



**“Identificación y caracterización molecular de *Babesia canis* en caninos del albergue “Narices Frías” de Santo Domingo de los Tsáchilas”.**

Verduga Soledispa, Angela Cristina

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Reyna Bello, Armando Ph.D.

02 de Marzo del 2022





**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

### **CERTIFICACIÓN**

Certifico que el trabajo de titulación, "Identificación y caracterización molecular de *Babesia canis* en caninos del albergue "Narices Frías" de Santo Domingo de los Tsáchilas" fue realizado por la señorita Verduga Soledispa Angela Cristina el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 02 de marzo de 2022

Firma:

Firmado digitalmente por ARMANDO  
REYNA BELLO  
Número de reconocimiento (CR): 1-EC,  
s-SECURITY DATA S.A. 1.000-ENTIDAD DE  
CERTIFICACION DE INFORMACION  
serialNumber=200420182224  
cn=ARMANDO REYNA BELLO  
Fecha: 2022.03.02 12:12:02 -05'00'

**Reyna Bello, Armando Ph.D.**

C. C. 1758891830



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA**

Yo, **Verduga Soledispa Angela Cristina**, con cédula de ciudadanía n° 2300624919, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: "**Identificación y caracterización molecular de *Babesia canis* en caninos del albergue "Narices Frías" de Santo Domingo de los Tsáchilas**" es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

**Santo Domingo de los Tsáchilas, 02 de marzo de 2022**

Firma

**Verduga Soledispa Angela Cristina**

C.C.: 2300624919



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN**

Yo **Verduga Soledispa Angela Cristina**, con cédula de ciudadanía n° 2300624919, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Identificación y caracterización molecular de Babesia canis en caninos del albergue “Narices Frías” de Santo Domingo de los Tsáchilas”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi/nuestra responsabilidad.

**Santo Domingo de los Tsáchilas, 02 de marzo de 2022**

Firma

**Verduga Soledispa Angela Cristina**

C.C.: 2300624919

## **Dedicatoria**

Dedico este trabajo con mucho cariño y amor a mis padres, Lider y Martha quienes han sido apoyo incondicional en mi vida.

A mis hermanos, Lider y Génesis por ser comprensivos, cuidarme y siempre darme apoyo.

A mis abuelos, Cirilo y Martha que no se encuentran a mi lado pero que estarían muy felices de que haya cumplido esta meta profesional.

A mis mascotas, por siempre brindarme cariño y fidelidad.

Angela Cristina Verduga Soledispa

## Agradecimiento

Agradezco a Dios por darme la oportunidad de cumplir una meta más en mi vida, y ser mi fortaleza en cada momento.

A mis padres y hermanos por ser mi apoyo incondicional en cada meta que me he propuesto, por ser mi motivación a cumplir mis sueños, por todos los esfuerzos que realizan y por todo el amor que me brindan cada día.

Al Dr. Armando Reyna por todo su apoyo brindado en la realización de este trabajo de titulación, y por su constante enseñanzas a lo largo de la carrera.

A mis amigos, Jessica, Briggith, Génesis, Solange, Kevin, y Boris por todas las risas compartidas, por convertir agradable esta experiencia, y por todo el apoyo brindado en malos momentos. A Jairo, por todo su apoyo y amor incondicional en esta etapa de mi vida.

A mis compañeros de laboratorio, Hugo, Mateo y Jordan por su ayuda y colaboración en la realización de este proyecto, además a la Ing. Vanessa Armijos por su ayuda en el laboratorio.

A mis docentes en el transcurso de mi vida universitaria, por sus conocimientos y apoyo brindado en esta etapa. Al Ing. Gustavo Echeverría y a la Ing. Cristina Cholata por sus aportes en la realización de este proyecto.

A los encargados de los refugios y personas que han ayudado en los muestreos, Dra. Brenda Tola, Dra. Karolina Lopez, y Génesis Rosero, por su colaboración en la elaboración de esta investigación.

## Índice de contenidos

Caratula.....	1
Reporte de verificación de contenido.....	2
Certificación.....	3
Responsabilidad de autoría .....	4
Autorización de publicación .....	5
Dedicatoria .....	6
Agradecimiento .....	7
Listado de figuras .....	10
Listado de tablas .....	11
Lista de abreviaturas .....	12
Resumen.....	13
Abstract .....	14
Capítulo I.....	15
Introducción .....	15
Objetivos del proyecto .....	17
Objetivo general .....	17
Objetivo específico .....	17
Capítulo II.....	18
Historia .....	18
Generalidades .....	18
Clasificación de Babesia en canes.....	19
Respuesta inmunitaria .....	19
Especies de Babesia en animales domésticos.....	20
Distribución de Babesia canis .....	22
Morfología de <i>Babesia spp.</i> .....	23
Taxonomía de Babesia spp. ....	25
Ciclo de vida de Babesia spp.....	25
Sintomatología de la Babesiosis canina.....	27
Tratamiento de babesiosis canina.....	28
Métodos de diagnóstico .....	29
Métodos directos de identificación .....	29
Frotis de Sangre .....	29

Métodos moleculares .....	29
<i>PCR convencional</i> .....	29
<i>Técnicas modificadas de PCR</i> .....	30
<i>LAMP</i> .....	31
Métodos serológicos.....	31
Capítulo III.....	32
Toma de muestra de sangre .....	32
Extracción de sangre periférica.....	32
Tinción Giemsa en frotis sanguíneos .....	33
Extracción de ADN total .....	33
Determinación de calidad de ADN .....	34
PCR para identificar <i>Babesia spp.</i> .....	34
Detección de los productos amplificados en la PCR .....	36
PCR convencional para identificar <i>Babesia spp.</i> .....	36
Diagnóstico de <i>Babesia canis</i> en los muestreos .....	38
Caracterización molecular.....	38
Ensamblaje y análisis de similitud y homología .....	38
Análisis filogenético.....	38
Capítulo IV.....	39
Resultados .....	39
Frotis sanguíneos en tinción Giemsa .....	39
ADN obtenido de sangre periférica .....	40
Amplificación de fragmentos de <i>Babesia spp.</i> .....	41
Prevalencia de los muestreos .....	44
Análisis filogenético .....	45
Capítulo V .....	46
Discusión.....	46
Capítulo VI .....	49
Conclusiones y Recomendaciones.....	49
Conclusiones .....	49
Recomendaciones .....	50
Bibliografía .....	51

## Listado de figuras

<b>Figura 1</b> Esporozoítos de <i>Babesia canis</i> en eritrocitos en tinción May Grünwald Giemsa .....	24
<b>Figura 2</b> Esporozoítos de <i>Babesia gibsoni</i> en eritrocitos en tinción May Grünwald Giemsa.....	24
<b>Figura 3</b> Ciclo de vida de <i>Babesia</i> spp.....	27
<b>Figura 4</b> Presencia de <i>Babesia canis</i> en eritrocitos de muestra obtenida de la localización N° 2 del refugio “Narices frías”, 2021. ....	39
<b>Figura 5.</b> Figura Calidad de ADN obtenido a partir del protocolo de del Instituto de investigación en Zoonosis-CIZ modificado por Rieras, Rojas & Zapata. ....	41
<b>Figura 6</b> Amplificación de fragmentos de <i>Babesia canis</i> en muestras de la localización 1 del refugio. ....	42
<b>Figura 7</b> Amplificación de fragmentos de <i>Babesia canis</i> en muestras de la localización 2 del refugio. ....	42
<b>Figura 8</b> Amplificación de fragmentos de <i>Babesia canis</i> en muestras del cantón Chone .....	43
<b>Figura 9</b> Amplificación de fragmentos de <i>Babesia canis</i> en muestras de Bahía de Caráquez.....	43
<b>Figura 10</b> Árbol filogenético de las secuencias del gen 18s rRNA de <i>Babesia</i> spp. ....	45

### Listado de tablas

<b>Tabla 1</b> Especies de Babesia que afectan a animales domésticos (Uilenberg, 2006). .20	20
<b>Tabla 2</b> Distribución geográfica de diferentes especies de Babesia y sus vectores (Matijatko y otros, 2012; Solano-Gallego y otros, 2008; Solano-Gallego & Baneth, 2011). .....	22
<b>Tabla 3</b> Componentes del PreMix de AccuPower® Babesia PCR kit (BIONEER, 2015). .....	35
<b>Tabla 4</b> Composición de la mezcla de la reacción de PCR para identificar Babesia spp. (BIONEER, 2015).....	35
<b>Tabla 5</b> Condiciones de amplificación por PCR para la identificación de Babesia spp. (BIONEER, 2015).....	35
<b>Tabla 6</b> Composición de PCR para identificación de Babesia spp. ....	37
<b>Tabla 7</b> Condiciones para la amplificación por PCR para identificación de Babesia spp. .....	37
<b>Tabla 8</b> Distribución de muestras positivas a Babesia canis en las dos localizaciones del refugio Narices frías. ....	40
<b>Tabla 9</b> Prevalencia de B. canis en los muestreos. ....	44

### Lista de abreviaturas

- PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa
- ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- µL:** microlitro
- µm:** micrometro
- TNF-a:** Factor de necrosis tumoral alpha
- IL-:** Interleucina
- CID:** Coagulación intravascular diseminada
- RT-PCR:** Real Time PCR
- LAMP:** Amplificación isotérmica mediada por bucle
- pg:** Picogramos
- ELISA:** Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
- rRNA:** Ácido ribonucleico ribosómico
- °C:** Grados centígrados

## Resumen

La babesiosis canina es una enfermedad de los canes ocasionada por el protozoario intraeritrocítico denominado *Babesia spp.* *B. canis* se ha clasificado en 3 subespecies a la vez, *B. canis vogeli*, *B. canis rossi* y *B. canis canis*, donde *B. canis vogeli* es la mayormente distribuida en el mundo por su vector *R. sanguineus*, el cual se ha comprobado que se encuentra presente en el Ecuador. En el país no existen reportes sobre la identificación de *B. canis*, es por ello que el objetivo del estudio es la identificación y caracterización molecular de *Babesia canis* en el albergue “Narices frías” ubicado en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas. El estudio se llevó a cabo en 2 provincias, en Santo Domingo de los Tsáchilas se obtuvo muestras de 2 localizaciones del refugio donde se muestrearon un total de 54 perros y en la provincia de Manabí se obtuvieron 22 muestras de Chone y 26 de Bahía de Caráquez. Luego de las extracciones de ADN y usando el kit y el protocolo de AccuPower® *Babesia* para PCR convencional, en la segunda localización de Santo Domingo de los Tsáchilas (34 animales) se encontró una prevalencia de 2,94 % (1/34) por PCR, y de la misma forma se encontró una prevalencia de 2,94 % (1/34) para los frotis sanguíneos teñidos, donde a través de secuenciación se encontró similitud a *B. canis vogeli*, mientras que en Manabí se encontró una prevalencia de 3,84% (1/26) por PCR en Bahía de Caráquez. En este estudio se demuestra la presencia de *B. canis* en el Ecuador, por lo que se debe estudiar ampliamente en el país para conocer su distribución e importancia.

### Palabras clave:

- **BABESIOSIS CANINA,**
- **BABESIA CANIS,**
- **CANINOS,**
- **R. SANGUINEUS**

### Abstract

Canine babesiosis is a disease of dogs caused by the intraerythrocytic protozoan called *Babesia* spp. *B. canis* has been classified into 3 subspecies at once, *B. canis vogeli*, *B. canis rossi* and *B. canis canis*, where *B. canis vogeli* is the most widely distributed in the world due to its vector *R. sanguineus*, which has been found to be present in Ecuador. There are no reports on the identification of *B. canis* in the country, which is why the objective of the study is the identification and molecular characterization of *Babesia canis* in the "Narices Frias" shelter located in the province of Santo Domingo de los Tsáchilas. The study was carried out in 2 provinces, in Santo Domingo de los Tsáchilas samples were obtained from 2 locations of the shelter where a total of 54 dogs were sampled and in the province of Manabí 22 samples were obtained from Chone and 26 from Bahía de Caráquez . After DNA extractions and using the AccuPower® *Babesia* kit and protocol for conventional PCR, in the second location of Santo Domingo de los Tsáchilas (34 animals) a prevalence of 2.94% (1/34) was found per PCR, and in the same way a prevalence of 2.94% (1/34) was found for the stained blood smears, where similarity to *B. canis vogeli* was found through sequencing, while in Manabí a prevalence of 3.84% (1/26) by PCR in Bahía de Caráquez. This study demonstrates the presence of *B. canis* in Ecuador, so a lot of study must be done in the country to know its distribution and importance. Summary

#### Keywords:

- **CANINE BABESIOSIS,**
- **BABESIA CANIS,**
- **CANINES,**
- **R. SANGUINEUS.**

## Capítulo I

### Introducción

La babesiosis es una enfermedad zoonótica emergente distribuida en todo el mundo, resultada de la infección de los eritrocitos por *Babesia spp*, protozoo intraeritrocitos, transmitido por una variedad de garrapatas (Beugnet & Moreau, 2015; Irwin, 2009). Se ha reportado en la actualidad más de 100 especies de *Babesia*, las cuales tienen como hospedadores a vertebrados, incluyendo al ser humano (El-Bahnasawy y otros, 2011).

Las garrapatas *Rhipicephalus sanguineus*, *Haemaphysalis spp.* y *Dermacentor spp.* son las responsables de causar babesiosis en perros de todo el mundo, esta enfermedad, de elevada morbilidad y mortalidad en caninos, puede originar un síndrome que se caracteriza por hipertermia y anemia, y que al complicarse puede ser mortal (Solano-Gallego & Baneth, 2011; Irwin, 2009).

En las últimas décadas, se ha encontrado que al menos siete especies del piroplasma son capaces de infectar a perros en el mundo (Irwin, 2009; Solano-Gallego & Baneth, 2011). La babesiosis canina es provocada por hemoparásitos que se clasifican como grandes ( $5 \times 2,5 \mu\text{m}$ ) o pequeños ( $2 \times 1,5 \mu\text{m}$ ), la *Babesia canis* o *Babesia* grande se divide en 3 sub especies, *Babesia canis canis*, *Babesia canis rossi* y *Babesia canis vogeli*, siendo *B. canis vogeli* la especie más distribuida en el mundo (Kuttler, 1988; Schetters, 2005; Matijatko y otros, 2012).

La babesiosis canina puede causar una enfermedad de leve a grave, teniendo esto poca relación directa con la parasitemia (Uilenberg y otros, 1989). Las principales manifestaciones clínicas agudas son fiebre, anorexia, letargo y deshidratación, mientras que las anomalías clínicopatológicas son trombocitopenia normocítica de leve a moderada, anemia normocrómica no regenerativa, neutropenia, pigmenturia,

bilirrubinemia y bilirrunuria (Bourdoiseau, 2006; Carli y otros, 2009; Solano-Gallego y otros, 2008).

La babesiosis en los bovinos, genera un impacto económico considerable, de igual manera, los caninos pueden afectarse y al ser estos animales de compañía generan un impacto económico y sentimental (Gray & Weiss, 2008). Los factores socioeconómicos y ecológicos, el turismo, viajes, el cambio climático, y la movilidad de perros han cambiado la distribución de garrapatas y los patrones de infección de babesiosis canina (Bilić y otros, 2018; Maggi & Krämer, 2019). La garrapata *R. sanguineus* es uno de los vectores más distribuidos en el mundo en zonas tropicales y subtropicales, incluyendo América Latina, la cual es una región con una de las mayores biodiversidades del mundo (Pauchard & Barbosa, 2013; Gray & Weiss, 2008). *R. sanguineus* es la causante de *B. canis vogeli*, siendo la especie de *Babesia* más extendida en América Latina, encontrándose también en áreas templadas de Argentina y Chile (Schnittger y otros, 2012). Ecuador, es uno de los países que tiene regiones tropicales y subtropicales, y por ellos es un ambiente apto para la multiplicación del vector de *B. canis* (Guillén & Muñoz, 2015). Además, se ha encontrado a *Babesia spp.* en bovinos de la zona de Quito a una altitud de 2469 msnm, siendo la mayor altitud reportada para animales con babesiosis, y demostrando que los cambios climáticos y la movilidad de animales portadores del vector han permitido la presencia de babesiosis en nuevas áreas geográficas (Chávez-Larrea y otros, 2021).

Algunos países de América Latina han reportado baja y alta prevalencia de babesiosis canina, se han encontrada baja prevalencia en localidades de Perú (1,4%), Venezuela (2,2%), Brasil (3,3%), Colombia (5,5%) y Argentina (7,7%) (Temoche y otros, 2018; Criado-Fornelio y otros, 2007; Silva y otros, 2012; Vargas-Hernández y otros, 2012; Mascarelli y otros, 2016). Mientras que se reportó alta prevalencia en localidades de

Nicaragua (15,4%), Brasil (23,4%) (Wei y otros, 2014; Jojima y otros, 2008). Sin embargo, en el caso de Ecuador, no se han presentado reportes de identificación molecular para *B. canis vogeli*, a pesar de que el vector se encuentra en el país (Panti-May & Rodríguez-Vivas, 2020).

## **Objetivos del proyecto**

### **Objetivo general**

Identificación y caracterización molecular de *Babesia canis* en el albergue “Narices frías” de Santo Domingo de los Tsáchilas.

### **Objetivo específico**

- Determinar la presencia de *Babesia canis* mediante frotis sanguíneo en hematocitos de los caninos.
- Caracterizar molecularmente *Babesia canis* en caninos provenientes de refugios.
- Analizar y construir mediante herramientas bioinformáticas el árbol filogenético de las muestras positivas para *Babesia canis*.

## Capítulo II

### Revisión de Literatura

#### Historia

A finales del siglo XIX, Babes descubrió microorganismos en eritrocitos de ganado bovino en Rumania, estos fueron asociados con la hemoglobinuria bovina o fiebre de las aguas rojas (Babes, 1888). En 1893 Smith y Kilborne reportaron la primera transmisión de un parásito protozoario en ganado bovino, el cual fue llamado *Pyrosom bigeminum*, el cual fue demostrado que se transmitía por medio de garrapatas (Smith & Kilborne, 1893). También en ese año, Starcovici nominó a estos parásitos como *Babesia bovis*, *Babesia ovis* y *Babesia bigemina*, respectivamente (Starcovici, 1893). El nombre de piroplasma aún es una denominación muy usada y se debe a que los parásitos después de la multiplicación suelen tener forma de pera (Uilenberg, 2006).

#### Generalidades

Babesiosis es una enfermedad producida por protozoos intraeritrocíticos del género *Babesia* spp., es transmitida por garrapatas y es una de las enfermedades infecciosas más importantes que afecta a animales domésticos, salvajes e incluso aves; Además aún presenta importantes desafíos para su diagnóstico y terapia en todo el mundo (Hunfeld y otros, 2008; Martínez-García y otros, 2021).

Actualmente, existen más de 100 *Babesia* spp., reportadas en huéspedes vertebrados, incluyendo al hombre (El-Bahnasawy y otros, 2011). La gravedad de la enfermedad va a depender de diferentes factores como, la especie de *Babesia* implicada, edad y estado inmunitario del huésped (Irwin, 2009). Los eritrocitos infectados por algunas especies (*B. bovis*, *B. canis*) pueden quedar atrapados en los capilares cerebrales causando Babesiosis cerebral.

La respuesta inmunitaria del huésped tiene un rol importante en la patogénesis de la babesiosis mediante la lisis de eritrocitos mediada por el sistema inmune y la sobreproducción de agentes farmacológicamente activos (Irwin, 2009; Tamzali, 2013; Vannier y otros, 2008).

### **Clasificación de Babesia en canes**

De modo tradicional, el género *Babesia* se clasificaba según su morfología, especificidad de huésped/vector y susceptibilidad a los fármacos. Por su morfología existen dos tipos de *Babesia*, las *Babesia* de grupo pequeño, son trofozoítos de 1,0-2,5 µm, incluyendo *B. gibsoni*, *B. microti* y *B. rodhaini*, mientras que las del grupo grande miden de 2,5-5,0 µm e incluyen a *B. bovis*, *B. caballi* y *B. canis*., la clasificación es acertada con la caracterización filogenética basada en secuencias del gen de rARN (18S rADN), que indica la división de dos grupos filogenéticos de las *Babesia* grandes y pequeñas, donde la *Babesia* pequeña se relaciona más con *Theileria spp.*, a excepción de *B. divergens*, la cual en frotis se observa pequeña pero por filogenia se acerca más a la *Babesia* grande (Beugnet & Moreau, 2015). Por otra parte, se demostró que *B. canis* se dividía en tres subespecies porque a pesar de la morfología idéntica, el vector, inmunidad cruzada y patogenicidad son diferentes, es por ello, que por medio de análisis filogénico *B. canis* se dividió en los sub especies *B. canis canis*, *B. canis rossi* y *B. canis vogeli* (Schnittger y otros, 2012; Lack y otros, 2012; Uilenberg, 2006).

### **Respuesta inmunitaria**

Los mediadores proinflamatorios son producidos por macrófagos tisulares, monocitos, mastocitos, células endoteliales, plaquetas y otros elementos celulares que son inducidos por agentes infecciosos. Las citosinas pro inflamatorias, TNF- $\alpha$ , IL-1 y la IL-6 son las más conocidas, además, los eventos tempranos en la respuesta inflamatoria, provoca la producción de cortisol, el cual es un potente mediador inflamatorio, mientras

que IL-4 e IL-10 desactivan la producción de monocitos. La acción combinada de los mecanismos mencionados, conduce la finalización de la infección (Matijatko y otros, 2012; Nyström, 1998). De igual manera, se ha reportado un rol importante de las citocinas proinflamatorias en la babesiosis humana (Shaio & Lin, 1998), bovina (Shoda y otros, 2000), equina (Hanafusa y otros, 1998), y canina (Schetters y otros, 2009), sin embargo, la única citocina proinflamatoria que se investigado más en profundidad es el TNF- $\alpha$  y el único mediador antiinflamatorio estudiado en la babesiosis canina es el cortisol (Matijatko y otros, 2012).

### Especies de *Babesia* en animales domésticos

Los animales domésticos más comunes que son afectados por alguna especie de *Babesia* son los bovinos, búfalos, renos, cerdo, ovejas, burros, mulas, cabras, perros y gatos. En la Tabla 1, indica las especies de *Babesia* que afectan a estos animales domésticos (Uilenberg, 2006).

**Tabla 1**

*Especies de Babesia que afectan a animales domésticos (Uilenberg, 2006).*

<b>Especies</b>	<b>Anfitrión(es) doméstico(s)</b>	<b>Genero del vector</b>
<i>B. occultans</i>	Ganado	<i>Hyalomma</i>
<i>B. ovata</i>	Ganado	<i>Haemaphysalis</i>
<i>B. major</i>	Ganado	<i>Haemaphysalis</i>
<i>B. bigemina</i>	Ganado, búfalo	<i>Boophilus,</i> <i>Rhipicephalus</i>
<i>B. bovis</i>	Ganado, búfalo	<i>Boophilus,</i> <i>Rhipicephalus</i>

<b>Especies</b>	<b>Anfitrión(es) doméstico(s)</b>	<b>Genero del vector</b>
<i>B. orientalis</i>	Búfalo	<i>Rhipicephalus</i>
<i>B. beliceri</i>	Ganado	<i>Hyalomma</i>
<i>B. jakimovi</i>	Ganado, renos	<i>Ixodes</i>
<i>B. jakimovi</i>	Ganado, renos	<i>Ixodes</i>
<i>B. perroncito</i>	Cerdo	Desconocido
<i>B. trautmanni</i>	Cerdo	<i>Rhipicephalus</i>
<i>B. crassa</i>	Ovejas, cabras	Desconocido
<i>B. motasi</i>	Ovejas, cabras	<i>Haemaphysalis</i>
<i>B. ovis</i>	Ovejas, cabras	<i>Rhipicephalus</i>
<i>B. caballi</i>	Caballo, burro, mula	<i>Dermacentor</i> , <i>Hyalomma</i> , <i>Rhipicephalus</i>
<i>B. canis rossi</i>	Perro	<i>Haemaphysalis</i>
<i>B. canis vogeli</i>	Perro	<i>Rhipicephalus</i>
<i>B. canis canis</i>	Perro	<i>Dermacentor</i>
<i>B. gibsoni</i> y otros pequeños piroplasmas de perros	Perro	<i>Haemaphysalis</i> , <i>Rhipicephalus</i>
<i>B. (canis) presentii</i>	Gato	Desconocido
<i>B. felis</i>	Gato	Desconocido

## Distribución de *Babesia canis*

Las babesias grandes o *B. canis*, actualmente se clasifican según su vector, distribución y patogenicidad, como *B. canis canis*, *B. canis rossi* y *B. canis vogeli* (Carret y otros, 1999; Uilenberg y otros, 1989; Irwin, 2009).

*B. canis vogeli* es transmitida por la garrapata marrón del perro, *Rhipicephalus sanguineus*, la cual está extendida en regiones tropicales y subtropicales del mundo, *B. canis canis* es transmitida por las garrapatas del género *Dermacentor* y reportadas en Europa, *B. canis rossi* es transmitida por *Haemaphysalis spp.* y ha sido reportada en Sudáfrica, y algunas áreas de África como, Nigeria y Sudán, *B. conradae* se ha reconocido en Estados Unidos, y *B. gibsoni* es transmitida por *Haemaphysalis longicornis*, y originalmente descrita en Asia. Curiosamente, se puede encontrar también en perros pitbull de países no asiáticos, y se considera que se transmite por la mordedura de perros infectados a no infectados durante peleas (Zahler y otros, 1998; Uilenberg, 2006).

En la Tabla 2 se observa la distribución geográfica de especies de *Babesia* en canes, con sus vectores (Matijatko y otros, 2012; Solano-Gallego y otros, 2008; Solano-Gallego & Baneth, 2011).

**Tabla 2**

Distribución geográfica de diferentes especies de *Babesia* y sus vectores (Matijatko y otros, 2012; Solano-Gallego y otros, 2008; Solano-Gallego & Baneth, 2011).

Forma	Especies	Talla ( $\mu\text{m}$ )	Distribución geográfica	Vectores comprobados
Grande ( <i>B. canis</i> )	<i>B. rossi</i>	2 x 5	Sudáfrica, Nigeria y Sudan	<i>Haemaphysalis</i> <i>leachii</i>

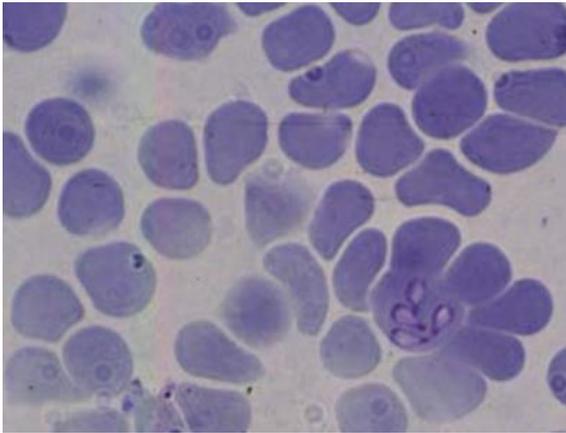
Forma	Especies	Talla ( $\mu\text{m}$ )	Distribución geográfica	Vectores comprobados
			África, Asia, Europa, Norteamérica, Centroamérica, Sudamérica y Australia	<i>Rhipicephalus</i> <i>sanguineus</i>
	<i>B. vogeli</i>	2.5 x 4.5		
	<i>B. canis</i>	2 x 5	Europa	<i>Dermacentor</i> <i>reticulatus</i>
	<i>Babesia sp.</i> (Coco)	2 x 6	Este de Estados Unidos	Desconocido
	<i>B. gibsoni</i>	1 x 3	Mundial	<i>Haemaphysalis</i> <i>sp. Rhipicephalus</i>
Pequeña ( <i>B.</i> <i>gibsoni</i> )	<i>B. conradae</i>	0.3 -3	California	<i>sp.</i> <i>R. sanguineus?</i>
	<i>B. microti</i>	1 x 2.5	Sur de Europa, Norteamérica	<i>Ixodes</i> <i>hexagonus?</i>

### Morfología de *Babesia* spp.

La longitud de la forma grande de piroplasma es mayor que el radio de un eritrocito, 2,5 – 5  $\mu\text{m}$ , mientras que la *Babesia* pequeña tienen una longitud de 0,5 y 2,5  $\mu\text{m}$ , además, *B. canis* tiene forma piriforme o de lagrima (Figura 1) y con frecuencia se presenta más de un merozoíto en un eritrocito, mientras que las *Babesia* pequeñas, como *B. gibsoni* es más pleomórfica (Figura 2) (Beugnet & Moreau, 2015).

**Figura 1**

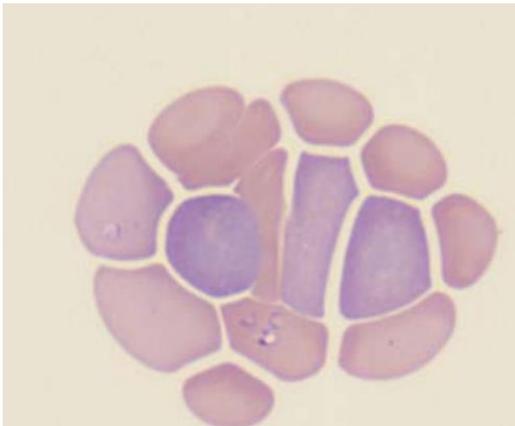
*Esporozoítos de Babesia canis en eritrocitos en tinción May Grünwald Giemsa*



*Nota: Tomado de (Beugnet & Moreau, 2015).*

**Figura 2**

*Esporozoítos de Babesia gibsoni en eritrocitos en tinción May Grünwald Giemsa*



*Nota: Tomado de (Beugnet & Moreau, 2015).*

**Taxonomía de Babesia spp.**

Clasificación taxonómica de *Babesia canis* (Jorgensen y otros, 2011).

**Phylum:** Apicomplexa

**Clase:** Sporozoasida

**Orden:** Piroplasmorida

**Familia:** Babesiidae

**Género:** *Babesia*

**Especies:** *B. canis*, *B. gibsoni*.

**Ciclo de vida de Babesia spp.**

El ciclo de vida de las especies de *Babesia* ocurre en garrapatas y vertebrados, presenta una reproducción sexual y asexual respectivamente, y consta de una fase de merogonía, gamogonía y esporogonia (Figura 3) (Mehlhorn & Schein, 1984; Martínez-García y otros, 2021)

El ciclo inicia una vez que la garrapata infectada se alimenta del huésped vertebrado e inocular saliva infectada con esporozoitos (fase infectiva de *Babesia spp.*), los cuales viajan mediante el torrente sanguíneo y se introducen en los glóbulos rojos, después el hemoparásito pasa a ser trofozoíto, y a través de fisión binaria el trofozoíto pasa a ser dos merozoítos en la fase de merogonía, así que lisan el eritrocito e invaden un nuevo eritrocito, sin embargo, que el hemoparásito pasa a ser dos o más merozoítos depende de la especie de *Babesia*. La fase de gamogonía inicia en el huésped vertebrado, los merozoítos maduros se transforman en pregametocitos, si es que la garrapata ingiere eritrocitos infectados del parásito, estos se destruyen pero algunos de

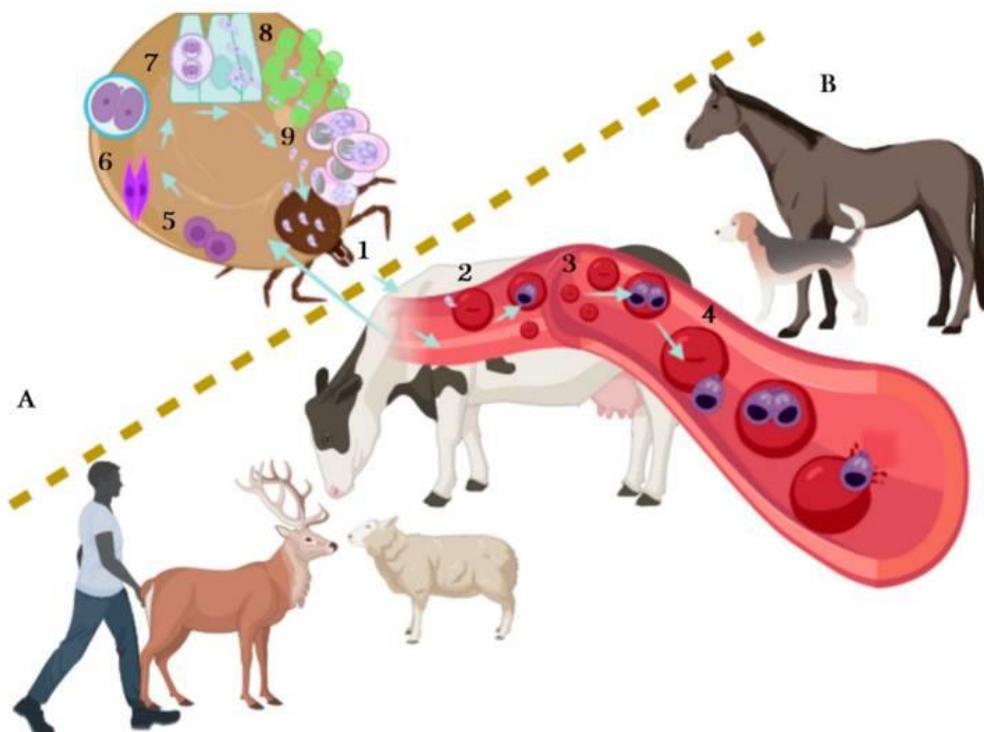
estos sobreviven y se convierten en gametocitos para dar inicio a la fase sexual (Chauvin y otros, 2009; Jalovecka y otros, 2018; Jalovecka y otros, 2019; Mehlhorn & Schein, 1984).

Posteriormente de la ingestión, se da la aparición de cuerpos alargados, con forma de punta de flecha, los cuales son gametos conocidos como strahlenkörper o cuerpos con rayos (Chauvin y otros, 2009). En la luz del tracto digestivo de la garrapata, los gametos se fusionan para formar un cigoto alargado de 8 a 10  $\mu\text{m}$  de longitud o conocido como ookinete, la punta del ookinete permite penetrar en las células intestinales de la garrapata, donde por medio de división meiótica se produce un kinete, el cual viaja mediante la hemolinfa e invaden el tejido de garrapatas, el kinete se disemina en glándula salival y se transforma en esperoblastos (Chauvin y otros, 2009; Gray & Weiss, 2008; Jalovecka y otros, 2019; Mehlhorn, 1988).

Los esperoblastos permanecen inactivos en el citoplasma de las células de las glándulas salivales hasta que la siguiente generación de garrapatas o la siguiente etapa de garrapatas, después de la muda, se adhieran a un huésped vertebrado, lo que permite la transmisión transestadial, estos esperoblastos pueden producir de 5000 a 10000 esporozoitos piriformes diferenciados con un polo apical ancho que muestra el organelo durante la fase de esporogonia y finalmente se liberan en el torrente sanguíneo del vertebrado, hasta repetir el ciclo, pero en el caso de *B. canis* no ha demostrado esporantes y la formación de esporozoítos piriformes típicos, aparénteme resultan de la fisión binaria sucesiva del kinete (Mehlhorn & Schein, 1984; Schein y otros, 1979).

### Figura 3

Ciclo de vida de *Babesia* spp.



Nota: Tomado de Martínez-García y otros, 2021

### Sintomatología de la Babesiosis canina

Los signos clínicos de babesiosis canina dependen de la especie infectante, la señalización y la inmunidad del huésped, además, el tiempo de incubación es de 10 a 28 días, por lo cual la enfermedad se manifiesta después de que la garrapata vector se ha alimentado y separado del huésped (Schoeman, 2009). *B. canis canis* es de signos leves, mientras que *B. canis rossi* es asociado a enfermedad más grave (Shakespeare, 1995).

Para *B. canis canis*, las manifestaciones clínicas son fiebre, letargo, anorexia e ictericia, y las anomalías clinicopatológicas pueden ser, trombocitopenia, anemia no regenerativa normocítica, normocrómica normocítica de leve a moderada, anemia regenerativa poco frecuente, neutropenia, pigmenturia, bilirrubinemia, y bilirrubina debido

a hemólisis (Bourdoiseau, 2006; Carli y otros, 2009; Solano-Gallego y otros, 2008). *B. canis vogeli* presenta como manifestaciones clínicas, fiebre, letargo, anorexia e ictericia, mientras que las anomalías clinicopatológicas pueden ser, anemia hemolítica regenerativa inmunomediada, anemia no regenerativa, leucocitosis, leucopenia y trombocitopenia (Carli y otros, 2009; Solano-Gallego y otros, 2008).

*B. canis rossi* puede no presentar complicaciones, como también presentarlas, las manifestaciones clínicas sin complicaciones pueden ser, fiebre, letargo, anorexia, palidez, membranas mucosas y esplenomegalia, mientras que las anomalías clinicopatológicas sin complicaciones pueden ser anemia leve a moderada, trombocitopenia, leucocitosis, pigmenturia, bilirrubinemia y bilirrubinuria. Las manifestaciones clínicas cuando existe complicación son, insuficiencia renal aguda, ictericia, hipotensión, síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), vómitos, diarrea, pancreatitis, mialgia, rabdomiólisis, ascitis, edema pulmonar, afectación cerebral y renal, y manifestaciones hiperagudas y shock. Las anomalías clinicopatológicas en *B. rossi* complicada pueden ser, desequilibrios ácido-base metabólicos y respiratorios mixtos, azotemia renal, coagulopatía, CID, anemia hemolítica inmunomediada, hipoglucemia e hiperlactemia (Jacobson, 2006; Keller y otros, 2004; Leisewitz y otros, 2001).

### **Tratamiento de babesiosis canina**

El tratamiento para la babesiosis canina se da por 3 fases: tratamiento para eliminar el parásito, transfusiones de sangre para tratar la anemia grave y atención de apoyo para los trastornos metabólicos (Köster y otros, 2015).

*B. canis canis*, *B. canis rossi* y *B. canis vogeli* se pueden tratar con mayor éxito con aceturato de diminazeno, en dosis de 3.5 mg/kg por vía subcutánea o intramuscular (Schoeman, 2009). También se pueden tratar con dipropionato de imidocarbo, en dosis de 5,0 a 6,6 mg/kg administrados por vía subcutánea o intramuscular dos veces en un

intervalo de dos a tres semanas, además, en la babesiosis aguda existe respuesta terapéutica rápida, con aumento de producción de nuevos glóbulos rojos en 12 a 24 horas (Uilenberg y otros, 1981; Vercammen y otros, 1996; Vial & Gorenflot, 2006).

## **Métodos de diagnóstico**

### **Métodos directos de identificación**

#### **Frotis de Sangre**

La identificación de *Babesia* se realiza mediante el uso de frotis de sangre con tinción de naranja de acridina o tinción Giemsa, sin embargo la sensibilidad de los frotis teñidos es baja, por lo cual se pueden observar falsos negativos (Alvarez y otros, 2019; Wagner y otros, 1992). Otras tinciones que se usan son Diff-Quick o Romanowsky, de Field y de Wright en frotis de sangre o tejidos infectados como ganglios linfáticos o bazo (Beugnet & Moreau, 2015). La identificación de *B. gibsoni* en frotis sanguíneo puede ser difícil porque muchos de los eritrocitos en perros anémicos están vacuolados y picados (Conrad y otros, 1991). Por ello, una de las características más importantes es que este método solo es útil para identificar eritrocitos infectados durante la fase aguda de la enfermedad, debido a que puede existir baja cantidad de parásitos en la sangre circulante (Bock y otros, 2004).

### **Métodos moleculares**

#### ***PCR convencional***

En la PCR convencional se ha usado los genes de ARN ribosomal 18S, 5.8S, 28S y las ITS, pero algunos investigadores también usan otros loci, como el p18/BgTRAP (Fukumoto y otros, 2001; Irwin, 2009).

La PCR es más sensible que el examen de frotis de sangre y permiten la detección precisa a nivel de especie, subespecie o genotipo (Halos y otros, 2014; Matijatko y otros, 2012; Halos y otros, 2013). Además, la detección por microscopía es

desventajosa porque el límite de detección es de aproximadamente 5000 eritrocitos infectados por mL, la PCR detecta cargas de parásitos en la región de 50 organismos por mL (Birkenheuer y otros, 2003; Trotta y otros, 2009).

Las ventajas de esta técnica es que tiene altas tasas de sensibilidad y especificidad analíticas y diagnósticas, y es más sensible que el frotis o que un cultivo in vitro del parásito, las desventajas pueden ser que la configuración y ejecución requiere de habilidades técnicas, también está la posibilidad de contaminación cruzada (Alvarez y otros, 2019).

La PCR tiene la capacidad de identificar el ADN del parásito en animales infectados de forma crónica y se puede mejorar realizándola más de una vez, pero es recomendable realizar ensayos de serología como prueba de diagnóstico complementaria y alternativa (Jefferies y otros, 2007; Goo y otros, 2008).

#### ***Técnicas modificadas de PCR***

La morfología del parásito no permite especificar la especiación del parásito, es por ello que se han usado modificaciones de la PCR para diferenciar entre especies de Babesia, se ha reportado que la RFLP-PCR y PCR anidada diferencian *B. vogeli* y *B. gibsoni* en Australia, y entre especies de grandes Babesia (Jefferies y otros, 2007; Zahler y otros, 1998; Irwin, 2009).

Otra técnica es RT-PCR, la cual permite la cuantificación de los niveles de patógenos en muestras de sangre y tejidos, donde su producto puede ser usado para deducir el número inicial de moléculas diana e inferir en los niveles de parásitos dentro del huésped (Irwin, 2009). La técnica RT-PCR tiene como ventaja que usa menos cantidad de material molde en comparación de la PCR convencional, sin embargo

requiere de equipos costosos y experiencia y habilidades para realizar el ensayo (Alvarez y otros, 2019).

### **LAMP**

LAMP es una técnica rápida, económica y altamente sensible y específica, se basa en la síntesis de desplazamiento de cadena de ciclo automático de ADN objetivo por la ADN polimerasa Bst en condiciones isotérmicas, además permite la identificación y discriminación entre especies de *B. bovis* y *B. bigemina*, la sensibilidad analítica de la técnica LAM es de 0,1 pg de ADN para el ensayo de ambas especies (Alvarez y otros, 2019; Liu y otros, 2012).

LAMP es considerado un método de diagnóstico simple que no necesita de un equipo especial, es rápido y tiene bajo riesgo de contaminación, y es un ensayo que se puede usar en un gran número de muestras en el campo (Alvarez y otros, 2019).

### **Métodos serológicos**

En ganado criado en áreas endémicas de *Babesia*, los parásitos se pueden encontrar en el torrente sanguíneo en cantidades muy bajas, por esto, los métodos serológicos como IFAT, ELISA y CFT se usan de forma rutinaria, por otra parte, estos métodos tienen como desventaja que los títulos altos de anticuerpos no necesariamente prueban la presencia de infección parasitaria elevada, ni inmunidad protectora, también se pueden presentar falsos negativos incluso cuando existen parásitos circulantes o animales protegidos por inmunidad estéril (Alvarez y otros, 2019; Holman y otros, 2005).

## Capítulo III

### Materiales y métodos

#### Toma de muestra de sangre

Para la obtención de la sangre periférica de los caninos, se realizaron muestreos en Santo Domingo de los Tsáchilas y en la provincia de Manabí. En Santo Domingo, se realizaron dos muestreos en diferentes ubicaciones del refugio “Narices frías” de la ciudad de Santo Domingo de los Tsáchilas,” en el primer muestreo se obtuvo 20 muestras, mientras que en el segundo se obtuvieron 34 muestras más. Posteriormente, se realizó el otro un muestreo en la provincia de Manabí, donde se obtuvo 22 muestras de un refugio de voluntariado ubicado en el cantón Chone, y 26 muestras de una clínica veterinaria localizada en el cantón Sucre, en la ciudad Bahía de Caráquez. En total, en el estudio se recolectaron 102 muestras al Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE sede Santo Domingo.

#### Extracción de sangre periférica

Se procedió a inmovilizar a los caninos con un bozal, de ser necesario se depiló la zona de punción y se esterilizó con alcohol. Luego, se realizó un torniquete para mejorar la visibilidad de la vena cefálica y ubicarla mejor, en la cual se introdujo la aguja 21G de una jeringuilla de 3 ml, luego la sangre obtenida se recolectó en tubos con EDTA.

#### Preparación de frotis sanguíneo

A partir de la sangre recolectada, se coloca en un portaobjeto una gota de sangre de 5  $\mu\text{m}$ , y con otro portaobjeto de forma horizontal en un ángulo de 45 °, se extiende la gota de sangre, formando una capa delgada y homogénea.

### **Tinción Giemsa en frotis sanguíneos**

Al estar secos los frotis sanguíneos después de unos 10 min, se procede a colocar metanol absoluto en los portaobjetos durante 5 minutos, luego se agrega una solución de Giemsa desionizada (1:9) durante 20 minutos, después se lava y se deja secar a temperatura ambiente. Se observó los frotis de la sangre canina en el microscopio Euromex iScope con un objetivo de 100x.

### **Extracción de ADN total**

El protocolo usado en la extracción de ADN total fue adquirido del Instituto de investigación en Zoonosis-CIZ modificado por Rieras, Rojas & Zapata., (2010), el cual se describe a continuación:

1. Colocar 500  $\mu$ L de sangre en un eppendorf de 1,5  $\mu$ L
2. Añadir 540  $\mu$ L de Buffer GR durante 1 minuto, homogenizado rápidamente con un vortex. El Buffer GR está compuesto por Tris-HCl 10 mM (pH 8.0), Tritón X-100 al 1% y sacarosa 600 mM.
3. Centrifugar durante 5 minutos a 13000 rpm, se descartó el sobrenadante.
4. Repetir el paso 2 y 3 hasta 3 veces.
5. Agregar 180  $\mu$ L de Buffer GB. El Buffer GB se compone de Tris-HCl 10 mM (pH 8.0), NaCl 400 mM y EDTA 2 mM.
6. Agregar 20  $\mu$ L de Proteinasa K (20 mg/mL).
7. Agregar 6 $\mu$ L de SDS al 20%, y homogenizar con un vortex durante 1 minuto.
8. Incubar a 56 °C durante 2 horas, y después enfriar las muestras a temperatura ambiente.
9. Agregar 90  $\mu$ L de Acetato de potasio 3M y homogenizar suavemente invirtiendo el vial.
10. Centrifugar durante 5 minutos a 13000 rpm y recuperar el sobrenadante.

11. Repetir los pasos 9 y 10.
12. Agregar 600  $\mu$ L de etanol absoluto a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , incubar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  overnight.
13. Centrifugar durante 5 minutos a 13000 rpm y descartar el sobrenadante.
14. Lavar el pellet con 100  $\mu$ L de etanol al 70%.
15. Centrifugar durante 5 minutos a 13000 rpm y descartar el sobrenadante.
16. Dejar secar el pellet a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
17. Resuspender en 50  $\mu$ L de Buffer TE e incubar a temperatura ambiente a 20 minutos.
18. Almacenar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su amplificación.

### **Determinación de calidad de ADN**

Para determinar la calidad de ADN se realizó una corrida electroforética en un gel de agarosa 0,8% (p/v) con bromuro de etidio (1/10000), en cada pocillo se cargó 3  $\mu$ L de buffer de carga Blue Juice 10x con 3  $\mu$ L de ADN. Se corrió el gel a 100 V durante 45 minutos y se observó las bandas del gel por medio del trasluminador Spectroline modelo TVD-1000R Bi-O-Vision.

### **PCR para identificar *Babesia spp.***

Para la identificación de *Babesia spp.* se usó el kit de PCR convencional, AccuPower® *Babesia* PCR kit, el cual permite identificar 17 especies de *Babesia spp.*, incluyendo *Babesia canis*. La metodología y el programa de la PCR se realizó de acuerdo a lo indicado en el protocolo del kit, los componentes del PreMix de AccuPower® *Babesia* PCR kit se muestran en la Tabla 3, la composición de la mezcla de la reacción PCR se indican en la Tabla 4 y las condiciones de la PCR en la Tabla 5, las condiciones de la PCR se realizaron en el termociclador PRIME Thermal modelo 3PRIMEBASE (BIONEER, 2015).

**Tabla 3**

*Componentes del PreMix de AccuPower® Babesia PCR kit (BIONEER, 2015).*

<b>Componentes de Pre Mix AccuPower® Babesia PCR kit</b>
Top DNA polymerase
dNTPs(dATP, dCTP dGTP ,dTTP)
Buffer de Reacción con <b>MgCl<sub>2</sub></b>
Tinte estabilizador y rastreador
8-MOP (disuelto en DMSO)
Primers para <i>Babesia spp.</i>

**Tabla 4**

*Composición de la mezcla de la reacción de PCR para identificar Babesia spp.*

(BIONEER, 2015).

<b>Composición de la mezcla de reacción PCR</b>	<b>Cantidad</b>
PreMix	1 tubo
Agua Ultra pura	20 µL
ADN	2 µL

**Tabla 5**

*Condiciones de amplificación por PCR para la identificación de Babesia spp. (BIONEER, 2015).*

<b>Proceso</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Pre-desnaturalización	94	5 min	1
Desnaturalización	94	20 seg	40

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Hibridación y Extensión	65	1 min	
Extensión final	72	5 min	1
Mantenimiento	4	∞	-

### **Detección de los productos amplificados en la PCR**

Para la identificación del producto de la PCR, se preparó un gel de agarosa 2% (p/v) con bromuro de etidio (1/10000), en cada pocillo se colocó 10 µL del producto de la PCR, y se corrió el gel de agarosa en 100 V, durante 45 minutos. Como control positivo se usó el incluido en el kit en una disolución 1/100. La corrida del gel se visualizó por medio de radiación UV con el trasluminador Spectroline modelo TVD-1000R Bi-O-Vision.

### **PCR convencional para identificar Babesia spp.**

Se realizó la PCR convencional con el uso de los primers PIRO A (5'-AATACCCAATCCTGACACAGGG-3') y PIRO B (5'-TTAAATACGAATGCCCCCAAC-3'), que amplifican una región variable del gen 18S rRNA. La composición de la reacción PCR y las condiciones fueron estandarizadas a partir de la metodología de Medina Naranjo et al. (2017), modificada por Chavez-Larrea et al., 2021, indicadas en la Tabla 6 y Tabla 7, esta PCR fue usada en las muestras 89 a 102 y en el producto PCR enviado a secuenciar. El programa de la PCR se llevó a cabo en el termociclador PRIME Thermal modelo 3PRIMEBASE.

**Tabla 6***Composición de PCR para identificación de Babesia spp.*

Reactivos	Concentración final	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
H <sub>2</sub> O	-	19.65
Buffer más MgCl <sub>2</sub>	1.00 X	2.50
PIRO A	0.25 $\mu\text{M}$	0.63
PIRO B	0.25 $\mu\text{M}$	0.63
dNTP	0.20 mM	0.50
Taq	0.50 U/ $\mu\text{L}$	0.10
ADN	-	1
<b>TOTAL</b>		<b>25.00</b>

**Tabla 7***Condiciones para la amplificación por PCR para identificación de Babesia spp.*

Proceso	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5 min	1
Desnaturalización	94	1 min	
Hibridación	55	1 min	30
Extensión	72	1 min	
Extensión final	72	5 min	1
Mantenimiento	4	$\infty$	-

### **Diagnóstico de *Babesia canis* en los muestreos**

Para el diagnóstico de *B. canis* se realizó una PCR convencional con el protocolo del AccuPower® Babesia PCR kit, usando los controles positivos que se incluían en el kit. Las 101 muestras fueron evaluadas y se calculó la prevalencia del piroplasma en cada una de las localizaciones del refugio, para ello se utilizó la fórmula:

$$\% \text{ Prevalencia} = \frac{\text{Total de positivos}}{\text{Total de muestras}} \times 100$$

### **Caracterización molecular**

La muestra positiva a *Babesia spp.* de la ciudad de Santo Domingo fue secuenciada por el laboratorio de investigación de la Universidad de las Américas (UDLA).

### **Ensamblaje y análisis de similitud y homología**

La secuencia obtenida se ensambló usando el programa MEGA para obtener la secuencia consenso de la muestra. La similitud y homología de la secuencia obtenida se realizó por la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) para nucleótidos, de la base de datos National Center for Biotechnology Information (NCBI), el programa permitió determinar la especie de *Babesia* al encontrar secuencias que presenten similitud con la secuencia obtenida.

### **Análisis filogenético**

El análisis filogenético se realizó usando el programa MEGA aplicando el método de máxima verosimilitud y el modelo de 3 parámetros de Tamura. Para el análisis se usaron 23 secuencias de *Babesia spp.* y una secuencia de *Hammondia heydorni* como grupo externo.

## Capítulo IV

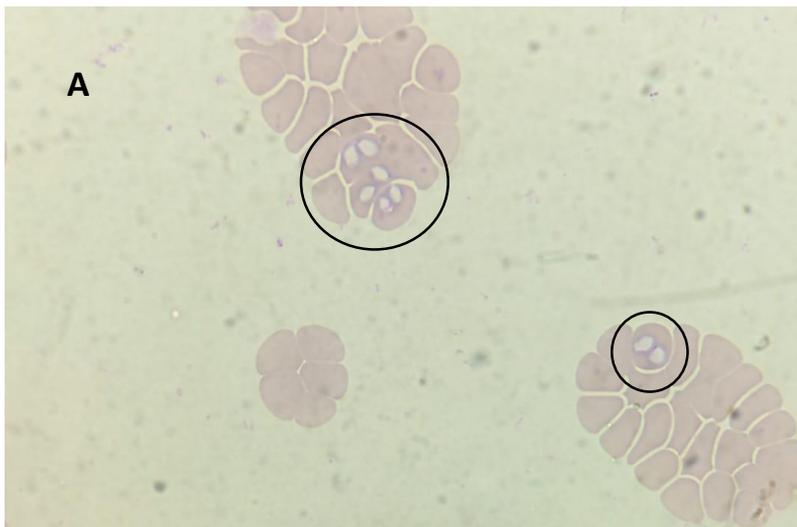
### Resultados

#### Frotis sanguíneos en tinción Giemsa

Se observó e identificó a partir de la morfología, la presencia de *Babesia* grande o *B. canis* en los eritrocitos de una de las localizaciones del refugio "Narices Frías", los protozoarios aproximadamente miden de 2.5 a 5  $\mu\text{m}$ , con forma piriforme o de lagrима, característico de las especies de *Babesia* de forma grande (Figura 4) (Beugnet & Moreau, 2015), sin embargo en las muestras obtenidas de la provincia de Manabí no se encontraron muestras positivas a *B. canis*, la distribución del hemoparásito se observa en la Tabla 8.

#### Figura 4

Presencia de *Babesia canis* en eritrocitos de muestra obtenida de la localización N° 2 del refugio "Narices frías", 2021.





*Nota: A: en el campo óptico se observan ocho Babesia canis o Babesia grande y los eritrocitos. B: en el campo óptico se observan cuatro Babesia canis o Babesia grande y los eritrocitos.*

**Tabla 8**

*Distribución de muestras positivas a Babesia canis en 2 provincias de Ecuador en 2022.*

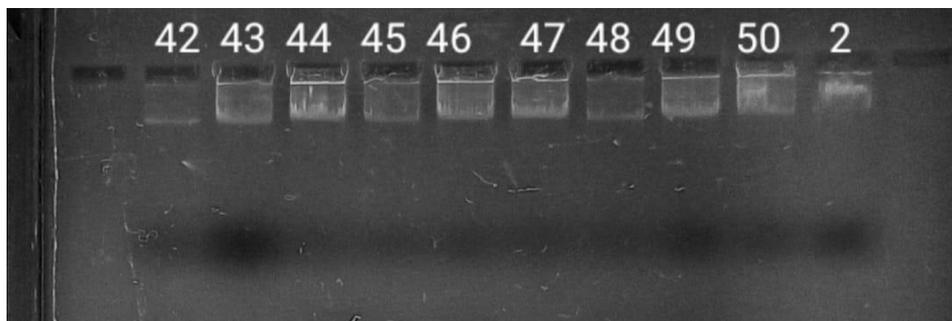
Ciudades	Animales muestreados	Frotis	
		(n) positivos	Prevalencia (%)
1. Santo Domingo	20	0	
2. Santo Domingo	34	1	2.94
Chone	22	0	
Bahía de Caráquez	26	0	
<b>Total</b>	<b>102</b>	<b>1</b>	<b>2.94</b>

### **ADN obtenido de sangre periférica**

Se obtuvo ADN de 101 muestras de sangre periférica en canes (Figura 5), a partir del protocolo adquirido del Instituto de investigación en Zoonosis-CIZ modificado por Rieras, Rojas & Zapata., (2010), a excepción de una muestra de la localización 1, la cual presentaba una cantidad insuficiente de sangre para aplicar el protocolo.

**Figura 5.**

Calidad de ADN obtenido a partir del protocolo de del Instituto de investigación en Zoonosis-CIZ modificado por Rieras, Rojas & Zapata., (2010).

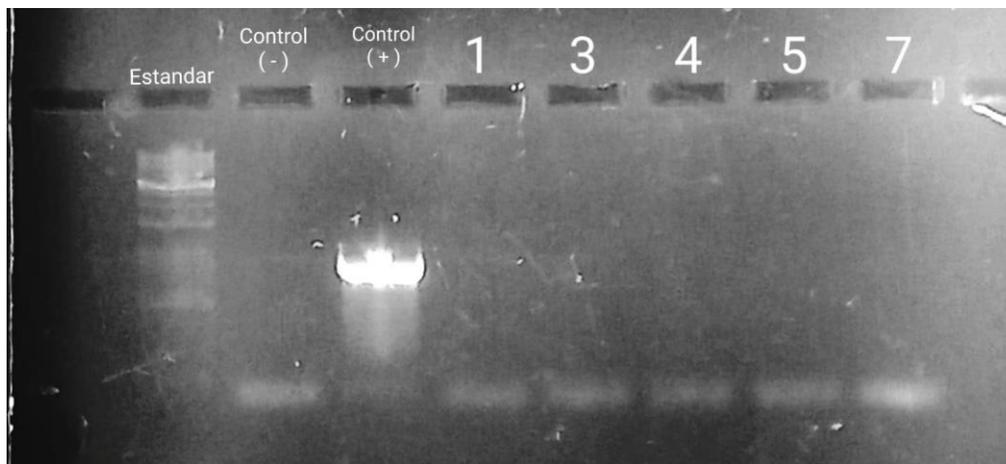
**Amplificación de fragmentos de *Babesia* spp.**

En las muestras obtenidas de la primera localización del refugio “Narices frías” no se encontró ningún amplicón que se pudiera comparar con el control positivo de AccuPower® *Babesia* PCR kit (Figura 6). Sin embargo en la localización número dos si se encontró un positivo para *Babesia* spp., al aparecer un amplicón de tamaño equivalente al control positivo del kit (Figura 7).

En cuanto a las muestras de Manabí, no se encontró ningún amplicón presente en las muestras obtenidas de Chone (Figura 8), pero en las muestras de la ciudad de Bahía de Caráquez se encontró un positivo para *Babesia* spp, el cual se comparó con el control positivo de AccuPower® *Babesia* PCR kit (Figura 9).

**Figura 6**

*Amplificación de fragmentos de Babesia canis en muestras de la localización 1 del refugio.*

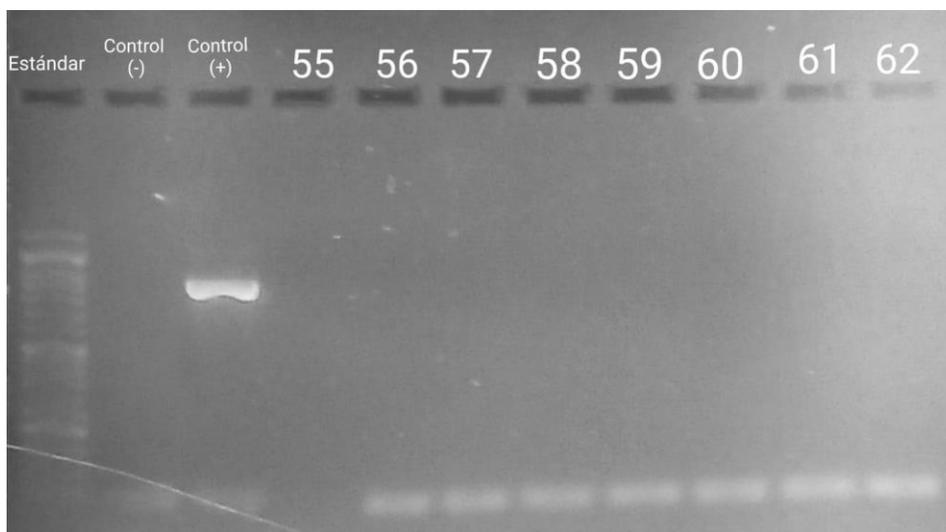
**Figura 7**

*Amplificación de fragmentos de Babesia canis en muestras de la localización 2 del refugio.*

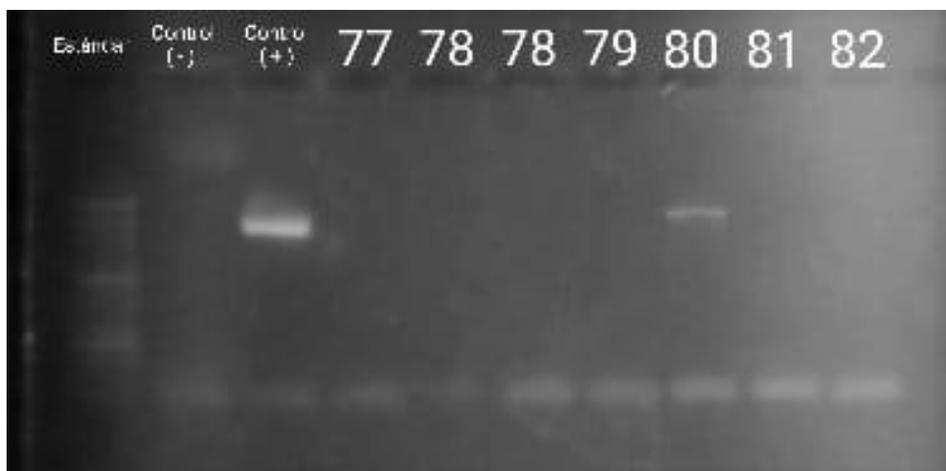


**Figura 8**

*Amplificación de fragmentos de Babesia canis en muestras del cantón Chone.*

**Figura 9**

*Amplificación de fragmentos de Babesia canis en muestras de Bahía de Caráquez.*



### Prevalencia de los muestreos

En la tabla 9, se demuestra la prevalencia que existe en las dos provincias de Ecuador, en las localizaciones del refugio Narices frías se encontró que en la localización 1 no existían positivos para *Babesia spp.* en las 19 muestras, mientras que en la localización 2 se encontró un positivo de las 34 muestras. En cuanto a las muestras de Manabí, no se encontró ningún positivo en las 22 muestras de la ciudad de Chone, sin embargo en la ciudad de Bahía de Caraquez se encontró un positivo de las 26 muestras.

**Tabla 9**

*Prevalencia de B. canis en los muestreos.*

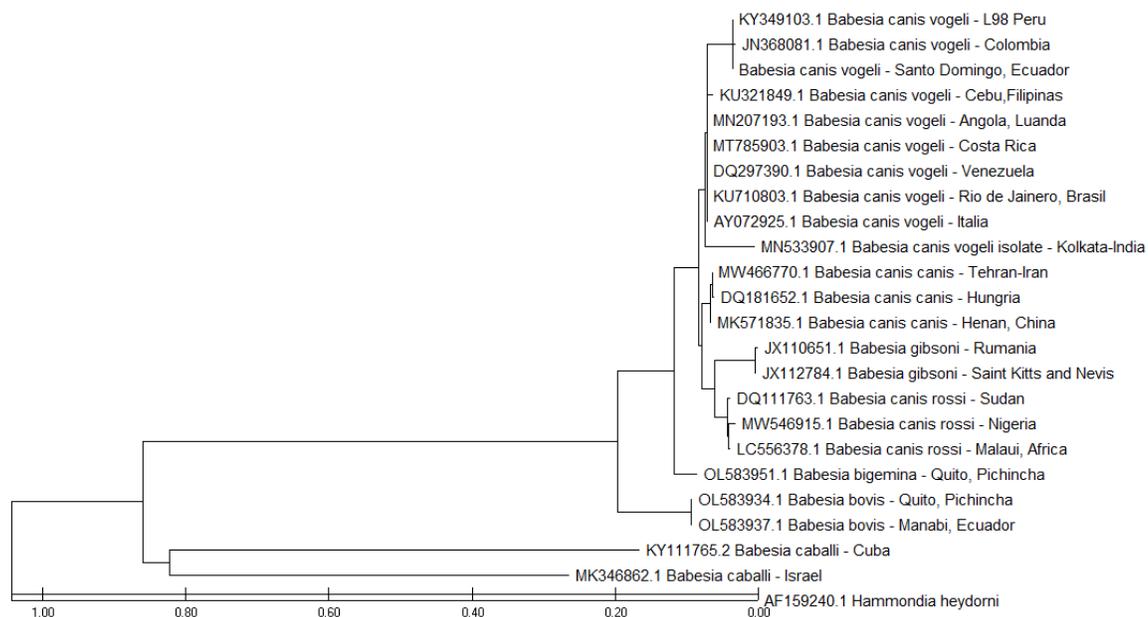
Prevalencia	Santo Domingo		Chone	Manabí
	Localización 1	Localización 2		Bahía de Caraquez
	0	2.94%	0	3.84%

## Análisis filogenético

A partir de la secuencia consenso de la muestra de Santo Domingo, evaluada en BLAST se encontró similitud con el gen 18s rRNA de *B. canis vogeli* (Figura 10).

### Figura 10

Árbol filogenético de las secuencias del gen 18s rRNA de *Babesia* spp.



Nota: Se encuentran 24 secuencias de nucleótidos, 23 de diversas especies de *Babesia* y un grupo externo de la especie *Hammondia heydomi*.

## Capítulo V

### Discusión

La identificación de patógenos caninos transmitidos por garrapatas es un desafío constante para los veterinarios e investigadores, además, la amplia gama de patógenos transmitidos por vectores, su comportamiento y distribución biológica diversa contribuyen a los conflictos de diagnosticar enfermedades caninas transmitidas por vectores (Dantas-Torres, 2008; de Caprariis y otros, 2011).

En Ecuador, *Rhipicephalus sanguineus* ha sido reportado en la región costa (Farovitch y otros, 2019), pero a pesar de eso, no se ha realizado los respectivos estudios de identificación de enfermedades que puedan afectar a los caninos a partir de este vector.

En este sentido, los estudios realizados en el país hasta el momento, han sido por examen de frotis sanguíneos teñidos, pero las infecciones por babesiosis son difíciles de detectar debido al bajo número de parásitos en la sangre periférica (Baneth, 2018), y aunque esta técnica ha sido estándar, no es suficiente para identificar las especies de *Babesia* presentes en los canes, esta técnica solo es fiable cuando se presenta una parasitemia de moderada a alta.

Otros métodos de diagnóstico son las pruebas serológicas, las cuales aumentan la posibilidad de detectar la infección pero puede ocurrir reactividad cruzada entre varias especies de *Babesia* y otros parásitos (Baneth, 2018). Por lo cual, los métodos moleculares basados en ADN presentan varias ventajas por su sensibilidad y especificidad, como es el caso de la PCR convencional (Criado-Fornelio, 2007).

En este estudio a través de una PCR convencional, se ha encontrado en una de las localizaciones del refugio “Narices frías” la presencia de un aplicón que comigra con

el control positivo para *Babesia spp*, y esa misma muestra positiva por frotis mostro estructuras compatibles con *Babesia grande* desde el punto de vista morfológico. Adicionalmente, se encontró en la provincia de Manabí la amplificación de fragmentos de *B. canis* en una muestra de la ciudad de Bahía de Caráquez. Siendo este hallazgo, el primer reporte e identificación molecular de *B. canis* en el país.

El protocolo usado para la PCR solo podía amplificar dos subespecies de *Babesia canis*, *B. canis canis* y *B. canis vogeli*, por medio de un control positivo de ADN plasmídico (BIONEER, 2015), de las cuales solo una de estas subespecies se ha reportado en Latino América, *Babesia canis vogeli*, debido a la presencia del vector, *R. sanguineus* (Panti-May & Rodríguez-Vivas, 2020). Esto se pudo corroborar a través de la secuencia obtenida de la muestra positiva del refugio “Narices frías”, la cual presentó similitud con otras secuencias de *B. canis vogeli*.

En América del Sur, investigaciones con técnicas moleculares han demostrado la presencia de *B. canis vogeli* (grande) y *B. gibsoni* (pequeña) como parásitos causante de babesiosis canina, en Venezuela se ha reportado prevalencia de infección por *Babesia* en perros infectados naturalmente de 2,24% (3/134) y en Colombia, prevalencia de 5,4 (5/91) (Criado-Fornelio y otros, 2007; Vargas-Hernández y otros, 2012). También en Río de Janeiro, Brasil se ha reportado prevalencia en perros positivos a *Babesia spp.* de 6,8 (7/103) (Lemos y otros, 2012).

En el análisis filogenético se comparó con secuencias de otros países, se encontró que *B. canis vogeli* de la ciudad de Santo Domingo es similar a *B. canis vogeli* de Perú (KY349103) y de Colombia (JN368081). Además se observó similitud con otras *Babesia canis vogeli* de diversas regiones del mundo; Filipinas (KU321849), Angola (MN207193), Costa Rica (MT785903), Venezuela (DQ297390), Brasil (KU710803), Italia (AY072925) e India (MN533907). También se demostró que las diversas subespecies de *B. canis* son

diferentes molecularmente, encontrándose en dos ramas superiores que separaron *B. canis vogeli* de *B. canis canis* y *B. canis rossi*, las cuales también presentaron diferencias moleculares.

De acuerdo a los cuidadores del albergue, los canes que han dado positivo a *B. canis vogeli* no han mostrado ninguna manifestación clínica de babesiosis canina, posiblemente porque muchos perros con infecciones crónicas no presentan ninguna manifestación clínica a menos que su sistema inmune se encuentre comprometido (Temoche y otros, 2018). En sí, la infección crónica es resultado de la incapacidad del sistema inmunitario del huésped a eliminar la infección, por lo que los patógenos se establecen y se reproducen con más intensidad provocando signos clínicos en el sistema inmune debilitado del huésped (Solano-Gallego & Baneth, 2011).

## Capítulo VI

### Conclusiones y Recomendaciones

#### Conclusiones

En este estudio se identificó la presencia de *B. canis vogeli* en la localización 2 del refugio “Narices frías”, la cual se determinó a través tinción de frotis sanguíneo, PCR convencional y se demostró que la prevalencia del piroplasma en este albergue es de 2,94% (1/34). Esto fue comprobado por la secuenciación, donde se encontró similitud de 100% a *Babesia canis vogeli*. En cuanto a la provincia de Manabí, se determinó igualmente la presencia de *Babesia canis* a través de identificación molecular en la ciudad de Bahía de Caráquez, demostrando una prevalencia de 3.84% (1/26), lo que sugiere que la distribución de este parásito en Ecuador puede ser mayor a la conocida actualmente.

Es importante destacar que comúnmente los veterinarios de practica canina, tratan y controlan Ehrlichia canis y Anaplasma platys, no obstante olvidan considerar este hemoparásito en su clínica rutinaria. Quizás por eso mismo, este es el primer reporte de identificación y caracterización molecular de *B. canis vogeli* en Ecuador.

Además, se encontró que tanto la localización 1 del refugio “Narices frías”, como el refugio de voluntariado ubicado en Chone no existe prevalencia de babesiosis canina en los 42 perros muestreados, demostrando que se ha llevado bien la profilaxis del vector en estas ubicaciones.

## **Recomendaciones**

Se recomienda realizar más estudios con mayor número de canes en diferentes ubicaciones del país para confirmar si es la única especie del piroplasma que parasita a los perros del país.

Se recomienda igualmente, realizar la secuenciación respectiva del producto obtenido en la PCR de la muestra de Manabí, para comparar y caracterizar cabalmente este protozooario en el país, y poder comparar con otras secuencias que poseen otros países de Latinoamérica.

Se recomienda realizar pruebas parasitológicas cuando se den manifestaciones clínicas para así realizar el respectivo diagnóstico, y así evitar también la propagación de la enfermedad.

Este hemotrópico por primera vez identificado en Ecuador debe ser evaluado de manera más profunda para identificar su epidemiología, importancia, prevalencia y desarrollar medidas de control.

## Bibliografía

- Alvarez, J. A., Rojas, C., & Figueroa, J. V. (2019). Diagnostic Tools for the Identification of *Babesia* sp. in Persistently Infected Cattle. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, *8*(3), 143. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030143>
- Babes, V. (1888). Sur l'hémoglobinurie bacterienne du boeuf. *CR Acad. Sci.*, *107*, 692-694.
- Baneth, G. (2018). *Babesia of Domestic Dogs*. (M. Florin-Christensen, & L. Schnittger, Edits.) Springer International Publishing, Cham.
- Beugnet, F., & Moreau, M. (2015). Babesiosis. *Scientific & Technical Review*, *34*(2), 627-639. <https://doi.org/10.20506/rst.34.2.2385>
- Bilić, P., Kuleš, J., Barić Rafaj, R., & Mrljak, V. (2018). Canine babesiosis: where do we stand? . *Acta Veterinaria*, *68*(2), 127–160. <https://doi.org/10.2478/acve-2018-0011>
- BIONEER. (2015). AccuPower(R) Babesia PCR kit. PM-560-Kr(V1).
- Birkenheuer, A., Levy, M., & Breitschwerdt, E. (2003). Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. *J. Clin. Microbiol.*, *41*(9), 4172–4177. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4172-4177.2003>
- Bock, R., Jackson, L., de Vos, A., & Jorgensen, W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology*, *129*, 247–269. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005190>
- Bourdoiseau, G. (2006). Canine babesiosis in France. *Vet Parasitol.*, *138*(1-2), 118-125. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.046>
- Carli, E., Tasca, S., Trotta, M., Furlanello, T., Caldin, M., & Solano-Gallego, L. (2009). Detection of erythrocyte binding IgM and IgG by flow cytometry in sick dogs with

- Babesia canis canis or Babesia canis vogeli infection. *Vet Parasitol.*, 161(1-2), 51-57. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.02.002>
- Carret, C., Walas, F., Carcy, B., Grande, N., Précigout, E., Moubri, K., Schetters, T., & Gorenflot, A. (1999). Babesia canis canis, Babesia canis vogeli, Babesia canis rossi: Differentiation of the three subspecies by a Restriction Fragment Length Polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 46, 298–303. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb05128.x>
- Chauvin, A., Moreau, E., Bonnet, S., Plantard, O., & Malandrin, L. (2009). Babesia and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Veterinary research*, 40 (2), 37. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009020>
- Chávez-Larrea, M. A., Cholota-Iza, C., Medina-Naranjo, V., Yugcha-Díaz, M., Ron-Román, J., Martín-Solano, S., Gómez-Mendoza, G., Saegerman, C., & Reyna-Bello, A. (2021). Detection of Babesia spp. in High Altitude Cattle in Ecuador, Possible Evidence of the Adaptation of Vectors and Diseases to New Climatic Conditions. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(12), 1593. <https://doi.org/10.3390/pathogens10121593>
- Conrad, P., Thomford, J., Yamane, I., Whiting, J., & Bosma, L. (1991). Hemolytic anemia caused by Babesia gibsoni infection in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 199(5), 601-605.
- Criado-Fornelio, A. (2007). A review of nucleic acid-based diagnostic tests for Babesia and Theileria, with emphasis on bovine piroplasms. *Parassitologia*, 49(Suppl 1), 39–44.

- Criado-Fornelio, A., Rey-Valeiron, C., Buling, A., Barba-Carretero, J., Jefferies, R., & Irwin, P. (2007). New advances in molecular epizootiology of canine hematic protozoa from Venezuela, Thailand and Spain. *Veterinary parasitology*, *144*(3-4), 261-269. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.09.042>
- Dantas-Torres, F. (2008). Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasit Vectors*, *1*(1), 25. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-1-25>
- de Caprariis, D., Dantas-Torres, F., Capelli, G., Mencke, N., Stanneck, D., Breitschwerdt, E. B., & D., O. (2011). Evolution of clinical, haematological and biochemical findings in young dogs naturally infected by vector-borne pathogens. *Vet Microbiol*, *149*(1-2), 206-212. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.10.006>
- El-Bahnasawy, M. M., Khalil, H. H., & Morsy, T. A. (2011). Babesiosis in an Egyptian boy acquired from pet dog, and a general review. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, *41*(1), 99-108.
- Farovitch, L., Sippy, R., Beltrán-Ayala, E., Endy, T., Stewart-Ibarra, A., & Leydet, B. (2019). "Detection of Antibodies to Spotted Fever Group Rickettsiae and Arboviral Coinfections in Febrile Individuals in 2014-2015 in Southern Coastal Ecuador.". *The American journal of tropical medicine and hygiene*, *101*(5), 1087–1090. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0157>
- Fukumoto, S., Xuan, X., Shigeno, S., Kimbita, E., Igarashi, I., Nagasawa, H., Fujisaki, K., & Mikami, T. (2001). Development of a polymerase chain reaction method for diagnosing *Babesia gibsoni* infection in dogs. *J Vet Med Sci.*, *63*(9), 977-981. <https://doi.org/10.1292/jvms.63.977>
- Goo, Y. K., Jia, H., Aboge, G. O., Terkawi, M. A., Kuriki, K., Nakamura, C., Kumagai, A., Zhou, J., Lee, E. G., Nishikawa, Y., Igarashi, I., Fujisaki, K., & Xuan, X. (2008).

*Babesia gibsoni*: Serodiagnosis of infection in dogs by an enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant BgTRAP. *Exp Parasitol.*, 118(4), 555-560.

<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.11.010>

Gray, J. S., & Weiss, L. M. (2008). *Babesia microti*. In: Khan N.A. (E. P. Pathogens, Ed.) New York, USA.

Guillén, N., & Muñoz, L. (2015). "Estudio taxonómico a nivel de genero de garrapatas en ganado bovino de la parroquia Alluriquín - Santo Domingo de los Tsáchilas." 60.

<http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/7264/1/T-ESPE-002686.pdf>

Halos, L., Lebert, I., Abrial, D., Danlois, F., Garzik, K., Rodes, D., Schillmeier, M., Ducrot, C., & Guillot, J. (2014). Questionnaire-based survey on the distribution and incidence of canine babesiosis in countries of Western Europe. *Parasite*, 21.

<https://doi.org/10.1051/parasite/2014015>

Halos, L., Lebert, I., Chao, I., Vourc'h, G., Ducrot, C., Abrial, D., R. J., & Guillot, J. (2013). Questionnaire-based survey on distribution and clinical incidence of canine babesiosis in France. *BMC Veterinary Research*, 9(1), 1-7.

Hanafusa, Y., Cho, K. O., Kanemaru, T., Wada, R., Sugimoto, C., & Onuma, M. (1998).

Pathogenesis of *Babesia caballi* infection in experimental horses. *J. Vet. Med. Sci.*,

60(10), 1127-1132. <https://doi.org/10.1292/jvms.60.1127>

Holman, P., Spencer, A., Telford, S. I., Goethert, H., Allen, A., Knowles, D., & Goff, W.

(2005). Comparative infectivity of *Babesia divergens* and a zoonotic *Babesia divergens*-like parasite in cattle. *Am J Trop Med Hyg*, 73(5), 865-870.

- Hunfeld, K., Hildebrandt, A., & Gray, J. (2008). Babesiosis: recent insights into an ancient disease. *Int. J. Parasitol.*, 38(11), 1219–1237. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.03.001>
- Irwin, P. J. (2009). Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasit Vectors*, 2(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-S1-S4>
- Jacobson, L. (2006). The South African form of severe and complicated canine babesiosis: clinical advances 1994–2004. *Vet. Parasitol.*, 138, 126–139.
- Jalovecka, M., Hajdusek, O., Sojka, D., Kopacek, P., & Malandrin, L. (2018). The Complexity of Piroplasms Life Cycles. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 248. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00248>
- Jalovecka, M., Sojka, D., Ascencio, M., & Schnittger, L. (2019). Babesia life cycle—When phylogeny meets biology. *Trends Parasitol.*, 35, 356–368. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00248>
- Jefferies, R., Ryan, U., & Irwin, P. (2007). PCR-RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies. *Vet Parasitol*, 144(1-2), 20-27. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.09.022>.
- Jojima, F. S., Garcia, J. L., Vidotto, M. C., Balarin, M. R., Fabretti, A. K., Gasparini, M. R., ..., & Vidotto, O. (2008). Ocorrência e caracterização molecular de espécies de Babesia em cães de uma população hospitalar da região de Londrina. *PR. Rev. Bras. Parasitol. Veterinária*, 17(1), 277-283.
- Jorgensen, J., Carroll, K., Funke, G., Landry, M., & Warnock, D. (2011). *Manual of Clinical Microbiology*.

- Keller, N., Jacobson, L., Nel, M., de Clerq, M., Thompson, P., & Schoeman, J. (2004). Prevalence and risk factors of hypoglycemia in virulent canine babesiosis. *J. Vet. Intern. Med*, *18*, 265–270.
- Köster, L. S., Lobetti, R. G., & Kelly, P. (2015). Canine babesiosis: a perspective on clinical complications, biomarkers, and treatment. *Veterinary medicine (Auckland, N.Z.)*, *6*, 119–128. <https://doi.org/10.2147/VMRR.S60431>
- Kuttler, K. L. (1988). *World-Wide Impact of Babesiosis*. In *Babesiosis of Domestic Animals and Man* (1 ed.). CRC Press.
- Lack, J. B., Reichard, M. V., & Van Den Bussche, R. A. (2012). Phylogeny and evolution of the Piroplasmida as inferred from 18S rRNA sequences. *Int. J. Parasitol.*, *42*(4), 353–363. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.02.005>
- Leisewitz, A., Jacobson, L., de Moraes, H., & Reyers, F. (2001). The mixed acid–base disturbances of severe canine babesiosis. *J. Vet. Intern. Med.*, *15*, 445–452.
- Lemos, T. D., Cerqueira, A. D., Toma, H. K., Silva, A. V., Corrêa, R. G., Paludo, G. R., ..., & Almosny, N. R. (2012). Detection and molecular characterization of piroplasms species from naturally infected dogs in southeast Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, *21*(2), 137-142. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612012000200012>
- Liu, A., Guan, G., Du, P., Gou, H., Liu, Z., Liu, J., Ma, M., Yang, J., Li, Y., Niu, Q., Ren, Q., Bai, Q., Yin, H., & Luo, J. (2012). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method based on two species-specific primer sets for the rapid identification of Chinese *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Parasitol Int.*, *61*(4), 658-663. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.07.004>

- Maggi, R. G., & Krämer, F. (2019). A review on the occurrence of companion vector-borne diseases in pet animals in Latin America. *Parasites & vectors*, *12*(1), 1-37. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3407-x>
- Martínez-García, G., Santamaría-Espinosa, R., Lira-Amaya, J., & Figueroa, J. (2021). Challenges in Tick-Borne Pathogen Detection: The Case for Babesia spp. Identification in the Tick Vector. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, *10*(2), 92. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020092>
- Mascarelli, P., Tartara, G., Pereyra, N., & Maggi, R. (2016). Detection of Mycoplasma haemocanis, Mycoplasma haematoparvum, Mycoplasma suis and other vector-borne pathogens in dogs from Córdoba and Santa Fé, Argentina. *Parasites & vectors*, *9*(1), 1-5.
- Matijatko, V., Torti, M., & Schetters, T. P. (2012). Canine babesiosis in Europe: how many diseases? *Trends in Parasitology*, *28*(3), 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.11.003>
- Medina Naranjo, V. L., Reyna Bello, A., Tavares-Marques, L. M., Campos, A. M., Ron Román, J. W., Moyano, J. C., Jarrín Porras, E. C., Sandoval Morejón, E. D., & Chávez Larrea, M. A. (2017). Diagnosis of hemotropics Anaplasma marginale, Trypanosoma spp. and Babesia spp. by elisa and pcr techniques in three livestock farms of Pastaza Province, Ecuador. *Revista Científica-Facultad de Ciencias Veterinarias*, *27*(3), 162-171.
- Mehlhorn, H. (1988). Parasitology in focus: facts and trends. (No. 616.9 PAR).
- Mehlhorn, H., & Schein, E. (1984). The Piroplasms: Life Cycle and Sexual Stages. *Advances in Parasitology*, *37*–103. [https://doi.org/10.1016/s0065-308x\(08\)60285-7](https://doi.org/10.1016/s0065-308x(08)60285-7)

- Nyström, P. (1998). The systemic inflammatory response syndrome: definitions and aetiology. *J. Antimicrob. Chemother.*, 41((Suppl. A)), 1-7.
- Panti-May, J. A., & Rodríguez-Vivas, R. I. (2020). Canine babesiosis: A literature review of prevalence, distribution, and diagnosis in Latin America and the Caribbean. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 21, 100417. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100417>
- Pauchard, A., & Barbosa, O. (2013). *Regional assessment of Latin America: rapid urban development and social economic equity threaten biodiversity hotspots*. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-7088-1\\_28](https://doi.org/10.1007/978-94-007-7088-1_28)
- Riera, M. A., Rojas, M. E., & Zapata, P. D. (2010). Protocolo de extracción de DNA por salting-out para pequeños volúmenes de sangre. *Revista de Ciencia y Tecnología*(14), 4-7.
- Schein, E., Mehlhorn, H., & Voigt, W. P. (1979). Electron microscopical studies on the development of *Babesia canis* (Sporozoa) in the salivary glands of the vector tick *Dermacentor reticulatus*. *Acta tropica*, 36(3), 229-241.
- Schettters, T. (2005). Vaccination against canine babesiosis. *TRENDS in Parasitology*, 21(4), 179-184. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.02.006>
- Schettters, T. P., Kleuskens, J. A., Van De Crommert, J., De Leeuw, P. W., Finizio, A. L., & Gorenflot, A. (2009). Systemic inflammatory responses in dogs experimentally infected with *Babesia canis*; a haematological study. *Veterinary parasitology*, 162(1-2), 7-15. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.02.012>

- Schnittger, L., Rodriguez, A. E., Florin-Christensen, M., & Morrison, D. A. (2012). Babesia: a world emerging. *Infect. Genet. Evol.*, 12(8), 1788-1809. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.07.004>
- Schoeman, J. P. (2009). Canine babesiosis. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 76(1), 59-66.
- Shao, M., & Lin, P. (1998). A case study of cytokine profiles in acute human babesiosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 58, 335–337.
- Shakespeare, A. S. (1995). The incidence of canine babesiosis amongst sick dogs presented to the Onderstepoort Veterinary Academic Hospital. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, 66(4), 247–250.
- Shoda, L. K., Palmer, G. H., Florin-Christensen, J., Florin-Christensen, M., Godson, D. L., & Brown, W. C. (2000). Babesia bovis-stimulated macrophages express interleukin-1beta, interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide and inhibit parasite replication in vitro. *Infect. Immun.*, 68(9), 5139-5145. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.9.5139-5145.2000>
- Silva, A. B., Costa, A. P., De Sá, J. C., Costa, F. B., dos Santos, A. C., & Rita de Maria, S. D. (2012). Detecção molecular de Babesia canis vogeli em cães e em Rhipicephalus sanguineus na mesorregião do oeste maranhense, nordeste brasileiro. *Ciência Animal Brasileira*, 13(3), 388-395.
- Smith, T., & Kilborne, F. (1893). Investigations into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever (No. 1). *US Department of Agriculture, Bureau of Animal Industry*.

- Solano-Gallego, L., & Baneth, G. (2011). Babesiosis in dogs and cats-Expanding parasitological and clinical spectra. *Veterinary Parasitology* , 181(1), 48-60. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.04.023>
- Solano-Gallego, L., Trotta, M., Carli, E., Carcy, B., Caldin, M., & Furlanello, T. (2008). *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian n dogs suspected of tick-borne disease. *Vet. Parasitol*, 157(3-4), 211-221. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.07.024>
- Starcovici, C. (1893). Bemerkungen über den durch Babes entdeckten Blutparasiten und die durch denselben hervorgebrachten. *Zbl. Bakt. I. Abt*, 14, 1 - 8.
- Tamzali, Y. (2013). Equine piroplasmiasis: an updated review. *Equine Vet. Educ.*, 25, 590–98.
- Temoche, L., Assad, R., E.S., S.-J., Lemos, T., & Almosny, N. (2018). Frequency of *Babesia vogeli* in domestic dogs in the metropolitan area of Piura, Peru. *Acta Veterinaria Brno*, 87(3), 255-260. <https://doi.org/10.2754/avb201887030255>
- Trotta, M., Carli, E., Novari, G., Furlanello, T., & Solano-Gallego, L. (2009). Clinicopathological findings molecular detection and characterization of *Babesia gibsoni* infection in a sick dog from Italy. *Vet. Parasitol.* , 165(3-4), 318–322. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.07.022>
- Uilenberg, G. (2006). *Babesia*—A historical overview. *Veterinary Parasitology* , 138(1-2), 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.035>

- Uilenberg, G., Franssen, F., Perié, N. M., & Spanjer, A. A. (1989). Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. *Vet Q*, *11*(1), 33-40. <https://doi.org/10.1080/01652176.1989.9694194>
- Uilenberg, G., Verdiesen, P. A., & Zwart, D. (1981). Imidocarb: a chemoprophylactic experiment with *Babesia canis*. *Vet Q*, *3*(3), 118-123. <https://doi.org/10.1080/01652176.1981.9693811>
- Vannier, E. G., Gewurz, B. E., & Krause, P. J. (2008). Human babesiosis. *Infectious disease clinics of North America*, *22*(3), 469-488. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2008.03.010>
- Vargas-Hernández, G., André, M. R., Faria, J. L., Munhoz, T. D., Hernandez-Rodriguez, M., Machado, R. Z., & Tinucci-Costa, M. (2012). Molecular and serological detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in dogs in Colombia. *Veterinary Parasitology*, *186*(3-4), 254-260. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.011>
- Vercammen, F., De Deken, R., & Maes, L. (1996). Prophylactic activity of imidocarb against experimental infection with *Babesia canis*. *Veterinary parasitology*, *63*(3-4), 195-198. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(95\)00901-9](https://doi.org/10.1016/0304-4017(95)00901-9)
- Vial, H., & Gorenflot, A. (2006). Chemotherapy against babesiosis. *Vet. Parasitol*, *138*(1-2), 147–160.
- Wagner, G., Cruz, D., Holman, P., Waghela, S., Perrone, J., Shompole, S., & Rurangirwa, F. (1992). Non-immunologic methods of diagnosis of babesiosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, *87*, 193–199. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761992000700032>
- Wei, L., Kelly, P., Ackerson, K., Zhang, J., Kaltenboeck, B., & El-Mahallawy, H. (2014). First report of *Babesia gibsoni* in Central America and survey for vector-borne

infections in dogs from Nicaragua. *Parasites & Vectors*, 7(1), 1-6.  
<https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-126>

Zahler, M., Schein, E., Rinder, H., & Gothe, R. (1998). Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. *Parasitol. Res.*, 84(7), 544–548.  
<https://doi.org/10.1007/s004360050445>