

Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI-

Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud

Distribución geográfica de garrapatas (Superfamilia Ixodoidea) y agentes infecciosos protozoos y bacterias rickettsiales asociados en animales de producción.

Código B6 – 2021

Instituto de Investigación en Ciencia Animal y Ecosalud (IICAE)

M.V. Luis Felipe Choc Martínez
Br. Juan Fernando Agreda Sánchez

Guatemala, 29 de abril de 2022

Autoridades

Dr. Hugo Pérez Noriega
Director General de Investigación

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar Pérez
Coordinador General de Programas

Dra. Hilda Valencia de Abril
Coordinador(a) del Programa de Investigación

Autores

Nombre del coordinador(a) del proyecto
M.V. Luis Felipe Choc Martínez

Nombre del investigador(a)
M.V. Luis Felipe Choc Martínez

Nombre del auxiliar de investigación II
Juan Fernando Sánchez Agreda

Colaboradores:

Licda. Doris García. Encargada de diagnóstico molecular, Laboratorio Regional de Referencia de Sanidad Animal (LARRSA).

Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación (Digi), 2021.
El contenido de este informe de investigación es responsabilidad exclusiva de sus autores.

Esta investigación fue cofinanciada con recursos del Fondo de Investigación de la Digi de la Universidad de San Carlos de Guatemala a través de del código B6-2021 en el Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud.

Los autores son responsables del contenido, de las condiciones éticas y legales de la investigación desarrollada.



Universidad de San Carlos de Guatemala
Dirección General de Investigación



Índice General

1.	Resumen y palabras claves	1
2.	Introducción.....	2
3.	Planteamiento del problema	3
4.	Delimitación en tiempo y espacio	4
4.1.	Delimitación en tiempo	4
4.2.	Delimitación espacial.....	4
5.	Marco teórico.....	4
6.	Estado del arte.....	7
7.	Objetivos generales y específicos	9
7.1.	Objetivo general	9
7.2.	Objetivos específicos.....	9
8.	Materiales y métodos.....	9
8.1.	Enfoque de la investigación.....	9
8.2.	Método.....	9
8.2.1.	Muestreo de campo.....	9
8.2.2.	Identificación de especímenes y análisis de laboratorio	10
8.2.3.	Recolección de información.....	10
8.2.4.	Técnicas e instrumentos	11
8.2.5.	Procesamiento y análisis de la información	16
9.	Resultados y discusión	16
9.1.	Resultados	16
9.2.	Discusión	18
10.	Referencias	233
11.	Apéndice.....	28
12.	Aspectos éticos y legales	377
13.	Vinculación.....	377

Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI-

14.	Estrategia de difusión, divulgación y protección intelectual.....	377
15.	Aporte de la propuesta de investigación a los ODS	388
16.	Orden de pago final	388
17.	Declaración del Coordinador(a) del proyecto de investigación	399
18.	Aval del Director(a) del instituto, centro o departamento de investigación o Coordinador de investigación del centro regional universitario	399
19.	Visado de la Dirección General de Investigación	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Regiones de Guatemala	28
Figura 2	Hoja de control de información. Diagnóstico de frotis sanguíneos	29
Figura 3	Hoja de control de información. Diagnóstico morfológico de garrapatas	30
Figura 4	Referenciación geográfica y datos climáticos de unidades productivas	31
Figura 5	<i>Rhipicephalus microplus</i>	31
Figura 6	<i>Rhipicephalus microplus</i>	32
Figura 7	<i>Anaplasma</i> spp. y <i>Babesia</i> spp.	32
Figura 8	Amplificación de fragmento de ARNr. Región A. 541 pb. <i>Babesia bovis</i>	33
Figura 9	Amplificación de fragmento de ARNr. Región A. 1024 pb. <i>Babesia bigemina</i>	33
Figura 10	Amplificación de Gen 16S de ARNr. 750 pb. <i>Anaplasma</i> spp.	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Datos de medición ambiental y georreferenciación de unidades productivas	34
Tabla 2	Diagnóstico de especies de garrapatas colectadas por unidad productiva	35
Tabla 3	Diagnósticos microscópicos positivos a <i>Babesia</i> spp. y <i>Anaplasma</i> spp. según unidad productiva muestreada.....	36
Tabla 4	Diagnóstico por PCR de acuerdo con cada unidad productiva muestreada.....	36

1. Resumen y palabras claves

Las garrapatas son organismos que parasitan a mamíferos de diferentes especies entre los que se encuentran animales domésticos. Estos actúan como agentes transmisores vectoriales de distintos organismos patógenos entre los que se encuentran *Babesia* spp. y *Anaplasma* spp., que producen enfermedades en animales y seres humanos.

Para identificar las garrapatas que parasitan animales de producción, comprender su participación en la transmisión de agentes patógenos bacterianos y parasitarios, y su distribución geográfica en nuestro país; se tomaron muestras de especímenes que parasitan bovinos, se identificaron las características ambientales de los sitios de recolección, se identificó morfológicamente a las garrapatas colectadas en los animales y se identificó a los agentes parasitarios mediante microscopía y biología molecular por PCR.

Se identificaron garrapatas *Rhipicephalus microplus* en fincas de la región central de Guatemala, también se identificaron mediante microscopía agentes parasitarios y rickettsiales compatibles con los géneros *Babesia* spp. y *Anaplasma* spp., pudiéndose confirmar únicamente *Babesia bigemina*, *B. bovis* y *Anaplasma* spp. por diagnóstico molecular. La temperatura ambiente registrada en las unidades productivas varió entre los 26°C y 32°C, mientras que la humedad ambiente varió entre 43% y 80%, mostrando condiciones favorables para el desarrollo de agentes vectores de hemoparásitos y rickettsias.

Palabras clave: Vectores, Ectoparásitos, Bovinos, Babesia, Anaplasma

Abstract and keyword

Ticks are parasites of different mammal species, including domestic production animals. There are vectors-transmitting agents of different pathogenic organisms, including *Babesia* spp. and *Anaplasma* spp., which produces diseases in animals and humans.

To identify ticks in production animals, role in the transmission of bacterial and parasitic pathogens geographical distribution, samples were taken from specimens parasitizing cattle, the environmental characteristics of the collection sites were identified, the ticks collected in the animals were morphologically identified and the parasitic agents were identified by microscopy and molecular biology by PCR.

Rhipicephalus microplus ticks were identified in the central region of Guatemala, as well as parasitic and rickettsial agents compatible with the genera *Babesia* spp. and *Anaplasma* spp., the species confirmed by molecular diagnosis were: *Babesia bigemina*, *B. bovis* and *Anaplasma* spp. In productive units the temperature ranges from 26°C to 32°C, while the humidity varies from 43% to 80%, which is a favorable development environment for the vector-transmitting agents and rickettsiae.

Keywords: Vectors, Ectoparasites, Cattle, Babesia, Anaplasma

2. Introducción

Guatemala se encuentra en una región con alta variabilidad climática, habiendo condiciones tropicales variables según la época del año y sus regiones geográficas. Esta variabilidad se traduce también en alta riqueza ecológica que da lugar a interacción entre los organismos de distintos niveles tróficos que, en ocasiones, dan lugar a procesos patológicos como es el caso de la relación parasitaria entre las garrapatas y sus hospederos.

Parte de estas interacciones ecológicas incluyen la transmisión de agentes infecciosos de tipo viral, bacteriano y parasitario como algunos protozoos que pueden provocar patologías graves entre animales y seres humanos. Entre los organismos que se han reportado en nuestro país como productores de enfermedades tanto entre animales domésticos de producción como en seres humanos se encuentran los géneros *Babesia* spp. y *Anaplasma* spp. productores de Babesiosis y Anaplasmosis bovina y equina, enfermedades que también pueden ser transmitidas a seres humanos.

Estudios previos como los realizados por van Andel et al. (1997), Eremeeva et al. (2013) y Estrada (2019), han demostrado la presencia de estos agentes infecciosos en diferentes regiones del país, estos reportes siempre han asociado la presencia de las enfermedades con la presencia de garrapatas de diferentes especies que actúan como agentes vectores transmisores, aunque las garrapatas tienden a proliferar en sitios con temperaturas más cálidas y templadas, se ha observado actualmente la presencia de garrapatas en regiones que antes se consideraban de clima frío, en parte por la adaptación de estos organismos a

diferentes condiciones climáticas y principalmente por la reciente alteración climatológica derivada del calentamiento global, por lo que regiones con temperatura más frías ahora presentan períodos cálidos durante determinadas épocas del año lo que origina una adaptación de organismos a estas nuevas regiones.

Este estudio busca es determinar la presencia de garrapatas por identificación morfológica de diferentes géneros y especies parasitando animales de producción en la región central de Guatemala, con el fin de establecer su distribución; además de identificar la presencia de *Babesia* spp., y *Anaplasma* spp. transmitidos por estos agentes vectoriales utilizando técnicas de microscopía como el frotis sanguíneo y la confirmación de los agentes parasitarios y rickettsiales por biología molecular utilizando PCR.

3. Planteamiento del problema

Guatemala se ubica en una región de clima subtropical que se caracteriza por temperaturas superiores a los 21°C en promedio, con una tendencia al incremento anual en los últimos años como consecuencias del calentamiento climático, originando modificaciones climáticas que conducen a la presencia de ciclos de lluvias y sequías muy marcadas (Bardales et al., 2019), alterando a los diferentes microclimas como ecosistemas, por lo que ahora es común observar especies animales y vegetales invasoras entre las que destaca la presencia de organismos parasitarios, pertenecientes a niveles tróficos inferiores como es el caso de las garrapatas (Bardales et al., 2015; Estrada, 2015).

La presencia de nuevos organismos parásitos en un ecosistema conlleva un nuevo período de adaptación tanto al clima como a nuevos hospederos, los cuales también deben adaptarse a estos nuevos organismos (Estrada, 2015). Es sabido el papel vectorial que juegan los ectoparásitos ixodídeos en la transmisión de diferentes enfermedades infecciosas virales y bacterianas como de otros organismos protozoarios causantes de importantes parasitosis en América Latina como lo mencionan los estudios de Maggi y Krämer, (2019).

De acuerdo con Eremeeva et al. (2012) existe una alta prevalencia de casos no reportados de Piroplasmosis y Anaplasmosis, enfermedades originas por *Babesia* spp. y

Anaplasma spp. en ganado de nuestro país, los cuales se encuentran registrados en la Unidad de Parasitología de la FMVZ, USAC.

Estos agentes infecciosos son diseminados por garrapatas, siendo los géneros más comúnmente identificados en nuestro país: *Rhipicephalus* spp., *Dermacentor* spp., *Ixodes* spp., *Amblyomma* spp., *Haemaphysalis* spp., *Otobius* spp., *Ornithodoros* spp. y *Argas* spp. Es importante que tanto las especies de agentes patógenos como de las garrapatas que actúan como sus vectores, y que se encuentran afectando a animales domésticos, sean identificados de forma precisa para establecer su distribución geográfica, y así sentar una base para correlacionar en el futuro posibles casos de enfermedades que afectan el desempeño productivo.

4. Delimitación en tiempo y espacio

4.1. Delimitación en tiempo

La duración del presente estudio fue de 11 meses (enero 2021 a noviembre 2021). Durante este tiempo se realizó el muestreo de campo tomando parámetros ambientales en las unidades productivas a las que se tuvo acceso durante la primera mitad de tiempo del estudio y se realizaron análisis de laboratorio para el diagnóstico de los agentes parasitarios en la última fase del estudio.

4.2. Delimitación espacial

El estudio se desarrolló en unidades productivas de las regiones I y V de Guatemala. Comprendidas por los departamentos de Guatemala (Región I metropolitana) y Chimaltenango, Sacatepéquez y Escuintla (Región V) (Figura 1).

5. Marco teórico

Las garrapatas del género *Argas* spp. miden de 5 a 10 mm, poseen una forma oval y aplanada con coloración amarillenta a pardo rojizo dorsalmente. Ventralmente poseen una textura rugosa, coriácea y mamelonada con un borde lateral afilado. Su aparato bucal se ubica ventralmente por lo que no es observable cuando se les ve desde una vista superior. Tienden a mantenerse en hendiduras y grietas de gallineros, así como en jaulas. Es raro verlas sobre

su huésped. *Argas* spp. es vector de *Borrelia* spp. para aves de corral gallináceas y aves de ornato como gallinas de Guinea y canarios. La transmisión de *Borrelia* spp. entre garrapatas suele ser de tipo transovárico (Nava et al., 2017).

El género *Ornithodoros* spp. se caracteriza por tener una forma globular sin bordes afilados casi redondeada cuando se observa desde arriba. Su cuerpo es aplanado volviéndose convexo en especímenes repletos. Suele ubicarse en grietas y hendiduras de nidos, así como en ramas donde las aves anidan, también se ubican en madrigueras de roedores y zonas de descanso de grandes mamíferos (Donaldson et al., 2016; Nava, 2017).

Son vectores transmisores de *Borrelia recurrentis* a seres humanos, así como a roedores en cuya población el agente se vuelve endémico. Una garrapata puede permanecer infectada con *Borrelia* por varios años y transmitir el agente a su prole de forma transovárica (Donaldson et al., 2016). Otra forma de transmisión de agentes patógenos se da a través de la transmisión transovárica, donde el agente infeccioso se transmite desde una garrapata adulta a las larvas de su prole por infección de sus ovarios. Este mecanismo es la única forma de transmisión de agentes patógenos por la que las garrapatas de un hospedero (Obregón et al., 2020; Polanco y Ríos, 2016).

Ixodes sp. es un género que se puede encontrar en regiones que no sobrepasen los 1500 msnm, es responsable de la transmisión de *Babesia*, *Borrelia* y *Ehrlichia*. Su escudo no está ornamentado, no posee ojos ni festones, posee un surco anal en forma de arco anterior al ano. El hipostoma presenta dentición 3/3 con siete pares de pelos o sedas dorsales, además de pelos suplementarios. Los pedipalpos son fusiformes y los palpos son más anchos en la unión del segundo y tercer artejo. Las coxas poseen dos espinas triangulares que nunca son redondeadas (Mitchel et al., 2016; Nava, 2017).

El género *Haemophysalis* spp. posee palpos con artejos ensanchados lateralmente, base del capítulo hexagonal, similar a *Rhipicephalus* spp. No poseen ojos ni ornamentación en su escudo, pero si poseen festones en el extremo posterior. Su surco anal se encuentra posterior al ano. *H. leporispalustris* presenta larvas y ninfas que se alimentan de aves que anidan en el suelo y de pequeños mamíferos. Las fases adultas parasitan conejos ubicándose

a nivel de orejas y alrededor de ojos, se han reportado infestaciones raras en gatos (López, 2016).

Rhipicephalus microplus anteriormente clasificadas dentro del género *Boophilus* spp., tienen afinidad parasitaria por bovinos y son importantes vectores de agentes infecciosos como *Theileria* spp., *Babesia* spp. y *Anaplasma* spp. Pueden encontrarse en latitudes que van de los 0 hasta los 2000 msnm (Obregón et al., 2020; Polanco y Ríos, 2016). Morfológicamente se caracterizan por un capítulo hexagonal, la coxa I posee dos espolones triangulares tan largos como anchos y redondeados que originan una escotadura poco profunda, más visible en machos, mientras que las coxas II y III son similares a la coxa I pero menos marcadas. Los estigmas son de forma ovalada en ambos sexos, es una característica muy útil para diferenciar a este género, son típicas de ninfas y adultos (Nava, 2017).

Dermacentor nittens parasita caballos y se relaciona con la infestación de *Babesia* sp. en equinos. Su escudo no posee ornamentación, es de color café rojizo, siendo en las hembras de mayor longitud con textura lisa, redondeado posteriormente y ancho a nivel de los ojos. Las hembras también poseen una estrechez del cuerpo a nivel de placas estigmatales. Los machos presentan siete festones pequeños no muy bien diferenciados. El gnatosoma posee una base rectangular con pedipalpos cortos, moderadamente anchos sin cubrir a los quelíceros ni al hipostoma que a su vez presenta una dentición de cuatro filas a cada lado de la línea media. En machos los estigmas son ovals con cuatro a diez anillos grandes más o menos aislados (López, 2016).

Amblyoma spp. son garrapatas que no poseen placas adanales. Las ninfas se caracterizan por su gran tamaño que puede ir de 2.4 hasta 4 mm, por lo que son fáciles de visualizar. Su forma es redondeada cuando están repletas con una coloración gris oscura y se desprender con facilidad (Nava, 2017).

Amblyoma cajenense se ha descrito como un complejo de varias especies siendo las principales *A. mixtum*, *A. cajennense*, *A. tonelliae*, *A. interandinum* y *A. sculptum*. Parasita a equinos y bovinos principalmente pero también puede encontrarse infestando a otras especies de animales al igual que seres humanos. Es común encontrarla en regiones de baja altitud sobre el nivel del mar con clima cálido. Está especialmente asociada a la transmisión de

ehrlichiosis y tularemia. (Acevedo, 2020; Martins et al., 2016; Mitchel et al., 2016; Pesquera et al., 2015).

Su escudo es subtriangular, más ancho que largo o de similar de ancho y largo, posee ornamentación abundante con una coloración pálida que se extiende por todo el escudo tanto en machos como en hembras. Las hembras poseen dibujos distribuidos por todo el escudo y son de coloración grisácea vacíos o repletas. Los machos poseen dibujos en la parte central del escudo y festones (Nava, 2017).

Por otra parte, en cuanto a los agentes infecciosos transmitidos por garrapatas, su diagnóstico su diagnóstico molecular amplifica la región ITS 2 5.8S - 28S, ITS 12S, ITS 16S – 23S de ARN ribosomal (ARNr) y el gen COI, *gtlA*, *sca4*, *omp A*, *ompB* de ADN nuclear, utilizando diferentes *primers* de acuerdo con la especie de interés (Faccini et al., 2017; López, 2016; Martínez et al., 2019; Martins et al., 2016; Miller et al., 2016; Mitchel et al., 2016; Morales et al., 2015; Pesquera et al., 2015; Rehman et al., 2017).

Los métodos serológicos incluyen la detección de anticuerpos IgG contra *Ehrlichia* spp, *Rickettsias* y *Anaplasma* spp. en humanos y distintas especies de animales domésticos (Faccini et al., 2017; Moraes et al., 2015).

6. Estado del arte

Alvarez et al. (2003) determinaron la distribución de garrapatas del género *Amblyomma* spp. en bovinos y equinos de diferentes regiones de Costa Rica. La especie con mayor prevalencia identificada en este estudio fue *A. cajennense*, seguida de otros especímenes identificados como *A. maculatum*, *A. inornatum* y *A. oblongoguttatum*. Este estudio hizo un análisis comparativo entre factores ambientales y la abundancia poblacional de los especímenes en diferentes fincas ganaderas, de esta manera se estableció que regiones presentaban las mejores características ecológicas que favorecían la abundancia de garrapatas de este género y si las diferentes especies presentaban un determinado tropismo por nichos ecológicos específicos.

Otro estudio desarrollado por Alvarez y Bonilla (2007) estableció el grado de tropismo de garrapatas *A. cajennense* por un determinado huésped, utilizando para ello como

sujetos de experimentación a equinos y bovinos de San José, Costa Rica. Este estudio evaluó la biología de las garrapatas, correlacionando la estación climática con los hábitos alimenticios de cada base evolutiva y su ubicación en el hospedero. Como resultado se observó una mayor predilección de garrapatas adultas por equinos más que por bovinos, de los que, a su vez, *Bos taurus* fue el más afectado con respecto a individuos *Bos indicus*. Las mayores cargas parasitarias se presentaron durante los meses de temporada lluviosa. Además, se hizo un registro de las regiones corporales más frecuentadas, siendo la axila el área más afectada por bovinos *Bos taurus*, mientras que la pierna el lugar más afectado por bovinos *Bos indicus* y equinos.

Álvarez et al. (2018) desarrolló un estudio sobre garrapatas más frecuentes en venados cola blanca (*Odocoileus virginianus*) de Escuintla, Guatemala, demostrando que los especímenes más prevalentes correspondían a *Rhipicephalus microplus* seguidos de garrapatas *Amblyomma* spp. y *Dermacentor* spp. asociando la presencia de estos ectoparásitos a la cohabitación de nichos ecológicos con ganado bovinos que es frecuentemente afectado los mismos.

En nuestro país también se han desarrollado estudios enfocados en el diagnóstico de agentes infecciosos cuyo ciclo biológico necesita de la presencia de diferentes especies de garrapatas, tal es el caso del estudio de Eremeeva et al. (2012) quien reportó la presencia de infección por rickettsias en diferentes regiones de nuestro país, asociadas a picaduras de garrapatas del género *Amblyomma* spp., demostrando que la enfermedad presente en el ser humano es frecuentemente subdiagnosticada, debido a su similitud con signos clínicos de infecciones por otras enfermedades infecciosas más prevalentes en nuestro medio como el caso de Dengue, Zika, entre otros.

7. Objetivos generales y específicos

7.1. Objetivo general

Determinar los géneros y especies de garrapatas argasidas e ixodidas y su relación con agentes protozoarios y bacterianos causantes de enfermedades presentes en animales de producción.

7.2. Objetivos específicos

- Identificar las especies de garrapatas argasidas e ixodidas presentes en la región metropolitana y central de Guatemala.
- Establecer la distribución geográfica y nichos ecológicos de especies de garrapatas argasidas e ixodidas de la región metropolitana y central de Guatemala.
- Correlacionar la presencia de agentes infecciosos de los géneros *Babesia* spp., y *Anaplasma* spp. con especies de garrapatas presentes en la región metropolitana y central de Guatemala.

8. Materiales y métodos

8.1. Enfoque de la investigación

Cuantitativo, identificando agentes vectoriales y agentes parasitarios externos y hemoparásitos mediante microscopía, e identificando por técnicas moleculares la presencia de los agentes parasitarios, así como cuantificando la cantidad de animales afectados por agentes hemoparásitos según la región geográfica estudiada.

8.2. Método

8.2.1. Muestreo de campo

Se hizo un acercamiento con Médicos Veterinarios que realizan clínica de animales de producción para permitir el acceso a instalaciones productivas y poder muestrear a bovinos para establecer si existen infecciones por agentes hemoparásitos y rickettsiales,

carga ectoparasitaria y conocer las condiciones climáticas imperantes en el sitio de muestreo.

Una vez establecidos los contactos con los propietarios que estuvieron dispuestos a permitir el acceso a sus instalaciones y animales productivos, se procedió a realizar el muestreo de animales tomando muestras de sangre, colectando especímenes de garrapatas y tomando parámetros ambientales de la unidad productiva.

8.2.2. Identificación de especímenes y análisis de laboratorio

Se desarrolló una planificación para el diagnóstico de agentes parasitarios en la Unidad de Parasitología de la FMVZ y el Laboratorio Regional de Referencia de Sanidad Animal (LARRSA).

El diagnóstico morfológico de garrapatas se realizó por microscopía observando las características morfológicas diferenciales que permiten la identificación del espécimen de acuerdo con la guía de identificación de especímenes de la Unidad de Parasitología, FMVZ – USAC.

La identificación de especímenes hemoparásitos y rickettsiales se realizó por microscopía observando la presencia de fases parasitarias características en glóbulos rojos.

La identificación molecular de los especímenes hemoparásitos y rickettsiales se realizó en LARRSA siguiendo los protocolos descritos por Chaudhry et al. (2010) para *Babesia bigemina* y *Babesia bovis* y Tana et al. (2016) para *Anaplasma marginale*, con algunas modificaciones y siguiendo las instrucciones del fabricante del kit diagnóstico utilizado [Thermo Scientific DreamTaq Hot Start Green PCR Máster Mix (2X)].

8.2.3. Recolección de información

La información a nivel de campo sobre parámetros ambientales se tomó mediante un termómetro ambiental y los datos fueron almacenados en una hoja de colecta de datos.

Los datos recabados sobre diagnósticos parasitarios tanto de ectoparásitos como hemoparásitos fueron recolectados en hojas de control de datos diseñadas para este fin (Figura 2 y 3).

La información y datos de unidades productoras por ser de carácter sensible, quedó en anonimato para proteger la identidad a solicitud de los participantes en el estudio. Por lo cual únicamente se utilizó una numeración y georreferenciación para el control de información.

Los datos recabados del diagnóstico molecular se colectar en una hoja de resultados donde se identificó el número de muestra analizada, la identificación de la unidad productiva y el resultado como “positivo” o “negativo” a *Babesia bovis*, *B. bigemina* o *Anaplasma* spp. (Tabla 4).

8.2.4. Técnicas e instrumentos

En el sitio de muestreo se tomaron parámetros ambientales (Temperatura y Humedad relativa) para determinar el tipo de ambiente donde prevalecían los agentes vectoriales (garrapatas) por medio de un termómetro ambiental que registró tanto la temperatura ambiente como la humedad relativa durante el muestreo.

Se tomó sangre de la vena yugular o vena coccígea media que fueron depositadas en dos tubos con anticoagulante EDTA de 4 ml los cuales fueron identificados como “tubo 1” además de los datos de identificación de los animales muestreados y “tubo 2” conteniendo la misma información respectivamente. Las muestras fueron trasladadas posteriormente al laboratorio en frío por medio de una hielera, contenidas en gradillas para la correcta sujeción de los tubos.

Las muestras de sangre contenidas en los tubos se separaron en dos grupos, cada grupo contenía el “tubo 1” y el “tubo 2” de muestras sanguíneas colectadas del mismo animal respectivamente. El grupo de “tubo 1” se almacenó a -20°C y se reservó para el diagnóstico molecular. El segundo grupo “tubo 2” fue utilizado para el diagnóstico microscópico de agentes hemoparásitos y rickettsiales.

Para el diagnóstico microscópico de agentes hemoparásitos (*Babesia* spp. y *Anaplasma* spp) se realizaron frotis sanguíneos de la sangre contenidas en tubos con EDTA. El frotis sanguíneo se realizó tomando el equivalente a una gota mediana de sangre y colocando esta sobre una lámina porta objetos, posteriormente se realizó un extendido de la muestra tomando otra lámina porta objetos para este fin en una inclinación de 45°. A continuación, el extendido fue coloreado con Giemsa y se procedió a la observación en microscopio con un aumento de 1000X (inmersión), observando las fases parasitarias y rickettsiales dentro de glóbulos rojos.

También se extrajeron por medio de pinzas, especímenes de garrapatas que se encontraban adheridos a la piel, parasitando a estos animales en diferentes regiones del cuerpo. Estos fueron depositados en tubos que contenían alcohol al 70% para preservación de los especímenes y posterior identificación. Los tubos fueron transportados a temperatura ambiente en una gradilla hacia el laboratorio para su posterior análisis y tipificación morfológica.

La tipificación morfológica de garrapatas se realizó colocando a las garrapatas en una caja Petri, a continuación, la caja de Petri fue colocada en un estereoscopio y se observaron las características morfológicas diferenciales con un aumento de 40X, de acuerdo con la guía de identificación de especímenes de la Unidad de Parasitología de la FMVZ-USAC.

Las muestras destinadas para diagnóstico molecular fueron elegidas y distribuidas de acuerdo con el número de diagnósticos positivos presentes en cada una de las explotaciones bajo estudio. De esta manera, siete muestras correspondieron a explotaciones presentes en el departamento de Guatemala y 32 a explotaciones ubicadas en el departamento de Escuintla. Todas las muestras elegidas fueron previamente diagnosticadas como positivas a *Babesia* spp. o *Anaplasma* spp. por microscopía.

El diagnóstico molecular fue desarrollado por personal del Laboratorio Regional de Referencia de Sanidad Animal (LARRSA) a partir de las muestras de sangre que fueron almacenadas para este fin, de acuerdo con el protocolo de Chaudhry et al. (2010)

para *Babesia bigemina* y *B. bovis* y Tana et al. (2016) para *Anaplasma marginale*, con algunas modificaciones y siguiendo las instrucciones del fabricante del kit diagnóstico utilizado [Thermo Scientific DreamTaq Hot Start Green PCR Máster Mix (2X)].

Los primers utilizados fueron los siguientes:

Babesia bigemina

GAU 5 (Forward) 5'- TGGCGGCGTTTATTAGTTTCG- 3'

GAU 6 (Reverse) 5'- CCACGCTTGAAGCACAGGA- 3'

Babesia bovis

GAU9 (Forward) 5'- CTGTCGTACCGTTGGTTGAC-3'

GAU 10 (Reverse) 5'- CGCACGGACGGAGACCGA-3'

Anaplasma marginale

Ana 19A GTGTTCTGGGGTACTCCTA

Ana 19B TGATCTGGTCAGCCCCAGCT

El protocolo utilizado para la reacción de extracción genómica fue el siguiente:

1. A 200 µl de muestra congelada sin atemperar se agregaron:
 - a. 20 µl de Proteinasa K
 - b. 20 µl de ARNasa A
 - c. 200 µl de Buffer Purelink Genomic Digestion
2. Se incubó agitando suavemente a 55°C por 10 minutos
3. Se hizo vortex rápido y centrifugación breve para eliminar restos de la tapa del tubo de extracción
4. Se atemperó a temperatura ambiente
5. Se agregaron 200 µl de Purelink Genomic Lysis/Binding Buffer
6. Se realizó vortex rápido y se centrifugó brevemente para eliminar restos de la tapa de tubo de extracción
7. Se incubó a 55°C durante 10 minutos

8. Agregar 200 µl de etanol 96 – 100%
9. Se realizó vortex rápido y se centrifugó brevemente para eliminar restos de la tapa de tubo de extracción
10. Se agregó la muestra junto con el tubo colector a una columna de sílice y centrifugación a 10,000 x g por 1 minuto
11. Se descartó el tubo colector y se sustituyó por uno nuevo
12. Se agregaron 500 µl de Purelink Genomic Wash Buffer 1
13. Se centrifugó a 10,000 x g por 1 minuto
14. Se descartó el tubo colector y se sustituyó por uno nuevo
15. Se agregaron 500 µl de Purelink Genomic Wash Buffer 2 para centrifugación a 12,000 x g durante 3 minutos
16. Se descartó el tubo colector y se sustituyó por uno nuevo
17. Se colocó la columna de sílice en un tubo colector de 1.5 ml
18. Se agregaron 50 µl de Purelink Genomic Elution Buffer
19. Se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente, para centrifugación a 12,000 x g por 1 minuto
20. Se almacenó la muestra a 4°C

El protocolo utilizado para el diagnóstico molecular de *Babesia bigémina* y *Babesia bovis* fue el siguiente:

1. Preparación de PCR MIX

Se preparó 17.5 ul de Agua libre de ARNasas, se adicionó 25 ul de Dream Taq Hot Start Green PCR Master Mix ®2X, 1.25 ul de primer F GAU 5 y R GAU 6 respectivamente para un volumen total de mezcla para reacción de PCR de 45 ul.

2. Protocolo para reacción de PCR

Desnaturalización inicial 95°C / 3 minutos, continuando con 40 ciclos que incluyeron desnaturalización a 95°C / 30 segundos, alineamiento a 50°C / 30 segundos, extensión a 72°C / 1 minuto y una extensión final a 72°C / 15 minutos.

3. Lectura de Bandas de amplificación

- Se preparó gel de agarosa al 2% con 1X TAE Buffer
- Se agregó en el primer pocillo del gel 9 µl de escalera
- Se agregó 9 µl de muestra en cada pocillo
- Se ejecutó electroforesis a 120V por 45 minutos
- El resultado se observó en un transluminador de UV
- Las bandas positivas presentaron un peso de 1,124 pb de acuerdo con la tabla de referencia.
- Las muestras negativas no mostraron bandas de amplificación

El protocolo utilizado para el diagnóstico molecular de *Anaplasma spp.* fue el siguiente:

1. Preparación de PCR MIX

Se preparó 17.5 ul de Agua libre de ARNasas, se adicionó 25 ul de Dream Taq Hot Start Green PCR Master Mix @2X, 1.25 ul de primer F Ana19A 5 y R Ana19B 6 respectivamente para un volumen total de mezcla para reacción de PCR de 45 ul.

2. Protocolo para reacción de PCR

Desnaturalización inicial 95°C / 5 minutos seguida de 35 ciclos que incluyeron desnaturalización a 94°C / 45 segundos, alineamiento a 64°C / 30 segundos, extensión a 72°C / 1 minuto, finalizando con una extensión final a 72°C / 10 minutos.

3. Lectura de Bandas de amplificación

- Se preparó gel de agarosa al 2% con 1X TAE Buffer
- Se agregó en el primer pocillo del gel 9 µl de escalera
- Se agregó 9 µl de muestra en cada pocillo
- Se ejecutó electroforesis a 120V por 45 minutos
- El resultado se observó en un transluminador de UV

- Las bandas positivas presentaron un peso de 750 pb de acuerdo con la tabla de referencia.
- Las muestras negativas no mostraron bandas de amplificación

8.2.5. Procesamiento y análisis de la información

Los datos de las tablas de colecta de información se ingresaron a una base de datos que varió en su contenido de acuerdo con los objetivos del estudio que buscaban la tipificación de agentes parasitarios y rickettsiales e identificación de vectores.

La información se analizó por medio de un programa estadístico (Open Epi) para la determinación de prevalencia de infección en la explotación muestreada y en la región de estudio y fue interpretada por medio de gráficas y tablas.

La información sobre temperatura y humedad relativa registrada en una hoja de colecta de datos fue interpretada por medio de un mapa y comparada con los datos de localización geográfica de los especímenes parasitarios.

El diagnóstico confirmatorio molecular se realizó analizando 39 muestras positivas a diagnóstico microscópico que se escogieron de forma equitativa, de acuerdo con la cantidad de animales muestreados en cada una de las unidades productivas evaluadas. Las muestras fueron almacenadas a -20°C en el Laboratorio Regional de Referencia de Salud Animal (LARRSA) y posteriormente fueron analizadas por PCR para amplificar el genoma de *Babesia* spp. y *Anaplasma* spp. El resultado del diagnóstico molecular fue registrado en un cuadro de resultado indicando las muestras positivas a *Babesia bovis*, *B. bigemina* y *Anaplasma* spp.

9. Resultados y discusión

9.1. Resultados

La toma de parámetros ambientales arrojó una temperatura constante según la región de nuestro país que varía entre los 26 a 29°C en la región central de Guatemala

(Tabla 1). Las unidades productivas muestreadas se ubicaron en regiones de diferente altitud sobre el nivel del mar, observándose temperaturas menos cálidas en regiones consideradas templadas, pertenecientes al departamento de Guatemala. Sin embargo, el registro mínimo de temperatura fue de 20°C para el sitio de muestreo No. 1 y 29°C como máxima temperatura para el sitio de muestreo No. 4 (Figura 4).

En los puntos de muestreo pertenecientes a la costa sur del país las temperaturas se presentaron mucho más cálidas con rangos entre los 26°C y 32°C. Estos datos combinados con los datos de humedad muestran que la región central de Guatemala donde se desarrolló el presente estudio posee una humedad ambiente bastante alta que va del 43% en el punto de muestreo 6 en el departamento de Guatemala a el 72% para la costa sur e incluso 80% dentro de la misma zona del departamento de Guatemala. Ambas condiciones favorecen el desarrollo de agentes vectores de piroplasmosis y anaplasmosis.

Del total de garrapatas colectadas (91 garrapatas), 71 correspondían al género *Rhipicephalus* spp. (78%), mientras que únicamente 20 (22%) correspondían al género *Dermacentor* spp. (Tabla 2). El total de unidades productivas del departamento de Guatemala presentaron infestaciones por garrapatas del género *Rhipicephalus microplus* (Figura 5 y 6), mientras que las unidades muestreadas en el departamento de Escuintla presentaron animales infestados con garrapatas *Rhipicephalus microplus* y *Dermacentor nittens* (Tabla 2).

Los resultados obtenidos por frote sanguíneo (Tabla 3), arrojaron 65% de prevalencia para *Babesia* spp., y del 27% para *Anaplasma* spp. (Figura 7). Si estos datos se separan por departamento, se observa que en el departamento de Guatemala las muestras observadas por frote sanguíneo no arrojaron resultados positivos para *Anaplasma* spp., sin embargo, para *Babesia* spp., la prevalencia fue de un 59%. El otro departamento de donde se obtuvieron resultados fue Escuintla, donde la prevalencia de *Babesia* spp. fue de 66%, y 32% de *Anaplasma* spp..

El diagnóstico molecular de *Babesia* spp. confirmó la presencia de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* (Figura 8 y 9), afectando a los bovinos sujetos de estudio, siendo positivos a *B. bovis* 20 de las 39 muestras sanguíneas analizadas, y *B. bigemina* 16 de 39 muestras. La identificación de *Anaplasma* spp. se hizo en 31 de las 39 muestras analizadas (Figura 10). Los resultados demostraron que 5 de las 7 muestras analizadas, del departamento de Guatemala, dieron positivo a presencia de *Anaplasma* spp. De igual manera, las muestras analizadas de las unidades productivas ubicadas en Escuintla mostraron presencia de *Anaplasma* spp. en 26 de 32 muestras analizadas. Se observó infecciones mixtas por *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en 10 muestras. Mientras que 9 muestras analizadas demostraron infecciones combinadas de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma* spp.

9.2. Discusión

Los resultados de los parámetros ambientales de temperatura y humedad mostraron que las condiciones climáticas en las unidades productivas muestreadas tienen a tener un clima cálido de tipo tropical, según García (2004) la clasificación de Köppen modificada para climas subtropicales; coloca a las condiciones climáticas descritas en el departamento de Guatemala como climas cálidos y húmedos, mientras que las temperaturas de la región sur de Guatemala corresponden a climas muy cálidos que son aquellos que sobrepasan los 28°C, teniendo temporadas de lluvias copiosas que aumentan la humedad relativa ambiente.

Estas condiciones climáticas originan los factores propicios para el desarrollo de ectoparásitos como las garrapatas ixódidas que son vectores importantes de agentes patógenos como *Babesia* spp. y *Anaplasma* spp. El factor climático puede resultar ser el desencadenante de otros elementos que favorecen el desarrollo y colonización de garrapatas en nuevas regiones geográficas y acentúan su presencia en regiones endémicas. El aumento de temperatura favorece el rápido desarrollo de las garrapatas lo que a su vez aumenta la frecuencia de alimentación de estos organismos (Sánchez et al., 2020). Condiciones de manejo de potreros, disponibilidad de alimento

y estrés climático originan que los animales de producción sean más susceptibles a la colonización de ectoparásitos y en forma indirecta a la infección de agentes hemoparásitos y rickettsiales como *Babesia* spp. y *Anaplasma* spp. (Benavides et al., 2016).

Esta relación entre el factor climático y la persistencia de agentes ixódidos queda demostrado con la colecta de especímenes de garrapatas que fue una constante en todas las unidades productivas a las que se tuvo acceso, tomando en cuenta que, en todas, la temperatura y humedad relativa altas favorecen su desarrollo, tal como lo demostró Pulido et al. (2015).

Se sabe que *Rhipicephalus microplus* es una de las garrapatas más exitosas en su capacidad de reproducción y adaptación a condiciones climáticas, así como en desarrollo de resistencias a productos ixodicidas (Chevillon et al., 2012). Esta adaptabilidad les hace capaces de perdurar en condiciones de temperatura y humedad variables a sus diferentes fases evolutivas en ambientes definidos, conocidos como focos naturales de infección. Los focos naturales de infección en el caso de *R. microplus* corresponden a zonas tanto tropicales como subtropicales pudiendo sobrevivir por mucho tiempo sin alimento en condiciones con baja temperatura, caso contrario ocurre en zonas cálidas tropicales donde la incubación de huevos es corta y su metabolismo en fases larvarias, ninfas y adultos es muy activo, lo que origina serios problemas económicos para explotaciones ganaderas (García et al., 2019).

Las garrapatas del género *Dermacentor* spp., es importante mencionar que, al ser una garrapata de tres hospederos, su ciclo depende de la disponibilidad de ciertos huéspedes específicos como los equinos para poder prevalecer en una zona o foco natural de infección. La infección por estos especímenes en ganado bovino puede darse en ausencia de hospederos favorables, o en caso que las cargas parasitarias tanto en el terreno como en huéspedes favorables sea demasiado alta, debiendo adaptarse al parasitismo de otros animales presentes en su nicho ecológico, lo que no lo descarta de hallazgos como el presente caso en bovinos u otros rumiantes, incluso en perros o seres humanos (Atif, 2016; Estrada, 2015).

Tanto *R. microplus* como *Dermacentor* spp., son agentes vectoriales que han sido involucrados en la transmisión de *Babesia* spp. y *Anaplasma* spp. Estudios anteriores hechos en el norte de Guatemala confirmaron que la prevalencia de estos agentes es bastante alta tanto en bovinos como equinos (Teglas et al., 2005), y no se circunscribe a regiones determinadas, si no que se encuentran distribuidos ampliamente infectando a animales de otras regiones del país, como se confirma con los resultados obtenidos por frote sanguíneo y biología molecular del presente estudio en una porción de la región central y sur de Guatemala.

Los estudios enfocados a establecer la prevalencia de piroplasmosis y anaplasmosis en nuestro país son escasos y las fuentes no publicadas son de escaso valor estadístico como para reflejar una condición real y evolución de la enfermedad en años anteriores, entre estos estudios desarrollados en el pasado, destaca el desarrollado en la costa sur de Guatemala (van Andel et al., 1997) que muestra rangos similares de prevalencia de infecciones por estos agentes patógenos que van entre 50 a 60% de prevalencia tanto de *Babesia* spp. como *Anaplasma* spp., resultados similares a los presentados en este estudio.

La prevalencia constante de la enfermedad, en esta región, puede explicarse por un equilibrio ya existente entre agentes patógenos, medio ambiente y huéspedes, conocido como estabilidad endémica (Bock et al., 2004), en el cual la enfermedad se puede establecer como un proceso subclínico por la constante circulación del agente patógeno entre las poblaciones de animales expuestos a los vectores en un medio ambiente con características climáticas poco variables durante largos períodos como es el clima tropical de la costa sur de Guatemala que posee estaciones climáticas bien marcadas y establecidas.

En el caso del departamento de Guatemala, no se logró diagnosticar *Anaplasma* spp. por frotis sanguíneo, sin embargo, los resultados confirmatorios por biología molecular indicaron que este agente patógeno si se encuentra presente en las explotaciones de esta zona del país, la razón por la cual podría haberse obviado el diagnóstico de *Anaplasma* spp. en frotis sanguíneos se debe a que este método posee

sensibilidad y especificidad dependientes del investigador, se debe tomar en cuenta que la identificación de estos agentes puede ser muy subjetiva y pasarse por alto debido a las características de tamaño y morfología muchas veces difíciles de determinar cuando la carga parasitaria es muy baja.

Los resultados observados nos permiten actualizar la información sobre los agentes patógenos que afectan a animales productivos de la región central de nuestro país, donde las condiciones ecosistémicas asociadas al clima favorecen cada vez más la diseminación de vectores y el establecimiento de infecciones endémicas en los hatos ganaderos de nuestro país con infecciones subclínicas originadas por el fenómeno de estabilidad enzoótica, provocando que *Babesia* spp. y *Anaplasma* spp pasen desapercibidos, tal como lo hacen notar Polanco y Ríos (2016). Este fenómeno origina que los casos diagnosticados suelen ser únicamente los asociados a infecciones agudas que requieren la atención de un médico veterinario, siendo realizados por medio de microscopía.

El uso de técnicas moleculares como el PCR permite además una identificación más precisa de los diagnósticos parasitológicos en infecciones subclínicas, en apoyo a las técnicas de microscopía, al demostrar que posee una mayor sensibilidad y especificidad, por lo que la implementación de esta técnica en el LARRSA, viene a ser una herramienta muy útil para continuar con los estudios diagnósticos encaminados a la obtención de información epidemiológica más certera sobre el comportamiento estacional y distribución de la enfermedad en otras regiones de Guatemala, tal como lo indican otros estudios donde la implementación de técnicas de diagnóstico molecular ha sido una contribución de importancia para apoyar el control de enfermedades parasitarias y rickettsiales (Chauhdry et al., 2010).

En conclusión, la mayor frecuencia de garrapatas encontradas en bovinos de las unidades productivas muestreadas fue *R. microplus*, confirmando que se encuentran distribuidas extensamente en la región central de Guatemala, favorecidas por las condiciones cada vez más tropicales de nuestra región. Otras especies diagnosticada fue *D. nittens*, que a pesar de no ser un parásito frecuente de bovinos es muy probable

que su presencia se deba a escasez de huéspedes naturales, que son equinos, o bien a excesiva carga parasitaria en la unidad productiva muestreada.

Se estableció que *R. microplus* sigue siendo un agente ectoparásito de importancia con extensión a regiones templadas de nuestro país, posiblemente asociado a los cambios ambientales en humedad y temperatura actualmente más tropicales en regiones anteriormente consideradas como zonas templadas de la región central de Guatemala.

Las unidades productivas muestreadas también se encuentran notoriamente afectadas por la presencia de agentes parasitarios protozoarios como *Babesia* spp. y bacterias rickettsiales como *Anaplasma* spp., lo cual influye negativamente en el buen desempeño productivo de estos animales, conllevando pérdidas económicas por gastos médicos y manejo enfocados a prevenir y tratar las enfermedades originas por los agentes diagnosticados. Con este estudio se logró establecer de forma más certera que tanto *Babesia bigemina* como *Babesia bovis* se encuentran afectando a las unidades productivas de la región central de Guatemala, mientras que *Anaplasma* también se encuentra distribuido ampliamente y provocando infecciones. La secuenciación genética de *Anaplasma* spp. no pudo desarrollarse en el presente estudio, pero será fundamental en estudios futuros para determinar las especies presentes en nuestro medio.

La confirmación de la presencia de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, así como *Anaplasma* spp. en los animales que también se encuentran parasitados por garrapatas *R. microplus* y *D. nittens*, puede ser un referente para comprender la dinámica de transmisión de piroplasmosis y anaplasmosis en los animales productivos muestreados, sin embargo, la muestra no logra ser representativa para poder desarrollar un estudio de correlación y establecer una asociación fiable entre la presencia de hemoparásitos y su agente transmisor, sin embargo resulta interesante observar que la mayor presencia de casos confirmados de anaplasmosis se dieron en la explotación con carga parasitaria por *Dermacentor nittens*. Se recomienda en el futuro hacer estudios para confirmar esta posible asociación.

10. Referencias

- Acevedo, L., Paternina, L., Pérez, J., Londoño, A., López, G., y Rodas, J. (2019). Garrapatas duras (Acari: Ixodidae) de Colombia: Una revisión a su conocimiento en el país. *Acta Biológica Colombiana*, 1(25), 126-139. <https://dx.doi.org/10.15446/abc.v25n1.75252>
- Álvarez, E., Fuentes, H., Meoño, E., Recinos, R., y Figueroa, L. (2018). Aproximación al estudio de los parásitos externos del venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en la reserva natural de la Brigada de Paracaidistas de San José, Escuintla Guatemala. *Redvet*, 19(5), 1-11. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050518.html>
- Álvarez, V., y Bonilla, R. (2007). Adultos y ninfas de la garrapata *Amblyomma cajennense* Fabricius (Acari: Ixodidae) en equinos y bovinos. *Agronomía Costarricense*, 31(1), 61-69. <https://www.redalyc.org/pdf/436/43631107.pdf>
- Álvarez, V., Bonilla, R., y Chacón, I. (2003). Abundancia relativa de *Amblyoma* spp. (Acari: Ixodidae) en bovinos (*Bos taurus* y *B. indicus*) de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 51(2), 435-444. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442003000200016
- Atif, H. (2016). Alpha proteobacteria of genus *Anaplasma* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): Epidemiology and characteristics of *Anaplasma* species related to veterinary and public health importance. *Parasitology*, 143, 659-685. <https://dx.doi.org/10.1017/S0031182016000238>
- Bardales, W., Campos, L., Gómez, R., Ordoñez, S., y Machuca, N. (2019). *Variabilidad y cambio climático en Guatemala*. Guatemala: INSIVUMEH.
- Benavides, E., Romero, J., y Villamil, L. (2016). *Las garrapatas del ganado bovinos y los agentes de enfermedad que transmiten en escenarios epidemiológicos de cambio climático*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA): <http://www.iica.int>

- Bock, R., Jackson, L., de Vos, A., y Jorgensen, W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology*(129), 247-269. <https://dx.doi.org/10.1017/S0031182004005190>
- Chauhdry, Z., Suleman, M., Younus, M., y Aslim, A. (2010). Molecular detection of Babesia bigemina and Babesia bovis in crossbred carrier cattle through PCR. *Pakistan Journal of Zoology*, 42(2), 201-204. [https://www.zsp.com.pk/pdf/201-204%20\(13\).pdf](https://www.zsp.com.pk/pdf/201-204%20(13).pdf)
- Chevillón, C., de Garine, M., Barré, N., Ducornez, S., y de Meeus, T. (2013). Understanding the genetic, demographical and/or ecological processes at play in invasions: lessons from the southern cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology*(59), 203-218. <https://dx.doi.org/10.1007/s10493-012-9602-5>
- Donaldson, T., Pérez, A., Li, A., Castro, I., y Wozniack, E. y otros. (2016). Assessment of the geographic distribution of *Ornithodoros turicata* (Argasidae): climate variation and host diversity. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(2), 1-19. <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004383>
- Eremeeva, M. E., Berganza, E., Suarez, G., Gobern, L., Dueger, E. y otros. (2013). Investigation of an outbreak of rickettsial febrile illness in Guatemala, 2007. *International Journal of Infectious Diseases*, 17, 304 - 311. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2012.11.011>
- Estrada Andrés, J. (2019). Determinación de prevalencia de Babesia sp. mediante la técnica de frotis sanguíneo en équidos del casco urbano de San Andrés Itzapa, Chimaltenango Año 2017[Tesis de licenciatura, Universidad de San Carlos de Guatemala]. <http://www.repositorio.usac.edu.gt/11308/1/Tesis%20MV%20Jairo.pdf>
- Estrada Peña, A. (2015). Ticks as vectors: taxonomy, biology and ecology. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 34(1), 53 - 65. <https://dx.doi.org/10.20506/rst.34.1.2345>
- Faccini, A., Ramírez, A., Barreto, C., Forero, E., Milán, D., y otros. (2017). Epidemiology of spotted fever group rickettsioses and acute undifferentiated febrile illness in Villeta, Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 3(97), 782-788. <https://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.16-0442>

- García, E. (1964). *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koppen*. Biblioteca de la Universidad Nacional de México. <https://www.igg.unam.mx/geoigg/biblioteca/archivos/memoria/20190917100949.pdf>
- López, M., May, J., Foster, R., Harmsen, B., Sanchez, E., Martins, T., y otros. (2016). Ticks and rickettsiae from wildlife in Belize, Central America. *Parasites & Vectors*, 62(9), 1-7. <https://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1348-1>
- Maggi, R., y Krämer, F. (2019). A review on the occurrence of companion vector-borne diseases in pet animals in Latin America. *Parasites & Vectors*, 145(12), 1-37. <https://dx.doi.org/10.1186/s13071-019-3407-x>
- Martínez, S., Sánchez, J., Sotelo, S., Díaz, H., Hegazy, W., y otros. (2019). Genetic diversity of Bm86 sequences in Rhipicephalus (Boophilus) microplus ticks from Mexico: analysis of haplotype distribution patterns. *BMC Genetics*, 56(20), 1-12. <https://dx.doi.org/10.1186/s12863-019-0754-8>
- Martins, T., Barbieri, A., Costa, F., Tarassini, F., Camargo, L., y otros. (2016). Geographical distribution of Amblyomma cajennense (sensu lato) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of A. cajennense (sensu stricto). *Parasites & Vectors*, 186(9), 1-14. <https://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1460-2>
- Miller, M., Esser, H., Loaiza, J., Herre, E., Aguilar, C., y otros. (2016). Molecular ecological Insights into neotropical bird–tick Interactions. *Plos One*, 11(5), 1-17. <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0155989>
- Mitchell, E., Williamsom, P., Billingsley, P., Seals, J., Ferguson, E., y Allen, M. (2016). Frequency and distribution of rickettsiae, borreliae, and ehrlichiae detected in human-parasitizing ticks, Texas, USA. *Emerging Infectious Diseases*, 22(2), 312-315. <https://dx.doi.org/10.3201/eid2202.150469>
- Moraes, J., Krawczak, F., Costa, F., Sorarez, J., y Labruna, M. (2015). Comparative evaluation of the vector competence of four south american populations of the Rhipicephalus sanguineus group for the bacterium Ehrlichia canis, the agent of canine monocytic Ehrlichiosis. *PLOS one*, 9(10), 1-16. <https://dx.doi.org/10.1371/journal>

- Nava, S., Venzal, J., Gonzalez, D., Martins, T., y Guglielmone, A. (2017). *Ticks of the southern cone of America*. Elsevier.
- Obregón, D., Corona, B., Díaz, A., Armas, Y., Roque, E., y otros. (2020). Efficient Transovarial Transmission of Babesia Spp. in Rhipicephalus microplus Ticks Fed on Water Buffalo (Bubalus bubalis). *Pathogens*, 1-10. <https://dx.doi.org/10.3390/pathogens9040280>
- PDH Guatemala [@PDHgt].(14 de abril de 2020). *El @PDHgt @JordanRodas recomienda al @GutamalaGob presentar la distribución de caso por #COVID19gt deacuerdo al Decreto 70-86 Ley Preliminar de Regionalización para el Ordenamiento Territorial, que en el artículo 3 establece 8 regiones para #Guatemala* [Tweet][Imágenes adjuntas]. Twitter. <https://twitter.com/pdhgt/status/1250127827682217984>
- Pesquera, C., Portillo, A., Palomar, A., y Oteo, J. (2015). Investigation of tick-borne bacteria (Rickettsia spp., Anaplasma spp., Ehrlichia spp. and Borrelia spp.) in ticks collected from Andean tapirs, cattle and vegetation from a protected area in Ecuador. *Parasites & Vectors*, 46(8), 1-10. <https://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-0662-3>
- Polanco, D., y Ríos, L. (2016). Aspectos biológicos y ecológicos de las garrapatas duras. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 17(1), 81-95. <http://www.scielo.org.co/pdf/ccta/v17n1/v17n1a08.pdf>
- Pulido, L., Rudas, A., Betancourt, J., Grant, W., y Vilchez, S. (2016). Distribución inusual y potencial de la garrapata común del ganado, Rhipicephalus (Boophilus) microplus, en zonas tropicales de alta montaña de los Andes colombianos. *Biota colombiana*, 16(2), 75-95. <http://revistas.humboldt.org.co/index.php/biota/article/view/376/374>
- Rehman, A., Nijhof, A., Sauter, C., Schauer, B., Staubach, C., y otros. (2017). Distribution of ticks infesting ruminants and risk factors associated with high tick prevalence in livestock farms in the semisemi-arid Pakistan. *Parasites & Vectors*, 190(10), 1-15. <https://dx.doi.org/10.1186/s13071-017-2138-0>
- Sánchez, B., Flores, S., Rodríguez, E., Anaya, A., y Contreras, E. (2020). Causas y consecuencias del cambio climático en la producción pecuaria y salud animal.

Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias, 11(2), 126-145.
<https://dx.doi.org/10.22319/rmcp.v11s2.4742>

Tana, L., Navarrete, K., Ron, J., Reyna, A., y Chávez, M. (2017). PCR-diagnosis of *Anaplasma marginale* in cattle populations of Ecuador and its molecular identification through sequencing of ribosomal 16S fragments. *BMC Veterinary Research*, 392(13), 1-7. doi:10.1186/s12917-017-1311-1

Teglas, M., Metern, E., Lein, S., Foley, P., Mahan, S., y Foley, J. (2005). Ticks and tick-borne disease in Guatemalan cattle and horses. *Veterinary Parasitology* 131, 119-127. <https://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.04.033>

van Andel, J., Dwinger, R., y Alvarez, J. (1997). Study of *Anaplasma* and *Babesia* infection rates of cattle and associated ticks in the South Coast of Guatemala. *Pahtologie Parasitaire*, 4(50), 285 - 292.
<https://revues.cirad.fr/index.php/REMVT/article/view/9558/9552>

11. Apéndice

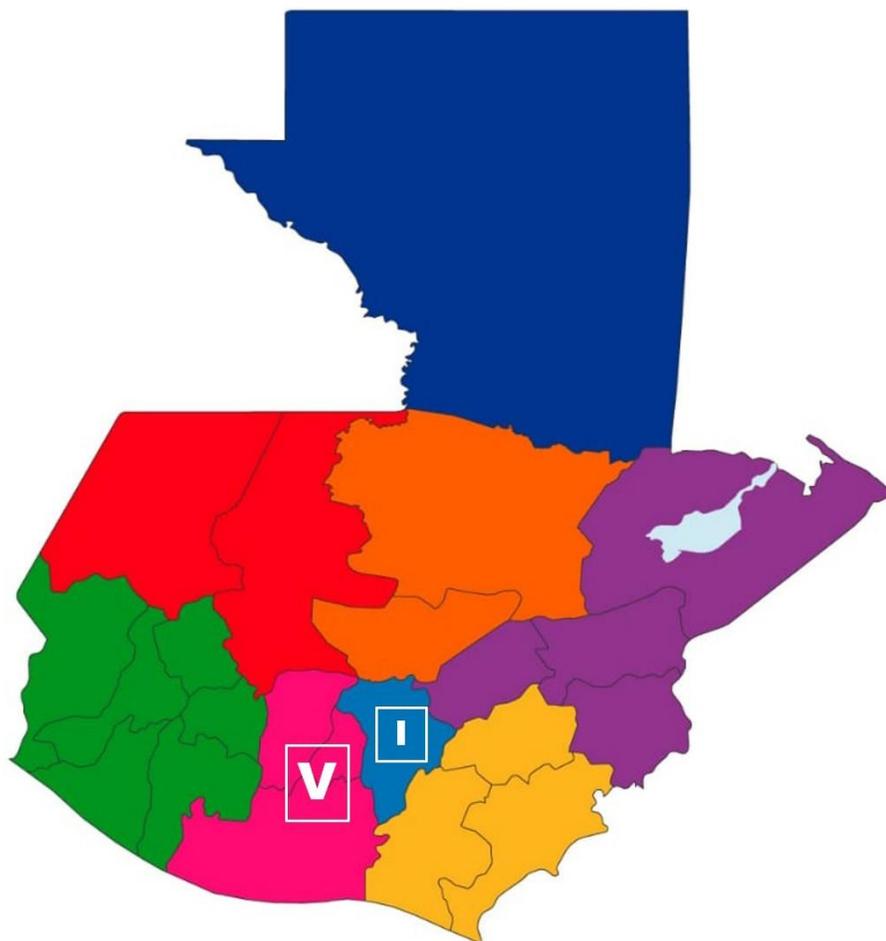


Figura 1. Regiones de Guatemala. Resaltan las regiones I y V donde se desarrolló el presente estudio. Imagen referencia tomado de (PDH Guatemala, 2020).

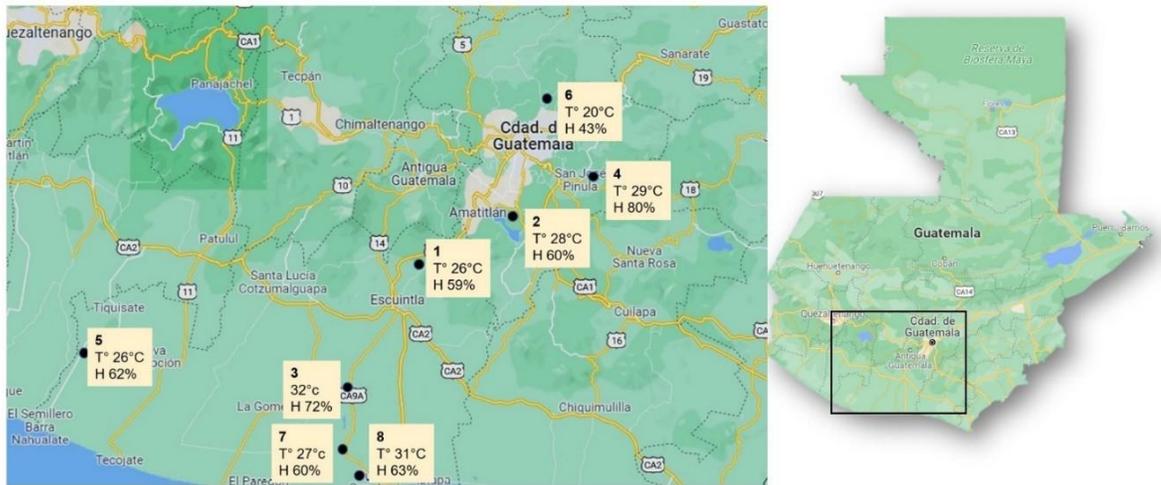


Figura 4. Referenciación geográfica y datos climáticos de unidades productivas.



Figura 5. *Rhipicephalus microplus*. Vista dorsal. Escudo sin ornamentación con ojos. Hipostoma y palpos cortos.



Figura 6. *Rhipicephalus microplus*. Vista ventral. Primera coxa bífida. Espiráculos respiratorios circulares

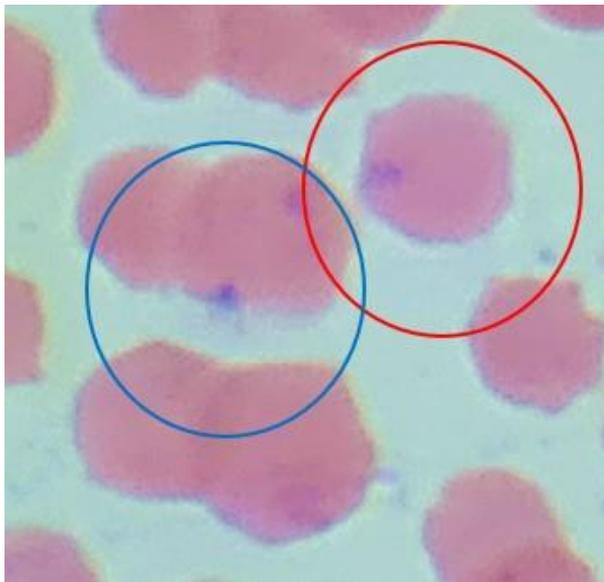


Figura 7. *Anaplasma* spp. y *Babesia* spp. Diagnóstico microscópico por frotis sanguíneo.

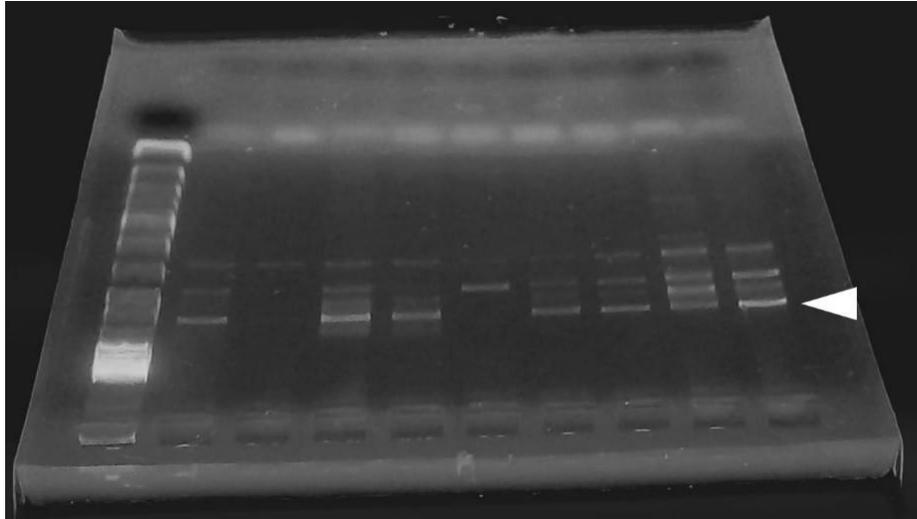


Figura 8. Amplificación de fragmento de ARNr. Región A. 541 pb. *Babesia bovis*.

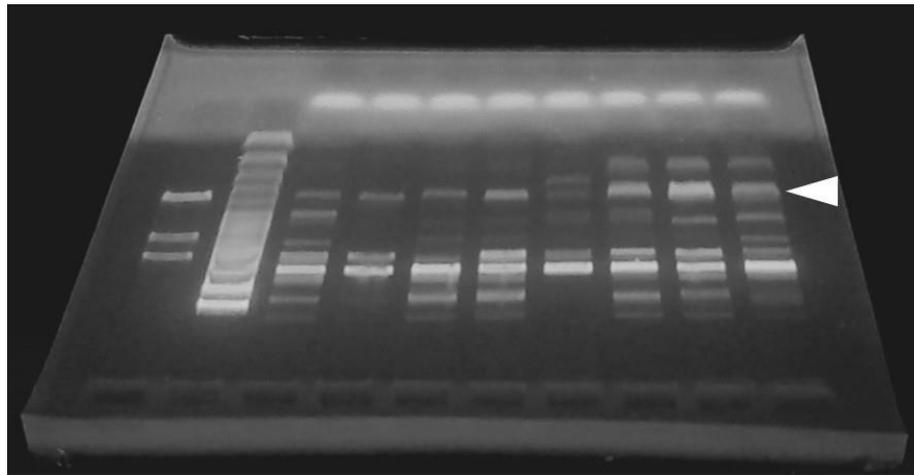


Figura 9. Amplificación de fragmento de ARNr. Región A. 1024 pb. *Babesia bigemina*.

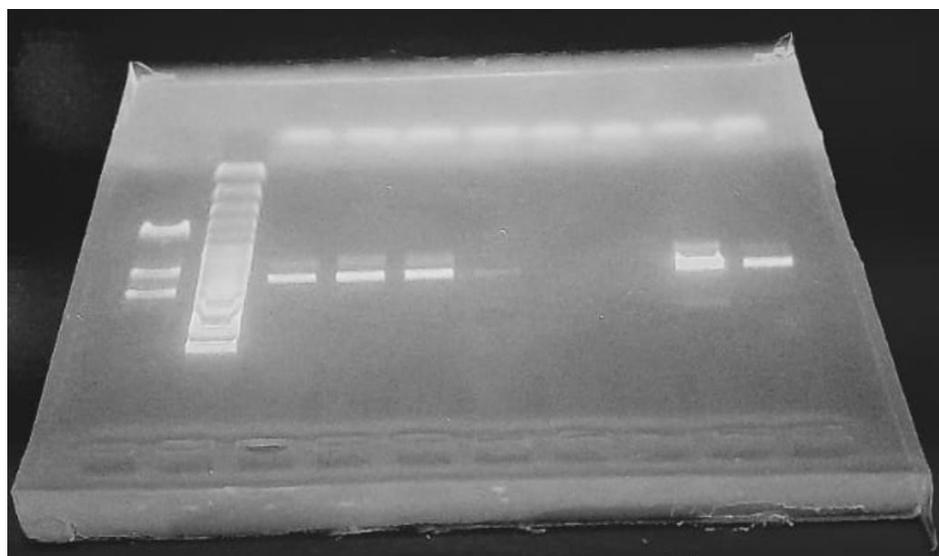


Figura 10. Amplificación de Gen 16S de ARNr. 750 pb. *Anaplasma* spp.

Tabla 1

Datos de medición ambiental y georreferenciación de unidades productivas

Fecha	No. De Finca	Ubicación	Temperatura ambiente	Humedad relativa
16-abr	1	14°21'46"N 90°44'08"O	26°C	69%
20-abr	2	14°27'27"N 90°30'28"O	28°C	60%
24-abr	3	14°08'07"N 90°53'14"O	32°C	72%
10-may	2	14°27'27"N 90°30'28"O	25°C	75%
21-may	4	14°33'25"N 90°22'06"O	29°C	80%
10-jul	5	14°12'01"N 91°26'33"O	26°C	62%
22-jul	6	14°28'50"N 90°58'33"O	21°C	80%

Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI-

24-jul	7	14°43'22"N 90°27'48"O	20°C	43%
21-ago	8	13°59'11"N 90°53'51"O	27°C	60%
21-ago	9	13°57'20"N 90°51'43"O	31°C	63%

Tabla 2

Diagnóstico de especies de garrapatas colectadas por unidad productiva

<i>Número de unidad productiva</i>	Rhipicephalus sp.	Dermacentor sp.	Número de Especímenes colectados
1	20	0	20
2	15	0	15
3	10	0	10
4	10	0	10
5	10	0	10
6	6	0	6
7	0	10	10
8	0	10	10
TOTAL	71	20	91

Tabla 3

Diagnósticos microscópicos positivos a Babesia spp. y Anaplasma spp. según unidad productiva muestreada

Número de unidad productiva	Babesia sp.	Anaplasma sp.	Total de muestras obtenidas
1	3	0	15
2	4	0	10
3	3	0	3
4	4	0	5
5	5	5	5
6	8	0	12
7	37	20	45
8	45	20	72
TOTAL	109	45	167

Tabla 4

Diagnóstico por PCR de acuerdo con cada unidad productiva muestreada

No. de Unidad Productiva	Muestras analizadas	Babesia bovis	Babesia bigemina	Anaplasma spp.
1	1	1	1	1
2	2	0	1	2
3	1	0	0	1
4	2	1	2	0
5	2	2	2	2
6	3	2	2	3
7	13	9	6	11
8	15	5	2	11
TOTAL	39	20	16	31

12. Aspectos éticos y legales

El presente proyecto no requirió de una aprobación por comité de bioética, debido a que no se realizaron procedimientos invasivos que provoquen daño a los animales sujetos de estudio. Sin embargo, se respetó en todo momento la integridad de los animales sujetos de estudio al momento de realizar la toma de muestras correspondiente, bajo el principio de las tres “R” del bienestar animal, donde al no poder reemplazar los sujetos de estudio a un procedimiento *in vitro*, por tratarse de un estudio de campo, se redujo la cantidad de animales utilizados a la muestra mínima que nos permitiese obtener una muestra representativa del sitio muestreado, de manera que no se afecte el bienestar y la calidad de vida del hato, y utilizando la técnica apropiada de toma de muestras, minimizando el riesgo de daño sobre animales de acuerdo a su constitución física y estado de salud, evitando alterarlos en todo momento.

13. Vinculación

Se realizó un trabajo conjunto entre los laboratorios de la Unidad de Parasitología de la FMVZ -USAC, donde se realizó el diagnóstico microscópico de *Babesia* spp. y *Anaplasma* spp. y el Laboratorio de Referencia Regional de Sanidad Animal (LARRSA), que es un laboratorio certificado bajo la norma ISO/IEC1702572017 para validación de los resultados de laboratorio, donde se incluye el diagnóstico molecular por PCR de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma* spp. Este procedimiento ha quedado implementado y estandarizado para futuros proyectos de investigación que busquen el diagnóstico de estos agentes patógenos en animales de producción de otras regiones de nuestro país y los demás países de la región centroamericana.

14. Estrategia de difusión, divulgación y protección intelectual

Se ha solicitado la publicación de los resultados del presente estudio en la revista “Ciencia, Tecnología y Salud” de la DIGI y Posgrado de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

15. Aporte de la propuesta de investigación a los ODS

Este proyecto de investigación permitirá tener una visión actualizada de la situación actual del diagnóstico de Babesia bovis y Babesia bigemina, así como de bacterias rickettsiales como Anaplasma spp., que afectan a los hatos productivos en Guatemala, es un primer paso para el desarrollo de estudios epidemiológicos más amplios y completos enfocados en conocer mejor la distribución de las enfermedades causadas por los agentes patógenos antes mencionados.

La presencia de Piroplasmosis y Anaplasmosis provoca serios problemas al desarrollo de animales domésticos, en el caso de los bovinos, que son una fuente importante de alimento de origen proteico para la población guatemalteca. Conocer el comportamiento de agentes infecciosos como ectoparásitos asociado al clima y su distribución geográfica será un aporte que mostrará cómo se encuentra actualmente la salud de los animales domésticos que son una fuente importante de desarrollo económico para pequeños y medianos productores, la información generada es un primer paso para promover estrategias de control de estas infecciones así como la presencia de organismos ectoparásitos como las garrapatas que actúan como sus vectores y a la vez consumen recursos nutritivos del animal al ingerir su sangre, permitirá mejorar la calidad de productos derivados del consumo de productos de origen animal y la rentabilidad de los mismos, sobre todo en casos donde la subsistencia de la población depende muchas veces de una pequeña cantidad de animales.

16. Orden de pago final

Nombres y apellidos	Categoría (investigador /auxiliar)	Registro de personal	Procede pago de mes (Sí / No)	Firma
Juan Fernando Sánchez Agreda	Auxiliar de investigación II	2019142	Si	
Luis Felipe Choc Martínez	Coordinador	20091238	Si	

17. Declaración del Coordinador(a) del proyecto de investigación

El Coordinador de proyecto de investigación con base en el *Reglamento para el desarrollo de los proyectos de investigación financiados por medio del Fondo de Investigación*, artículos 13 y 20, deja constancia que el personal contratado para el proyecto de investigación que coordina ha cumplido a satisfacción con la entrega de informes individuales por lo que es procedente hacer efectivo el pago correspondiente.

Luis Felipe Choc Martínez	
Nombre del coordinador del proyecto de investigación	Firma
Fecha: dd/mm/año	

18. Aval del Director(a) del instituto, centro o departamento de investigación o Coordinador de investigación del centro regional universitario

De conformidad con el artículo 13 y 19 del *Reglamento para el desarrollo de los proyectos de investigación financiados por medio del Fondo de Investigación* se avala este informe mensual de las actividades realizadas en el proyecto Distribución geográfica de garrapatas (Superfamilia Ixodoidea) y agentes infecciosos protozoos y bacterias rickettsiales asociados en animales de producción en mi calidad de director del Instituto de Investigación en Ciencia Animal y Ecosalud, mismo que ha sido revisado y cumple su ejecución de acuerdo a lo planificado.

Vo.Bo. Juan Carlos Valdez Director del Instituto de Investigación en Ciencia Animal y Ecosalud	 Firma
Fecha: 29/04/2022	

Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI-

19. Visado de la Dirección General de Investigación

Vo.Bo. Nombre Coordinador(a) del Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud	 Firma
Fecha: 29/04/2022	

Vo.Bo. Nombre Coordinador General de Programas Universitarios de Investigación	 Firma
Fecha: 29/04/2022	

Ing. MARCELO Rufino SANCHEZ Pérez
Coordinador General de Programas de
Investigación, Digi-Usac