipetas

Vortex

Termociclador Mastercycler nexus GSX1

3.3.4. Procedimiento para amplificación de PCR convencional

Paso 1. En tubos para PCR se agregaron los reactivos para la premezcla de las reacciones: Agua grado biología molecular, solución amortiguadora, iniciadores, nucleótidos, cloruro de magnesio, ADN polimerasa y ADN total (Tabla 1) con sus respectivos volúmenes de reacción.

Tabla 1. Reactivos y volúmenes por reacción empleados para el proceso de amplificación.

Reactivos	Concentración	Volumen por reacción*
Agua grado biología molecular	No aplica	79.5 µl
Buffer de amplificación	10 X	12.5 µl
Solución enhancer	10 X	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 µl
Muestra de ADN total	ng/ µl	10 µl
Volumen final	-----	122.5 µl

*Para 35 muestras

Paso 2. En tubos PCR se colocaron 10 µl de la premezcla y se adicionó 1 µl de ADN total de las muestras correspondientes.

Paso 3. Se procedió a mezclar los componentes en vortex por 6 a 7 segundos.

Paso 4. Las muestras fueron colocadas en el termociclador donde el perfil de temperatura fue previamente programado (tabla 2), para la generación de amplicones.

Tabla 2. Ciclos de temperatura empleados en el proceso de amplificación.

Etapa	Desnaturalizaci	40 ciclos			Extensió
	ón inicial	Desnaturalizaci	Alineació	Extensió	n final
Temperatur	94.0 °C	94.0 °C	52.0 °C	68.0 °C	68.0 °C
Tiempo	5 min	30 seg	25 seg	40 seg	5 min

Paso 5. Terminado el proceso de amplificación se añadió en cada tubo 3 µl de Buffer de carga de ADN 6X. Se mezclaron en vortex para posteriormente ser sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1.2%.

3.4. Electroforesis en gel de agarosa

3.4.1. Material Biológico

Productos PCR

3.4.2. Reactivos

Agarosa (Invitrogen, N° cat; 16500-500).

Solución Buffer TAE 1X (40 mM de Tris-acetato, 1 mM de EDTA) (Sigma, N° cat.: T4661, A6283, EDS, S8045).

Solución Bromuro de Etidio a 10mg/ml (Sigma, N° cat: E7637).

Marcador de peso molecular para ADN (Invitrogen, N° cat: 10488058).

Buffer de carga 6X (60 mM de Tris-HCl, 6mM de EDTA, 0.3% de Azul de bromofenol, 0.3% de Xilencianol y 30 % de Glicerol) (Sigma, N° cat.: T4661-320331; EDS-S8045; B8026; X1426; G5516).

3.4.3. Materiales de laboratorio y Equipos

Matraz

Probeta 100ml

Microondas

Micropipetas (20 µl)

Puntas para micropipetas

Balanza analítica

Tubos eppendorf

Tubos PCR

Vortex

Cámara horizontal de electroforesis (molde para realizar el gel, cables para conectar a la fuente de poder)

Fuente de alimentación

Transiluminador (fuente de luz ultravioleta)

Fotodocumentador

Computadora de escritorio

3.4.4. Procedimiento de electroforesis de los amplicones de ADN en gel de agarosa al 1.2%

Paso 1. Para la electroforesis se procedió a preparar el gel de agarosa al 1,2%; se pesaron 1,08gr de agarosa que se agregó con cuidado en un matraz Erlenmeyer mismo que contenía 90ml de buffer TAE 1X. Con ayuda del horno microondas se calentó la mezcla contenida en intervalos de 30 segundos hasta lograr una composición homogénea y transparente. Evitando siempre la ebullición violenta de la mezcla.

Paso 2. La solución se dejó enfriar de manera ligera y posteriormente se adicionó 3 μ l de Bromuro de Etidio, mezclando completamente. Se preparó el molde y se ajustó herméticamente la pared móvil. La mezcla caliente de agarosa/buffer fue vaciada evitando burbujas, colocando inmediatamente los peines para formar los pocillos.

Paso 3. Se dejó enfriar hasta que solidifique durante al menos 30 minutos. Los peines se retiraron y el gel se colocó en la cámara de electroforesis, verificando que la solución Buffer TAE 1X cubra por completo el gel.

Paso 4. En cada pocillo se añadieron 8 μ l de la muestra anteriormente mezclada (5 μ l de la muestra y 3 μ l de Buffer de carga TAE). En el último pocillo de cada fila se añadió 5 μ l de marcador de peso molecular.

Paso 5. Después de terminada la carga de las muestras y marcador de peso en los pocillos se procedió a colocar la tapa de la cámara de electroforesis, conectar los cables a la fuente de poder y se ajustó el voltaje 80V por 45 minutos.

Paso 6. Una vez separados los fragmentos de ADN, se retiró el gel y se colocó sobre el transiluminador para la visualización de los productos, con ayuda del fotodocumentador se tomaron las imágenes correspondientes.

Paso 7. Se determinó el tamaño de bandas, considerando como positivas para Babesia bigemina un peso aproximado de 393 pb.

Las muestras validadas como positivas se sometieron al ensayo PCR-RFLP para detección de material genético de *B. bigemina*.

3.5. PCR en tiempo Real

Para la amplificación en tiempo real se usó el kit Primerdesign para *B. bigemina*

3.5.1. Especificidad del Kit comercial

El kit Primerdesign genesig está diseñado para la cuantificación in vitro de genomas de *Babesia bigemina*, se caracteriza por tener un amplio perfil de detección. Específicamente, los cebadores representan un 100 % de homología con más del 95 % de las secuencias de referencia de la base de datos NCBI disponibles en el momento del diseño.

3.5.2 Contenido del kit

- Mezcla de sonda/cebador específico de *B. bigemina* (150 reacciones MARRÓN) Etiquetado con FAM
- Plantilla de control positivo de *B. bigemina* (para curva estándar ROJA)
- Agua libre de ARNasa / DNasa (BLANCO) para la re-suspensión de mezclas de cebador/sonda
- Tampón de preparación de plantillas (AMARILLO) para la re-suspensión de la plantilla de control positivo y la preparación de la curva estándar.

3.5.3 Principio de la prueba

La mezcla de cebador y sonda explota el llamado principio TaqMan®. Durante la amplificación por PCR, los cebadores directos e inversos se hibridan con el ADN de *B. bigemina*. Se incluye la sonda fluorogénica en la misma mezcla de reacción que consta de una sonda de ADN marcada con un colorante 5' y un extintor 3'. Durante la amplificación por PCR, la sonda se escinde y el colorante indicador y el extintor se separan.

3.5.3.1 Control positivo

Para la determinación del número de copias y como control positivo para la configuración de PCR, el kit contiene una plantilla de control positivo. Un resultado positivo indica que los cebadores y las sondas para detectar el gen de *B. bigemina* funcionaron correctamente en el escenario experimental. Si se obtiene un resultado negativo, los resultados de la prueba no son válidos y deben repetirse. Se debe tener cuidado para asegurarse de que el control positivo no contamine ningún otro componente del kit, lo que podría dar lugar a resultados falsos positivos. También se debe tener cuidado para evitar la contaminación cruzada de otras muestras al agregar el control positivo al experimento.

3.5.3.2 Control negativo

Para validar cualquier resultado positivo, se debe incluir una reacción de control negativo cada vez que se utilice el kit. Para esta reacción, se usó agua libre de ARNasa / DNasa. Un resultado negativo indica que los reactivos no se han contaminado al configurar el experimento (GENESIG, 2018).

3.5.4. Material Biológico

ADN total extraído de las muestras

3.5.5. Reactivos

Agua grado biología molecular (Sigma, N° cat: w4502).

Buffer de amplificación 10X (Invitrogen, N° cat: 10966-030).

Solución de dNTP's (Bio basic, N° cat: DD0058.4 X 0,5ml).

Enzima Taq ADN polimerasa (Invitrogen, N° cat: 10966-030).

Agua grado biología molecular (Sigma, N° cat: w4502).

Solución de MgCl₂ (Invitrogen, N° cat: 10966-030).

Kit de detección por PCR en tiempo real para *Babesia bigemina* (Primer Desing, N° cat: 348778).

3.5.6. Materiales y equipos para el ensayo qPCR.

Tubos PCR

Micropipetas

Puntas estériles con filtro

Gradilla para tubos

Termociclador tiempo real TIANLONG TL 988 con 96 pocillos

Regulador de voltaje

Computador con el programa de análisis para qPCR

3.5.7 Protocolo qPCR

Paso 1. Los tubos se mezclaron adecuadamente mediante vortex el cebador y sonda liofilizados.

Paso 2. Se resuspendieron los componentes del kit en agua libre de ARNasa/ADNasa, agitando bien el tubo, de acuerdo con la tabla 3.

Tabla 3. Volumen de resuspención cebador/sonda

Componente - resuspender en agua	Volumen
Paquete Pre-PCR	
Mezcla de cebador/sonda <i>B.bigemina</i> (MARRÓN)	165 ul

Paso 3. Se suspendió la plantilla de control positivo en el tampón de preparación de plantillas, de acuerdo con la tabla 4:

Tabla 4. Volumen de resuspención control positivo.

Componente: resuspender en tampón de preparación de plantilla	Volumen
Lámina termosellada post-PCR	
Plantilla de control positivo <i>B.bigemina</i> (ROJO) *	500 ul

* Se abrió y manipuló con cuidado, para evitar contaminación.

3.5.8. Protocolo de detección qPCR

Paso 1. Para cada muestra de ADN, se preparó una mezcla de reacción de acuerdo con la tabla 6:

Tabla 5. Reactivos y volúmenes por reacción empleados para el Premix 2X.

Reactivos	Concentración	Volumen premezcla 2X
Buffer de amplificación 10X	10 X	210 µl
dNTP's	10 mM c/u	21 µl
Enzima Taq ADN polimerasa	2,5 U/ µl	18 µl
Agua grado biología molecular	No aplica	717 µl
MgCl2	50 mM	84 µl
Volumen final	-----	1050 µl

Tabla 6. Volumen de cada componente para detección qPCR.

Componente	Volumen
Premix 2X	10 µl
Mezcla de cebador/sonda B.bigemina (MARRÓN)	1 µl
Agua libre de ARNasa/ADNasa (BLANCO)	4 µl
Volumen final	15 µl

Paso 2. Se tomo 15 µl de la mezcla y se colocó en cada pocillo.

Paso 3. Se prepararon las plantillas de ADN para cada una de las muestras.

Paso 4. De cada muestra se tomaron 5 µl.

Para pocillos de control negativo, se utilizaron 5 µl de agua libre de ARNasa/ADNasa. El volumen final en cada pocillo fue de 20 µl.

3.5.9. Protocolo de amplificación qPCR

Paso 1. Para la amplificación se empleó el termociclador, sistema de PCR en tiempo real TIANLONG TL 988 de 96 pocillos de la Universidad de Azuay, donde se colocaron los tubos de 0,2ml en tiras de 8, con las muestras y controles debidamente rotulados.

Paso 2. Se programó la curva de amplificación como lo indica la tabla 7.

Tabla 7. Curva de amplificación empleando.

	Paso	Tiempo	Temperatura
	Activación de enzima	2 min	95° C
Ciclo	Desnaturalización	10 s	95° C
	RECOPILACIÓN DE DATOS *	60 s	60 ° C

Paso 3. Para la recopilación y análisis de datos de PCR en tiempo real se usó el software Data Analysis- Primer qPCR.

3.5.10 Interpretación de resultados

Tabla 8. Interpretación de resultados.

OBJETIVO	CONTROL	CONTROL	INTERPRETACION
	POSITIVO	NEGATIVO	
RESULTADO CUANTITATIVO			
+	+	-	POSITIVO calcular el número de copias
RESULTADO NEGATIVO			
EXPERIMENTO FALLIDO			
+/-	+	≤ 35	debido a la contaminación de la prueba
+/-	+	> 35	Reinterpretación
+/-	-	+/-	EXPERIMENTO FALLIDO

Se espera que la plantilla de control positivo (Rojo) se amplifique entre Cq 16 y 23. El incumplimiento de este criterio de control de calidad es una fuerte indicación de que el experimento se ha visto comprometido.

3.6. Ensayo RFLP de los productos PCR y visualización de los mismos

3.6.1. Material Biológico

Productos amplificados PCR (almacenados a -20°C).

3.6.2. Reactivos

Enzima de restricción Alu I (Thermo Scientific 10 U/μl).

Buffer Tango 10X 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 BSA)).

Agarosa (Invitrogen, N° cat; 16500-500).

Solución Buffer TAE 1X (40 mM de Tris-acetato, 1 mM de EDTA) (Sigma, N° cat.: T4661, A6283, EDS, S8045).

Solución Bromuro de Etidio a 10mg/ml (Sigma, N° cat: E7637).

Marcador de peso molecular para ADN (Invitrogen, N° cat: 10488058).

Buffer de carga 6X (60 mM de Tris-HCl, 6mM de EDTA, 0.3% de Azul de bromofenol, 0.3% de Xilencianol y 30 % de Glicerol) (Sigma, N° cat.: T4661-320331; EDS-S8045; B8026; X1426; G5516).

3.6.3. Materiales y equipos

Micropipetas de diferentes volúmenes

Puntas para micropipetas

Tubos eppendorf

Tubos PCR

Gradillas

Agua grado biología molecular

Incubadora J.P. Selecta con puertas de cristal

Matraz

Probeta 100ml

Microondas

Balanza analítica

Vortex

Cámara horizontal de electroforesis

Fuente de alimentación

Transiluminador (funte de luz ultravioleta)

Fotodocumentador

Computadora de escritorio

3.6.4. Procedimiento técnica PCR-RFLP

Paso 1. Se adicionó a los productos PCR (12,5 µl), 1,5 µl de la enzima de digestión Alu I y 4 µl de Buffer Tango 10X con BSA. Mezclando con ayuda del vortex por 6 a 7 segundos. Y para el control negativo se adicionó 5 µl de agua grado biología molecular en un tubo para PCR.

Paso 2. Se colocó en la incubadora bacteriológica para la reacción de ligación por una a dos horas a 37°C.

Paso 3. Concluido el proceso de digestión, se procedió a realizar la electroforesis en gel de agarosa al 1,2%, siguiendo el procedimiento descrito en el punto 3.4.4.

Paso 4. En cada muestra se añadió 3 µl de buffer de carga, se mezcló mediante vortex por 6 segundos.

Paso 5. 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.

Paso 6. Sellada correctamente la cámara de electroforesis se conectó a la fuente de poder ajustando el voltaje a 80V por una 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', cortó los amplicones de ADN de *B. bigemina* en fragmentos aproximadamente de 144 y 211bp.

3.7. Criterios de selección e instrumentos de medición.

El presente estudio se realizó en el cantón Girón perteneciente a la provincia del Azuay, Ecuador, mismo que se encuentra situado a una altura de 2.162 metros sobre el nivel del mar, la superficie del cantón es de 337 Km². Su clima por valores altimétricos diferentes, existe variedad y contrastante en temperatura y pluviosidad, desde el tropical en las zonas bajas hasta el frío en los páramos, hay valles subtropicales con 21°C de temperatura y 500 mm. de precipitación y páramos con 8°C y 2000mm. de precipitaciones.

La población bovina del cantón Girón, Ecuador, en la zona alta (> de 2.000 msnm) es de 4.900 animales, mientras en la zona baja (< de 2.000 msnm), la cantidad de animales es de

922, para un total de cabezas de ganado de 5.822 de razas mestizas Bos *Taurus* y Bos *indicus*, de varias edades y grupos etarios (AGROCALIDAD, 2018).

Según la fórmula universal para determinar el tamaño de la muestra, calculando en base a la menor de las prevalencias reportadas en la zona para *B. bigemina* de 6,37% (Bustamante, 2021).

La siguiente fórmula indica la cantidad de muestras requeridas:

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

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% es de 91, pero se trabajaron con un total de 100 muestras.

$$n = \frac{5822 \cdot 1,96^2 \cdot 0,0637 \cdot 0,9363}{0,05^2 \cdot (5822 - 1) + 1,96^2 \cdot 0,0637 \cdot 0,9363} = 91$$

6.8. Análisis estadístico.

Los datos obtenidos mediante los ensayos qPCR y RCR-FRLP se tabularon utilizando el programa Microsoft Excel y el programa estadístico SPSS. Se realizaron tablas de doble entrada para la prueba de McNemar, entre las variables Test Aplicados, con valores tanto numéricos como porcentuales. Sensibilidad y especificidad diagnóstica de la prueba calculados como probabilidades, falsos positivos y negativos, índices predictivos negativos y positivos, con intervalos de confianza al 95% para los diferentes indicadores.

Capítulo 4. Resultados

4.1. Ensayo PCR convencional

En este estudio se procesaron un total de 100 muestras de sangre de bovinos provenientes del cantón Girón en la provincia del Azuay, Ecuador; zona considerada como endémica para babesiosis. De las cuales se extrajo material genético para el posterior proceso de amplificación mediante el ensayo PCR convencional, utilizando los oligonucleótidos Bspp For (AATACCCAATCCTGACACAGGG) y Bspp Rev (TTAAATACGAATGCCCAAC) amplificando el gen 18S de *Babesia spp.* con un tamaño aproximado de 393 pb para *B. bigemina*. Como resultado se obtuvo un total de 11 muestras positivas 3, 6, 8, 40, 44, 46, 54, 61, 82, 95 y 96 correspondientemente.

Para tener las mejores condiciones del ensayo se ajustó la curva de temperatura para una mayor intensidad del producto PCR, como se indicó en el punto 3.3.4 paso 4. En la figura 1 se muestran los resultados de la electroforesis en gel agarosa al 1,2%, en los pocillos de los extremos 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.

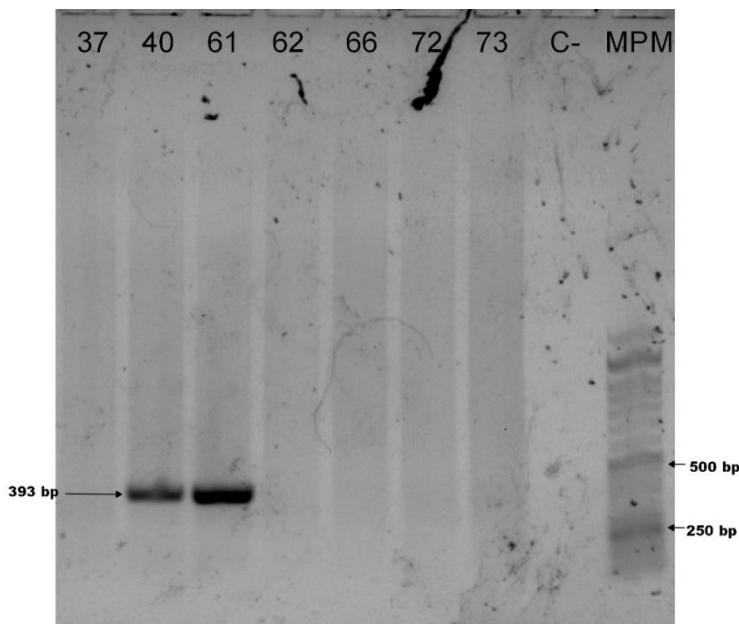


Figura 1. Electroforesis de los productos PCR para *B. bigemina* 393pb. Carriles 1,2,3,4,5,6,7; muestras 37, 40(positiva), 61(positiva), 62, 66, 72, 73 (negativas); respectivamente. Carril C- control negativo. Carril MPM Marcador de peso molecular de 100pb.

4.2. Ensayo qPCR

El estado de diagnóstico después de la amplificación de las 100 muestras, se determinó en base al valor Cq obtenido, realizando la lectura en un software qPCR. En la figura 2 se muestran el control positivo con un Cq de 18 y el control negativo mismos que indican que la prueba es válida. De acuerdo con las instrucciones del kit PRIMER DESING, una curva de tipo s con Cq ≥ 35 representa un resultado positivo, en la figura 3 se muestran las curvas de amplificación de las muestras y sus respectivos valores Cq, teniendo como resultado un total de 43 positivas, mismas que se detallan en la tabla 9.

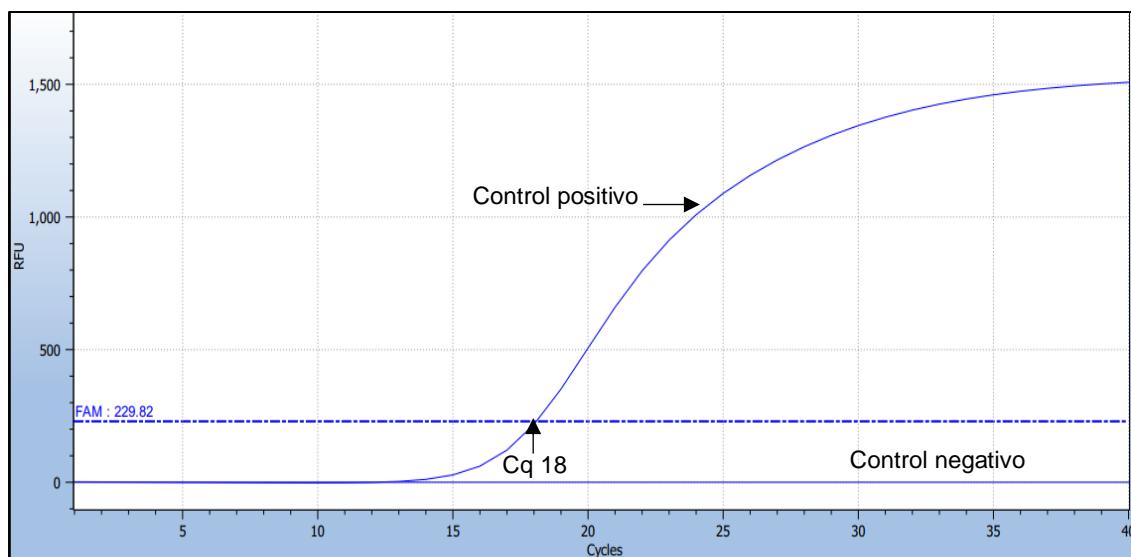


Figura 2. Validación de la prueba. Control positivo con un Cq 18 y control negativo.

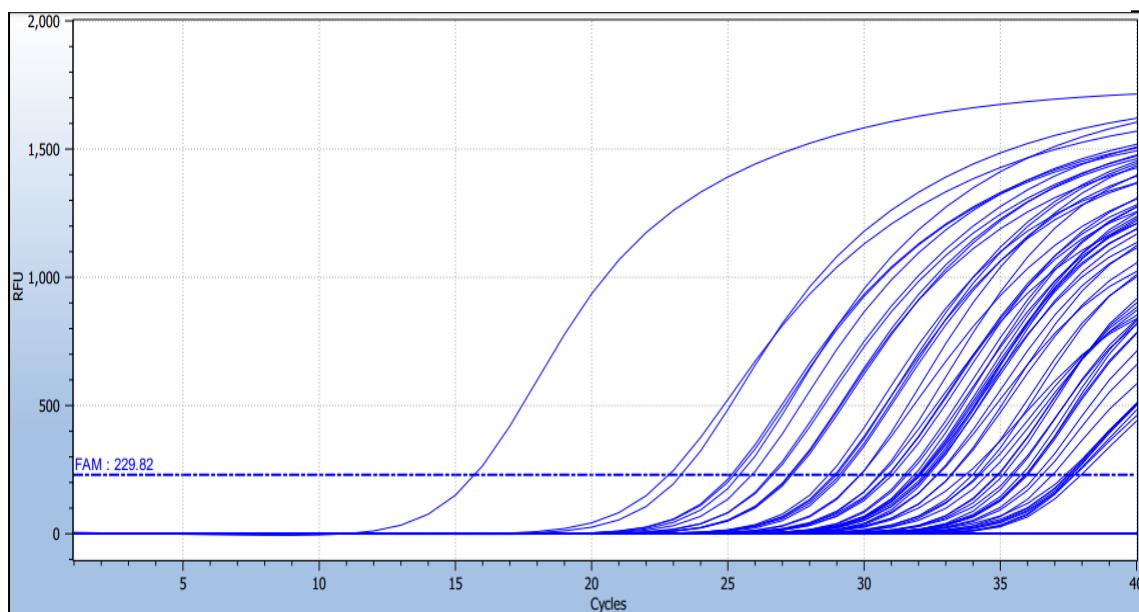


Figura 3. Nivel de umbral y valor de Cq en una curva de amplificación por muestra donde se indica cuantos ciclos se necesitaron para detectar el aumento de la fluorescencia. Los valores más bajos de Cq indican cantidades altas de la secuencia, mientras que los valores más altos significan cantidades bajas del ácido nucleico.

Tabla 9. Muestras positivas, Cq inferior a 35.

Nº Muestra	2	7	9	10	11	14	15	22	23	24	25	27	28	30	31
Cq	34.5	27	30.9	34.2	32	34.3	26.6	31.5	31	22.8	27	25.4	32.2	31.6	32,05
Nº 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
Nº 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	25.25		

4.3. Ensayo PCR-RFLP para detección de material genético de *B. bigemina*.

Mediante el ensayo RFLP se realizó la digestión enzimática confirmando como positivas 11 muestras de PCR convencional, empleando la enzima de restricción Alu I, con los fragmentos correspondientes de *B. bigemina*.

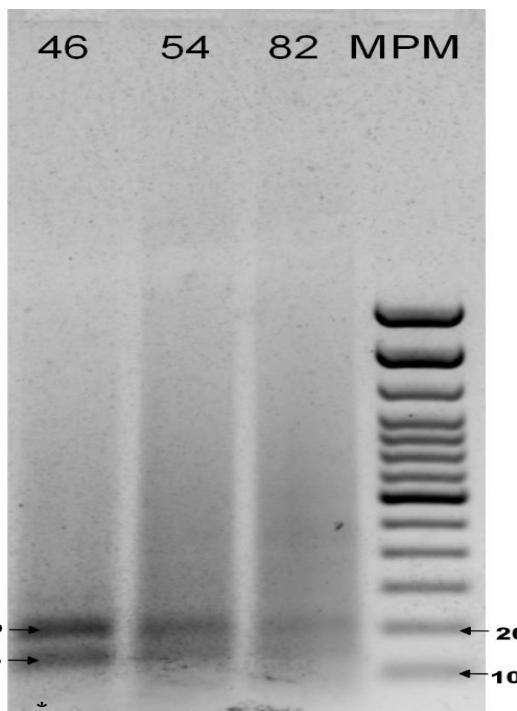


Figura 4. Digestión enzimática con la enzima Alu I. Se indica los fragmentos 144 pb y 211 pb para *B. bigemina*. Carril 1, 2, 3 muestras 46, 54 y 82 respectivamente. Carril MPM marcador de peso molecular de 100 pb.

* Fragmento 34pb esperado no se observa.

4.4. Comparación mediante tablas de contingencia entre los ensayos qPCR y PCR-RFLP

Los datos obtenidos de los dos métodos de identificación molecular para diagnóstico de *B. bigemina* en las 100 muestras de sangre bovina; se recopilaron y analizaron, empleando una tabla de 2x2, prueba de chi-cuadrado como se muestra en la tabla 10. Obteniendo como resultado, que hay significancia estadística por lo tanto si existe diferencia en la capacidad de detección de material genético de *B. bigemina* entre pruebas aplicadas con un *p* obtenido inferior a 0.05.

Tabla 10. Tabla de contingencia. Prueba de McNemar.

Ensayo		qPCR prueba de referencia		TOTAL	Chi cuadrado p (0,05)
		Resultado	Positivo		
RFPL	Positivo	2 (2%) VP	9 (9%) FP	11	
	Negativo	41 (41%) FN	48 (48%) VN	89	0,0001
TOTAL		43	57	100	

La tabla de contingencia resultante que compara PCR-RFLP como método convencional con qPCR como referencia reveló una sensibilidad del 4,6%; especificidad del 84%; porcentaje de falsos negativos 95,3%; porcentaje de falsos positivos 15,7%; IPP 18%, IPN 53%. Estos resultados indicaron que la eficacia de detección del kit PCR en tiempo real para diagnóstico molecular de *Babesia bigemina* fue mayor que el ensayo convencional PCR-RFLP.

$$\%Sensibilidad = \frac{VP}{VP + FN} = \frac{2}{2 + 41} = 0,046 = 4,6\%$$

$$\%Especificidad = \frac{VN}{VN + FP} = \frac{48}{48 + 9} = 0,84 = 84\%$$

$$\%FalsosNegativos = (1 - Sensibilidad) * 100 = (1 - 0,046) * 100 = 95,34$$

$$\%FalsosPositivos = 1 - Especificidad * 100 = (1 - 0,84) * 100 = 15,789$$

$$IndicePredictivoPositivo = \frac{VP}{VP + FP} = \frac{2}{2 + 9} = 0,181 = 18\%$$

$$IndicePredictivoNegativo = \frac{VN}{FN + VN} = \frac{48}{41 + 48} = 0,539 = 53,9\%$$

Donde:

VP= Valores positivos observados;

FN= Falsos negativos;

VN= Valores negativos observados;

FP= Falsos positivos.

Capítulo 5. Discusión

En zonas endémicas, los hatos contienen un gran número de animales portadores asintomáticos que se encuentran crónicamente infectados, en los que no se detecta parasitemia mediante el examen microscópico de frotis de sangre debido a su baja sensibilidad (*Romero et al.*, 2016). Los métodos serológicos empleados a nivel de campo han presentado inconvenientes como la aparición de reacciones cruzadas entre *B. bovis* y *B. bigemina* (*Oliveira et al.*, 2005). Por esta razón se han empleado herramientas moleculares basadas en PCR, donde varios autores han confirmado características de alta sensibilidad y especificidad (*AL-Hosary, 2017; Morzaria et al., 1992; Quroollo et al., 2017*) proporcionando resultados rápidos y precisos.

En el presente estudio se evidencia la presencia de Babesiosis en el cantón Girón caracterizado por ser una zona altitudinal alta con más de 2000 msnm, los resultados del ensayo convencional realizando el corte de los amplicones con la enzima de restricción Alu I que reconoce los sitios AG⁺CT mostraron, que de las 100 muestras el 11% (11/100) dio positivo para *B. bigemina*, lo que sugiere que debido a factores climáticos, movilidad de animales portadores de garrapatas sin un adecuado control permiten la transmisión de *Babesia spp.* en esta área geográfica. Corroborando lo informado por Chávez y colaboradores en 2021 quienes en su trabajo evidenciaron la presencia de *Babesia spp* en bovinos de la zona de Quito que se encuentra a una altitud de 2469 msnm, empleando como método de diagnóstico convencional PCR-RFLP con la enzima BoxI que reconoce los sitios GACNN⁺NNGTC; en el cual de los 143 animales muestreados el 5,59% (8/143) fue positivo. Siendo esta última la mayor altitud en la que se ha reportado la presencia de babesiosis.

El kit Primer desing en tiempo real para *Babesia bigemina* utilizado en este estudio, se basa en el principio TaqMan, que emplea una sonda fluorogénica para permitir la detección de un producto específico a medida que se acumula durante los ciclos de PCR. Obteniendo como resultado un 43% de muestras positivas, corroborando la sensibilidad de este ensayo. De igual manera Criado y colaboradores en 2009, determinaron que el método más sensible fue el ensayo dúplex TaqMan donde el 41% de muestras revelaron la presencia de ADN de *babesia*. No se ha descrito en estudios anteriores el uso de un kit comercial, por lo que esta sería la primera vez que se aplica esta técnica de diagnóstico en nuestro medio.

La detección de *Babesia spp.* en ganado bovino, puede ser problemático de manera especial cuando la parasitemia es baja. En nuestro estudio se confirma que la prueba no se contaminó al ser validada por el Cq mismo que indica el fabricante del kit. Por esta razón se comparó el ensayo PCR convencional, con el ensayo en tiempo real; determinando que este último

tiene varias ventajas al momento de cuantificar el ADN del parásito. Permite analizar un gran número de muestras en pocas horas, gracias al formato de placa de micro titulación de 96 pocillos característico del termociclador en tiempo real. Además, dado que normalmente utiliza sistemas de tubo cerrado y la cuantificación no requiere manipulación posterior a la amplificación, los problemas de contaminación del amplicón posteriores a la PCR se reducen significativamente (Monis *et al.*, 2005). Giglioti *et al.*, 2016 mencionan que las pruebas convencionales permiten únicamente la detección cualitativa de la infección; mientras que los ensayos en tiempo real empleados en su investigación permitieron detectar *B. bovis* y *B. bigemina* presentes en el ADN genómico obtenido de muestras de sangre de ganado Angus.

Según los resultados del presente estudio, 43 de las 100 muestras fueron positivas usando el ensayo en tiempo real. Sin embargo, solo 11 fueron positivas con el ensayo convencional. PCR-RFLP mostró una baja sensibilidad (4,6%) catalogándola como no deseable debido a que se incluye un alto porcentaje de falsos negativos 95,3%; bajo IPP 18% y un moderado IPN 53%. Tales evidencias sugieren que el ensayo PCR-RFLP no puede identificar con eficacia los verdaderos positivos, por lo tanto, la capacidad de detección de material genético de *Babesia bigemina* fue mayor en el ensayo qPCR. Estos hallazgos están de acuerdo con los resultados informados por Zhang *et al.*, 2016 quienes confirmaron que la qPCR es más sensible que la convencional, pudiendo detectar la infección por *Babesia* en sangre bovina a concentraciones 1000 veces más bajas que la PCR estándar. De igual manera en 2013 Vasco, comprobó que la PCR en tiempo real es la técnica más rápida, segura y sencilla; para la diferenciación de especies de Babesia.

Los resultados obtenidos en la PCR TaqMan se visualizaron por dos medios; el gráfico de amplificación que refleja la generación del colorante informador mismo que está directamente relacionado con la formación de productos PCR, y la intersección entre el gráfico y el umbral definido como el umbral del ciclo, ct o cq como lo indica Leutenegger, 2001. Relacionando el valor de cq con la cantidad de ADN de *B. bigemina* presente en la reacción. Las muestras positivas se reflejaron al aumentar la intensidad fluorescente del colorante informador, FAM siendo el cq más bajo 15,7 que corresponde a la muestra número 46 y el más alto 34,5 de la muestra 2, para este estudio. De igual manera, en el estudio realizado por Kim y colaboradores, en 2007 donde desarrollaron ensayos de PCR en tiempo real basados en Taqman para detección diagnóstica de *Babesia bovis* y *bigemna*, determinaron que el valor del umbral del ciclo que indica la cantidad de gen objetivo en la muestra osciló entre 23,1 y 37,1. Estos resultados sugirieron que el ensayo q-PCR empleando el sistema Taqman descrito en el presente estudio proporcionó una forma rápida y sensible la detección de

material genético mediante el monitoreo continuo de fluorescencia a partir de muestras de sangre.

Únicamente dos muestras resultaron positivas en ambos ensayos, lo que sugiere que la mayor proporción de detecciones positivas por el ensayo en tiempo real puede atribuirse a la sensibilidad diagnóstica de esta prueba mientras que el método convencional no fue eficiente debido a la necesidad de una mayor cantidad de ADN para que los productos se puedan visualizar. Corroborando lo mencionado por Guevara *et al.*, (2011), donde indican que el límite de detección de qPCR es menor al del ensayo convencional. Con la finalidad de aumentar la sensibilidad, el diagnóstico de babesiosis se debería realizar con métodos de reacción en cadena de la polimerasa, especialmente en tiempo real para minimizar los falsos negativos o detectar casos de coinfección, teniendo en cuenta que los animales pueden o no manifestar síntomas actuando como reservorio con un gran potencial para transmitir la enfermedad de un área a otra.

Capítulo 6: Conclusiones

- Los ensayos moleculares PCR- RFLP y qPCR son capaces de diagnosticar la presencia de *Babesia bigemina* en sangre periférica de bovinos.
- Los resultados del presente estudio indicaron que la eficacia de la técnica convencional PCR-RFLP para la detección de material genético de *Babesia bigemina* en bovinos de zonas endémicas para babesiosis resultó menor, para considerarla un método alternativo confiable en comparación con el método qPCR.
- El empleo del ensayo en tiempo real reduce la necesidad de un paso posterior a la amplificación brindando resultados en un tiempo considerablemente más corto en comparación con PCR-RFLP.

Capítulo 7: Recomendaciones

- Realizar estudios comparativos sobre ensayos en tiempo real y convencionales, como la PCR multiplex (mPCR) que se caracteriza por ser una herramienta muy valiosa en estudios sobre hemoparásitos.
- Aplicar diferentes protocolos de extracción de ADN, ya que el rendimiento óptimo de todos los ensayos de amplificación molecular depende en gran medida de la eficiencia del procedimiento.
- Incentivar la aplicación de tecnologías de diagnóstico rápido de ácidos nucleicos, como la PCR en tiempo real debido a que es más sensible y reduce significativamente el riesgo de contaminación.

Referencias

- AGROCALIDAD. (2018). *Base de datos (UPAs) Vacunación contra la fiebre aftosa en cantones suroccidentales de la provincia del Azuay.*
- Aguilera, P., Ruiz, M., Rocha, M., Pineda, B., & Chánez, M. (2014). PCR en Tiempo Real. In *Herramientas moleculares aplicadas en ecología* (Primera, pp. 175–197).
- AL-Hosary, A. A. T. (2017). Comparison between conventional and molecular methods for diagnosis of bovine babesiosis (*Babesia bovis* infection) in tick infested cattle in upper Egypt. *Journal of Parasitic Diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology*, 41(1), 243. <https://doi.org/10.1007/S12639-016-0785-2>
- Álvarez, A., Rojas, C., & Figueroa, J. (2019). Diagnostic Tools for the Identification of *Babesia* sp. in Persistently Infected Cattle. *Pathogens 2019, Vol. 8, Page 143*, 8(3), 143. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS8030143>
- Antonio Alvarez, J., Rojas, C., & Figueroa, J. v. (2019). Diagnostic Tools for the Identification of *Babesia* sp. in Persistently Infected Cattle. *Pathogens*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS8030143>
- Arboleda, M. (2019). *Diagnóstico molecular y prevalencia de Babesia spp. Mediante PCR-RFLP en ganado bovino de la Provincia de Manabí – Ecuador.* Universidad de las Fuerzas Armadas.
- Assadian, O., & Stanek, G. (2002). Theobald Smith—The Discoverer of Ticks as Vectors of Disease. *The Middle European Journal of Medicine*, 13–14. <https://www.researchgate.net/publication/11043051>
- Bock, R., Jackson, L., de Vos, A., & Jorgensen, W. (2004). Babesiosis of cattle. In *Parasitology* (Vol. 129, Issue SUPPL.). <https://doi.org/10.1017/S0031182004005190>
- Bustamante, J. G. (2021). *Caracterización molecular de la Babesia bigemina en Bovinos ubicados en dos niveles geomorfológicos en el municipio Girón-Ecuador.* Universidad del Zulia.
- Carter, P., & Rolls, P. (2022, March). *Babesiosis in Animals.* MSD Veterinay Manual. <https://www.msdbvetmanual.com/circulatory-system/blood-parasites/babesiosis-in-animals>

- CFSPH. (2018). *Bovine Babesiosis*. www.cfsph.iastate.edu
- Chávez, M., Cholota, C., Medina, V., Yugcha, M., Ron, J., Martin, S., Gómez, G., Saegerman, C., & Reyna, 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). <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS10121593>
- Cheriyyedath, S. (2019). Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Technique. In *News Medical Life Sciences*. <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/35104.pdf>
- Criado, A. (2007). Parassitologia Second Babesia World Summit. *Official Journal of the Italian Society of Parasitology*, 49, 39–44. <https://www.researchgate.net/publication/6147199>
- Criado, A., Buling, A., Asenzo, G., Benitez, D., Florin-Christensen, M., Gonzalez-Oliva, A., Henriques, G., Silva, M., Alongi, A., Agnone, A., Torina, A., & Madruga, C. R. (2009). Development of fluorogenic probe-based PCR assays for the detection and quantification of bovine piroplasmids. *Veterinary Parasitology*, 162(3–4), 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.040>
- Dantas, F., Alves, L., & Uilenberg, G. (2016). Babesiosis. In *Arthropod Borne Diseases* (pp. 347–354). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-13884-8_21
- Euzéby, J. (2008). *Grand dictionnaire illustré de parasitologie médicale et vétérinaire*. Lavoisier.
- Ferrini, A. (2021, March 17). Introducción a la PCR | Redes de tecnología. *Genomics Research*. <https://www.technologynetworks.com/genomics/articles/an-introduction-to-pcr-345445>
- Fesseha, H., Mathewos, M., Eshetu, E., & Tefera, B. (2022). Babesiosis in cattle and ixodid tick distribution in Dasenech and Salamago Districts, southern Ethiopia. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-022-10416-4>
- Gasque, R. (2008). Babesiosis Bovina. In *Enciclopedia Bovina* (Primera Edición, p. 97). Universidad Autónoma de México.
- Giglioti, R., Oliveira, H., Santana, C., Ibelli, A., Néo, T., Bilhassi, T., Rabelo, M., Machado, R., Brito, L., & Oliveira, M. (2016). Babesia bovis and Babesia bigemina infection

- levels estimated by qPCR in Angus cattle from an endemic area of São Paulo state, Brazil. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7(5), 657–662. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.02.011>
- Guan, F., Jin, Y. T., Zhao, J., Xu, A. C., & Luo, Y. Y. (2018). A PCR Method That Can Be Further Developed into PCR-RFLP Assay for Eight Animal Species Identification. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5890140>
- Guevara, N., Rivas, L., & Ríos, L. (2011). Utilidad de las técnicas moleculares aplicadas al diagnóstico de Babesia bovis y Babesia bigemina en Ganado Bovino: Revisión Sistemática. *Hechos Microbiología*, 2(2), 65–78.
- Jabir, J. (2017). Review on Bovine Babesiosis and its Economical Importance. *Journal of Veterinary Medicine and Research*, 4(5), 1090.
- Kadri, K. (2019). Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.86491>
- Kim, C., Iseki, H., Herbas, M. S., Yokoyama, N., Suzuki, H., Xuan, X., Fujisaki, K., & Igarashi, I. (2007). Development of Taqman-Based Real-Time PCR Assays for Diagnostic Detection of Babesia bovis and Babesia bigemina. www.ajtmh.org.
- 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>
- Leutenegger, C. (2001). The Real-Time TaqMan PCR and Applications in Veterinary Medicine. *Veterinary Sciences Tomorrow*, 1.
- Mariani, S., & Bekkevold, D. (2013). The Nuclear Genome: Neutral and Adaptive Markers in Fisheries Science. In *Stock Identification Methods: Applications in Fishery Science: Second Edition* (pp. 297–327). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397003-9.00014-X>
- Menegesha, A. (2020). A Review on Bovine Babesiosis. *J Vet Med Animal Sci*, 3(1), 1028. <http://meddocsonline.org/>
- Monis, P., Giglio, S., Keegan, A. ., & Thompson, A. (2005). Emerging technologies for the detection and genetic characterization of protozoan parasites. In *Trends in*

Parasitology (Vol. 21, Issue 7, pp. 340–346).
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.05.012>

Morzaria, S., Katende, J., Kairo, A., Nene, V., & Musoke, A. (1992). New methods for the diagnosis of Babesia bigemina infection. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 87, 201–205. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761992000700033>

Mosqueda, J., Olvera-Ramírez, A., Aguilar-Tipacamú, G., & Cantó, G. (2012). Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis. *Current Medicinal Chemistry*, 19(10), 1504. <https://doi.org/10.2174/092986712799828355>

Ndao, M. (2009). Diagnosis of Parasitic Diseases: Old and New Approaches. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2009, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2009/278246>

Nolan, T., Huggett, J., & Sanchez, E. (2013). Good practice guide for the application of quantitative PCR (qPCR). *National Measurement System*, 8.

OIE. (2021). *BOVINE BABESIOSIS Aetiology Epidemiology Diagnosis Prevention and Control References*. <http://www.oie.int/wahis/public.php?page=home>

Oliveira, T. C. G., Oliveira, M. C. S., Araujo, J. P., & Amarante, A. F. T. (2005). PCR-based detection of Babesia bovis and Babesia bigemina in their natural host Boophilus microplus and cattle. *International Journal for Parasitology*, 35(1), 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.09.002>

Pestana, E., Belak, S., Diallo, A., Crowther, J., & Viljoen, G. (2010). *Early, Rapid and Sensitive Veterinary Molecular Diagnostics-Real Time PCR Applications*. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-3132-7>

Pfeffer, M., Kro'l, N., & Obiegala, A. (2018). Prevention and control of tick-borne anaplasmosis, cowdriosis and babesiosis in the cattle industry. In *Ecology and Control of Vector-Borne Diseases* (Vol. 5, pp. 175–194). Wageningen Academic Publishers. https://doi.org/10.3920/978-90-8686-863-6_7

Poitras, E., & Houde, A. (2002). La PCR en temps réel: principes et applications . *Reviews in Biology and Biotechnology*, 2(2), 2–11. <http://www.rbmc.qc.ca/reviews/>

Quroollo, B. A., Archer, N. R., Schreeg, M. E., Marr, H. S., Birkenheuer, A. J., Haney, K. N., Thomas, B. S., & Breitschwerdt, E. B. (2017). Improved molecular detection of Babesia infections in animals using a novel quantitative real-time PCR diagnostic

- assay targeting mitochondrial DNA. *Parasites and Vectors*, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S13071-017-2064-1/FIGURES/5>
- Rasmussen, H. B. (2012). Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis - Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting. In *Gel Electrophoresis - Principles and Basics* (pp. 315–333). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/37724>
- Rodriguez, A., Schnittger, L., Tomazic, M., Florin, M., Rodriguez, A. E., & Tomazic, M. L. (2013). *Current and prospective tools for the control of cattle-infecting Babesia parasites* (V. Castillo & R. Harris, Eds.; 1st ed.). Nova Science Publishers Inc. <https://www.researchgate.net/publication/236179696>
- Romero, D., Mira, A., Mosqueda, J., García, Z., Hidalgo, M., Vela, N. A. O., de León, A. A. P., Florin, M., & Schnittger, L. (2016). Molecular and serological detection of Babesia bovis- and Babesia bigemina-infection in bovines and water buffaloes raised jointly in an endemic field. *Veterinary Parasitology*, 217, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.12.030>
- Sachman-Ruiz, B., Lozano, L., Lira, J. J., Martínez, G., Rojas, C., Antonio Álvarez, J., & Figueroa, J. v. (2021). A Comparative Genomic Study of Attenuated and Virulent Strains of Babesia bigemina. *MDPI*, 10(3), 318. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS10030318>
- Suarez, C., Alzan, H., Silva, M., Rathinasamy, V., Poole, W., & Cooke, B. (2019). Unravelling the cellular and molecular pathogenesis of bovine babesiosis: is the sky the limit? *International Journal for Parasitology*, 49(2), 183–197. <https://doi.org/10.1016/J.IJPARA.2018.11.002>
- Vasco, K. (2013). “Estandarización de la técnica de análisis de fusión de alta resolución para la detección de Babesia en garrapatas utilizando polimorfismos de nucleótidos”. Universidad Central del Ecuador .
- Williams, R. (2003). Restriction Endonucleases. *Molecular Biotechnology*, 23. [https://cbpbu.ac.in/userfiles/file/2020/STUDY_MAT/ZOO/1st%20SEM_Restriction%20Enzyme%20\(Course%2020201\).pdf](https://cbpbu.ac.in/userfiles/file/2020/STUDY_MAT/ZOO/1st%20SEM_Restriction%20Enzyme%20(Course%2020201).pdf)
- Yabsley, M. J., & Shock, B. C. (2013). Natural history of Zoonotic Babesia: Role of wildlife reservoirs. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 2(1), 18. <https://doi.org/10.1016/J.IJPPAW.2012.11.003>

Yang, W., Kang, X., Yang, Q., Lin, Y., & Fang, M. (2013). Review on the development of genotyping methods for assessing farm animal diversity. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 4(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-4-2/METRICS>

Zhang, B., Sambono, J., Morgan, J., Venus, B., Rolls, P., & Lew-Tabor, A. (2016). An Evaluation of Quantitative PCR Assays (TaqMan® and SYBR Green) for the Detection of Babesia bigemina and Babesia bovis, and a Novel Fluorescent-ITS1-PCR Capillary Electrophoresis Method for Genotyping B. bovis Isolates. *Veterinary Sciences 2016, Vol. 3, Page 23*, 3(3), 23. <https://doi.org/10.3390/VETSCI3030023>

Anexos

Anexo 1. Fotografías del trabajo de laboratorio



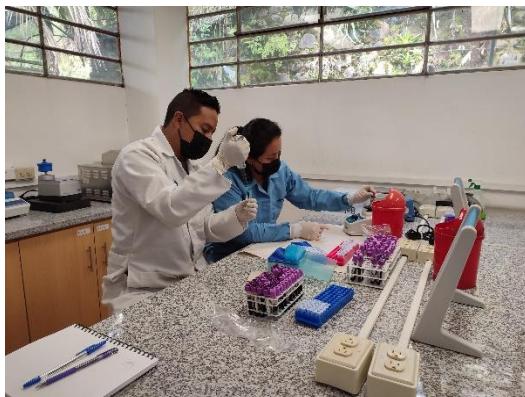
Fotografía 1. Rotulación de tubos eppendorf.

Fuente: los autores



Fotografía 2. Muestras de sangre bovina.

Fuente: los autores



Fotografía 3. Preparación de muestras.

Fuente: Los autores.



Fotografía 4. Elaboración de buffer de lisis.

Fuente: Los autores.



Fotografía 5. Protocolo de extracción de ADN.

Fuente: Los autores.



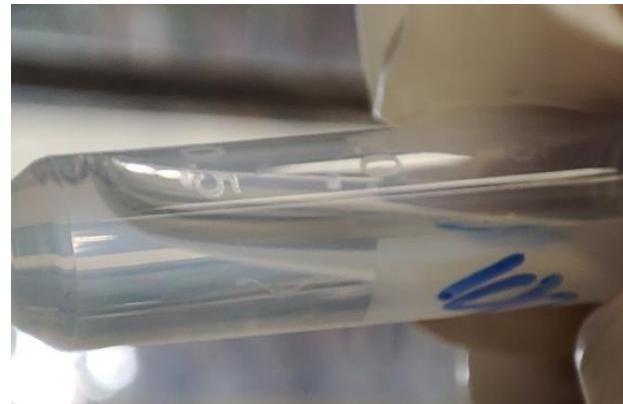
Fotografía 6. Centrifugación de las muestras.

Fuente: Los autores.



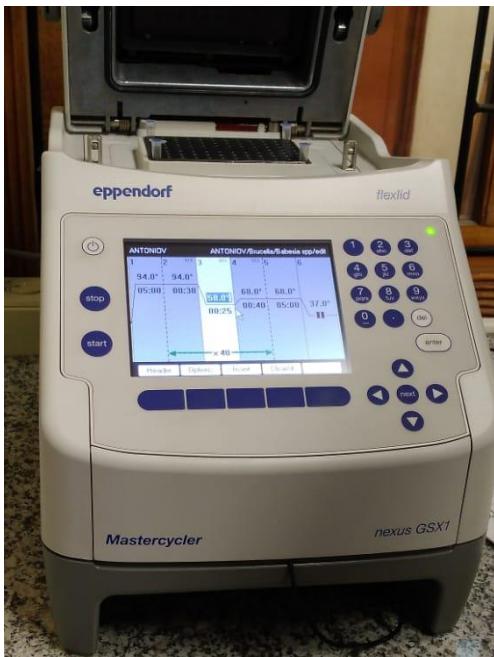
Fotografía 7. Centrífuga, laboratorio de Biología Molecular. Universidad de Cuenca.

Fuente: Los autores.



Fotografía 8. ADN Babesia spp.

Fuente: Los autores.



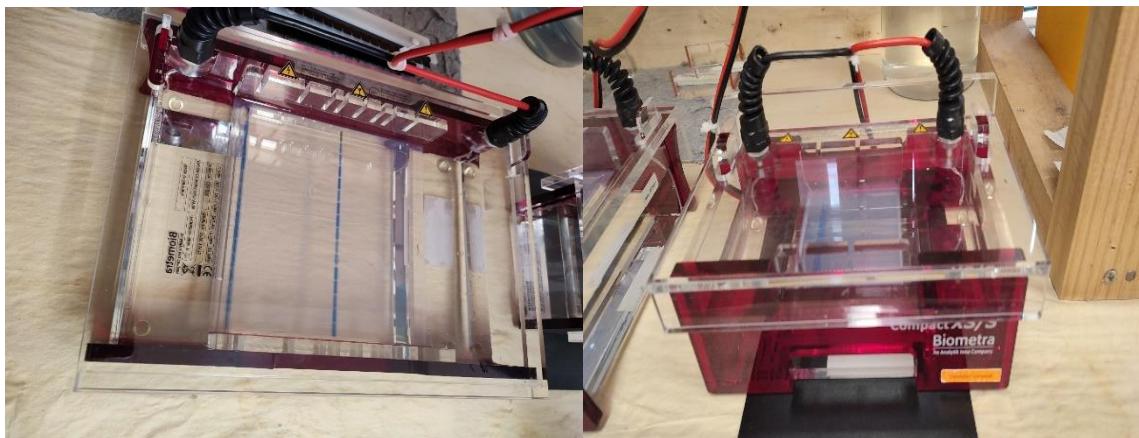
Fotografía 9. Proceso de amplificación. Termociclador con función gradiente Mastercycler nexus GSX1. De 64 pocillos.

Fuente: Los autores.



Fotografía 10. Electroforesis de ADN.

Fuente: Los autores.



Fotografía 11. Cámara de electroforesis horizontal. **Fuente:** Los autores.



Fotografía 12. Fotodocumentador BIO RAD Gel Doc XR+.
Fuente: Los autores.



Fotografía 13. Visualización de los productos PCR.
Fuente: Los autores.



Fotografía 14. Kit qPCR.
Fuente: Los autores.



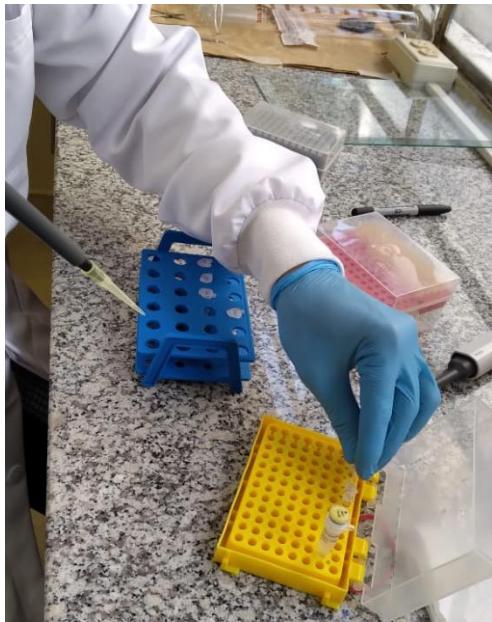
Fotografía 15. Mezcla de reacción para detección qPCR.
Fuente: Los autores.



Fotografía 16. Termociclador sistema de PCR en tiempo real TIANLONG. Universidad del Azuay.
Fuente: Los autores.



Fotografía 17. Enzima de restricción Alu I.
Fuente: Los autores.



Fotografía 18. Buffer Tango para garantizar las condiciones de reacción óptimas para la enzima de restricción.
Fuente: Los autores.



Fotografía 19. Visualización de productos PCR del ensayo convencional RFLP.
Fuente: Los autores.