

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL  
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL



Detección de anaplasmosis y babesiosis bovina transmitida por la garrapata  
*Rhipicephalus microplus* en ganado bovino ubicado en el municipio de Tlahuiltepa,  
Hidalgo y Coatzintla, Veracruz.

Por:

**EDGAR JESÚS MACÍAS ORTIZ**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

Torreón, Coahuila, México  
Junio 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL  
DEPARTAMENTO DE PRODUCCION ANIMAL

Detección de anaplasmosis y babesiosis bovina transmitida por la garrapata  
*Rhipicephalus microplus* en ganado bovino ubicado en el municipio de Tlahuiltepa,  
Hidalgo y Coatzintla, Veracruz

Por:

**EDGAR JESÚS MACÍAS ORTIZ**


TESIS

Que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito  
parcial para obtener el título de:

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**


Aprobada por:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Fernando Ulises Adame de León  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
M.C. María Guadalupe Sánchez Loera  
Vocal

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Ma. de los Angeles de Santiago  
Miramontes  
Vocal

  
\_\_\_\_\_  
MC. Gerardo Arriano Rodríguez  
Vocal Suplente

  
\_\_\_\_\_  
MVZ. J. Guadalupe Rodríguez Martínez  
Coordinador de la División Regional de ~~Ciencia Animal~~ **División  
Regional de Ciencia Animal**

Torreón, Coahuila, México  
Junio de 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL  
DEPARTAMENTO DE PRODUCCION ANIMAL

Detección de anaplasmosis y babesiosis bovina transmitida por la garrapata  
*Rhipicephalus microplus* en ganado bovino ubicado en el municipio de Tlahuiltepa,  
Hidalgo y Coatzintla, Veracruz

Por:


**EDGAR JESÚS MACÍAS ORTIZ**


TESIS


Presentada como requisito parcial para obtener el título de:


**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**


Aprobada por el Comité de Asesoría:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Fernando Ulises Adame de León  
Asesor Principal

  
\_\_\_\_\_  
M.C. María Guadalupe Sánchez Loera  
Coasesor

  
\_\_\_\_\_  
M.C. Olivia García Morales  
Coasesor

  
\_\_\_\_\_  
MVZ. J. Guadalupe Rodríguez Martínez  
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal



Coordinación de la División  
Regional de Ciencia Animal

Torreón, Coahuila, México  
2018

## AGRADECIMIENTOS

Dr. Fernando Ulises Adame de León:

Agradezco infinitamente su apoyo y la confianza que me ha otorgado, su visión por la superación me fortalece y me motiva para seguir cumpliendo metas.

M.V.Z: Antonio Lugo Trejo:

Gracias por todos sus consejos y por la manera de guiarme, ha sido fundamental en mi formación como Médico Veterinario Zootecnista.

Dra. Beatriz Xoconostle Cazares:

Gracias por los sabios consejos y magnífica guía en mi estancia realizando mis prácticas profesionales y proyecto de tesis, sobre todo, agradezco su apoyo y el permitirme ser parte del equipo de laboratorio el cual dirige. El entusiasmo y superación que irradia, son un gran ejemplo e inspiración para todos nosotros.

Dr. Ramiro Gonzales Avalos:

Sus conocimientos y la manera en la cual los trasmite me han facilitado el camino en este proyecto.

M.C. Olivia García Morales:

Gracias por su apoyo y su disponibilidad para ayudarme a lograr esta meta.

A mis compañeros del laboratorio de biotecnología del CINVESTAV, agradezco de manera especial su atención y apoyo, he aprendido demasiado de ustedes, incluyendo su profesionalismo y pasión por la ciencia.

## DEDICATORIA

***A todos aquellos quienes me han extendido su sincero amor, confianza y apoyo...***

A mis padres:

Les dedico este trabajo de tesis, el cual representa una manera de agradecer su gran esfuerzo que me motiva a cumplir mis metas. Sin su confianza, apoyo y sobre todo, cariño, los obstáculos se hubieran tornado más complicados. Quisiera que, en todo momento, tengan presente que los amo y que me han ayudado a construir la fuerza que me impulsa a continuar y creer en mí.

A mis hermanos:

Oswaldo y Cindy, son una parte esencial de mi motivación para salir adelante ante los problemas que se me presenten día a día.

A mi familia materna y paterna:

Mis abuelitos Moisés, Margarita y Francisca, mi tío Francisco. Ustedes han sido mi soporte y me han enseñado el valor del significado de la palabra “familia”.

## RESUMEN

*Anaplasmosis marginale* y *babesia bovis* son patógenos intraeritrocíticos que son responsables de las enfermedades transmitidas por garrapatas más prevalentes y costosas en el mundo. Su vector la garrapata *Rhipicephalus microplus* se encuentra principalmente en zonas tropicales y subtropicales, hasta el momento no se cuenta con un método de control seguro y eficaz contra estas enfermedades, por lo cual resulta de gran importancia diagnosticar en tiempo y forma posibles brotes en el ganado susceptible, ya que dependiendo del estado inmune del animal pueden estar presentes sin manifestar signos clínicos. El presente estudio tiene como objeto detectar la presencia de *Anaplasma marginale* y *Babesia bovis* en 40 animales ubicados en climas tropical y subtropical de México, de los cuales 14 resultaron positivos contra *Anaplasma marginale* y 22 positivos a *Babesia bovis*.

**Palabras clave:** *Babesia bovis*, *Anaplasma marginale*, PCR punto final, Diagnóstico.

## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS .....	I
DEDICATORIA .....	II
RESUMEN .....	III
ÍNDICE DE CUADROS .....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS .....	V
1. INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVO.....	2
HIPÓTESIS .....	2
2. REVISION DE LITERATURA .....	3
2.1 AGENTES ETIOLÓGICOS .....	3
2.2 SIGNOS CLÍNICOS .....	4
2.3 BABESIOSIS.....	5
2.3.1 CICLO BIOLÓGICO: .....	5
2.4 ANAPLASMOSIS .....	6
2.4.1 CICLO BIOLÓGICO: .....	7
2.5 CICLO BIOLÓGICO Y ECOLOGÍA DE LAS GARRAPATAS .....	8
2.5.1 1) HUEVOS:.....	9
2.5.2 2) LAS LARVAS O PINOLILLOS .....	10
2.5.3 3) NINFAS:.....	10
2.5.4 4) ADULTOS:.....	10
2.6 BIOLOGÍA DE LAS SECRECIONES SALIVALES DE GARRAPATAS.....	11
2.7 MEDIDAS DE CONTROL Y POSIBLES ALTERNATIVAS .....	12
2.8 IMPORTANCIA DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR EN EL DIAGNOSTICO VETERINARIO: .....	13
2.9 MATERIALES Y METODOS .....	14
2.9.1 Muestras trabajadas .....	14
2.9.2 Extracción de DNA.....	16
2.9.3 Cuantificación de DNA mediante espectrofotometría .....	16
2.9.4 Control negativo .....	17

2.9.5 Control positivo:.....	18
2.9.6 Determinación de la calidad de DNA .....	18
2.9.7 Amplificación del gen constitutivo BtTCTP como control endógeno .....	18
2.9.8 Amplificación del segmento del gen msp4 ( <i>Anaplasma</i> ) mediante PCR.....	20
2.9.9 Amplificación del segmento del gen 18S ( <i>Babesia</i> ) mediante PCR.....	23
3. RESULTADOS.....	24
4. DISCUSIONES .....	29
5. CONCLUSIONES.....	30
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

## ÍNDICE DE CUADROS



<b>Cuadro 1 Información de animales muestreados (Hidalgo)</b> .....	14
<b>Cuadro 2 Información de animales muestreados (Veracruz)</b> .....	15
<b>Cuadro 3 Cuantificación de ADN de las muestras mediante espectrofotometría (NanoDrop One, Thermo Scientific)</b> .....	17
<b>Cuadro 4 Oligonucleótidos iniciadores del gen constitutivo BtTCTP utilizados como control endógeno</b> .....	19
<b>Cuadro 5 Programa de amplificación mediante PCR punto final de Bos Taurus TCTP</b> .....	20
<b>Cuadro 6 Reacción PRC</b> .....	21
<b>Cuadro 7 Oligonucleótidos iniciadores para la detección de Anaplasma marginale y Babesia bovis</b> .....	21
<b>Cuadro 8 Programa de amplificación mediante PCR punto final de Anaplasma marginale</b> .....	22
<b>Cuadro 9 Programa de amplificación mediante PCR punto final de Babesia Bovis</b> .....	23
<b>Cuadro 10 Tabla de análisis de correlación lineal, se encontró correlación entre la edad y la infección con Anaplasma y Babesia</b> .....	25

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Adulto macho de la garrapata <i>Rhipicephalus microplus</i> (Garza, 2007).	.3
Figura 2. Etapas sanguíneas durante el desarrollo de parásitos <i>Babesia bovis</i> en cultivos de eritrocitos bovinos in vitro (Suarez y Noh, 2011).	6
Figura 3 Eritrocitos bovinos infectados con <i>A. marginale</i> (Kocan et al., 2003)	7
Figura 4 Adulto hembra de la garrapata <i>Rhipicephalus microplus</i> (Garza, 2007).	.9
Figura 5 Huevecillos de la garrapata <i>Rhipicephalus microplus</i> (Garza, 2007).	9
Figura 6 Larvas de la garrapata <i>Rhipicephalus microplus</i> (Garza, 2007).	10
Figura 7 Ciclo biológico de la garrapata <i>Rhipicephalus microplus</i> (Kocan et al., 2003).	11
Figura 8 Situación actual del control de la garrapata <i>Rhipicephalus microplus</i> (SENASICA, 2016).	13
Figura 9 Resultados muestras Tlahuiltepa Hidalgo: Barras azules muestran el porcentaje del total de casos positivos para cada enfermedad 34.375 % (11/32) <i>A. marginale</i> y 62.5 (21/32) <i>B. bovis</i> .	26
Figura 10 Resultados muestras Coatzintla Veracruz: Barras azules muestran el porcentaje del total de casos positivos para cada enfermedad 37.5 % (3/8) <i>A. marginale</i> y 25% (2/8) <i>B. bovis</i> .	26
Figura 11 Detección por PCR punto final <i>Anaplasma marginale</i> del total de las muestras (1-32 Tlahuiltepa Hidalgo, 33-40 Coatzintla Veracruz), M: marcador de peso molecular de 1 kb, +: Control positivo, 1-22: muestras (Primer gel).	27
Figura 12 Detección por PCR punto final <i>Anaplasma marginale</i> del total de las muestras (1-32 Tlahuiltepa, Hidalgo, 33-40 Coatzintla, Veracruz), M: marcador de peso molecular de 1Kb, 23-40: muestras, NTC: Not Template control, - : Control negativo (Segundo gel).	27

Figura 13 Detección por PCR punto final Babesia bovis del total de las muestras (1-32 Tlahuiltepa Hidalgo, 33-40 Coatzintla Veracruz), M: marcador de peso molecular de 1 kb, 1-24: muestras (Primer gel).....28

Figura 14 Detección por PCR punto final Babesia bovis del total de las muestras (1-32 Tlahuiltepa Hidalgo, 33-40 Coatzintla Veracruz), M: marcador de peso molecular de 1 kb, +: Control positivo, 25-40: muestras, NTC: Not Temple control, - : Control negativo (Segundo gel).....28

## 1. INTRODUCCIÓN

Las infestaciones de garrapatas (*Rhipicephalus microplus*) y las enfermedades que transmiten (Babesiosis y Anaplasmosis) causan grandes pérdidas económicas en México (Rodríguez *et al.*, 2009). El impacto negativo de *Rhipicephalus microplus* a la ganadería se debe a las pérdidas millonarias de dólares que causan anualmente a los ganaderos por los daños a las pieles a causa de las picaduras, anemia por la pérdida de sangre y baja producción de leche y carne. (Brown *et al.* 2006). Se estima que hay una pérdida de 1-3 ml de sangre por cada garrapata de ganado que completa su ciclo de vida en un animal. El problema de las garrapatas amenaza seriamente la exportación de ganado bovino a los Estados Unidos, es una actividad económicamente muy importante para la ganadería mexicana, que genera divisas por el orden de los 700 millones de dólares anualmente (González-Sáenz, 2009). La FAO alienta a los países a intensificar sus esfuerzos para controlar las garrapatas y las enfermedades que transmiten, con el fin de mejorar la eficiencia de la producción ganadera. Asimismo, la FAO recomienda priorizar el control de este parásito a las autoridades sanitarias en cada país con este problema, tal es el caso de México. La detección oportuna de babesiosis y anaplasmosis resulta en un impacto positivo debido a que permite establecer una mayor inocuidad en los hatos de ganado, limitando la diseminación de la enfermedad y su potencial de evolución. Las técnicas de biología molecular como PCR (Replicación en cadena de la Polimerasa) confieren una mayor sensibilidad a comparación de otras tecnologías aplicadas ya sean serológicas o de microscopía. Por lo cual resulta una buena

alternativa para ser utilizada como una herramienta de diagnóstico. El presente estudio tiene como objeto determinar la presencia de *Anaplasma marginale* y *babesia bovis* en zonas tropicales de México.

#### OBJETIVO

Detectar anaplasmosis y babesiosis bovina transmitidas por la garrapata *Rhipicephalus Microplus* en ganado bovino ubicado en el municipio de Tlahuiltepa, Hidalgo y Coatzintla, Veracruz.

#### HIPÓTESIS

El desarrollo de un método molecular sensible nos permitirá identificar a ganado y garrapatas portadoras de babesiosis y anaplasmosis.

## 2. REVISION DE LITERATURA

### 2.1 AGENTES ETIOLÓGICOS

Las enfermedades transmitidas por la garrapata *R. microplus* limitan la productividad del ganado bovino. En general los estudios epidemiológicos han demostrado que estos patógenos están presentes en el ganado bovino y en su vector, la garrapata *R. microplus* (Figura 1), la cual es el vector de los protozoarios *Babesia bovis*, *B. bigemina* y *Anaplasma marginale*. Estas enfermedades son endémicas en las zonas tropicales y semitropicales de México y coinciden con la distribución del vector (Estrada-Peña *et al.*, 2006). *R. microplus* tiene un ciclo biológico de un solo hospedero y, a pesar de ello, el estudio de estas enfermedades es complejo por el hecho de que dependiendo del sistema inmune del animal, pueden estar presentes sin provocar signología. *Babesia bovis* es más virulenta que *B. bigemina*, y son los agentes causales de la *babesiosis bovina*; mientras que *Anaplasma marginale* es el agente causal de la anaplasmosis bovina. Se ha estimado que más de 20 millones de cabezas de ganado están expuestos a la babesiosis y anaplasmosis en México (Figueroa *et al.*, 1998; García-Vázquez *et al.*, 2010).



Figura 1. Adulto macho de la garrapata *Rhipicephalus microplus* (Garza, 2007).

## 2.2 SIGNOS CLÍNICOS

*Anaplasma marginale* es un parásito intracelular obligado que infecta a los eritrocitos y causa una enfermedad hemolítica en el ganado. Las células reticuloendoteliales fagocitan a los eritrocitos infectados, causando el desarrollo de anemia e ictericia (Kocan *et al.*, 2003). La anaplasmosis es inusual porque los signos clínicos son más severos en animales adultos. Los terneros de menos de un año que están infectados con *A. marginale* generalmente no muestran signos clínicos de la enfermedad, pero se convertirán en portadores. El ganado de 1 a 3 años de edad mostrara signos clínicos más graves, y entre el 30 y el 50 por ciento morirán si no se tratan temprano. Los signos clínicos de infección incluyen pérdida de apetito, fiebre, dificultad para respirar, deshidratación, depresión, ictericia, pérdida de peso rápida, abortos y una disminución en la producción de leche. En el recuento de eritrocitos, los valores de hemoglobina y el volumen de células disminuyen significativamente, y el animal infectado puede morir a causa de una anemia grave (Whittier *et al.*, 2007). La babesiosis es causada por parásitos intraeritrocíticos obligados que infectan una variedad de animales, incluido los humanos. *Babesia bigemina* y *B. bovis* son dos agentes que pueden causar babesiosis en el ganado en África, Asia, Australia, el sur de Europa y América Central y del Sur (Bock *et al.*, 2004). La patogénesis de *B. bovis* es el resultado de la anemia hemolítica causada por el parásito y la sobre producción de citoquinas y otros componentes relacionados con la respuesta inmune que contribuyen a la progresión de la enfermedad. Signos clínicos de *B. bovis* son anorexia, depresión, aumento de la frecuencia respiratoria, debilidad, anemia, ictericia, renuencia a

moverse y hemoglobinuria (Suarez y Noh, 2011). El ganado joven (menos de 9 meses de edad) exhibe una mayor resistencia natural a la infección clínica causada por la babesiosis que el ganado más viejo (Zintl *et al.*, 2005). Las fiebres causadas por una infección pueden provocar el aborto. En las infecciones agudas de *B. bovis* se observan trastornos de la coagulación, hipotensión y citohaderencia, los casos avanzados muestran desgaste muscular, temblores, convulsiones y otros signos neurológicos, hasta poder llegar a la muerte. Los animales que se recuperan pueden ser portadores subclínicos de la infección durante varios años. Los animales que se recuperan de la enfermedad pueden infectar las garrapatas durante toda su vida (Suarez y Noh, 2011).

### 2.3 BABESIOSIS

La babesiosis es causada en México por dos organismos *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*. De las dos especies *B. bovis* es la más importante debido a que causa mayor mortalidad y algunos brotes en México no son diagnosticados oportunamente (García-Vázquez, 2010). La distribución global de estas especies depende de las garrapatas ixodid que son responsables de la transmisión de estos parásitos entre el ganado. Tanto *B. bovis* como *B. bigemina* son más comúnmente transmitidas entre el ganado por los vectores *Rhipicephalus microplus* y *Rhipicephalus anuletes* y se encuentran principalmente en regiones tropicales y subtropicales del mundo (Bock *et al.*, 2004).

2.3.1 Ciclo biológico: Los parásitos del género *Babesia* se transmiten cuando los esporozoitos se liberan con la saliva durante la alimentación con garrapatas y causan enfermedades cuando estos invaden y se replican dentro de los eritrocitos



del huésped (Figura 2). Los merozoitos de *Babesia*, como otros parásitos apicomplexa, usan una combinación de moléculas de la superficie celular y del complejo apical para unirse e invadir las células del huésped (Young y Morzaria, 1986). La invasión de células huésped por estos parásitos apicomplexan implica la exocitosis sucesiva de tres organelas secretoras diferentes: micronemas, rhoptries y gránulos densos (Dubremetz *et al.*, 1998). En *B. bovis*, merozoite surface antigen 1 (MSA-1) y rhiptry-associated protein 1 (RAP-1) participan en la invasión de los eritrocitos (Golf *et al.*, 1998).

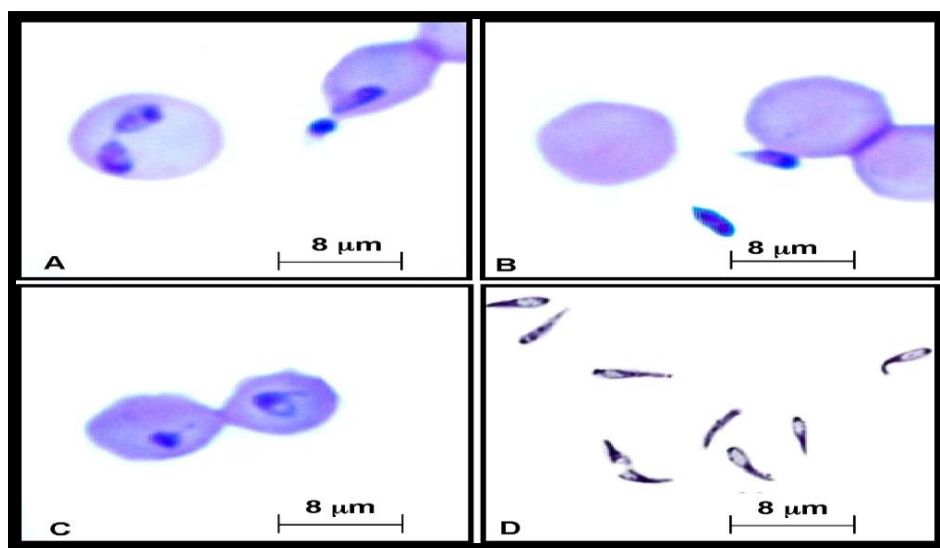


Figura 2. Etapas sanguíneas durante el desarrollo de parásitos *Babesia bovis* en cultivos de eritrocitos bovinos *in vitro* (Suarez y Noh, 2011).

#### 2.4 Anaplasmosis

El patógeno intracelular *Anaplasma marginale* es endémico en todo el mundo en áreas tropicales y subtropicales. La infección del ganado con *A. marginale* causa anaplasmosis bovina, una enfermedad hemolítica de leve a severa que ocasiona pérdidas económicas considerables tanto para la industria láctea como para la de carne. La transmisión de *A. marginale* al ganado se produce biológicamente por

garrapatas y mecánicamente por mordeduras de moscas y por fómites contaminados con sangre. Tanto la garrapata macho como los hospedadores de ganado se infectan persistentemente con *A. marginale* y se convierten en reservorios de la infección. Mientras que los eritrocitos son el principal sitio de infección en el ganado (Fig.3)

2.4.1 Ciclo biológico: *A. marginale* se somete a un complejo ciclo de desarrollo en las garrapatas que comienza por la infección de las células intestinales, y la transmisión a los huéspedes susceptibles se produce a partir de las glándulas salivales durante la alimentación. Las principales proteínas de superficie (MSP) desempeñan un papel crucial en la interacción de *A. marginale* con las células huéspedes, e incluyen proteínas de adhesión y MSP de familias multigénicas que experimentan cambios antigénicos y selección en el ganado, contribuyendo así al mantenimiento de las infecciones persistentes (Kocan *et al.* 2010).

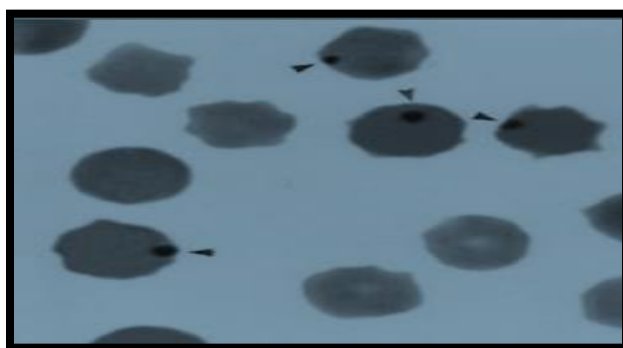


Figura 3 Eritrocitos bovinos infectados con *A. marginale* (Kocan *et al.*, 2003)

## 2.5 Ciclo biológico y ecología de las garrapatas

Las garrapatas son ectoparásitos del orden ixodida, que se fijan sobre la piel de los animales y se alimentan de su sangre. Se encuentran presentes en zonas tropicales donde la temperatura, la humedad y la vegetación, son determinantes para que se desarrolle su ciclo de reproducción (SENASICA, 2016). Las garrapatas tienen dos estadios, uno parasítico y otro no parasítico. El estadio parasítico lo realizan sobre su hospedadero que es el bovino. Este estadio se realiza en un periodo de 21 días durante el cual la garrapata pasa por los estadios de larva (tres pares de patas), ninfa y adulto (cuatro pares de patas). La hembra adulta se alimenta lentamente por alrededor de una semana, llenándose rápidamente con sangre en las últimas 24 horas (Figura 4). Las garrapatas entonces se desprenden del hospedero y caen al suelo y empiezan a ovipositar aproximadamente 3000 huevos y al final las garrapatas mueren. De los huevos eclosionan las larvas que infestan los pastos hasta que las larvas infestan a sus hospederos y si no las larvas mueren. Este es el estadio no parasítico el cual puede variar dependiendo de la temperatura y humedad presente en el ambiente, durante el verano duran aproximadamente 2 meses a 6 o 7 meses en el invierno y son afectados adversamente por las temperaturas extremas y los niveles de humedad. Los machos se alimentan ocasionalmente pero no se llenan de sangre (ingurgitamiento). Los machos se desplazan a través de todo el cuerpo de los animales por varios meses y se aparean por las hembras. Existen cuatro estadios en el ciclo de la garrapata: Huevo, Larva, Ninfa, Adulto (Fig.7).



*Figura 4 Adulto hembra de la garrapata Rhipicephalus microplus (Garza, 2007).*

2.5.1 1) Huevos: los huevos es donde eclosionan las larvas después de 2 ó 6 meses, la eclosión ocurre más rápidamente en lugares calurosos y húmedos (Figura 5). El clima frío mata los huevos, y esto determina los lugares donde se van a encontrar las garrapatas.



*Figura 5 Huevecillos de la garrapata Rhipicephalus microplus (Garza, 2007).*

2.5.2 2) Las larvas o pinolillos: eclosionan de los huevos que se encuentran en el suelo y se suben a las hojas de los pastos y las larvas pueden sobrevivir hasta 8 meses antes de encontrar el hospedadero (Figura 6). Una vez que se encuentra el hospedador (bovino) las larvas se alimentan succionando sangre por 5 o 6 días y posteriormente se transforman en ninfas.



*Figura 6 Larvas de la garrapata Rhipicephalus microplus (Garza, 2007).*

2.5.3 3) Ninfas: Las ninfas se alimentan por otros seis u ocho días y entonces se transforman en adultos.

2.5.4 4) Adultos: Las hembras adultas se alimentan de 7-2 días, se ingurgitan rápidamente con sangre las últimas 24 horas del ciclo y al final ellas se desprenden del hospedadero cayendo a los pastos, donde empezaran a depositar sus huevos y al final morirán (Figura 4) (García-Vázquez, 2010).

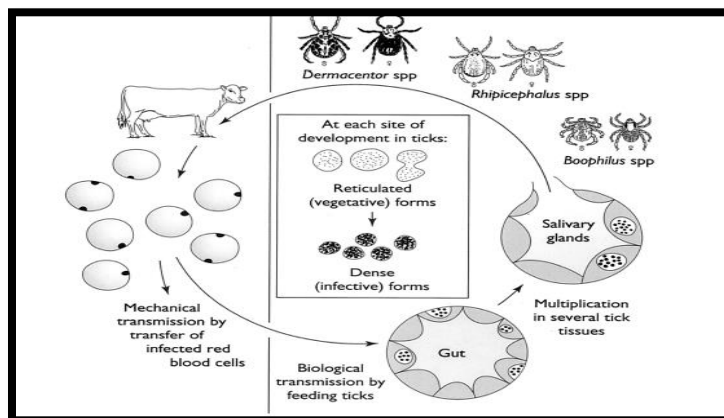


Figura 7 Ciclo biológico de la garrapata *Rhipicephalus microplus* (Kocan *et al.*, 2003).

## 2.6 Biología de las secreciones salivales de garrapatas.

Estos ectoparásitos pueden inmunosuprimir al ganado durante la extracción de la sangre con el aparato bucal al secretar moléculas farmacológicamente activas. Durante la alimentación, las garrapatas salivales secretan una gran variedad de moléculas farmacológicamente activas (Valenzuela, 2002; Nuttall, 2009); tal es el caso de la proteína 64TRP de 15 kDa, asociada al aparato bucal de la garrapata. La proteína 64TRP recombinante induce respuestas de hipersensibilidad de tipo humoral (Trimnell *et al.*, 2002) y provocando la muerte en garrapatas. Las ferritinas son proteínas de almacenamiento de hierro que desempeñan un papel fundamental en la homeostasis del hierro durante la alimentación con garrapatas. Una ferritina tipo 2 de cadena pesada común (Kopacek *et al.*, 2003), *sin ortólogos funcionales en vertebrados*, se ha caracterizado recientemente como una proteína específica del intestino secretada en la hemolinfa de la garrapata, donde actúa como transportador de hierro (Hajdusek *et al.*, 2009). La inhibición de la ferritina 2 (RmFER2) por ARNi y la vacunación con la proteína recombinante redujeron la alimentación, la

oviposición y la fertilidad en *I. ricinus*, *R. microplus* y *R. annulatus* (Hajdusek *et al.*, 2010).

## 2.7 Medidas de control y posibles alternativas

El SENASICA por medio de la campaña nacional para el control de la garrapata *Rhipicephalus microplus*, busca erradicar la garrapata de este género en áreas donde sea ecológicamente factible. Además, para evitar la infestación en las zonas que ya han sido liberadas de este ectoparásito, se establecen medidas de control integral en las zonas endémicas para reducir al mínimo las pérdidas en la producción del ganado. Dentro de las actividades de la campaña se realiza inspección de ganado, aplicación de tratamientos garrapaticidas, envío de especímenes para el diagnóstico taxonómico y de resistencia a los garrapaticidas, vigilancia epidemiológica de las enfermedades hemoparasitarias, atención a unidades de producción donde exista garrapata resistente a los diferentes ixodicidas, así como capacitación y divulgación de la campaña a productores y médicos veterinarios (SENASICA, 2006).



*Figura 8 Situación actual del control de la garrapata *Rhipicephalus microplus* (SENASICA, 2016).*

## 2.8 Importancia de la biología molecular en el diagnóstico veterinario:

La detección e identificación de enfermedades y el diagnóstico de sus agentes causales se han realizado por numerosos métodos, desde los más clásicos utilizando técnicas morfológicas y bioquímicas, hasta utilizando cada vez más las técnicas inmunológicas y moleculares de la biotecnología moderna. Por otra parte, con el desarrollo de la biología molecular, se han abierto posibilidades muy importantes en las técnicas de diagnóstico y generalizan aceleradamente en los laboratorios de diagnóstico veterinario. Las secuencias únicas de DNA proveen un alto grado de especificidad en el diagnóstico y el control de microorganismos patógenos, las técnicas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permiten niveles de especificidad extremadamente altos (Borroto, 2008).



## 2.9 MATERIALES Y METODOS

### 2.9.1 Muestras trabajadas

Se muestran un total de 40 animales, 32 procedentes de Tlahuiltepa, Hidalgo (31 hembras, 1 macho) y 8 de Coatzintla, Veracruz (7 hembras, 1 macho) cruce de ganado *Bos taurus*/*Bos indicus*, con el fin de realizar actividades de cría con propósito de producción de carne, los datos se encuentran condensados en el Cuadro 1 y 2. La sangre utilizada para el diagnóstico se obtuvo mediante la punción de la vena coxígea utilizando un tubo vacutainer con EDTA, previa desinfección de la piel de la base de la cola. Las muestras de sangre se transportaron en hielera con refrigerantes a una temperatura de 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio.

*Cuadro 1 Información de animales muestreados (Hidalgo)*

N° de muestra	Arete	Sexo	Edad	Presencia de garrapata
1	0000	Macho	11 meses	No
2	0001	Macho	1 año	No
3	0007	HEMBRA	2 años	No
4	0008	HEMBRA	1 año	No
5	0009	HEMBRA	1 año 5 meses	Si
6	0010	HEMBRA	1 año 9 meses	Si
7	0012	HEMBRA	1 año 5 meses	Si
8	0013	HEMBRA	7 meses	No
9	0015	HEMBRA	1 año 4 meses	No
10	0018	HEMBRA	1 año 3 meses	Si
11	0019	HEMBRA	1 año	No
12	1495	HEMBRA	12 años	Si

13	2047	HEMBRA	6 años	No
14	2050	HEMBRA	8 años	No
15	2084	HEMBRA	6 años	No
16	2086	HEMBRA	4 años	No
17	2089	HEMBRA	6 años	No
18	3267	HEMBRA	3 años	No
19	3325	HEMBRA	1 años	No
20	3321	HEMBRA	7 años	No
21	3329	HEMBRA	1 año 8 meses	No
22	3332	HEMBRA	3 años y medio	No
23	3338	HEMBRA	5 años	No
24	3414	MACHO	8 años	No
25	4734	HEMBRA	2 años	Si
26	4916	HEMBRA	9 años	No
27	7494	HEMBRA	2 años	No
28	7496	HEMBRA	2 años	Si
29	8010	HEMBRA	1 año y medio	No
30	8030	HEMBRA	6 años	No
31	1993	HEMBRA	3 años	No
32	1995	HEMBRA	3 años	No

*Cuadro 2 Información de animales muestreados (Veracruz)*

N° de muestra	Arete	Sexo	Edad	Muestra de garrapata
33	0472	HEMBRA	4	No
34	1494	HEMBRA	7	No
35	2260	HEMBRA	10	No
36	6515	HEMBRA	3	No

37	2262	HEMBRA	2	No
38	6816	HEMBRA	4	No
39	6509	HEMBRA	5	No
40	6513	HEMBRA	8	No

### 2.9.2 Extracción de DNA

La extracción de DNA se realizó mediante el kit ZR Plant/Seed DNA MiniPrep siguiendo el manual de usuario con modificaciones. Las muestras se centrifugaron a 2500 rpm por 10 minutos para separar la porción de suero y obtener la mayor concentración de glóbulos rojos. De los cuales se utilizaron 500  $\mu$ l para la extracción de DNA. En resumen 500  $\mu$ l (sangre centrifugada) se mezclaron con 750  $\mu$ l de solución de lisis en un tubo Eppendorf de 2 ml, se procedió a centrifugar a 13000 rpm/10 min, transfiriendo 400  $\mu$ l del sobrenadante al tubo de colección Zymo-Spin™ IIC Column que posteriormente se centrifugo a 13000rpm/ 1min, a continuación se añadieron 200  $\mu$ l de DNA Wash Buffer centrifugando a 13000 rpm/min, un segundo lavado se realizó mediante la adición de 500  $\mu$ l de Plant/Seed DNA Wash Buffer centrifugando a 13000 rpm/min, por último el DNA se recolecto de la columna agregando 22  $\mu$ l de agua miliQ estéril recolectándolo en un tubo Eppendorf de 1.5 ml para su posterior almacenamiento a -20°C hasta su uso.

### 2.9.3 Cuantificación de DNA mediante espectrofotometría

La cantidad de DNA extraído de las muestras se cuantifico por espectrofotometría nanométrica utilizando 2 ul de extracción (Cuadro 3).

**Cuadro 3 Cuantificación de ADN de las muestras mediante espectrofotometría (NanoDrop One, Thermo Scientific).**

<b>N° de muestra</b>	<b>Concentración (ng/ul)</b>
1	50.7
2	86.7
3	29.5
4	63.1
5	14.2
6	11.4
7	14.3
8	13.5
9	19.7
10	6.6
11	7.9
12	51.8
13	5.9
14	11.4
15	31.2
16	8.7
17	10.5
18	15
19	10.9
20	6.3
21	8.6
22	11.2
23	51.6
24	30.9
25	4.9
26	12
27	8.5
28	11.2
29	22
30	26.7
31	21.5
32	5.6
33	11.3
34	2.2
35	8.1
36	8.7
37	6.1
38	5.1
39	2.6
40	3.7

#### 2.9.4 Control negativo

El sujeto de estudio usado como control negativo, fue un bovino de raza limusin de 9 años de edad, procedente de una explotación pecuaria de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), certificado libre de *brúcela* y *tuberculosis*. La determinación de hemoparásitos y extracción sanguínea fue realizada por Luis Francisco Núñez Ruiz siguiendo la metodología descrita previamente.

#### 2.9.5 Control positivo:

Para determinar un control positivo, se planteó la hipótesis de que *Babesia* y *Anaplasma* son parásitos intraeritrocíticos obligados, por lo tanto, las concentraciones más altas posiblemente corresponden a bovinos infectados con uno o ambos parásitos, por ende, la extracción con mayor concentración (ng/ul) podría ser una posible candidata positiva para ambas enfermedades. Basándonos en esta hipótesis, se realizó una PCR a la muestra con mayor concentración para detectar *Babesia bovis* y *Anaplasma marginal*, obteniendo como resultados en ambos casos la amplificación del gen.

#### 2.9.6 Determinación de la calidad de DNA

Para determinar la calidad de DNA, se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 0.8% (p/v) con un voltaje de 90v a 50 minutos.

#### 2.9.7 Amplificación del gen constitutivo BtTCTP como control endógeno

La calidad de DNA obtenido, fue verificada mediante la amplificación por PCR punto final de un fragmento del gen que codifica a BtTCTP con el uso de oligonucleótidos específicos diseñados por la Dra. Beatriz Xoconostle (Cuadro 4), utilizando el siguiente programa de amplificación: desnaturalización inicial 94°C 1 minuto, 35 ciclos de 94°C 20 segundos, 60°C 30 segundos, 72°C 40 segundos y extensión final de 72°C 5 minutos (Cuadro 5).

**Cuadro 4 Oligonucleótidos iniciadores del gen constitutivo BtTCTP utilizados como control endógeno.**

	Nombre del oligonucleótido iniciador	Oligonucleótido iniciador	Posición en el gen	Producto amplificado esperado	Temperatura de fusión (TM)
<i>Bos Taurus</i> -Proteína Tumoral Controlada Translacionalmente	BtTCTP	5'atgacgagatgttctccgacatctacaaga3'	130-159	352pb	60°C
		5'gcaaggatgtgcttgattgttctgcagcc3'	449-481		

**Cuadro 5 Programa de amplificación mediante PCR punto final de *Bos Taurus* TCTP**

	Temperatura	Tiempo
<b>Desnaturalización inicial</b>	94°C	3 minuto
<b>30 Ciclos</b>	94°C	30 segundos
	60°C	30 segundos
	72°C	1 minuto
<b>Extensión final</b>	72°C	5 minutos

#### 2.9.8 Amplificación del segmento del gen msp4 (*Anaplasma*) mediante PCR

La amplificación del segmento del gen se realizó mediante PCR punto final, se estandarizaron todas las extracciones de DNA de las muestras a una concentración de 5 ng/ul , con un volumen final de 12.5 ul por reacción de PCR (Cuadro 6), conteniendo 5.76 ul de H<sub>2</sub>O de agua estéril miliQ, 1.25 ul de Buffer 10x sin Mg<sup>+2</sup>(x), 0.38 de Mg<sup>+2</sup> (50 mM), 0.31 de dNTPs (10 mM), 0.05 de Taq platinum (U/uL) (invitrogen), 0.38 ul de cebadores: 5´ atgaattacagagaattgtttacagggggc 3´ y 5´ gtactgcccgtccgccaagtagcaaacct 3´ (Cuadro 7), y 4 ul del DNA de las muestras con una concentración de 5 ng/ul. Se utilizó el siguiente programa de amplificación: desnaturalización inicial 94°C 1 minuto, 35 ciclos de 94°C 20 segundos, 60°C 30 segundos, 72°C 40 segundos y extensión final de 72°C 5 minutos (Cuadro 8).

**Cuadro 6 Reacción PRC**

<b>Reactivos</b>	<b>Volumen</b>
H <sub>2</sub> O	5.76
Buffer 10X sin Mg <sup>+2</sup> (X)	1.25
Mg <sup>+2</sup>	0.38
dNTPs	0.31
Primer F	0.38
Primer R	0.38
Taq Platinum	0.05
DNA (5 ng/uL)	4
Volumen reaccion final	12.5

**Cuadro 7 Oligonucleótidos iniciadores para la detección de *Anaplasma marginale* y *Babesia bovis*.**



Enfermedad	Nombre del oligonucleótido iniciador	Oligonucleótido iniciador	Posición en el gen	Producto amplificado esperado	Temperatura de fusión ( TM )
<i>Anaplasma marginale</i>	Msp4	5'ccaatacggggctactgct ctgtaattggc3'	1-30	420 pb	60°C
		5'gagtcgaggcgacgaccaccaa tccctagt3'	391-410		
<i>Babesia Bovis</i>	18S Ribosomal	5'atgaattacagagaattgtttacag ggggc3'	21-50	510 pb	68°C
		5'gagtcgaggcgacgaccaccaa tccctagt3'	501-530		

**Cuadro 8 Programa de amplificación mediante PCR punto final de *Anaplasma marginale***

	Temperatura	Tiempo

<b>Desnaturalización inicial</b>	94°C	1 minuto
<b>35 Ciclos</b>	94°C	20 segundos
	60°C	30 segundos
	72°C	40 segundos
<b>Extensión final</b>	72°C	5 minutos

#### 2.9.9 Amplificación del segmento del gen 18S (Babesia) mediante PCR

La amplificación del segmento del gen 18S se realizó mediante PCR punto final, se estandarizaron todas las extracciones de DNA de las muestras a una concentración de 5 ng/ul, con un volumen final de 12.5 ul por reacción de PCR (Cuadro 6), conteniendo 5.76 ul de H<sub>2</sub>O de agua estéril miliQ, 1.25 ul de Buffer 10x sin Mg+2(x), 0.38 de Mg+2 (50 mM), 0.31 de dNTPs (10 mM), 0.05 de Taq platinum (U/uL) (invitrogen), 0.38 ul de cebadores: 5'ccaatacggggctactgctctgtaattggc3' y 5'gagtcgaggcgacgaccaccaatccctagt3' (Cuadro 7), y 4 ul del DNA de las muestras con una concentración de 5 ng/ul. Se utilizó el siguiente programa de amplificación: desnaturalización inicial 94°C 1 minuto, 35 ciclos de 94°C 20 segundos, 68°C 40 segundos, 72°C 40 segundos y extensión final de 72°C 5 minutos (Cuadro 9).

**Cuadro 9 Programa de amplificación mediante PCR punto final de Babesia Bovis**

	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>

<b>Desnaturalización inicial</b>	94°C	1 minuto
<b>35 Ciclos</b>	94°C	20 segundos
	68°C	30 segundos
	72°C	40 segundos
<b>Extensión final</b>	72°C	5 minutos

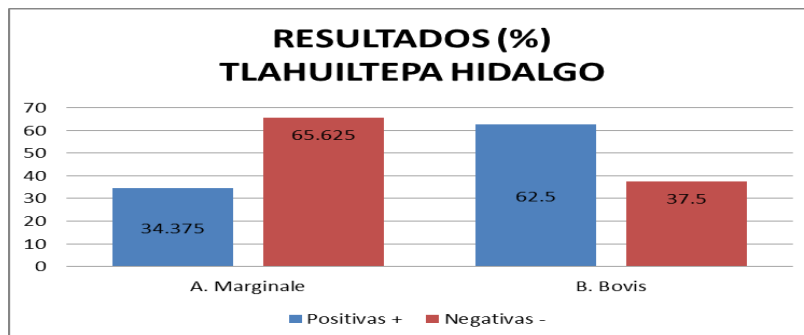
### 3. RESULTADOS

El presente estudio, reveló la presencia de Anaplasma y Babesia en ambas entidades donde se realizó la toma de muestra. Las muestras recolectadas en el

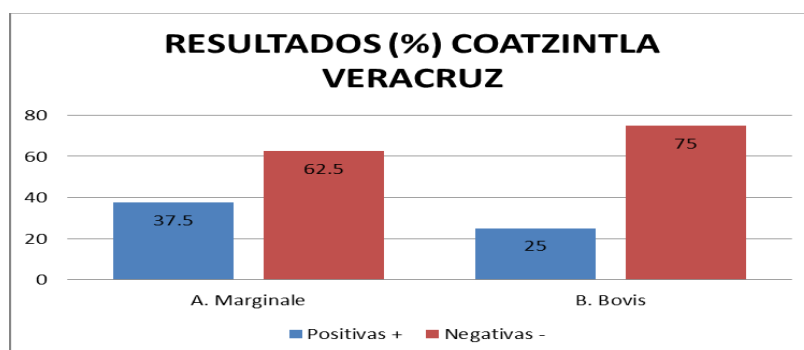
municipio de Tlahuiltepa, Hidalgo presentaron una mayor prevalencia a infecciones del parásito *B.bovis*, con un 62% del total de muestras recolectadas (21/32), mientras *A. marginale* resultó en un 34% (11/32) (Figura 9). De la misma manera se detectaron ambas enfermedades en las muestras procedentes de Coatzintla, Veracruz, con un 25% (3/8) a *B. bovis* y un 37% (2/8) para *A. marginale* (Figura 10). Por medio de análisis estadísticos (D de Spearman) se comprobó una correlación entre la edad del individuo y la presencia de una o ambas enfermedades (Cuadro 10). Los oligonucleótidos utilizados para detectar Anaplasma marginalis y Babesia bovis en la PCR resultaron específicos ya que no hubo amplificación a partir del ADN de otros hemoparásitos en ambos casos que pueden estar presentes en el bovino, ni ADN bovino. La amplificación del fragmento del gen msp4 resultó específica en la detección de Anaplasma obteniendo el amplicon esperado de 420pb (Figura 11 y 12), de la misma manera el fragmento que codifica a 18s resultó útil para la detección de la babesiosis obteniendo el amplicon esperado de 510pb (Figura 13 y 14).

**Cuadro 10** *Tabla de análisis de correlación lineal, se encontró correlación entre la edad y la infección con Anaplasma y Babesia.*

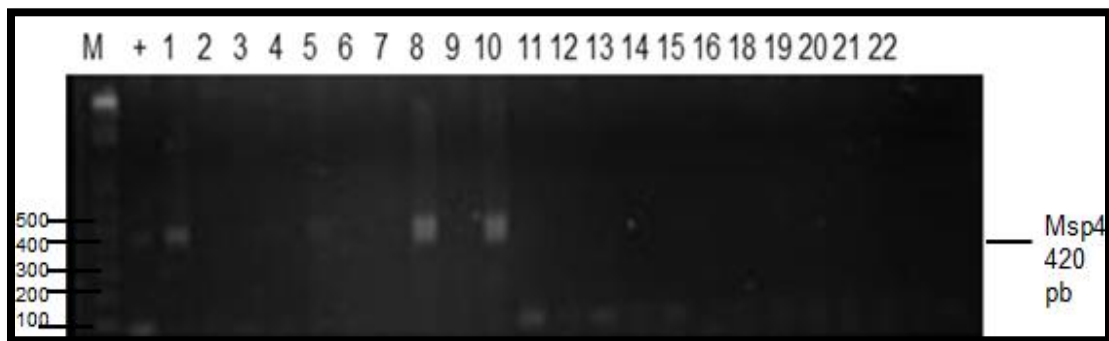
	Localidad	Sexo	Edad	Presencia de Garrapata	Msp4	18s
Localidad		0.55335	0.048911	0.1504	0.87	0.059709
SEXO	3990		0.36685	0.41279	0.23776	0.67667
Edad	5525.5	5695.5		0.25269	0.01433	0.024304
Presencia de Garrapata	5990	3000	8875.5		0.63564	0.075777
Msp4	6040	5510	12366	5510		0.13021
18s	8440	5350	12546	4550	5760	



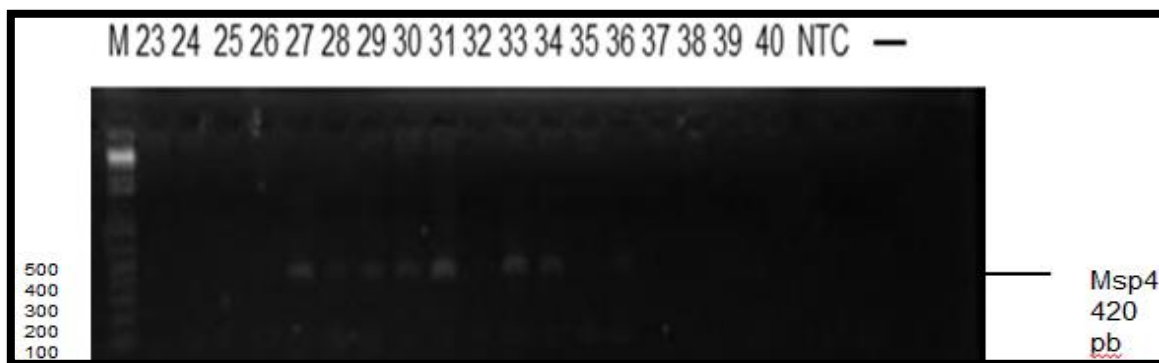
*Figura 9 Resultados muestras Tlahuiltepa Hidalgo: Barras azules muestran el porcentaje del total de casos positivos para cada enfermedad 34.375 % (11/32) A. marginale y 62.5 (21/32) B. bovis.*



*Figura 10 Resultados muestras Coatzintla Veracruz: Barras azules muestran el porcentaje del total de casos positivos para cada enfermedad 37.5 % (3/8) A. marginale y 25% (2/8) B. bovis.*



*Figura 11 Detección por PCR punto final Anaplasma marginale del total de las muestras (1-32 Tlahuiltepa Hidalgo, 33-40 Coatzintla Veracruz), M: marcador de peso molecular de 1 kb, +: Control positivo, 1-22: muestras (Primer gel).*



*Figura 12 Detección por PCR punto final Anaplasma marginale del total de las muestras (1-32 Tlahuiltepa, Hidalgo, 33-40 Coatzintla, Veracruz), M: marcador de peso molecular de 1Kb, 23-40: muestras, NTC: Not Temple control, - : Control negativo (Segundo gel).*

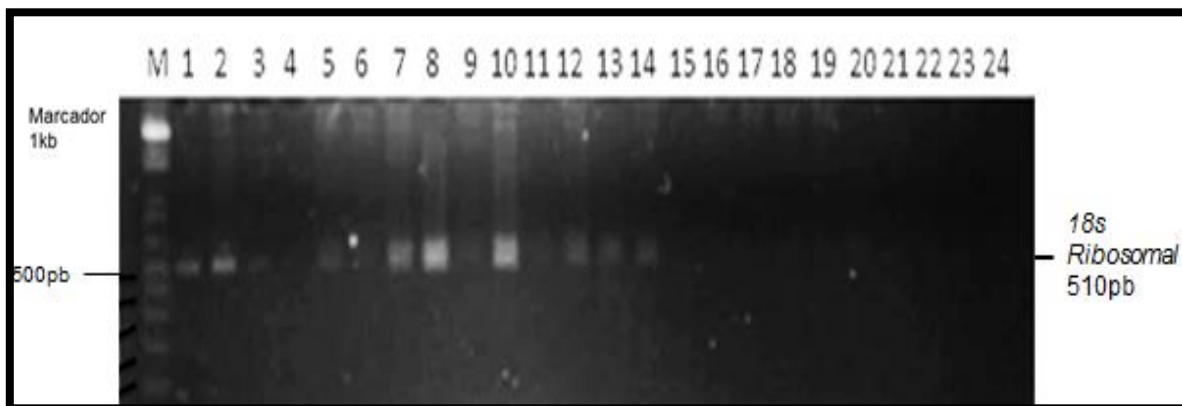


Figura 13 Detección por PCR punto final *Babesia bovis* del total de las muestras (1-32 Tlahuiltepa Hidalgo, 33-40 Coatzintla Veracruz), M: marcador de peso molecular de 1 kb, 1-24: muestras (Primer gel).

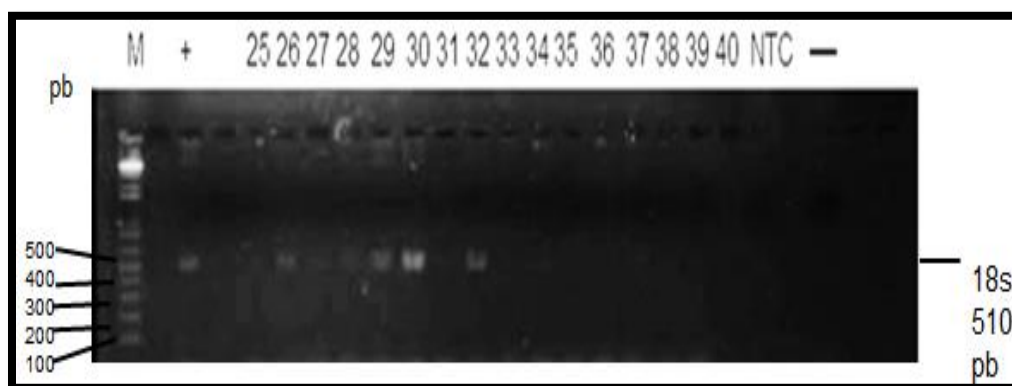


Figura 14 Detección por PCR punto final *Babesia bovis* del total de las muestras (1-32 Tlahuiltepa Hidalgo, 33-40 Coatzintla Veracruz), M: marcador de peso molecular de 1 kb, +: Control positivo, 25-40: muestras, NTC: Not Template control, -: Control negativo (Segundo gel).

#### 4. DISCUSION

En ambas localidades donde se realizó el estudio los animales no presentaban manifestaciones clínicas de tener una infección o ambas (anaplasmosis y babesiosis), su condición corporal se observó aceptable para un sistema de manejo extensivo, por lo cual se consideraron como animales aparentemente sanos, después de las pruebas de laboratorio (PCR) se demostró la presencia de uno o ambos parásitos por animal, por lo cual algunos ejemplares son portadores sin presentar sinología y se consideran un posible foco de infección para que se diseminen estas enfermedades, ya sea dentro del mismo rebaño o rebaños cercanos. La correlación existente entre la edad y la presencia de una o ambas enfermedades por animal se asume que es debido a que los animales más longevos han estado expuestos a un mayor número de brotes de garrapatas, por ende, tienen más probabilidades de estar contagiados. Las desparasitaciones, la temporada climática y el cambio de lugar de pastoreo son condiciones que pueden intervenir en la presencia de la garrapata, pero una vez que estos hayan estado expuestos a un brote de garrapata infectada serán contagiados y quedaran como portadores de la enfermedad sin estar estrechamente asociados con una alta población de garrapatas, por estas razones se asume que el estudio de correlación lineal no mostro una correlación entre la presencia de garrapata-enfermedad.



## 5. CONCLUSIONES

La detección de anaplasmosis y babesiosis empleando técnicas de biología molecular es una alternativa eficaz para realizar un diagnóstico oportuno y sensible que permite tomar las medidas preventivas en forma y tiempo adecuado. Se detectó por PCR la presencia de *Anaplasma marginale* y *babesia bovis* en los ejemplares ubicados en el estado de Veracruz e Hidalgo. Existe la presencia de coinfecciones de ambas enfermedades por individuo en las dos localidades. Estos no presentaban signos clínicos de los cuales sirvieran como fundamento para sospechar de las enfermedades, por lo cual se consideran como portadores con signología inaparente y un foco de posible infección hacia otros animales. De esta manera podemos concluir que las técnicas de biología molecular como PCR es una alternativa eficaz para realizar el diagnóstico y el posible control de la babesiosis y anaplasmosis.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bock, R., Jackson, L., de Vos, A., Jorgensen, W., 2004. Babesiosis of cattle. *Parasitology*. 129: 257-269.
2. Borroto, C.G.2008. La biotecnología y su aplicación en las ciencias veterinarias. OIE. P p. 241-250.
3. Brown, W.C., Normine, J., Goff, W.L., Suarez, C.E., Elwain, T.F. (2006). Prospects for recombinant vaccines against *Babesia bovis* and related parasites. *Parasite Immunol*. 28(7):315-27.
4. Dubremetz, J.F., Garcia-Reguet, V., Conseil, M.N. 1998. Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *International Journal for Parasitology*. 28: 1007-1013.
5. Estrada-Peña, A., García, Z., Sánchez, H.F. 2006. The distribution and ecological preferences of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in Mexico. *Experimental and applied acarology*. 38: 307-316.
6. Figueroa, J.V., Alvarez, J.A., Ramos, J.A., Rojas, E.E., Santiago, C., Mosqueda, J.J, Vega, C.A., Buening, G.M. 1998. Bovine babesiosis and anaplasmosis follow-up on cattle relocated in an endemic area for hemoparasitic diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 29:1-10.
7. García-Vázquez, Z. 2010. 1er. Simposium de Salud y Producción de Bovinos de Carne en la Zona Norte-Centro de México. Aguascalientes, Ags. Mayo 2010. En el Marco de La Feria de San Marcos 2010.
8. Garza, U.E. 2007. La garrapata *Boophilus microplus* y su manejo en la planicie huasteca. No 14. INEFAP. San Luis Potosí, México. P 3-5.

9. Golf, W.L., Davis, W.C., Palmer, G.H., McElwain, T.F., Johnson, W.C., Bailey, J.F., McGuire, T.C. 1998. Identification of *Babesia bovis* merozoite surface antigens by using immune bovine sera and monoclonal antibodies. *Infect. Immune.* 56: 2363-2368.
10. González-Sáenz, J.R. 2009. *Boophilus microplus*: Estado actual de la Resistencia a los acaricidas en la frontera México-Estados Unidos y su impacto en la relación comercial. II Simposio Internacional de la resistencia a pesticidas. Mérida, Yucatán. México. 30-34.
11. Hajdusek, O., Almazán, C., Loosova, G., Villar, M., Canales, M., Grubhoffer, L. 2010. Characterization of ferritin 2 for the control of tick infestations. *Vaccine* 28:2993–2998.
12. Hajdusek, O., Sojka, D., Kopacek, P., Buresova, V., Franta, Z., Sauman, I. 2009. Knockdown of proteins involved in iron metabolism limits tick reproduction and development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 106:1033–1038.
13. Kocan, K.M., De la fuente, J., Blouin, E.F., Coetzee, J.F., Ewing, S.A. 2010. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Veterinary parasitology.* 167: 95-107.
14. Kocan, K.M., de la Fuente, J., Guglielmone, A.A., Melendez, R.D. 2003. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clin. Microbial. Rev.* 16: 698-712.
15. Kopacek, P., Zdychova, J., Yoshiga, T., Weise, C., Rudenko, N., Law, J.H. 2003. Molecular cloning expression and isolation of ferritins from two tick species- *Ornithodoros moubata* and *Ixodes ricinus*. *Insect.Biochem.Mol.Biol.* 33:103-113.

16. Nuttall, P.A. (2009). Molecular characterization of tick-virus interactions. *Front.Biosci.* 14:2466–2483.
17. Rodríguez, S.D., García-Ortiz, M.A., Jiménez-Ocampo, R., Vega-Murguía, C. 2009. Molecular epidemiology of bovine anaplasmosis with a particular focus in México. *Infec. Gen. Evol.* 9. 1092–1101.
18. SENASICA (2016). (<https://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/campana-nacional-para-el-control-de-la-garrapata-boophilus-spp>, consultado el 30 de Mayo, 2018).
19. Suarez, E.C., Noh, S. 2011. Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. *Veterinary parasitology.* 180: 109-125.
20. Trimnell, A.R., Hails, R.S., Nuttall, P.A. 2002. Dual action ectoparasite vaccine targeting “exposed” and “concealed” antigens. *Vaccine* 20: 3560–3568.
21. Valenzuela, J.G. 2002. High-throughput approaches to study salivary proteins and genes from vectors of disease. *Insect. Biochem. Mol.Biol.* 32: 1199–1209.
22. Whittier, D., Currin, N., Currin, J. 2007. Anaplasmosis in beef cattle. Virginia tech cooperative extension. Publication number 400-465.
23. Young, A.S., Morzaria, S.P. 1986. Biology of babesia. *Parasitology today.* 2(8):211-219.
24. Zintl, A., Gray, J.S., Skerrett, H.E., Mulcahy, G. 2005. Possible mechanisms underlying age-related resistance to bovine babesiosis. *Parasite-Immunol.* 27: 15-120.