

Reporte secuencia de una cepa de *Babesia bigemina* aislada en bovinos del municipio Girón, Azuay, Ecuador

Sequence report of a strain of *Babesia bigemina* isolated in cattle from the Girón 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. Maracaibo, Venezuela.

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

RESUMEN

En este estudio, los archivos ab1 obtenidos de la secuenciación Sanger (hacia adelante y hacia atrás) se utilizaron para realizar el ensamblaje y análisis de la secuencia. Para ello se utilizó el software Staden Package (versión 2.0b10), el cual consta de dos programas: Pregap4 y Gap4. Pregap4 fue responsable del análisis de calidad y la preparación de datos, mientras que Gap4 realizó el ensamblaje, la verificación, el análisis de pares de lectura, la edición contig y el cálculo de confianza de la secuencia de consenso. Se utilizó BLASTn para identificar posibles homólogos (*Babesia bovis* y *B. bigemina*). La secuenciación basada en secuencias del gen 18S de *B. bigemina*, utilizando los oligonucleótidos PIRO A For: (5'-TACCCAATCCTGACACACAGGG-3') y PIRO B (5'-TTAAATACACGAATGCCCCCAAC-3'), mostrando una banda de aproximadamente 393 pb, reveló la distribución nucleótica de una cepa designada como 4623Ba.bi_GIR-E, de *B. bigemina*. El producto produjo una secuencia de 369 pb (>H230420-007_C05_46_Oligo1.ab1) y 371 pb (>H230420-007_I07_46_Oligo2.ab1). *B. bigemina* fue aislada de sangre periférica de ganado mestizo infectado, positivo a prueba de Giemsa, PCR-RFLP y qRT-PCR, del municipio de Girón en la provincia del Azuay, Ecuador, ubicado a más de 2.000 metros sobre el nivel del mar, el cual comparte 99,72 % de homología con varias secuencias de *B. bigemina* reportadas en Ecuador, países latinoamericanos como Colombia, Brasil, revelando posibles orígenes del patógeno y, con las secuencias de *B. bigemina* publicadas aisladas en latitudes extracontinentales, corroborando así la estabilidad genómica del parásito.

Palabras clave: *Babesia bigemina*; *Babesia bovis*; *Rhipicephalus microplus*; frotis de Giemsa; PCR-RFLP; qRT-PCR; secuenciación de Sanger

ABSTRACT

In this study, the ab1 files obtained from Sanger sequencing (forward and reverse) were used to perform sequence assembly and analysis. For this, the Staden Package software (version 2.0b10) was used, which consists of two programs: Pregap4 and Gap4. Pregap4 was responsible for quality analysis and data preparation, while Gap4 performed assembly, verification, read pair analysis, contig editing, and confidence calculation of the consensus sequence. BLASTn was used to identify possible homologs (*Babesia bovis* and *B. bigemina*). Sequence-based sequencing of the 18S gene of *B. bigemina*, using the oligonucleotides For: PIRO A (5'-TACCCAATCCTGACACACAGGG-3') and PIRO B (5'-TTAAATACACGAATGCCCCCAAC-3'), which obtained a band of approximately 393 bp, revealed the nucleotide distribution of a strain designated as 4623Ba.bi_GIR-E, of *B. bigemina*. The product yielded a sequence of 369 bp (>H230420-007_C05_46_Oligo1.ab1) and 371 bp (>H230420-007_I07_46_Oligo2.ab1). *B. bigemina* was isolated from the peripheral blood of infected crossbred cattle, positive for Giemsa smear, PCR-RFLP and qRT-PCR, from the Municipality of Girón in the Province of Azuay, Ecuador, located at greater than 2,000 meters above sea level, which shares high homology, greater than 98 %, with several sequences of *B. bigemina* reported in Ecuador, Latin American Countries such as Colombia, Brazil, revealing possible origins of the pathogen and, with the sequences of *B. bigemina* published isolated in extra-continental latitudes, thus corroborating the genomic stability of the parasite.

Key words: *Babesia bigemina*; *Babesia bovis*; *Rhipicephalus microplus*; Giemsa smear; PCR-RFLP; qRT-PCR; Sanger sequencing

INTRODUCCIÓN

Los protozoarios intraeritrocitarios *Babesia bovis* y *B. bigemina* son los agentes causales de la Babesiosis bovina, que provoca importantes pérdidas económicas a la ganadería en áreas enzoóticas. *B. bovis* y *B. bigemina*, son eucariotas inferiores alveolados pertenecientes al phylum Apicomplexa, la clase Aconoidasida, orden Piroplasmida y familia Babesiidae. Entre las especies más importantes que afectan al ganado bovino se encuentran *B. 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* [1].

El vector responsable de la transmisión de la babesiosis bovina en Latinoamérica y varias partes del mundo es la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. En Ecuador, los datos sobre la ecología de las garrapatas y la información sobre su distribución son escasos. Enríquez y col. [2], realizan una clasificación taxonómica de las garrapatas que infestan al ganado bovino en la provincia de Loja; zona geográfica limítrofe con la provincia del Azuay en la que se encuentra el municipio Girón, y concluyen que el 100 % de las garrapatas encontradas pertenecen a *R. microplus*.

La presencia de *B. bovis* y *B. bigemina* en la sangre de los bovinos puede ser detectada por observación al microscopio óptico de extendidos finos de sangre periférica coloreados con la tinción de May Grünwald-Giemsa [3] y por métodos moleculares cualitativos analizando el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP) y PCR tiempo real cuantitativa (qRT-PCR). En estos preparados de frotis sanguíneos, los eritrocitos infectados contienen distintas formas del parásito, las formas simples ovaladas (merozoítos), las formas de anillo (trofozoito) y las formas pares (merozoítos luego de la división celular). En el caso de *B. bovis* estos cuerpos ovalados miden alrededor de $2,0 \times 1,5 \mu\text{m}$, mientras que *B. bigemina* mide $4,5 \times 2,0 \mu\text{m}$. Es por esta razón que a *B. bigemina* se la incluye dentro de las babesias "grandes" y a *B. bovis* dentro del grupo de las "pequeñas" [4].

Para la detección de *Babesia* por PCR convencional se utilizan cebadores específicos: PIRO A (5'-TACCAATCCTGACACACAGGG-3') y PIRO B (5'-TTAAATACACGAATGCCCCCAAC-3') [5]. Estos amplifican parcialmente el gen 18S rRNA de *Babesia* spp., mostrando una banda de aproximadamente 400 pares de bases (pb) del ssu-rDNA de la mayoría de especies de *Babesia* [6]. La capacidad de los cebadores combinados PIRO-A y PIROB para discriminar especies de *Babesia* permite 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 [6].

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 [7, 8, 9]. Su ritmo evolutivo es lento siendo un gen altamente conservado. Tiene un alto nivel de sensibilidad, y reportes de identidad cercanos al 100 % [10, 11, 12, 13]. *B. bigemina* tiene 3 copias del gen 18S rARN, de acuerdo a lo demostrado por Román y col. (1991) [14], quienes las denominaron a y b (idénticas) y la tercera c que se distinguió de las primeras por contener 2 nucleótidos diferentes. Además, las unidades a y b son transcritas con mayor frecuencia que la unidad c.

La PCR-RFLP se basa en un análisis bioinformático realizado con la secuencia de ADN ribosomal de cada especie de *Babesia*, se identifica el sitio de reconocimiento para *B. bovis* y *B. bigemina*

en la parte variable del gen 18S rARN del parásito. La endonucleasa de restricción AluI cuya secuencia de reconocimiento se ubica en 5'AG↓CT3', corta al amplicón correspondiente al DNA ribosomal de *B. bigemina* de 393 pb, en tres fragmentos de 38, 144 y 211 pb, mientras que al amplicón correspondiente al DNA ribosomal de *B. bovis* de 378 pb, lo corta en tres fragmentos de 38, 146 y 194 pb permitiendo así diferenciar ambas especies [4, 5].

Las técnicas de qPCR-RT explota el llamado principio TaqMan® fundamentado en la composición química de 5' nucleasa, que utiliza una sonda fluorogénica para habilitar la detección de un producto de PCR específico conforme se acumula durante la PCR [15].

Actualmente la Universidad Estatal de Washington está llevando a cabo los proyectos del genoma de *B. bovis* y *B. bigemina*. Hasta el momento se ha estudiado el genoma de *B. bovis* cepa Tejas T2Bo, el cual está constituido por cuatro cromosomas [16]. El genoma completo de *B. bigemina* aún no ha sido reportado en una revista indexada. Sin embargo, el Instituto Sanger, entidad que está secuenciando el genoma, tiene publicado en su sitio web datos que han permitido la caracterización, comparación del genoma e identificación de genes y predicción de secuencias codificantes y proteínas. Se estima que el genoma nuclear de *B. bigemina* tiene un tamaño de 10 Mb (un millón de pares de bases) distribuido en 4 cromosomas [16, 17].

Una vez identificada la *B. bigemina* por las técnicas de Frotis coloreado con Giemsa, PCR-RFLP y qPCR-RT, el ADN extraído de sangre periférica un bovino positivo, acompañado de los cebadores específicos: PIRO A (5'-TACCAATCCTGACACACAGGG-3') y PIRO B (5'-TTAAATACACGAATGCCCCCAAC-3'), fue sometido a secuenciación utilizando los servicios de la Empresa MACROGEN para ser procesados en Korea del Sur. Se analizan en este artículo las secuencias obtenidas.

MATERIALES Y METODOS

El municipio de Girón está ubicado al Sur - Oeste de la provincia del Azuay, Ecuador, en la Hoya del Jubones. Tiene una extensión de 346,5 km² y lo conforman 2 parroquias rurales: San Gerardo, y La Asunción. Su altitud está comprendida entre 1.200 a 3.400 m.s.n.m. con temperaturas promedio de 8 a 15,5°C [18]. La población bovina actual del Cantón Girón, Ecuador, en la zona alta (más de 2.200 msnm) es de aproximadamente 4.900 animales, mientras en la zona baja (menos de 2.200 msnm), la cantidad de animales es de 922 para un total de 5.822 cabezas de ganado bovino Mestizo Holstein-Criollo, de varias edades y grupos etarios. La garrapata *R. microplus*, principal vector del hemoparásito, fue detectada en la totalidad de los animales evaluados, incluso los ubicados a niveles a mas de 2.200 msnm.

Las muestras de sangre completa de bovino se analizaron mediante frotis sanguíneos coloreados con Giemsa [3]. Para detectar las regiones variables del gen 18S rARN, se realizó una PCR convencional a partir del ADN con los cebadores PIRO A (5'-TACCAATCCTGACACACAGGG-3') y PIRO B (5'-TTAAATACACGAATGCCCCCAAC-3'), de acuerdo al método descrito por Figueroa y col. [5]. Se realizó la visualización de los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa.

Dicha banda fue purificada, extraída y sometida a digestión con la enzima de restricción AluI (secuencia de reconocimiento 5'AG↓CT3') aplicando la técnica PCR-RFLP previamente descrita por Arboleda-García [19]. Para la amplificación en tiempo real (qPCR-RT), se utilizó el kit Primer Design (qPCR) específico para *B. bigemina*.

El ADN de las muestras (20 μ L, 30–50 ng gDNA) fue enviado a secuenciar por la Empresa MACROGEN a Korea del Sur, utilizando los oligonucleótidos PIRO A For: (3' AATACCCAATCCTGACACAGGG 5') y PIRO B Rev: (3' TTAAATACGAATGCCCCCAAC 5') (10 μ L de cada cebador, 5 pmol- μ L⁻¹).

Para el ensamblaje y análisis de las secuencias se utilizaron los archivos ab1 obtenidos de la secuenciación Sanger (forward y reverse). Para ello, se empleó el software Staden Package [20], que consta de dos programas: Pregap4 y Gap4. Pregap4 se encargó del análisis de calidad y preparación de los datos, mientras que Gap4 realizó el ensamblaje, verificación, análisis de pares de lectura, edición de contigs y cálculo de la confianza de la secuencia consenso. Se utilizó BLASTn para identificar posibles homólogos (*B. bovis* y *B. bigemina*). Se descargaron las secuencias correspondientes de la base de datos GenBank, considerando que los hospederos fueran rumiantes, que son generalmente afectados por estos parásitos. Estas secuencias descargadas se utilizaron para realizar el alineamiento múltiple, se utilizó el algoritmo Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages (UPGMA) como método de clasificación, el cual agrupa dos taxones con la mínima distancia, calculando la media aritmética de las distancias entre ellos. También se incluyó un grupo externo correspondiente al *Plasmodium falciparum* para generar árboles ultramétricos. Se ajustaron los parámetros sugeridos por el programa MEGA X (versión 10.2.4) [20] y se elaboraron los dendrogramas correspondientes, representando visualmente las relaciones filogenéticas entre las secuencias analizadas [21].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La técnica de Frotis coloreado con Giemsa de las muestras de sangre periférica de bovino permitió observar la *B. bigemina* intraeritrocitaria, FIG. 1.

Por PCR estándar se obtuvo una la banda de 393 pb correspondiente a la *B. bigemina*, FIG.2.

En la FIG.3 se muestran los resultados de la electroforesis en gel agarosa al 1,2 %, del producto de la digestión enzimática con la enzima AluI de la banda de 396 pb, 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 que sirvió de guía para determinar el sitio de amplificación, siendo las bandas más intensas consideradas como positivas.

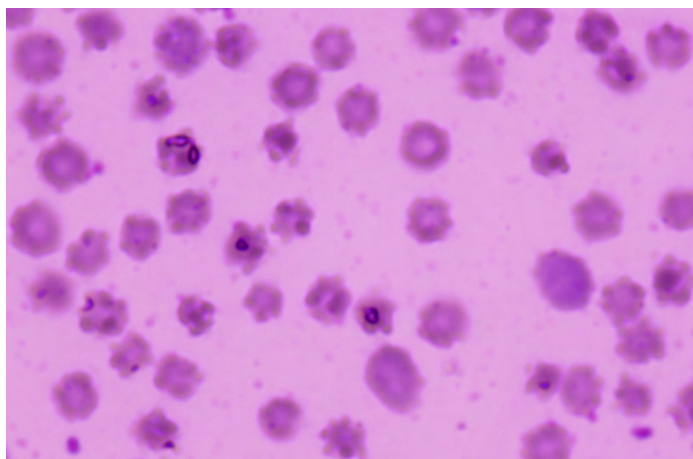


FIGURA 1. Frotis sanguíneo coloreado con Giemsa mostrando glóbulos rojos infectados con *Babesia bigemina*

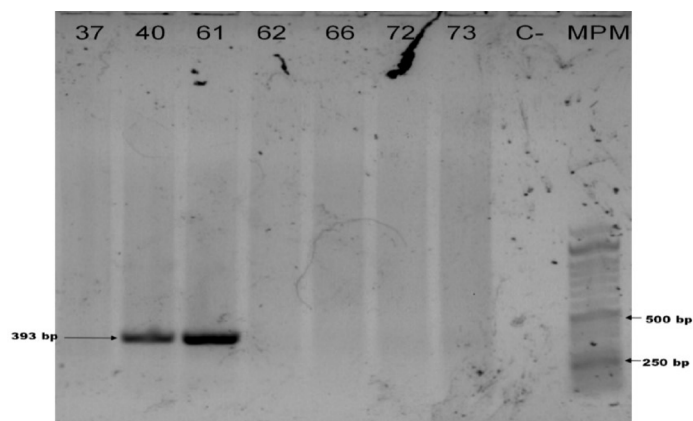


FIGURA 2. Electroforesis de los productos PCR para *Babesia bigemina* 393pb.; muestras 40 (positiva), 61(positiva), 62, 66, 72, 73 (negativas); respectivamente. Carril C- control negativo. Carril MPM Marcador de peso molecular de 100 pb

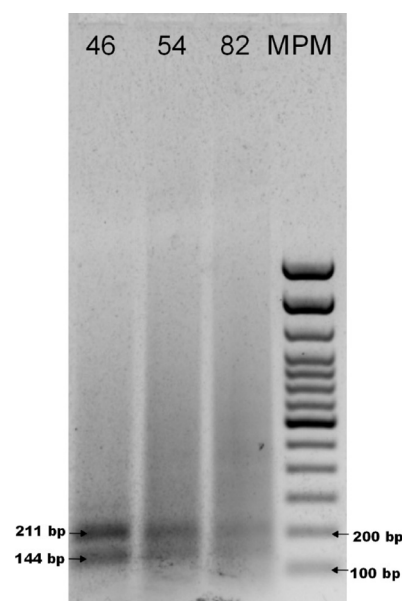


FIGURA 3. Digestión enzimática con la enzima AluI. Se indica los fragmentos 144 pb y 211 pb para *Babesia bigemina*. Carriles 1, 2, 3 muestras 46, 54 y 82, respectivamente. Carril MPM marcador de peso molecular de 100 pb. *El fragmento esperado de 38 pb, no se observó en el gel

Por qPCR-TR se obtuvo un resultado de Cq 15,7 para la muestra N° 46, seleccionada para secuenciación correspondiente a una parasitemia alta con 10⁷ copias- μ L⁻¹.

La combinación de las herramientas bioinformáticas utilizadas permitió obtener resultados precisos de la secuenciación basada en secuencias de 18S rRNA de especies de babesias, la cual reveló la distribución de nucleóticos de un cepa designada como la 4623Ba.bi_GIR-E de *B. bigemina*, correspondiente a la muestra N.º 46, positiva a frotis coloreado con Giemsa, PCR- RFLP y qPCR-RT, aislada de sangre periférica de un bovino infectado perteneciente al municipio Girón en la provincia de Azuay, Ecuador, ubicado a más de 2.000 msnm. El producto arrojó una secuencia de 369 pb (>H230420-007_C05_46_Oligo1.ab1) y de 371 pb (>H230420-007_I07_46_Oligo2.ab1), FIG. 4.

>H230420-007_C05_46_Oligo1 369
AGAACGAAACATACAGGGCTTTCGTTGTAATTGGAATGATGGT
GATGTACAACCTCACCAGAGTACCAATTGGAGGGCAAGTCTGGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTAACCT
TGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGATTTTCAGCCTCGCGTTTTT
TCCCTTTTGTGGGTCTTTTCGCTGGCTTTTTTTTACTTTGAGAAA
ATTAGAGTGTTTCAAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGG
AATAATAGAGTAGGACCTTGTTCTATTTTGTGGTTTGGAGCCTT
GGTAATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCATTCGTATTAATAAA
AGATGG
>H230420-007_I07_46_Oligo2.ab1 371
TAACTTTACAAGGCTCAAACCAACAAATAGAACCAAGGTCCTA
CTCTATTATTCATGCTGAAGTATTCAAGACAAAAGTCTGCTTGAA
ACACTCTAATTTCTCAAAGTAAAAAAAAGCCAGCGAAAAAGACC
CAACAAAAGGGAAAAAACGCGAGGCTGAAATACAACCTACGAGCT
TTTTAACTGCAACAAGTTTAAATATACGCTATTGGAGCTGGAATTAC
CGCGGCTGCTGGCACCAGACTTGCCTCCAATTGGTACTCTGGTG
AGGTTGTACATCACCATCATTCCAATTACAAGACGAAAGCCCTGT
ATTGTTATTTCTTGCTACTACCTCCCTGTGTCAGGGTTGGGGTATT
TTTGAAAAA

FIGURA 4. File: 46_Oligo1.ab1 Run Ended: 2023/4/20 18:32:22 Signal G:270 A:402 C:537 T:675, Sample: 46_Oligo1 Lane: 29 Base spacing: 13.3753195 369 bases in 4458 scans. File: 46_Oligo2.ab1 Run Ended: 2023/4/20 18:32:22 Signal, G:565 A:1132 C:1578 T:1220, Sample: 46_Oligo2 Lane: 24 Base spacing: 13.033701 371 bases in 4456 scans

La cepa 4623Ba.bi_GIR-E y otro aislado de *B. bigemina*, una cepa confirmada de *B. bigemina* y dos cepas de *B. bovis* fueron cotejada con una sonda de *B. bigemina* la cual se alineó con las todas secuencias de babesias analizadas, FIG. 5.

A partir del análisis de las muestras positivas a *B. bigemina* y otras especies de babesia detectadas en la zona, se identificaron las secuencias, modelos matemáticos y estadísticos óptimos para la elaboración del dendograma.

La secuencia 4623Ba.bi_GIR-E se ubicó cercana a las cepas de *B. bigemina* de Ecuador, Brasil, EUA, Colombia y México, agrupada solamente en el clado de las cepas de *B. bigemina* analizadas, aparte del clado de las cepas de *B. bovis* reportadas previamente en Ecuador y varios países de Latinoamérica, con porcentajes de homología superiores al 99 %. La secuencia 4623Ba.bi_GIR-E se ubica en un clado diferente al del *P. falciparum*, incluido para el análisis como grupo externo, FIG. 6.

La muestra 4623Ba.bi_GIR-E, mostró 99,24 % de homología con las cepas de *B. bigemina* NCBI MH257718.1. de Sudáfrica, MH194392.1 y X59604.1. de Colombia, X59604.1. de México, MH050352.1 de EUA, FJ42636.1 de Brasil y OL583951.1, OL583950.1 de Ecuador, TABLA I.

Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con lo publicado por Chavez-Larrea quien describe dos grandes clados para *B. bovis* y *B. bigemina* [22], en un estudio filogenético realizado a partir de las secuencias descargadas de BLAST y comparadas con 19 muestras analizadas. En las ramas superiores se encontraban las *B. bovis* y en las inferiores *B. bigemina*. De las 19 muestras evaluadas en dicho estudio se

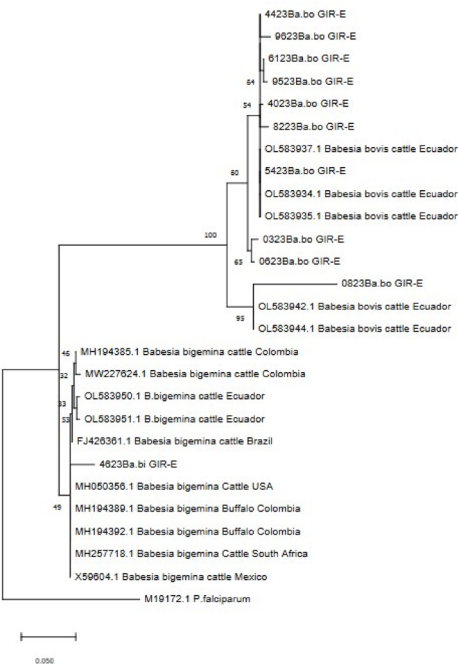
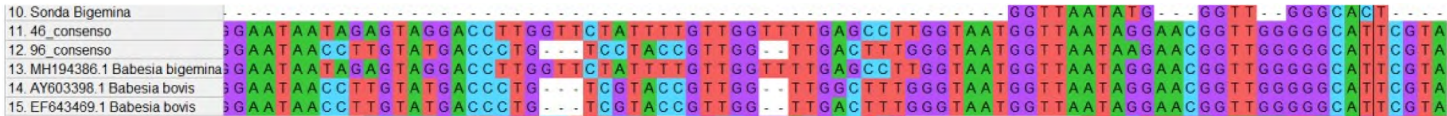


TABLA I Especies de <i>Babesia</i> spp. utilizadas en el análisis filogenético			
Especies	Hospedero	Ubicación	Nro. de acceso
<i>Babesia bovis</i>	Vacuno	Ecuador	OL583937.1
<i>Babesia bovis</i>	Vacuno	Ecuador	OL583942.1
<i>Babesia bovis</i>	Vacuno	Ecuador	OL583935.1
<i>Babesia bovis</i>	Vacuno	Ecuador	OL583944.1
<i>Babesia bovis</i>	Vacuno	Ecuador	OL583934.1
<i>Babesia bigemina</i>	Vacuno	Colombia	MH194385
<i>Babesia bigemina</i>	Vacuno	Colombia	MW227624
<i>Babesia bigemina</i>	Vacuno	Ecuador	OL583950.1
<i>Babesia bigemina</i>	Vacuno	Brasil	FJ426361.1
<i>Babesia bigemina</i>	Vacuno	EUA	MH050356.1
<i>Babesia bigemina</i>	Vacuno	Sudáfrica	MH257718.1
<i>Babesia bigemina</i>	Búfalo	Colombia	MH194392.1
<i>Babesia bigemina</i>	Búfalo	Colombia	MH194389.1
<i>Babesia bigemina</i>	Vacuno	Mexico	X59604.1
<i>Babesia bigemina</i>	Vacuno	Ecuador	OL583951.1

identificaron 7 genotipos diferentes para muestras similares a *B. bovis* y 3 genotipos para secuencias similares a *B. bigemina*, ligeramente diferentes entre sí y, a su vez, similares a otros genotipos descritos en América Latina y el mundo, cerca de aislados de Puerto Rico, Islas Vírgenes, Uruguay, etc. Otra secuencia de *B. bigemina* fue similar a los aislamientos de Cuba, Bolivia y Argentina, cercanos, además, de un aislamiento de *B. bigemina* de la India.

CONCLUSIONES

La secuenciación de la región 18S rARN de la cepa 4623Ba.bi_GIR-E de *B. bigemina*, aislada de sangre periférica de un bovino infectado, del municipio Girón en la provincia de Azuay, Ecuador, mostró una distribución de nucleótidos con alta homología con secuencias de *B. bigemina* reportadas en Ecuador, y países latinoamericanos como Colombia, Brasil y también con secuencias publicadas de otras latitudes extra continentales. Esto puede indicar posibles procedencias del patógeno y corroborar la estabilidad genómica del parásito.

Conflictos de interés

Los autores declaran que no existen conflicto de interés en el presente estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] Alvarez JA, Rojas C, Figueroa JV. Diagnostic tools for the identification of *Babesia* sp. in persistently infected cattle. *Pathog.* [Internet]. 2019; 8(3):143-157. doi: <https://doi.org/m2hj>
- [2] Enríquez S, Guerrero R, Arrivillaga-Henríquez J, Araujo P, Villacrés E, Enríquez A., Benítez-Ortiz W. New records of ticks of genus *Amblyomma* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) for Ecuador. *Acta Parasitol.* [Internet]. 2020; 65:430-440. doi: <https://doi.org/m2hm>
- [3] Retamales-Castelletto E, Manzo-Garay V. Recomendaciones para la tinción de frotis sanguíneos para la lectura del hemograma [Internet]. Santiago, Chile: Instituto de Salud Pública de Chile; 2018 [consultado 20 Ago. 2023]. 14 p. Disponible en: <https://goo.su/WICeUm>
- [4] Abdela N, Ibrahim N, Begna F. Prevalence, risk factors and vectors identification of bovine anaplasmosis and babesiosis in and around Jimma town, Southwestern Ethiopia. *Acta Trop.* [Internet]. 2018; 177:9-18. doi: <https://doi.org/m2hn>
- [5] Carret C, Walas F, Carcy B, Grande N, Précigout É, Moubri K, Schetters TP, Gorenflot A. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *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>
- [6] Soberanis-Bernal PJ, Castañeda-Arriola RO, Figueroa-Millán JV, Rojas-Martínez C, Lira-Amaya JJ, Álvarez-Martínez JA, Santamaría-Espinosa RM, Martínez-García G. Aplicación de una prueba de PCR-RFLP en el diagnóstico de la infección por *Babesia* spp. en bovinos. Estudio retrospectivo. En: Da Silva LF, De Oliveira VC, comps. Ciencias agrarias: Estudios sistemáticos e investigación avanzada 3 [Internet]. Ponta Grossa, Paraná, Brasil: Atena Editora; 2023. p. 70-89. doi: <https://doi.org/m2xi>
- [7] Allsopp MT, 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. doi: <https://doi.org/dv9b5v>
- [8] 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>
- [9] Criado-Fornelio A, Buling A, Casado N, Gimenez C, Ruas J, Wendt L, Rosa-Farías N, Pinheiro M, Rey-Valeiron C, Barba-Carretero JC. Molecular characterization of arthropod-borne hematozoans in wild mammals from Brazil, Venezuela and Spain. *Acta Parasitol.* [Internet]. 2009; 54(3):187-193. doi: <https://doi.org/bxdssx>
- [10] Durrani AZ, Kamal N. Identification of ticks and detection of blood protozoa in friesian cattle by polymerase chain reaction test and estimation of blood parameters in district Kasur, Pakistan. *Trop. Anim. Health Prod.* [Internet]. 2008; 40:441-447. doi: <https://doi.org/bwxhft>
- [11] 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/b3wvfq>
- [12] Mghirbi Y, Bouattour A. Detection and molecular characterization of *Babesia canis vogeli* from naturally infected dogs and *Rhipicephalus sanguineus* ticks in Tunisia. *Vet. Parasitol.* [Internet]. 2008; 152(1-2):1-7. doi: <https://doi.org/c3spzf>
- [13] Salih DA, El Hussein AM, Seitzer U, Ahmed JS. Epidemiological studies on tick-borne diseases of cattle in Central Equatoria State, Southern Sudan. *Parasitol. Res.* [Internet]. 2007; 101:1035-1044. doi: <https://doi.org/dmf2f4>
- [14] Reddy GR, Chakrabarti D, Yowell CA, Dame JB. Sequence microheterogeneity of the three small subunit ribosomal RNA genes of *Babesia bigemina*: expression in erythrocyte culture. *Nucleic Acids Res.* [Internet]. 1991; 19(13):3641-3645. doi: <https://doi.org/chd66v>
- [15] Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* [Internet]. 1991; 88(16):7276-7280. doi: <https://doi.org/cmpfrs>
- [16] Brayton KA., Lau AOT, Herndon DR, Hannick L, Kappmeyer LS, Berens SJ, Bidwell SL, Brown WC, Crabtree J, Fadrosch D, Feldblum T, Forberger HA, Haas BJ, Howell JM, Khouri H, Koo H, Mann DJ, Norimine J, Paulsen IT, Radune D, Ren Q, Smith Jr. RK, Suarez CE, White O, Wortman JR, Knowles Jr. DP, McElwain TF, Nene VM. Genome sequence of *Babesia bovis* and comparative analysis of apicomplexan hemoprotozoa. *PLoS pathog.* [Internet]. 2007; 3(10):e148. doi: <https://doi.org/fqkf64>
- [17] Ray BK, Bailey CW, Jensen JB, Carson CA. Chromosomes of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Mol. Biochem. Parasitol.* [Internet]. 1992; 52(1):123-126. doi: <https://doi.org/cczhx5>
- [18] 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 22 Ago. 2022]; Cap. 2.1. p. 2.1.1-2.1.96. Disponible en: <https://goo.su/5UdKAjT>

- [19] 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 [consultado 10 Mar. 2023]. 72 p. Disponible en: <https://goo.su/x7jE>
- [20] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. [Internet]. 1977; 74(12):5463-5467. doi: <https://doi.org/dgsrk5>
- [21] Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Mol. Biol. Evol. [Internet]. 2018; 35(6):1547-1549. doi: <https://doi.org/gd39d8>
- [22] 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. Pathog. [Internet]. 2021;10(12):1593-1606. doi: <https://doi.org/mrkj>