

1-1-2017

Detección de cepas de babesia canis en caninos con diagnóstico presuntivo de hemoparasitismo a través de herramientas moleculares

Andrés Felipe Bermúdez Cáceres
Universidad de La Salle, Bogotá

Follow this and additional works at: https://ciencia.lasalle.edu.co/maest_ciencias_veterinarias

Citación recomendada

Bermúdez Cáceres, A. F. (2017). Detección de cepas de babesia canis en caninos con diagnóstico presuntivo de hemoparasitismo a través de herramientas moleculares. Retrieved from https://ciencia.lasalle.edu.co/maest_ciencias_veterinarias/61

This Tesis de maestría is brought to you for free and open access by the Facultad de Ciencias Agropecuarias at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Maestría en Ciencias Veterinarias by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.

Universidad de La Salle
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Maestría en Ciencias Veterinarias

Detección de cepas de *Babesia canis* en caninos con diagnóstico presuntivo de
hemoparasitismo a través de herramientas moleculares

Preparado Por
Andrés Felipe Bermúdez Cáceres
76132204

Bogotá, Junio
2017

Universidad de La Salle
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Maestría en Ciencias Veterinarias

Detección de cepas de *Babesia canis* en caninos con diagnóstico presuntivo de
hemoparasitismo a través de herramientas moleculares

Tesis de grado

Andrés Felipe Bermúdez Cáceres

76132204

Directora

Arlen Patricia Gómez Ramírez, M.V., Ph.D.

Bogotá, Colombia

2017

Aprobación

Directora

Arlen Patricia Gómez Ramírez

Jurado

Diana Andrea Murillo

Jurado

Patricia Hernández Rodríguez

Jurado

Efraín Benavides Ortiz

Directivas de la Universidad de La Salle

Rector	Hno. Alberto Prada Sanmiguel
Vicerrector Académico	Dra. Carmen Amalia Camacho
Vicerrector De Investigación Y Transferencia	Dr. Luis Fernando Ramírez Hernández
Vicerrector De Promoción Y Desarrollo Humano	Hno. Diego Andrés Mora Arenas
Vicerrector Administrativo	Dr. Eduardo Ángel Reyes
Decano Facultad de Ciencias Agropecuarias	Hno. Ariosto Ardila Silva
Secretario Académico	Dr. Alejandro Tobón González
Director de la Maestría en Ciencias Veterinarias	Dr. Luis Carlos Villamil Jiménez

Compromiso

Este trabajo de grado no contiene ideas que sean contrarias a la doctrina católica en asuntos de dogma y moral. La Universidad, la directora y los jurados no son responsables de las ideas expuestas por el graduando.

Agradecimientos

Expreso mi más profundo, caluroso y sincero agradecimiento a todas las personas que con su apoyo han participado en la realización del presente trabajo de grado, en especial a la Dra. Arlen Patricia Gómez, directora de esta investigación a quien agradezco su guía, supervisión continúa y tiempo dedicado a la misma, pero sobre todo por la motivación y el soporte recibido a lo largo de estos meses, gracias por creer en mi proceso.

Especial reconocimiento merece por el interés mostrado en el desarrollo de esta investigación y las sugerencias recibidas el colega y amigo Dr. Andrés Felipe Santander quien junto a todo el capital humano del laboratorio GENMEJOR me brindaron conocimientos, confianza y camaradería haciendo mi paso por el laboratorio grato.

Quisiera hacer extensiva mi gratitud a mis compañeros y docentes de la Maestría en Ciencias Veterinarias por su amistad y siempre tener una palabra de aliento.

Finalmente, quiero expresar mi agradecimiento por la comprensión, paciencia y el esfuerzo recibidos por parte de mi familia, novia y amigos.

A todos ellos, muchas gracias.

Resumen

La babesiosis canina es una enfermedad producida por protozoarios del filo Apicomplexa llamados *Babesia*, entre los cuales se encuentra la especie *canis* con tres subespecies: *Babesia canis canis*, *Babesia canis rossi* y *Babesia canis vogeli*. El abordaje diagnóstico tradicional se basa en la identificación del parásito en extendidos sanguíneos; sin embargo, existen reportes de variaciones genéticas que pueden influenciar su capacidad patógena y la especificidad a los vectores. En el país hay pocos reportes de secuencias genéticas de *Babesia* identificadas y descritas. El objetivo de este estudio fue detectar y caracterizar un fragmento del gen de la subunidad pequeña ribosomal (ssu-rDNA) de *B. canis* en muestras de sangre de caninos con diagnóstico presuntivo de enfermedades transmitidas por garrapatas, mediante el uso de herramientas moleculares. Se realizó un muestreo intencional por conveniencia de 50 muestras de caninos procedentes de la ciudad de Ibagué (Colombia) sometidas previamente a PCR para *Ehrlichia* spp. Los iniciadores utilizados fueron *Bab-f* y *Babesia common* diseñados para detectar la secuencia ssu-rDNA de *B. canis*. Posteriormente se realizó secuenciación y análisis bioinformático para la construcción del árbol filogenético utilizando el método de distancias, así como el algoritmo prueba de arranque con 1000 réplicas. Se detectaron cuatro muestras positivas procedentes de animales sintomáticos: dos presentaron co-infección con *Ehrlichia* spp (4%) y dos infección simple con *B. canis* (4%). Luego de la secuenciación y posterior construcción del árbol filogenético, los productos mostraron 99% de similitud con aislamientos de *B. c. vogeli* en Venezuela (DQ297390.1), España (DQ439545.1), Brasil (EU436752.1), China (KJ939326.1), Estados Unidos (EU109716) y Sudan (DQ111766.1). Este estudio confirmó la presencia de *B. c. vogeli* en Ibagué (Colombia), lo que fortalece la

información disponible sobre la distribución del parásito en el país. Se requiere mayor investigación especialmente en otros hemoparásitos con signos similares.

Palabras clave: Babesiosis, caninos, PCR, relaciones filogenéticas, ssu-rDNA.

Abstract

The canine *Babesiosis* is an illness produced by a group of protozoans of the phylum *Apicomplexa* called *Babesia*, among which the *canis* species is reported with three sub-species: *Babesia canis canis*, *Babesia canis rossi* y *Babesia canis vogeli*.. The traditional diagnose approaches based on the identification of the parasite in blood smears; nevertheless, there are reports on variations within the genetic characteristics between strains which can influence its pathogen capability and the specificity to the vectors. Besides, there are few reports on the *Babesia* genetic sequences identified in the country. The objective of this research was to identify and single out a fragment of the small ribosomal unit rDNA gene (ssu-rDNA) of *B. canis* in blood samples of canines with a presumptive diagnose on tick-borne diseases (TBD) through the use of molecular tools. For this research, an intentional sampling was conveniently carried out with 50 blood canine samples taken from dogs coming from Ibagué (Colombia) and, previously submitted to PCR for *Ehrlichia* spp. The primers used were *Bab-f* and *Babesia common* designed to identify the *B. canis* ssu-r DNA subsequence. Sequencing and a bioinformatics analysis were subsequently carried out for the construction of the phylogenetic tree by using the distance neighbor-joining method, as well as the bootstrap logarithm with 1000 replicas. Four positive samples of the symptomatic animals were identified: two of them showed co-infection with *Ehrlichia* spp (4%) and the other two, a simple infection with *B. canis* (4%). After the sequencing and subsequent phylogenetic tree construction, the products showed a 99% similarity with isolations of *B. c. vogeli* in Venezuela (DQ297390.1), Spain (DQ439545.1), Brazil (EU436752.1), China (KJ939326.1), USA (EU109716) and Sudan (DQ111766.1). This research confirmed the presence of *B. c. vogeli* in Ibagué (Colombia), which strengthens the information available on the distribution of the

parasite within the country. More research is required, especially on other hemoparasites that generate similar clinical pictures.

Key words: *Babesiosis*, canine, PCR, phylogenetic relationships, ssu-rDNA.

Tabla de contenido

Introducción	1
Marco teórico	4
Agente etiológico	4
Patogénesis y cuadro clínico	9
Diagnóstico	12
Evolución natural y molecular	17
Objetivos	21
Objetivo general	21
Objetivos específicos	21
Materiales y métodos	22
Muestras y pacientes	22
Análisis moleculares	22
Extracción de ácidos nucleicos	22
Selección de iniciadores	23
Reacción en cadena de polimerasa (PCR)	24
Secuenciación de ácidos nucleicos	25

Análisis de las secuencias y construcción de árboles filogenéticos	25
Resultados	27
Análisis bioinformático y selección de iniciadores	27
Estandarización de la PCR convencional y electroforesis	28
Análisis de secuencias	30
Discusión	38
Conclusiones	44
Lista de referencias	46

Lista de tablas

Tabla 1.	Especies de hemoparásitos de la familia <i>Babesiidae</i> , distribución geográfica y vectores asociados.	7
Tabla 2.	Características epidemiológicas de las especies de <i>B.canis</i> más comúnmente identificadas en perros.	10
Tabla 3.	Porcentaje de presentación de las fallas orgánicas en babesiosis canina complicada.	13
Tabla 4.	Secuencias de iniciadores utilizados alrededor del mundo para la detección del gen 18s rRNA de <i>Babesia</i> spp.	16
Tabla 5.	Secuencias del gen ribosomal 18s rRNA de las subespecies de <i>B. canis</i> reportadas.	19
Tabla 6.	Secuencias de iniciadores que se evaluaron para el estudio.	24
Tabla 7.	Porcentaje de afinidad de los iniciadores evaluados y algunas secuencias contra las que se compararon.	27
Tabla 8.	Comparación entre las muestras positivas a <i>Babesia canis</i> y sus hallazgos en la historia clínica. También se muestran los resultados para <i>Ehrlichia canis</i> por PCR.	30
Tabla 9.	Secuencias del gen ssu-rDNA de las cepas de <i>B. canis</i> detectadas en el estudio.	32

Lista de figuras

Figura 1.	Ciclo de vida de <i>Babesia</i> spp.	6
Figura 2.	Ciclo de vida de la garrapata parda del perro.	6
Figura 3.	Linaje taxonómico de <i>Babesia canis</i> .	18
Figura 4.	Posición filogenética de <i>B. c. vogeli</i> encontrada en sangre de perros de Colombia basado en la secuencia del gen 18 s rRNA y metodología de unión de vecinos (400pb).	20
Figura 5.	Electroforesis de las pruebas de estandarización de la PCR convencional para la detección de <i>B. canis</i> .	29
Figura 6.	Imagen representativa de la PCR para la detección de <i>B. canis</i> .	31
Figura 7.	Ubicación de la secuencia consenso en una cadena reportada de 1677 pb, reportada en el Gen Bank código HM590440.1 para <i>B. c. vogeli</i> .	33
Figura 8.	Ubicación de las secuencias correspondientes a los iniciadores <i>Bab f</i> y <i>Babesia commonen</i> en una cadena reportada de 1677 pb, reportada en el Gen Bank código HM590440.1 para <i>B. c. vogeli</i> .	35
Figura 9.	Ubicación de las secuencias correspondientes de los iniciadores reportados por Vargas-Hernández et al. (2012).	35
Figura 10.	Gráfico de diferencias filogenéticas entre las secuencias de	

hemoparásitos registradas en el GenBank y las secuencias detectadas 36
por este estudio (BabULS1, BabULS2, BabULS 3 y BabULS4).

Figura 11. Relaciones filogenéticas entre las secuencias de hemoparásitos
registradas en el GenBank y las secuencias detectadas por este estudio
(BabULS1, BabULS2, BabULS 3 y BabULS 4). 37

Introducción

La babesiosis canina es una enfermedad hemolítica que afecta a perros alrededor del mundo, la cual es generada por parásitos apicomplexos llamados *Babesia*, clasificados por su tamaño como grandes (3,0-5,0 μm) y pequeños (1,5-2,5 μm) (Kuttler, 1988). Levine en 1988 reportó cerca de 100 especies de *Babesia*, donde *Babesia canis* y *Babesia gibsoni* han sido reconocidas como causantes de infección en perros; sin embargo, existen otras especies de *Babesia* caninas como *B. conradae* (Criado-Fornelio, Rey-Valeiron, Buling, Barba-Carretero, Jef-feries e Irwin, 2007.) y *B. similar a microti* (*B. microti-like* o *Theileria annae*) (Camacho et al., 2005). *B. canis* se ha dividido en tres diferentes subespecies: *B. canis canis*, *B. canis vogeli* y *B. canis rossi*, las cuales difieren en el vector que las transmite y por ende en su distribución geográfica. *B. c. canis* es transmitida por garrapatas del género *Dermacentor* spp. y ha sido identificada en Europa y Asia, *B. c. vogeli* transmitida por la garrapata parda del perro o *Rhipicephalus sanguineus* en las regiones tropicales y subtropicales y *B. c. rossi* reportada en África y Asia, que usa como vector a la garrapata amarilla del perro (*Haemaphysalis leachii*) (Uilenberg, Fransenn, Perie y Spanjer, 1989). Según Martín et al. (2005) una diferencia entre subespecies fue identificada al momento de evaluar la efectividad de vacunas para el control de babesiosis canina, donde se reportó adecuada protección en el caso de ser agentes homólogos más no en heterólogos, lo que indica diferencias antigénicas entre las especies.

En el estudio de Carret et al. (1999) se evidenció que las tres subespecies de *B. canis* se encuentran separadas taxonómicamente pese a su similitud morfológica; así mismo, reportaron que *B. c. vogeli* está filogenéticamente separada de *B. c. canis* y *B. c. rossi*. En este estudio se concluyó que estas diferencias no son evidentes al examen microscópico. En Carolina del Norte, Estados Unidos, se reportó una *Babesia* grande en un perro inmuno-suprimido, que

poseía una secuencia única, más cercana a *B. bigemina* y *B. caballi* que a los agentes causantes de babesiosis comunes del canino. El hemoparásito detectado tenía una variación filogenética con las especies reconocidas de *B. canis* entre 91,2-91,6%, lo que sugiere que podrían ser diferentes (Birkenheuer, Neel, Ruslander, Levy, y Breitschwerdt, 2004).

Otra característica que diferencia a las subespecies de *B. canis* es la intensidad de la enfermedad, ya que *B. c. rossi* es la más virulenta y agresiva debido a que produce enfermedad aguda o per-aguda y está asociada con fallas orgánicas, *B. c. vogeli* produce una enfermedad crónica, leve o subclínica en adultos pero puede ser severa en cachorros y finalmente *B. c. canis* de patogenicidad e intensidad media (Schoeman, 2008). La severidad de la enfermedad varía desde una infección subclínica hasta falla orgánica y muerte; la mayoría de los caninos desarrollan anemia hemolítica y/o trombocitopenia con grados variables de anorexia, fiebre, esplenomegalia, ictericia y hemoglobinuria. En resumen, entre los factores que influyen en la severidad de los signos se incluyen: la especie de *Babesia* que está involucrada, el estado inmune y la edad del paciente; así como la presencia de co-infecciones con otros agentes transmitidos por el mismo vector (Kordick, Breitschwerdt y Hegarty, 1999).

Desde 1940 se conoce la presencia de la enfermedad en Colombia con reportes en regiones donde la presencia del vector es alta como la Costa Atlántica y Pacífica, los Llanos Orientales, el Valle del Magdalena, entre otros (Hernández y Peralta, 1999). Batista (1980) reportó una prevalencia de *B. canis* del 0,93% en perros del departamento de Córdoba. En otro estudio realizado en el piedemonte llanero se encontró una frecuencia de positividad del 68% de *B. canis* en perros parasitados asintomáticos pero con leve anemia en el hemograma, lo que sugiere la existencia de algún tipo de estabilidad enzoótica. En este estudio también se reportó que un 26% de los perros evaluados eran sospechosos de infección mixta con *E. canis* (Piedrahita, 2011). Guerra, Ardila y López (2012) reportaron el caso de un perro Weimaraner

de 2 años de edad positivo a *B. canis* en la ciudad de Cali, el cual llegó con sintomatología de ascitis, pérdida ponderal, mucosas pálidas, polidipsia/poliuria y presencia del vector en el pelaje. Las pruebas paraclínicas evidenciaron anemia normocítica normocrómica con trombocitopenia, proteinuria y creatinina elevada; el diagnóstico final fue síndrome nefrótico secundario a babesiosis canina crónica. Mediante detección por la reacción en cadena de polimerasa conocida como **PCR** por sus siglas en inglés (*polymerase chain reaction*) y posterior secuenciación de los fragmentos del ADN se detectaron aislamientos compatibles con *B. c. vogeli* a partir de perros provenientes de las ciudades de Bucaramanga, Villavicencio y Bogotá (Vargas-Hernández et al., 2012), similares aislamientos han sido reportados en Venezuela, Sudáfrica y Brasil (respectivamente correspondientes las accesiones de Genbank DQ297390, AF547387 y EF636702).

Debido a las diferencias antigénicas, filogenéticas y patogénicas descritas en la literatura y a que son pocos los reportes realizados en el país de secuencias de ADN de este hemoparásito, este documento busca aportar información con relación a la variabilidad genómica de detecciones moleculares de *Babesia* spp. recuperadas de caninos en el departamento del Tolima, a través del desarrollo y estandarización de metodologías moleculares que permitan caracterizar detecciones de las diferentes subespecies, generando así aportes a la epidemiología molecular del agente en el país.

Marco teórico

Los microorganismos del género *Babesia* fueron descubiertos por el bacteriólogo rumano Víctor Babes en 1888 quien reportó la presencia de microorganismos en el interior de los eritrocitos del ganado vacuno y las ovejas; posteriormente en 1893, Smith y Kilbourne demostraron que estos piroplasmas microscópicos eran transmitidos por la picadura de artrópodos a mamíferos y aves, actualmente existen cerca de 100 especies de *Babesia* spp. descritas; sin embargo, el número se incrementa entre más mamíferos son estudiados (Lack, Reichard y Van Den Bussche, 2012).

Agente etiológico

La babesiosis canina es causada por protozoarios del género *Babesia* (*Piroplasmida: Babesiidae*), las cuales se han organizado informalmente en dos grupos: grandes (como *B. canis* que varían entre 2-4 x 4-7 μ m) y pequeñas (como *B. gibsoni* con tamaño entre 1,1-2 x 1,2-4 μ m). Como se mencionó anteriormente, *B. canis* se ha dividido en tres diferentes subespecies (*B. c. canis*, *B. c. vogeli* y *B. c. rossi*), que difieren en el vector que las transmite y en su distribución geográfica. La tabla 1 resume los organismos de este grupo que se ha demostrado afectan al canino junto con la distribución geográfica y los vectores que la transmiten.

B. canis ingresa al cuerpo de la garrapata adulta cuando se alimenta de un perro infectado. La mayoría de los parásitos son destruidos en el intestino, sin embargo, los que sobreviven pasan por un proceso de gametogonia en el interior del lumen intestinal para posteriormente atravesar la pared del intestino hasta la hemolinfa para luego invadir los ovarios y finalmente los huevos, a este tipo de transmisión se le conoce como transovárica. Un solo huevo puede tener múltiples parásitos en su interior, en este punto se inicia un proceso de fisión binaria que

sigue durante el desarrollo del vector joven dentro del huevo. Una vez eclosiona, la larva puede transmitir la infección y llegan a la adultez en el intestino y migran a las glándulas salivares (Smith, 1978; Shortt, 1973). El ciclo de la *Babesia* spp. se muestra en la figura 1. Otra forma de infección del vector ocurre luego de alimentarse de un animal infectado donde consume las larvas junto con la sangre del animal y se transforman en gametos en el intestino. Estos ingresan a los eritrocitos y se reproducen sexualmente para finalmente acoplarse en el intestino del vector y viajar en forma de cigoto a las glándulas salivares donde se generan múltiples individuos o esporozoítos que son liberados en la saliva cuando la garrapata se alimenta nuevamente (Shortt, 1973).

Una vez el agente ha ingresado al huésped entra a los glóbulos rojos, donde se transforman en trofozoíto, y por medio de gemación o etapa asexual de la reproducción, se multiplican y destruyen el eritrocito infectado liberando los merozoítos que a su vez ingresan a nuevos hematíes y cerrar el ciclo. También se pueden diferenciar en gametos para ser consumidos por un nuevo vector (Homer, Aguilar-Delfin, Telford III, Krause y Persing, 2000).

Otro factor determinante en la transmisión de la enfermedad es la ecología del vector. *R. sanguineus* es el arácnido más comúnmente identificado como vector de babesiosis canina producida por *B. c. vogeli*, se caracteriza por ser una garrapata de tres huéspedes, lo que significa que a través de su ciclo vital requiere subir a tres diferentes perros. En la figura 2 se muestra el ciclo de vida de la garrapata parda del perro. La ovoposición y eclosión se realiza en el suelo, luego la larva sube a un primer huésped donde se alimenta y regresa al suelo, muda a ninfa y accede a un segundo hospedero donde se alimenta y cae, muda en adulto y parasita a un tercer huésped en el que se alimenta y realiza el coito completando el ciclo al caer al suelo para la ovoposición (Dantas-Torres, 2008a).

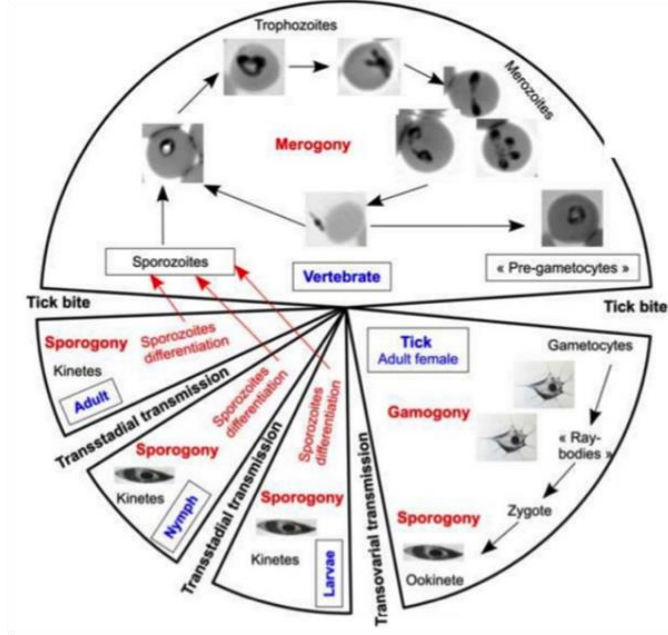


Figura 1. Ciclo de vida de la Babesia spp. Tomado de Chauvin, Moreau, Bonnet, Plantard y Malandrin (2009).

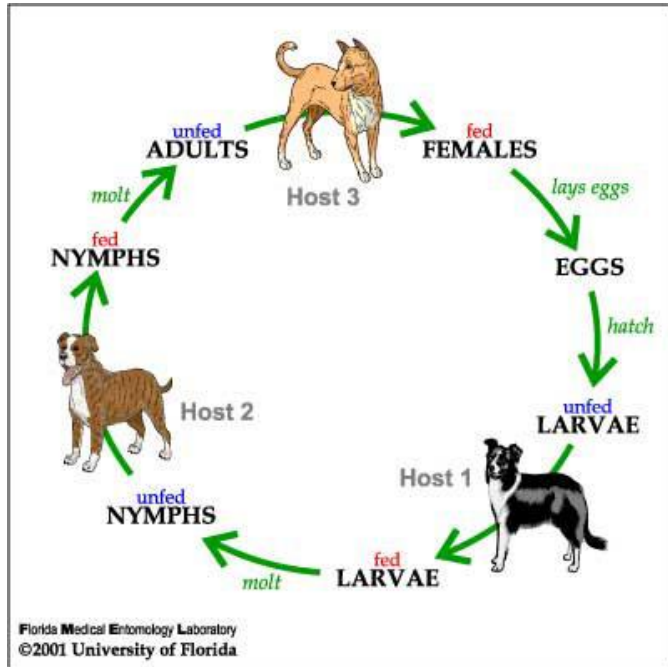


Figura 2. Ciclo de vida de la garrapata parda del perro. Dibujado por James Newman y Leah LeFevre, University of Florida; Tomado de Lord (2001).

Tabla 1

Especies de hemoparásitos de la familia Babesiidae, distribución geográfica y vectores asociados. Datos obtenidos de las referencias relacionadas en la tabla.

Grupo	Especies	Distribución geográfica	Vector	Referencia
Grande	<i>B. c. canis</i>	Europa y Asia	<i>Dermacentor</i> spp.	Uilenberg et al. (1989); Matijatko et al. (2012).
	<i>B. c. rossi</i>	África y Asia	<i>Haemaphysalis leachii</i>	Matjila et al. (2009); Penzhorn (2011); Kamani et al. (2013).
	<i>B. c. vogeli</i>	África, Europa, Asia, Australia, América del Norte y Sur.	<i>R. sanguineus</i> y <i>D. marginatus</i>	Dantas-Torres (2008b); Otranto et al. (2010); Barker et al. (2012); Claerebout et al. (2013).
	<i>Babesia</i> sp	América del Norte	Desconocido	Birkenheuer et al. (2004).
Pequeña	<i>B. conradae</i>	Europa, América del Norte y Brasil	<i>R. sanguineus</i>	Jojima et al. (2008); Irwin (2009).
	<i>B. gibsoni</i>	América Central, Brasil, Norte de África y Asia	<i>Haemaphysalis</i> sp. <i>Rhipicephalus</i> sp.	Criado-Fornelio et al. (2007); Wei et al. (2014); Jojima et al. (2008).
	<i>Babesia microti-like (Theileria annae)</i>	Europa	<i>Ixodes</i> sp.	Zygner, Baska, Wisniewski y Wedrychowicz (2010); Simões, Cardoso, Araújo, Yisaschar-Mekuzas y Baneth, (2011).

R. sanguineus también es el principal vector de otras enfermedades que afectan a los caninos, algunas de ellas son: *Anaplasma platys*, *Ehrlichia* / *Hepatozoon canis*, *Cercopithifilaria spp.*, *Rickettsia conorii* / *R. massiliae* y *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoff* (Pantchevet al., 2015); por lo que es común encontrar infecciones simultáneas producidas por diferentes agentes en caninos que tienen contacto frecuente con el vector y sintomatología de enfermedad hemoparasitaria. Un ejemplo es el reportado por Krawczak et al. (2015) quienes realizaron un estudio serológico donde se identificaron co-infección entre *Ehrlichia* spp y *B. canis* e incluso con *Leishmania* spp. en caninos de Minas Gerais (Brasil). Al igual que Izzi, Martin, Chan y Leutenegger en 2013, quienes reportaron el caso de un can criollo castrado con historia de diarrea, letargia, emaciación y polidipsia. En los exámenes paraclínicos se encontró anemia junto a trombocitopenia y positividad por serología y PCR a *E. canis* y *B. canis* mientras que solo por PCR se identificó *A. platys*. En este estudio se confirmó co-infección triple con microorganismos que usan a la garrapata como vector y generan síntomas inespecíficos y similares entre sí.

Mierzejewska, Welc-Falęciak, Bednarska, Rodo y Bajer (2014) reportaron el caso de una transmisión vertical en un camada de cachorros Pastores de 6 semanas de edad que mostraban signos clínicos de hemoparasitismo; la madre era asintomática excepto por la presencia de esplenomegalia. Al comparar las secuencias obtenidas se identificó que el porcentaje de similitud era del 100% con *B. c. canis* (EU622793). Los autores sugieren que tienen el mismo origen y mencionan que es el primer reporte que evidencia transmisión vertical de babesiosis en caninos.

Como se mencionó previamente, existen varias especies de *Babesia* en caninos; en Colombia se han reportado babesias grandes como *B. canis vogeli* (Vargas-Hernández et al., 2012), relacionadas con la distribución geográfica del vector reportado en el país. Según la

División de Enfermedades Parasíticas y Malaria del Centro de Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC), las babesias pequeñas, especialmente *B. microti*, *B. divergens* y *B. venatorum* tienen potencial zoonótico (Rozej-Bielicka, Stypułkowska-Misiurewicz y Gołąb, 2015). Según Benavides (2011) con base en la comprensión de la epidemiología de estos organismos se cree improbable que la enfermedad se genere en humanos por babesias de gran tamaño, así como, al examinar la distribución geográfica de las especies de *Babesia* sp. que afectan a los caninos y sus vectores (tabla 1), es poco factible que en el país se presente infección por otras especies de *Babesia* sp.

Patogénesis y cuadro clínico

La infección por *B. canis* puede cursar con diferentes grados de severidad, dependiendo de la subespecie infectante, la edad del huésped, el estado inmune y las coinfecciones con otros patógenos. En un estudio, Salem y Farag (2014) reportaron que babesiosis canina causada por *B. c. vogeli* es más frecuente en perros de edad media (3-5 años), seguidos por los menores de 3 años. La raza en la que más diagnosticó fue el Pastor Alemán, también se reportó mayor positividad en machos que en hembras. En la tabla 2 se resume la patogenicidad y el tiempo de incubación promedio de las especies de *Babesia* más comunes.

La babesiosis canina ha sido clasificada como crónica o complicada y aguda o no complicada; ésta última se asocia a la primera exposición con la presentación de un cuadro clínico que puede cursar con anemia, linfadenopatía, vómito, diarrea, letargia, temores, fiebre, esplenomegalia, dolor abdominal, taquicardia, taquipnea o disnea, membranas mucosas pálidas o ictericas e incluso hemoglobinuria y/o hematuria franca macroscópica (Máthé,

Vörös, Papp y Reiczingel, 2006). En el estudio de Salem y Farag (2014) realizado con perros en fase aguda de la enfermedad causada por *B. c. vogeli*, se reportaron los siguientes porcentajes de presentación de signos clínicos: elevación de temperatura superior a 39,6 °C con un porcentaje de presentación de 92%, anorexia en 92% de los caninos evaluados, esplenomegalia en 92%, aumento de tamaño de ganglios linfáticos 76,9%, membranas mucosas pálidas 61,5%, hematuria 15,38% e ictericia 15,3%. Asimismo, en el 76,9% de los perros del estudio se evidenció la presencia de garrapatas.

Tabla 2

Características epidemiológicas de las especies de B. canis más comúnmente identificadas en perros. Datos tomados de Schoeman, 2008.

Especie	Tipo de enfermedad	Tiempo de incubación (h)
<i>B. c. canis</i>	Patogenicidad media, signos moderados de enfermedad.	48-72
<i>B. c. rossi</i>	Es una especie virulenta y agresiva, produce enfermedad aguda y per-aguda, asociada con fallas orgánicas.	48-72
<i>B. c. vogeli</i>	Poco patogénica, produce enfermedad leve o subclínica en adultos, pero severa en cachorros Común en Greyhound.	48-72
<i>B. gibsoni</i>	Produce infección hiperaguda, aguda o crónica, la aguda es la más común. Común en Pitbull terrier.	Variable

En babesiosis canina complicada o crónica, el cuadro clínico depende del órgano u órganos afectados por el síndrome de respuesta inflamatoria generalizada (en inglés Systemic inflammatory response syndrome o SIRS). Otras complicaciones menos frecuentes en babesiosis canina complicada son: hipotensión, pancreatitis, patología isquémica miocárdica, mialgia, movimientos oculares involuntarios, signos respiratorios de vías aéreas altas, necrosis de las extremidades, acúmulo de fluidos, desórdenes ácido-base (acidosis metabólica) e hipoglicemia (más común en cachorros) (Lobetti 2006). Van de Maele, Savary-Bataille, Gielen y Daminet (2008) reportaron el caso de un canino Akita de 10 años con *B. canis*, el cual presentó deshidratación leve (5%), apatía, fiebre, anorexia, esplenomegalia y convulsiones; los exámenes de laboratorio revelaban una pancitopenia con anemia no regenerativa, hiperplasia eritroide, piuria y hematuria; una Tomografía Axial Computarizada (TAC) encefálica reveló leve atrofia cortical con disminución de la densidad cerebelar. Este caso es poco común debido a que la presentación cerebral es baja (1-10%), especialmente combinada con pancitopenia, lo que deja clara la variedad de hallazgos clínicos que pueden encontrarse en un paciente con babesiosis canina. El porcentaje de afección en los diferentes órganos en babesiosis complicada se resume en la tabla 3.

En la fisiopatología también es importante la interacción entre el microorganismo, el vector y el sistema inmune del huésped. La creación de inmunoglobulinas IgG e IgM en el perro infectado contra antígenos de la membrana de los eritrocitos es la causa principal de la anemia hemolítica clásica de la enfermedad; la trombocitopenia es más importante en otros tipos de hemoparasitismo como en la Anaplasmosis y la Ehrlichiosis Monocítica Canina (Day, 2011). La anemia conduce a hipoxia tisular, aumento de la peroxidación lipídica, liberación de radicales libres y mediadores inflamatorios (principalmente citoquinas y óxido nítrico), activación de la cascada de coagulación, SIRS y falla multi-orgánica. El agotamiento de los

factores de coagulación sumado a la trombocitopenia llevan a una coagulopatía intravascular diseminada (CID) y finalmente a la muerte (Máthé, Vörös, Papp y Reiczingel, 2006).

Diagnóstico

Prieto (2003) reportó que las alteraciones más representativas en el cuadro hemático de los animales estudiados fueron la disminución de los recuentos de glóbulos rojos y plaquetas, así como, la alteración de la morfología intraeritrocitaria. En este estudio el hematocrito medio de los animales afectados por Babesiosis canina fue de 28%, mientras que los que tenían infección concomitante con *E. canis* fue de 26%. Esto indica que el hemograma es determinante para identificar la anemia producida por el hemoparasito, que según Couto (2007) en fases agudas es macrocítica, hipocrómica, regenerativa y con índice de reticulocitos disminuido; mientras que en casos per agudos es común encontrar anemia no regenerativa. Otro hallazgo importante en el cuadro hemático es la presencia de trombocitopenia marcada, donde los valores suelen ser inferiores a 100.000 plaquetas por microlitro, también es común encontrar hemoglobinemia (plasma rojizo) o hiperbilirrubinemia (plasma amarillo) con presencia de esferocitos y policromatofilia (Van de Maele et al., 2008).

Con respecto a la línea blanca, Van de Maele et al. (2008) reportaron que los cambios son variables, desde leucopenia hasta leucocitosis dependiendo del tiempo de evolución y los órganos afectados. En perros parasitados por *B. c. vogeli* se han reportado anemias con índices eritrocíticos compatibles con aumento de tamaño de los glóbulos rojos y disminución de su hemoglobina interna; sin embargo, llama la atención que en la línea blanca se presentó una leucopenia con neutropenia en el 84,6% pero, con linfocitosis y monocitosis en el 69,2%. Los autores concluyen que la presencia de diferentes grados de trombocitopenia, anemia leve o no

regenerativa y leucopenia con neutropenia es un hallazgo sugestivo de infección con *B. canis* (Salem y Farag, 2014).

Tabla 3

Porcentaje de presentación de las fallas orgánicas en babesiosis canina complicada. Datos tomados de Lobetti, 2006.

Tipo de falla	Órganos implicados	Presentación (%)
Simple	Hígado	34
	Riñón	24
	Pulmón	17
	Sistema nervioso central (SNC)	1-10
	Músculo	7
Doble	Hígado/ Pulmón	31
	Hígado/Riñón	23
	Hígado/Músculo	15
	Músculo/Riñón	15
	Músculo/Pulmón	8
	Músculo/SNC	8
Triple	Hígado/Músculo/Riñón	33
	Hígado/Músculo/Pulmón	25
	Hígado/Riñón/Pulmón	17
	Hígado/Músculo/SNC	17
	Músculo/Riñón/Pulmón	8

En un estudio retrospectivo Kirtz, Leschnik, Hooijberg, Tichy y Leidinger (2012) resumieron los hallazgos hematológicos presentados en perros infectados con *Babesia canis canis* en la clínica de pequeños animales y equinos de la Universidad de Viena, Austria entre enero de 2005 y diciembre 2008; encontraron que en el 68% de los casos se presentó trombocitopenia severa, 11,5% moderada y 2,6% leve. Con respecto a la presencia de anemia, encontraron que fue leve en el 63,8%, moderada en el 31,9% y severa o muy severa en el 4,3% de los casos. Las anemias se clasificaron en el 93,2% de los casos como no regenerativa mientras que en el 6,8% lo fue levemente, la línea blanca presentó diferentes grados de leucopenia, con neutro y linfopenia.

Existen diferentes métodos para la identificación de *Babesia* spp.; los directos que demuestran la presencia del organismo como la evaluación en frotis con coloración de Giemsa y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los indirectos que brindan evidencia del contacto o infección, es el caso de la prueba de anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ELISA.

PCR es un método directo de identificación de *Babesia* spp. que consiste en sintetizar varias veces un fragmento de ADN utilizando una enzima polimerasa (Eguiarte, Sousa y Aguirre 2007). Cuando se realiza una PCR se busca simular el proceso de síntesis de ADN que sucede al interior de la célula. Es el caso de los cebadores que son cadenas de nucleótidos cortas y de cadena simple que se adhieren a la cadena de ADN a copiar con el fin de definir la región que será amplificada, revelando la presencia del ADN del parásito. En la tabla 4 se muestran algunas secuencias de iniciadores utilizadas para detectar el gen 18s rRNA para detección de *Babesia* spp.

En Colombia es poca la documentación referente a babesiosis canina; sin embargo, es una preocupación permanente en la práctica clínica debido a que la presencia del vector está

ligada con la aparición de la enfermedad. En un estudio realizado por Hernández y Peralta (1999) se evaluó con microscopía óptica e IFI la sangre de caninos esplectomizados e infectados experimentalmente con cepas de *Babesia* de campo. En este estudio se reportó la visualización de estructuras compatibles con *Babesia* sp de tamaño grande compatibles con *B. canis* a la evaluación microscópica. Así mismo, confirmaron por IFI la presencia del agente. De esta forma se demostró que los dos métodos son eficientes para el diagnóstico de babesiosis canina en el país.

Vargas-Hernández et al. (2012) reportaron la ocurrencia de cepas de *E. canis* y *B. canis* a través de herramientas moleculares en perros procedentes de las ciudades de Bucaramanga, Bogotá y Villavicencio. Al comparar los resultados por PCR versus IFI, pudieron identificar que la detección de *Babesia* sp por PCR fue baja (5,4%) mientras que por IFI fue de 51,6 %; esto ocurre debido a que la PCR detecta la presencia del ADN del parásito en sangre mientras la IFI indica contacto con el agente por medio de la activación de la respuesta inmune a través de anticuerpos. En este estudio se comparó la secuencia identificada con las reportadas internacionalmente, la filogenética demostró gran similitud entre ésta y *B. c. vogeli* confirmando su identidad por primera vez en Colombia.

En un estudio realizado en el piedemonte llanero se encontró una frecuencia de positividad del 68% de *B. canis* en perros parasitados asintomáticos pero con leve anemia en el hemograma, estos hallazgos sugieren la existencia de algún tipo de estabilidad enzoótica, así mismo, se reportó que un 26% de los perros evaluados eran sospechosos de infección mixta con *E. canis* (Piedrahita, 2011).

Tabla 4

Secuencias de iniciadores utilizados alrededor del mundo para la detección del gen 18s rRNA de Babesia spp. Datos tomados de Yabsley y Shock (2013).

Iniciadores	Secuencia (5'-3')
<i>bab1</i>	CTTAGTATAAGCTTTTATACAGC
<i>bab4</i>	ATAGGTCAGAACTTGAATGATACA
<i>bab2</i>	GTTATAGTTTATTTGATGTTTCGTTT
<i>bab3</i>	AAGCCATGCGATTTCGCTAAT
<i>PiroA</i>	AATACCCAATCCTGACACAGGG
<i>PiroB</i>	TAAATACGAATGCCCCCAAC
<i>Bab f</i>	AAGTACAAGCTTTTTACGGTG
<i>Babesia common</i>	CCTGTATTGTTATTTCTTGTCACTACCTC
<i>3,1</i>	CTCCTTCCTTTAAGTGATAAG
<i>5,1</i>	CCTGGTTGATCCTGCCAGTAGT
<i>RLBH-F</i>	GAGGTAGTGACAAGAAATAACAATA
<i>RLBH-R</i>	TCTTCGATCCCCTAACTTTC
<i>Babfor</i>	GACTAGGGATTGGAGGTC
<i>Babrev</i>	GAATAATTCACCGGATCACTC
<i>BdiF</i>	CAGCTTGACGGTAGGGTATTGG
<i>BdiR</i>	TCGAACCCTAATTCCCCGTTA
	FAM-CGAGGCAGCAACGG-MGB

Según França et al. (2014) un tipo de enfermedad hemoparasitaria está afectando a los caninos de Brasil, se trata de un protozoario del filo Apicomplexa y del orden Piroplasmorida (Gonçalves et al., 2016) denominado *Rangelia vitalii* que fue reportado por primera vez en

1910, luego de varios años sin investigación, se diagnosticó de nuevo en perros de Argentina y Uruguay. Actualmente se desconoce el vector pero se sospecha de *R. sanguineus* y *Amblyomma aureolatum*. A través del tiempo la enfermedad ha tenido varios nombres siendo más común “nambiuví”, pero también se ha utilizado “orejas sangrantes”, “fiebre amarilla de los perros” y “peste de sangre”. El microorganismo afecta eritrocitos, leucocitos y células endoteliales capilares. El hallazgo clínico más característico es el sangrado por las orejas, pero también se ha reportado fiebre, ictericia, esplenomegalia, hemorragias equimóticas y anemia en los animales infectados (Soares et al., 2011). Estudios moleculares han demostrado que *R. vitalii* está relacionada con la clada de *Babesia*, pero son genética y patogénicamente diferentes ya que *R. vitalii*, tiene la capacidad de infectar células endoteliales y la *Babesia* no (Loretti y Barros, 2005).

Evolución natural y molecular

Las babesias, al igual que las coccidias y el *Cryptosporidium*, hacen parte del grupo de los apicomplexos los cuales tuvieron su origen ancestral en parásitos acuáticos fotosintéticos tipo algas que parasitaban seres invertebrados hace alrededor de 1100 a 1250 millones de años (Ma por sus siglas en inglés *million years ago*). Se conoce evidencia de parasitismo a vertebrados desde hace 220 Ma. (Leander, 2007). En la figura 3 se muestra el linaje taxonómico de *Babesia* según el Centro Nacional para la Información en Biotecnología de los Estados Unidos (NCBI por sus siglas en inglés *National Center for Biotechnology Information*).

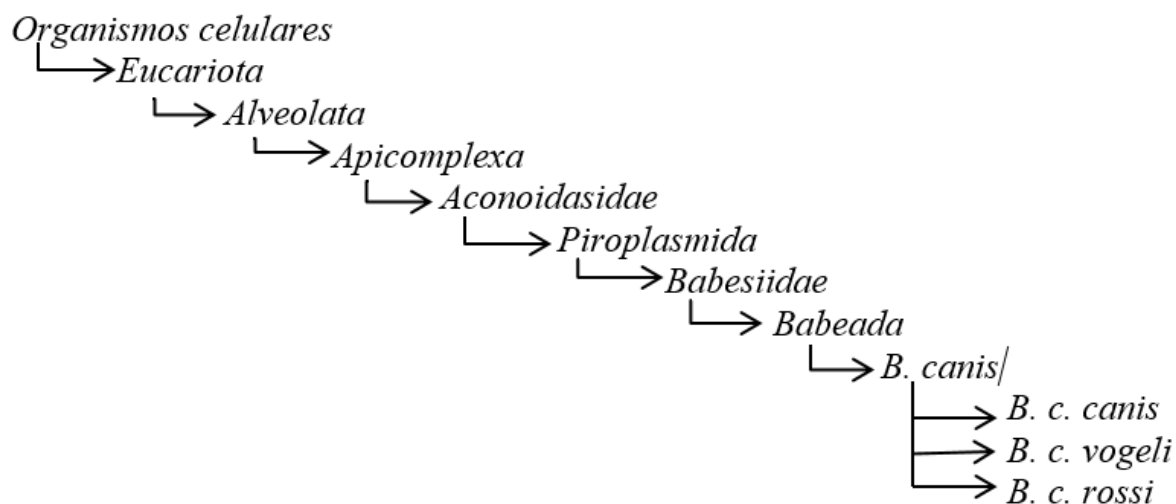


Figura 3. Linaje Taxonómico de *Babesia canis*. Datos tomados de *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Antes de la aplicación de metodologías moleculares, la clasificación de los piroplásmidos se basaba principalmente en la morfología y las características biológicas como el sitio donde se cumple la esquizogonia, para establecer diferencias taxonómicas entre *Babesia* y *Theileria* (Levine, 1988); sin embargo, la filogenia molecular basada en el análisis del gen 18s rRNA ha permitido seguir los linajes de *Babesia* spp. hasta su ancestro más antiguo. En la actualidad se han logrado determinar seis linajes o cladas de piroplásmidos mayores, ubicando a *B. canis* y *B. gibsoni* en la clada 6. Éste es el grupo más numeroso e incluye hemoparásitos tipo *Babesia* que infectan otros mamíferos como osos, roedores de campo, pumas, mapaches e incluso algunos ungulados, es el caso de *B. divergens*, *B. odocoilei*, *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. caballi* y *B. ovis* (Schnittger, Rodríguez, Florin-Christensen y Morrison, 2012).

Hasta el momento a nivel mundial no se ha reportado la secuenciación del genoma completo de *B. canis* ni de sus sub especies, pero si se ha hecho en otra *Babesias* es el caso de *B. bigemina*, *B. bovis*, *B. microti* y *B. equi*. Sin embargo, existen varios reportes de secuenciación parcial del gen 18 s rRNA; en la tabla 5 se resumen las longitudes de las secuencias parciales reportadas para las tres subespecies de *B. canis*.

Tabla 5

Secuencias del gen ribosomal 18s rRNA de las subespecies de B. canis reportadas. Datos tomados de National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Sub especie	Longitud (pb)	Número de reportes
<i>B. c. canis</i>	272-1714	41
<i>B. c. rossi</i>	437-1418	10
<i>B. c. vogeli</i>	174-1713	66

En el país, Vargas-Hernández et al. (2012) reportaron la primera detección de *B. c. vogeli* a través del uso de herramientas moleculares como PCR, secuenciación y análisis filogenético; dicho estudio reportó alta similitud (99%) entre las secuencias de las muestras analizadas de campo con las reportadas en Suráfrica (AF547387), Venezuela (DQ297390) y Brasil (EF636702) (Figura 4).

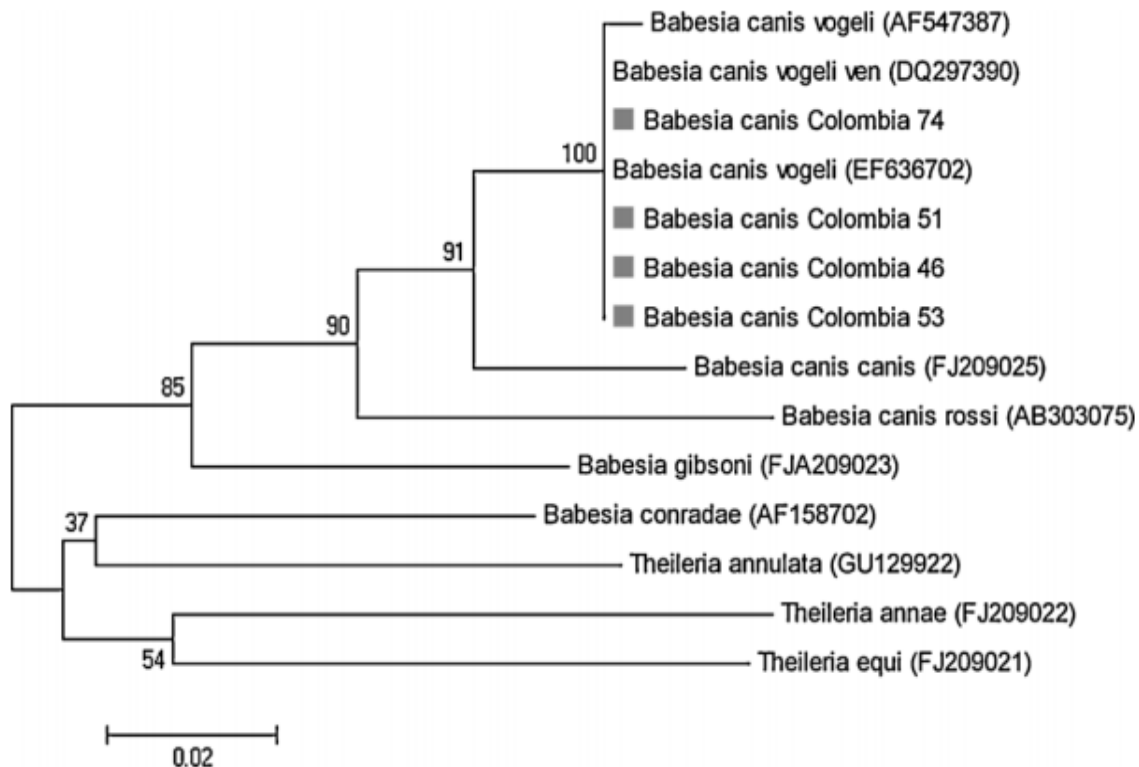


Figura 4. Posición filogenética de *B. c. vogeli* encontrada en sangre de perros de Colombia basado en la secuencia del gen 18 s rRNA y metodología de unión de vecinos o *Neighbor-joining* (400pb). Tomado de Vargas-Hernández et al. (2012).

Este estudio abre la puerta a otras investigaciones que por medio del uso de herramientas moleculares busquen detectar la presencia del agente en otras regiones de Colombia, validando las metodologías desarrolladas en otros contextos, que adicionalmente fortalezcan el conocimiento relacionado con la distribución y la presencia del agente. Los resultados de estas investigaciones enriquecerán la información científica disponible de *Babesia* para Colombia. Así mismo, permitirán validar una metodología que puede tener posible aplicación en la vigilancia epidemiológica de otras sub especies de *B. canis* que podrían ingresar al país, como es el caso de *B. c. canis* y *B. c. rossi* consideradas actualmente exóticas.

Objetivos

Objetivo General

1. Caracterizar secuencias parciales de nucleótidos a través de la detección del gen de la subunidad pequeña del rDNA (ssu-r DNA) de *B. canis* obtenidas de extracciones de ADN de muestras de sangre de caninos con diagnóstico presuntivo de hemoparasitismo, a través de herramientas moleculares.

Objetivos Específicos

2. Identificar la presencia de *B. canis* en extracciones de ADN procedentes de muestras de sangre de caninos originarios de la ciudad de Ibagué con diagnóstico presuntivo de hemoparasitismo, a través de la detección del gen de la subunidad pequeña del rDNA (ssu-rDNA).
3. Secuenciar los nucleótidos de los amplicones obtenidos de las detecciones positivas por PCR al gen ssu-rDNA de *B. canis*.
4. Analizar las características genéticas de las secuencias obtenidas, a través del uso de herramientas bioinformáticas y bases de datos.

Materiales y métodos

Muestras y pacientes

Esta investigación corresponde a un estudio transversal observacional no experimental con muestreo por conveniencia. Las muestras fueron obtenidas de sangre con EDTA del estudio previo de López (2016) y preservadas a 70°C en el banco de tejidos y ADN para estudios moleculares del laboratorio GENMEJOR de la Universidad de La Salle. En dicho estudio se seleccionaron 50 caninos: 40 con signos clínicos compatibles con Ehrlichiosis Monocítica Canina (EMC) y 10 sin signos clínicos. En esta investigación previa se evaluó la presencia de ADN de *E. canis* a través de PCR con dos juegos de iniciadores (uno que identifica el género *Ehrlichia* y otro para la especie *E. canis*).

Análisis moleculares

Las muestras seleccionadas para este estudio fueron sometidas a extracción de ácidos nucleicos y se les realizó PCR para la detección de *B. canis* se empleó el protocolo descrito por Martín, Dunstain, Roberts y Brown, (2006). Los productos obtenidos fueron secuenciados y analizados a través de herramientas bioinformáticas. Adicionalmente se contó con controles positivos obtenidos a partir de muestras de sangre de caninos infectados experimentalmente con *B. canis* en un estudio previo (Rodríguez-Mallon et al., 2013). El control negativo correspondió a una extracción de sangre de un canino infectado experimentalmente con *E. canis* por el mismo grupo de investigadores. El estudio se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio GENMEJOR de la Universidad de La Salle Sede Norte en la Ciudad de Bogotá.

Extracción de ácidos nucleicos. La extracción de ADN se realizó a partir de las muestras de sangre entera obtenida por López (2016). Para la extracción de DNA se utilizó el

kit comercial específico para muestras de sangre QIAamp DNA Mini Kit® (Qiagen, Valencia, California, USA), siguiendo el protocolo recomendado por la casa matriz Qiagen®.

Selección de iniciadores. Para la selección del grupo de iniciadores que se empleó en el estudio, se evaluó la especificidad del apareamiento a la secuencia diana de iniciadores reportados previamente en la literatura y denominados como *Piro A* y *Piro B* (Carret et al., 1999) y *Bab-f* y *Babesia common* (Martin et al. 2006; y Kordick, et al., 1999). Estos iniciadores fueron diseñados para la detección del gen de la ssu-rDNA 18S de *B. canis*. Las secuencias junto con los tamaños de productos esperados se muestran en la tabla 6. La especificidad del apareamiento a la secuencia diana fue evaluada a través de la herramienta “*Nucleotide BLAST*” disponible en la página web del NCBI, la cual permite calcular el porcentaje de similitud de una secuencia de nucleótidos (en este caso un cebador) a cadenas de ADN previamente reportadas. La finalidad del uso de esta herramienta fue determinar cuál de los cebadores disponibles tiene mayor afinidad con la cadena de ácidos nucleicos de la ssrDNA de *Babesia* spp. debido a que una mayor similitud entre el iniciador y la secuencia buscada se traduce en mayor probabilidad de identificación positiva del agente.

Para la estandarización del protocolo de PCR convencional y con el objetivo de seleccionar un grupo de iniciadores que se hibridara de forma específica a la secuencia de ADN de interés, se realizaron experimentos previos con base en los reportes de Carret et al. (1999) y Martín et al., (2006). De esta forma, se realizó un primer experimento con el protocolo utilizado por Carret et al. (1999), para evaluar la afinidad de los iniciadores *Piro A* y *Piro B*. El ADN utilizado para la prueba fue extraído de muestras de sangre de los siguientes animales: un canino infectado experimentalmente con *B. canis* por Rodríguez et al. (2013) (C+), paciente positivo por frotis sanguíneo a *B. canis* en fase aguda (C1) y un paciente positivo por IFI en fase crónica (C2). Se realizó una segunda prueba en la cual se utilizó

gradiente de temperatura. El ensayo buscó identificar la temperatura adecuada que permitiera la hibridación específica de las hebras sencillas del ADN de interés con los iniciadores. Una tercera prueba fue realizada en la cual, al igual que en la primera, se evaluó en protocolo empleado por Martín et al., (2006) y con los iniciadores *Bab-f* y *Babesia common*, las muestras para esta prueba fueron las mismas empleadas para la primera prueba. Con base en los resultados de la fase de estandarización de la técnica, se seleccionaron los iniciadores *Bab f* y *Babesia common*.

Tabla 6

Secuencias de iniciadores que se evaluaron en el estudio.

Iniciador	Secuencia	Tamaño esperado (pb)	Referencia
<i>Piro A</i>	AATACCCAATCCTGACACAGGG	397	Carret et al.(1999)
<i>Piro B</i>	TTAAATACGAATGCCCCAAC		
<i>Bab-f</i>	AAGTACAAGCTTTTTACGGTG		
<i>Babesia common</i>	CCTGTATTGTTATTTCTTGTCACT ACCTC	394	Martin et al.(2006); Kordick et al.(1999)

Reacción en cadena de polimerasa (por sus siglas en inglés PCR). Se amplificaron fragmentos de *B. canis* de 400 y 394 bp del gen *ssu-rDNA* por medio del uso de los cebadores *Piro A* y *Piro B* y *Bab f* y *Babesia common* descritas en la sección anterior y reportadas previamente (Carret et al., 1999; Martín et al., 2006; Kordick et al., 1999). El volumen final de reacción de PCR fue de 50 µl con las siguientes concentraciones de reactivos: 1 µM de cada iniciador (*upstream* y *downstream primer*), 1,25 U Taq polimerasa, 30 µM Tris-HCl, 3 µM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP y 4 µl de ADN. Para el set de cebadores *Piro A* y *Piro B*, las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador (Bio-Rad C1000®, California, USA) con las

siguientes condiciones: 94 °C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto y 72 °C por 1 minuto. Para el grupo de iniciadores *Bab f* y *Babesia common* se emplearon las siguientes condiciones: 95 °C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos. El tamaño de los productos fue confirmado por electroforesis en geles de agarosa al 0,8% teñidos con el marcador comercial Hydragreen[®] (ACTGene, Piscataway, New Jersey, USA) y su posterior visualización en un espectrofotómetro de luz UV.

Secuenciación de ácidos nucleicos. Los productos de PCR positivos fueron enviados para secuenciación a la empresa Macrogen Inc. (Corea), donde utilizaron el kit *Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* y un secuenciador ABI3730XL. El producto de PCR no purificado se trabajó a una concentración de 100ng/μL y un volumen de 50μL por reacción. La purificación se llevó a cabo por medio de precipitación alcohólica para remover moléculas pequeñas como dNTPs y residuos de iniciadores sobrantes de la PCR.

Análisis de las secuencias y construcción de árboles filogenéticos. La edición y análisis de las secuencias de nucleótidos se realizó por medio de la comparación con secuencias reportadas en el GenBank usando las herramientas básicas locales de alineamiento (BLAST) y los programas *Biological Sequence Alignment Editor* (Bioedit[®], Carlsbad, California, USA) y *Molecular Evolutionary Genetics Analysis 6* (MEGA 6[®], DNASTar Inc., Madison, Wisconsin, USA). Con el programa Bioedit[®] se realizó la edición manual de las secuencias obtenidas. Con el programa MEGA[®] se realizaron los alineamientos de las secuencias del presente estudio junto con las reportadas en las bases de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) para la obtención de secuencias homólogas antes de la construcción del árbol filogenético. Para la construcción del árbol filogenético se empleó el método de distancias llamado “unión de vecinos” o en inglés *neighbor-joining*; así

como, el algoritmo “prueba de arranque” o *bootstrap test* que genera 1000 réplicas de alineamientos a partir del original, eliminando al azar algunas posiciones en cada replica nueva. El número de posiciones se mantiene constante debido a que se adicionan secuencias repetidas de los sitios que han permanecido tras los análisis construyendo así el árbol filogenético. Al final del análisis, se evaluó el porcentaje de árboles en los que aparece cada nodo, donde los que tengan el valor de “prueba de arranque” más alto tienen mayor probabilidad de ser correctos lo que minimiza el azar al momento de publicar el árbol definitivo (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski y Kumar, 2013).

En este análisis se incluyeron secuencias de *Babesia canis* reportadas previamente en la literatura, al igual que secuencias de otros hemoparásitos transmitidos por vectores y detectados en sangre de caninos. Los números de identificación de la secuencias reportadas en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) incluidos en el análisis con su respectivo código de GenBank fueron: *B. c. vogeli*: AF547387, EF636702, JN368081, KJ93926, DQ439545, DQ297390, EU436752, DQ111766; *B. c. canis*: FJ209025; *B. c. rossi*: AB303075; *B. gibsoni*: FJ209023; *Babesia sp. Coco*: EU109716; *Anaplasma phagocytophilum*: KF576219; *A. platys*: KC989957; *E. canis*: JN368080; *H. canis*: AF418558; *Theileria anae*: FJ209022; *Theileria annulata*: GU129922; *Theileria equi*: FJ209021y *Rangelia vitalii*KT323926.

Resultados

Análisis bioinformático y selección de iniciadores

Tanto los iniciadores *Piro A* y *Piro B* como *Bab f* y *Babesia common* mostraron una alta afinidad con el agente, siendo 100% para *Piro B*, *Bab f* y *Babesia common*, mientras que para *Piro A* fue entre 90 y 100%. En la tabla 7, se muestra el porcentaje de similitud de los iniciadores evaluados y las secuencias con las que se compararon.

Tabla 7

Porcentaje de afinidad de los *iniciadores* evaluados y algunas secuencias contra las que se compararon.

Cebador	Agente	Código GenBank	Afinidad (%)
<i>Piro A</i>	<i>B. canis</i>	KJ696714.1	100
	<i>B. c. vogeli</i>	KP719089.1	90
	<i>Babesia</i> sp	AB935336.1	
		KP410274.1	
<i>Piro B</i>	<i>B. c. vogeli</i>	KP864657.1	100
	<i>B. c. canis</i>	KP745630.1	
	<i>Babesia</i> sp	KP410282.1	
<i>Bab f</i>	<i>B. c. vogeli</i>	KJ939326.1	100
	<i>B.c. canis</i>	HQ662634.1	
	<i>B. c. rossi</i>	DQ111760.1	
<i>Babesia common</i>	<i>B. c. canis</i>	KJ513201.1	100
	<i>B. c. vogeli</i>	KP719089.1	
	<i>B. c. rossi</i>	KC453992.1	

Estandarización de la PCR convencional y electroforesis

En la primera prueba se realizó una PCR convencional en la cual se identificó el producto esperado en el gel de electroforesis (Figura 5A); en esta prueba fueron evidentes bandas inespecíficas. Para la segunda prueba de PCR, esta vez con gradiente de temperatura. Los resultados de este experimento se muestran en figura 5B, donde a pesar de que las muestras fueron positivas con un producto entre 400 y 500 pb todavía era evidente la presencia de bandas inespecíficas. También se realizó la prueba con los iniciadores *Bab-f* y *Babesia common* y el protocolo utilizado por Martin et al., (2006). En este ensayo todas mostraron positividad con una banda de aproximadamente 400 pb. Las muestras C+ y C1 con una banda bien definida y mientras que la muestra C2 con presentó una banda tenue (Figura 5C), no se observaron bandas inespecíficas, por lo que se decidió utilizar para este estudio el protocolo planteado por Martin et al., (2006).

Con estos iniciadores y el protocolo utilizado por Martín et al. (2006) se procesaron las 50 muestras de estudio. Se obtuvieron cuatro detecciones moleculares (figura 6), las cuales fueron identificadas con los códigos internos BabULS1, BabULS2 y BabULS3 y BabULS4. En la tabla 8 se muestran los resultados por PCR para *B. canis* y se enfrentan con los hallazgos obtenidos previamente por López (2016) y los hallazgos en la historia clínica de los pacientes positivos. Los cuatro productos de PCR positivos fueron enviados a secuenciación.

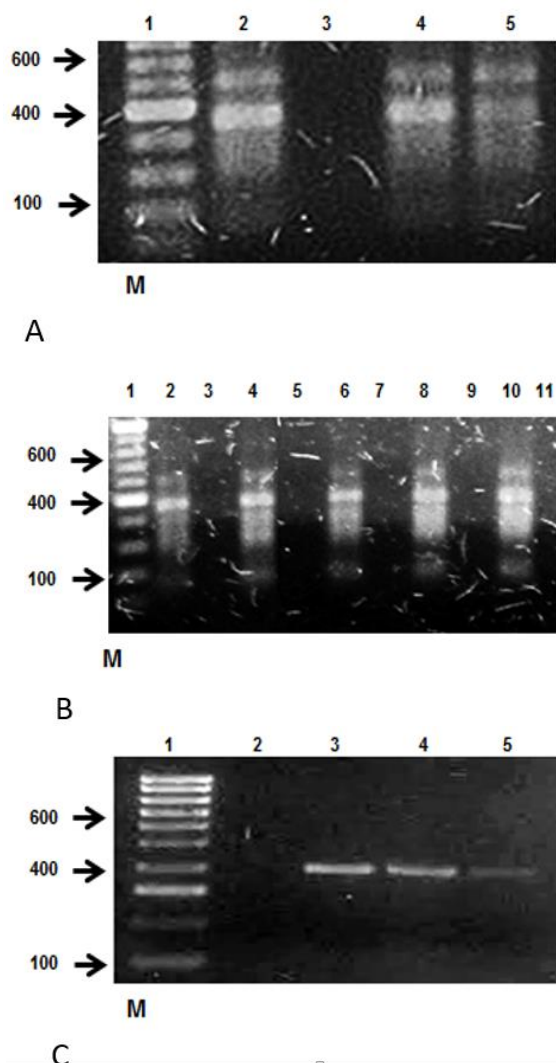


Figura 5. Electroforesis de las pruebas de estandarización de la PCR convencional para la detección de *B. canis*. Se utilizó el marcador de peso molecular de 100 pb (Promega®). **A.** Protocolo tomado de Carret et al. (1999), iniciadores *Piro A* y *Piro B*. El tamaño esperado es de 400pb. 1: marcador de peso molecular (M); 2: control positivo (C+); 3: control negativo (C-); 4: Paciente positivo a *B. canis* en fase aguda (C1); 5: Paciente positivo a *B. canis* en fase crónica (C2). **B.** PCR con gradiente de temperatura, donde 1: M; 2: 52 °C; 3: C- a 52 °C; 4: 53,9 °C; 5: C- a 53,9 °C; 6: 58,1 °C; 7: C- a 58,1°C; 8: 60 °C; 9: C- 60 °C; 10: 62 °C; 11: C- a 62°C. **C.** Protocolo tomado de Martín et al. (2006), iniciadores *Bab f* y *Babesia common*, donde 1: M; 2: C-; 3: C+; 4: C1; 5: C2.

Tabla 8

Comparación entre las muestras positivas a *Babesia canis* y sus hallazgos en la historia clínica. También se muestran los resultados para *Ehrlichia canis* por PCR. Los datos fueron obtenidos de López (2016).

Muestra	Signos clínicos	Hallazgos al hemograma	PCR <i>E. canis</i>
BabULS1	Fiebre, anorexia, linfadenopatía, petequias	Trombocitopenia, linfopenia relativa y neutrofilia realtiva	Positivo
BabULS2	Adelgazamiento progresivo, membranas mucosas pálidas, hipotermia, taquicardia y taquipnea	Anemia moderada normocítica-normocrómica, eosinofilia relativa	Negativo
BabULS3	Perdida ponderal, linfadenopatía, taquicardia, fiebre y membranas mucosas pálidas	Leucocitosis leve	Positivo
BabULS4	Ascitis, taquipnea, perdida ponderal y membranas mucosas pálidas	Anemia leve normocítica-normocrómica	Negativo

Análisis de secuencias

Se obtuvieron cuatro secuencias con un tamaño promedio de 344 pb (tabla 9). Al comparar las cuatro secuencias con el recurso BLAST, se obtuvo la siguiente secuencia consenso:

```
3'CAGATTCAATGGATAACCGTGCTAATTGTAGGGCTAATACACGTTTGAGGTCTTTGACCGCGTTT
ATTAGTTTGAAACCCGCTTGGCTTCGGTGATTTCATAATAAACTGGCGAATCGCATTAGCGATGGA
CCATTCAAGTTTCTGACCCATCAGCTTGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGAGGCAGCAACGGGTAA
CGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCA
GCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAAACAATACAGGATA-5'
```

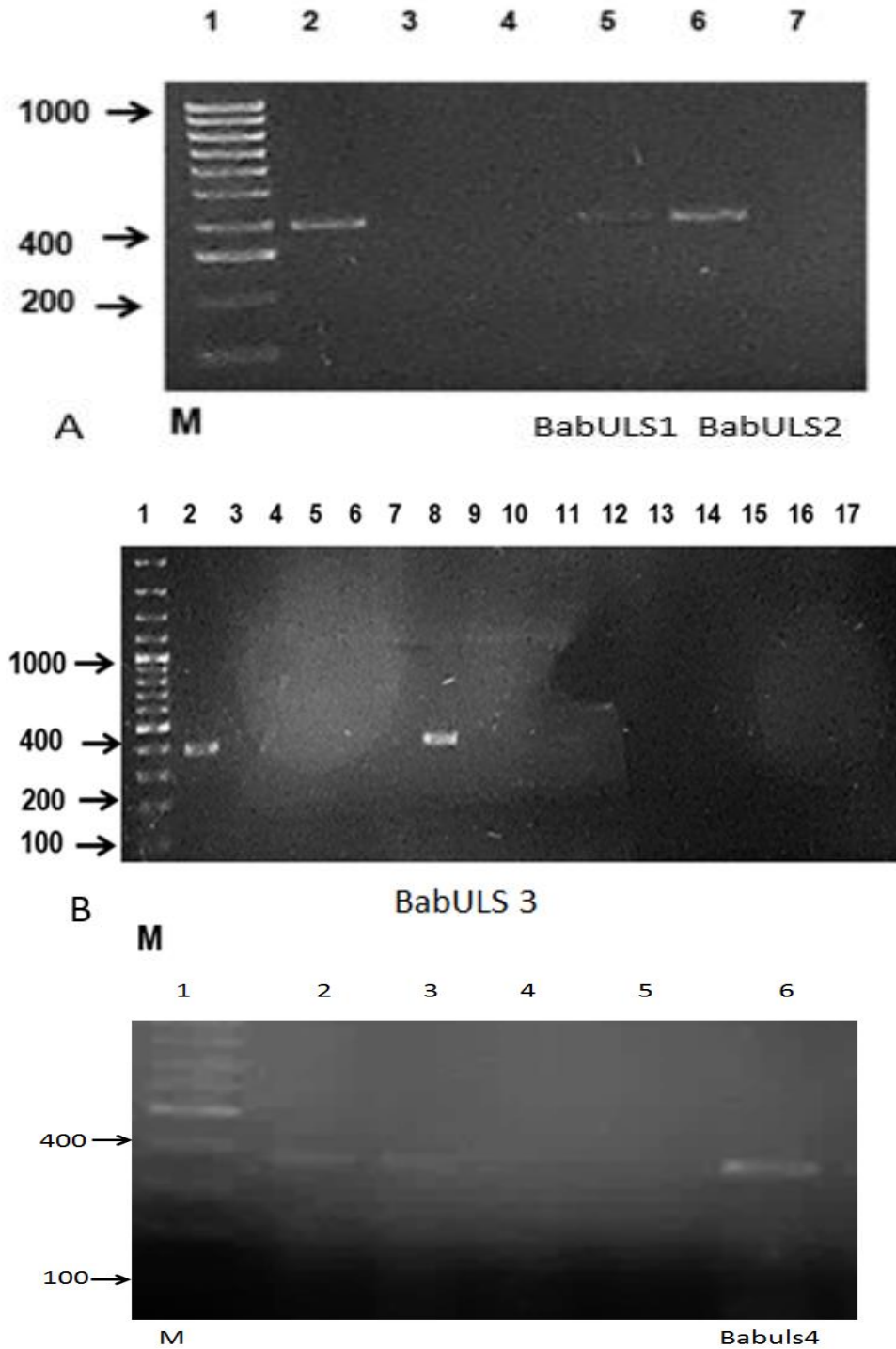


Figura 6. Imagen representativa de la PCR para la detección de *B. canis*. Se utilizó el marcador de peso molecular de 100 pb (Promega®). El tamaño esperado es de 400pb. **A.** Marcador de peso molecular (M); 2: control positivo; 3: control negativo; 6 y 7detecciones positivas **B.** Marcador de peso molecular (M); 2: control positivo; 3: control negativo; 8

detección positiva C. Marcador de peso molecular (M); 2 y 3 control positivo; 4: control negativo; 6 detección positiva.

Tabla 9

Secuencias del gen ssu-rDNA de las cepas de B. canis detectadas en el estudio.

Nombre	Secuencia	Tamaño (pb)
BabULS 1	TTATAGTTTATTTGGTATTCAGATTCAATGGATAACCGTGCTAAT TGTAGGGCTAATACACGTTTGAGGTCTTTTGACCGCGTTTATTAG TTTGAAACCCGCCTTGGCTTTCGGTGATTTCATAATAAACTGGCGA ATCGCATTTAGCGATGGACCATTCAAGTTTCTGACCCATCAGCTT GACGGTAGGGTATTGGCCTACCGAGGCAGCAACGGGTAACGGGG AATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTACC ACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGAC ACAGGGAGGTAGTGACAAGAAAACAATACAGGATA	348
BabULS 2	CGTTATAGTTTATTTGGTATTCAGATTCAATGGATAACCGTGCTA ATTGTAGGGCTAATACACGTTTGAGGTCTTTTGACCGCGTTTATT AGTTTGAAACCCGCCTTGGCTTTCGGTGATTTCATAATAAACTGGC GAATCGCATTTAGCGATGGACCATTCAAGTTTCTGACCCATCAGC TTGACGGTAGGGTATTGGCCTACCGAGGCAGCAACGGGTAACGG GGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTA CCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTG ACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAAACAAAATACAGATA	350
BabULS 3	TACACAGATTCAATGGATAACCGTGCTAATTGTAGGGCTAATAC ACGTTTGAGGTCTTTTGACCGCGTTTATTAGTTTGAAACCCGCCTT GGCTTTCGGTGATTTCATAATAAACTGGCGAATCGCATTTAGCGAT GGACCATTCAAGTTTCTGACCCATCAGCTTGACGGTAGGGTATTG GCCTACCGAGGCAGCAACGGGTAACGGGGAATTAGGGTTCGATT CCGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTACCACATCTAAGGAAGG CAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTG ACAAGAAATAACAATACAGGATA	334
BabULS 4	GTATATTTGGTATTCAGATTCAATGGATAACCGTGCTAATTGTAG GGCTAATACACGTTTGAGGTCTTTTGACCGCGTTTATTAGTTTGA AACCCGCCTTGGCTTTCGGTGATTTCATAATAAACTGGCGAATCGC ATTTAGCGATGGACCATTCAAGTTTCTGACCCATCAGCTTGACGG TAGGGTATTGGCCTACCGAGGCAGCAACGGGTAACGGGGAATTA GGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTACCACATC TAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGG GAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAGGA	342

Posteriormente se realizó el análisis de la ubicación de esta secuencia en una cadena parcial larga de *B. canis* reportada en el GenBank con el código HM590440.1 con una extensión de 1677 pb. La secuencia obtenida por este estudio se ubicó en el espacio comprendido entre el nucleótido 121 y 435 como se muestra en la figura 7. Mientras que en la figura 8 y 9 se ubican los cebadores utilizados por este estudio y los iniciadores utilizados por Vargas-Hernández et al., (2012), respectivamente.

```

1      gttgatcctg ccagtagtca tatgcttgtc ttaaagatta agccatgcat gtctaagtac
61     aagcttttta cggtgaaact gcgaatggct cattacaaca gttatagttt atttgggtatt
121    cagattcaat ggataaccgt gctaattgta gggctaatac acgtttgagg tcttttgacc
181    gcgtttatta gtttgaaacc cgccttggct ttcggtgatt cataataaac tggcgaatcg
241    catttagcga tggaccattc aagtttctga cccatcagct tgacggtagg gtattggcct
301    accgaggcag caacgggtaa cggggaatta gggttcgatt ccggagaggg agcctgagag
361    acggctacca catctaagga aggcagcagg cgcgcaaatt acccaatcct gacacagggā
421    ggtagtgaca agaaataaca atacagggct aatgtcttgt aattggaatg atggtgacc
481    aaaccctcac cagagtagca attggagggc aagtctggtg ccagcagccg cggtaattcc
541    agctccaata gcgtatatta aacttggtgc agttaaaaag ctcgtagttg aatthtagcg
601    tgttcgagtt tgccattcgt ttggcttttt cgagttcgtt tttgggtttt ccttttttac
661    tttgagaaaa ttagagtgtt tcaagcagac ttttgtcttg aatacttcag catggaataa
721    tagagtagga ctttggttct attttggttg ttattgaacc ttagtaatgg ttaataggaa
781    cggttggggg cattcgtatt taactgtcag aggtgaaatt cttagatttg ttaaagacga
841    actactgcga aagcatttgc caaggacgtt tccattaatc aagaacgaaa gttaggggat
901    cgaagacgat cagataccgt cgtagtccca accataaacc atgccgacta gtgattggag
961    gtcgtcgttt tgctgacccc ttcaggaact tgagagaaat caaagtcttt gggttctggg
1021   gggagtatgg tcgcaaggct gaaacttaa ggaattgacg gaagggcacc accaggcgtg
1081   gagcctgcgg cttaatttga ctcaacacgg ggaaactcac caggtccaga caaacggtag
1141   gattgacaga ttgatagctc tttcttgatt ctttgggtgg tggtgcatgg ccgttcttag
1201   ttggtggagt gatttgtctg gtttaattccg ttaacgaacg agacctaac ctgctaacta
1261   gcggcgggta ctgtggtttc cggttgcttc ttagagggac tttggggctc taagccctga
1321   ggaagttaa ggcaataaca ggtctgtgat gcccttagat gtcctgggct gcacgcgcgc
1381   tacactgatg cattcatcga gttgttccct ggccgagagg tcttggtaat ctttagtatg
1441   catcgtgacg gggattgatt tttgcaattc taaatcatga acgaggaatg cctagtatgc
1501   gcaagtcatc agcttgtgca gattacgtcc ctgccctttg tacacaccgc ccgtcgtccc
1561   taccgatcga gtgatccggt gaattattcg gactgtggct tttccgattc gtcggtttag
1621   cttcggaaag ttttgtgaac cttatcactt aaaggaagga gaagtcgtaa caagggtt

```

Figura 7. Ubicación de la secuencia consenso en una cadena reportada de 1677 pb, reportada en el Gen Bank código HM590440.1 para *B. c. vogeli*. Nótese la ubicación de la secuencia en el espacio comprendido entre el nucleótido 121 y el 435.

Utilizando la herramienta BLAST se identificó que las secuencias obtenidas mostraron un 99% de similitud con aislamientos de *B. c. vogeli* de Venezuela (DQ297390.1), España (DQ439545.1), Brasil (EU436752.1), China (KJ939326.1) y Sudan (DQ111766.1).

Las secuencias obtenidas y las secuencias de referencia mencionadas anteriormente fueron comparadas por medio de la construcción de un gráfico de diferencias porcentuales y un árbol filogenético y se muestran en la figura 10 y 11 respectivamente. Los productos también mostraron 99,9% de similitud con aislamientos de Estados Unidos *B. coco* (EU109716), *B. c. vogeli* de Venezuela (DQ297390.1), España (DQ439545.1), Brasil (EU436752.1) y Sudan (DQ111766.1).

```

1   gttgatcctg ccagtagtca tatgcttgtc ttaaagatta agccatgcat gtctaagtac
61  aagcttttta cggtgaaact gcgaatggct cattacaaca gttatagttt atttggatt
121 cagattcaat ggataacogt gctaattgta gggctaatac acgtttgagg tcttttgacc
181 gcgtttatta gtttgaaacc cgccttggct ttoggtgatt cataataaac tggcgaatcg
241 catttagcga tggaccatcc aagtttctga cccatcagct tgaocgtagg gtattggcct
301 accgaggcag caacgggtaa cggggaatta gggttcgatt cgggagaggg agcctgagag
361 acggctacca catctaagga aggcagcagg cgcgcaaatt acccaatcct gacacagggä
421 ggtagtgaca agaaataaca atacagggct aatgtcttgt aattggaatg atggtgacc
481 aaaccctcac cagagtagca attggagggc aagtctggtg ccagcagccg cggtaattcc
541 agctccaata gcgtatatta aacttggtgc agtataaaag ctcgtagttg aattttagcg
601 tgttcgagtt tgccattcgt ttggcttttt cgagtcgct tttgggtttt ccctttttac
661 tttgagaaaa ttagagtgtt tcaagcagac tttgtcttg aatacttcag catggaataa
721 tagagtagga ctttggttct attttggttg ttattgaacc ttagtaatgg ttaatagga
781 cggttggggg cattcgtatt taactgtcag aggtgaaatt cttagatttg ttaaagacga
841 actactgcga aagcatttgc caaggacgct tccattaatc aagaacgaaa gttaggggat
901 cgaagacgat cagataacgt cgtagtccta accataaacc atgccgacta gtgattggag
961 gtcgtcgttt tgctgacccc ttcaggaact tgagagaaat caaagtcttt gggttctggg
1021 gggagtatgg tcgcaaggct gaaacttaa ggaattgacg gaagggcacc accaggcgtg
1081 gagcctgcgg cttaatttga ctcaacacgg ggaactcac caggtccaga caaacggtag
1141 gattgacaga ttgatagctc tttcttgatt ctttgggtgg tgggtgcatgg ccgttcttag
1201 ttggtggagt gatttgtctg gttaattccg ttaacgaacg agacctaac ctgctaacta
1261 gcggcggtta ctgtggtttc cggttgcttc ttagagggac tttggggctc taagccctga
1321 ggaagttaa ggcaataaca ggtctgtgat gcccttagat gtccctgggt gcacgcgcgc
1381 tacactgatg cattcatcga gttgttccct ggccgagagg tcttggtaat ctttagtatg
1441 catcgtgacg gggattgatt tttgcaattc taaatcatga acgaggaatg cctagtatgc
1501 gcaagtcatc agcttgtgca gattacgtcc ctgccctttg tacacaccgc ccgtcgtcc
1561 taccgatcga gtgatccggg gaattattcg gactgtggct tttccgatto gtcggttag
1621 cttcgaaag ttttgtgaac cttatcactt aaaggaagga gaagtcgtaa caaggt

```

Figura 8. Ubicación de las secuencias correspondientes a los iniciadores *Bab f* entre el

nucleótido 55 al 75 y *Babesia common* entre el nucleótido 359 al 447 en una cadena de 1677 pb, reportada en el Gen Bank código HM590440.1 para *B. c. vogeli*.

```

1   gttgatcctg ccagtagtca tatgcttgtc ttaaagatta agccatgcat gtctaagtac
61  aagcttttta cggtgaaact gcgaatggct cattacaaca gttatagttt atttgggtatt
121 cagattcaat ggataaccgt gctaattgta gggctaatac acgtttgagg tcttttgacc
181 gcgtttatta gtttgaaacc cgccttggct ttoggtgatt cataataaac tggcgaatcg
241 catttagcga tggaccatte aagtttctga cccatcagct tgacggtagg gtattggcct
301 accgaggcag caacgggtaa cggggaatta gggttcgatt cgggagaggg agcctgagag
361 acggctacca catctaagga aggcagcagg cgcgcaaatt acccaatcct gacacagggg
421 ggtagtgaca agaaataaca atacagggct aatgtcttgt aattggaatg atggtgacct
481 aaaccctcac cagagtagca attggagggc aagtctggtg ccagcagccg cggtaattcc
541 agctccaata gcgtatatta aacttggtgc agttaaaaag ctcgtagttg aattttagcg
601 tgttcgagtt tgccattcgt ttggcttttt cgagttcgct tttgggtttt ccctttttac
661 tttgagaaaa ttagagtgtt tcaagcagac ttttgtcttg aatacttcag catggaataa
721 tagagtagga ctttggttct attttgttgg ttattgaacc ttagtaatgg ttaataggaa
781 cggttggggg cattcgtatt taactgtcag aggtgaaatt cttagatttg ttaaagacga
841 actactgcga aagcatttgc caaggacgtt tccattaatc aagaacgaaa gttaggggat
901 cgaagacgat cagataccgt cgtagtccta accataaacc atgccgacta gtgattggag
961 gtcgtcgttt tgctgacccc ttcaggaact tgagagaaat caaagtcttt gggttctggg
1021 gggagtatgg tcgcaaggct gaaacttaaa ggaattgacg gaagggcacc accaggcgtg
1081 gagcctgcgg cttaatttga ctcaacacgg ggaaactcac caggtccaga caaacggtag
1141 gattgacaga ttgatagctc tttcttgatt ctttgggtgg tgggtgcatgg ccgttcttag
1201 ttggtggagt gatttgtctg gttaattccg ttaacgaacg agacctaac ctgctaacta
1261 gcggcggtta ctgtggtttc cggttgcttc ttagagggac tttggggctc taagccctga
1321 ggaagtttaa ggcaataaca ggtctgtgat gcccttagat gtccctgggct gcacgcgcgc
1381 tacactgatg cattcatcga gttgttcctt ggccgagagg tcttggtaat ctttagtatg
1441 catcgtgacg gggattgatt tttgcaattc taaatcatga acgaggaatg cctagtatgc
1501 gcaagtcatc agcttgtgca gattacgtcc ctgccctttg tacacaccgc ccgtcgctcc
1561 taccgatcga gtgatccggt gaattattcg gactgtggct tttccgattc gtcggtttag
1621 cttcggaaaag ttttgtgaac cttatcactt aaaggaagga gaagtcgtaa caaggtt

```

Figura 9. Ubicación de las secuencias correspondientes los iniciadores reportados por Vargas-Hernández et al. (2012). *Piro A* ubicado entre los nucleótidos 390 a 420 y *Piro B* entre 782 y 803, en una secuencia de 1677 pb, reportada en el Gen Bank código HM590440.1 para *B. c. vogeli*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1. BabULS_1																							
2. BabULS_2	0.011																						
3. BabULS_3	0.041	0.029																					
4. BabULS_4	0.106	0.092	0.105																				
5. JN368081.1_Colombia_Babesia_canis_vogeli	1.072	1.037	1.021	1.160																			
6. KF576219.1_Anapiasma_phaococytophilum	1.408	1.380	1.393	1.454	1.135																		
7. KC989957.1_Anapiasma_platyis	1.465	1.434	1.384	1.517	1.137	0.026																	
8. JN368080.1_Ehrlichia_canis	1.358	1.332	1.294	1.355	1.077	0.091	0.091																
9. AF418558.1_Hepatozoon_canis	1.229	1.187	1.168	1.270	1.254	1.257	1.259	1.170															
10. EU109716.1_Babesia_sp._Coco	0.153	0.138	0.163	0.167	1.193	1.576	1.613	1.453	1.305														
11. AF547387.1_Babesia_canis_vogeli	1.032	0.998	1.058	1.184	0.017	1.169	1.170	1.136	0.271	1.119													
12. EF563702.1_Babesia_canis_vogeli	1.067	1.032	1.016	1.154	0.003	1.150	1.151	1.090	0.250	1.187	0.014												
13. FJ209025.1_Babesia_canis	1.122	1.085	1.069	1.212	0.050	1.219	1.233	1.137	0.259	1.259	0.063	0.047											
14. FJ209023.1_Babesia_gobsoni	1.159	1.121	1.103	1.232	0.084	1.264	1.266	1.140	0.247	1.290	0.097	0.081	0.085										
15. FJ209022.1_Theileria_gamiae	1.177	1.137	1.119	1.209	0.144	1.385	1.387	1.240	0.268	1.268	0.159	0.141	0.148	0.152									
16. FJ209021.1_Theileria_equi	1.284	1.239	1.218	1.307	0.180	1.393	1.382	1.269	0.248	1.377	0.195	0.176	0.185	0.182	0.195								
17. AB303075.1_Babesia_canis_rossi	1.192	1.152	1.125	1.237	0.107	1.127	1.118	1.044	0.276	1.294	0.121	0.104	0.114	0.114	0.201	0.191							
18. GU129922.1_Theileria_ammulata	1.242	1.210	1.189	1.236	0.211	1.370	1.373	1.267	0.240	1.343	0.227	0.207	0.235	0.216	0.222	0.151	0.203						
19. DQ297390.1_Babesia_canis_vogeli	0.112	0.099	0.122	0.032	1.269	1.543	1.613	1.498	1.396	0.146	1.186	1.262	1.327	1.349	1.323	1.436	1.353	1.356					
20. DQ439545.1_Babesia_canis_vogeli	0.112	0.099	0.122	0.032	1.269	1.543	1.613	1.498	1.396	0.146	1.186	1.262	1.327	1.349	1.323	1.436	1.353	1.356	0.000				
21. EU436752.1_Babesia_canis_vogeli	0.109	0.095	0.119	0.023	1.247	1.512	1.579	1.468	1.370	0.146	1.167	1.241	1.304	1.326	1.301	1.410	1.330	1.332	0.009	0.009			
22. DQ111766.1_Babesia_canis_vogeli	0.133	0.119	0.115	0.038	1.096	1.506	1.494	1.337	1.218	0.178	1.137	1.091	1.146	1.165	1.143	1.235	1.171	1.167	0.047	0.047	0.056		
23. KT323926_Rangella_vitali	1.252	1.209	1.209	1.326	0.193	1.335	1.351	1.237	0.336	1.416	0.208	0.189	0.189	0.204	0.275	0.245	0.202	0.258	1.446	1.446	1.419	1.252	

Figura 10. Gráfico de diferencias filogenéticas entre las secuencias de hemoparásitos registradas en el GenBank y las secuencias detectadas por este estudio (BabULS1, BabULS2, BabULS3 y BabULS4). Basado en secuencias parciales del gen 18S rRNA. Se empleó el método de distancias de “unión de vecinos”, y la prueba de arranque con 1000 réplicas para estimar el nivel de confianza de los patrones de ramificación del árbol.

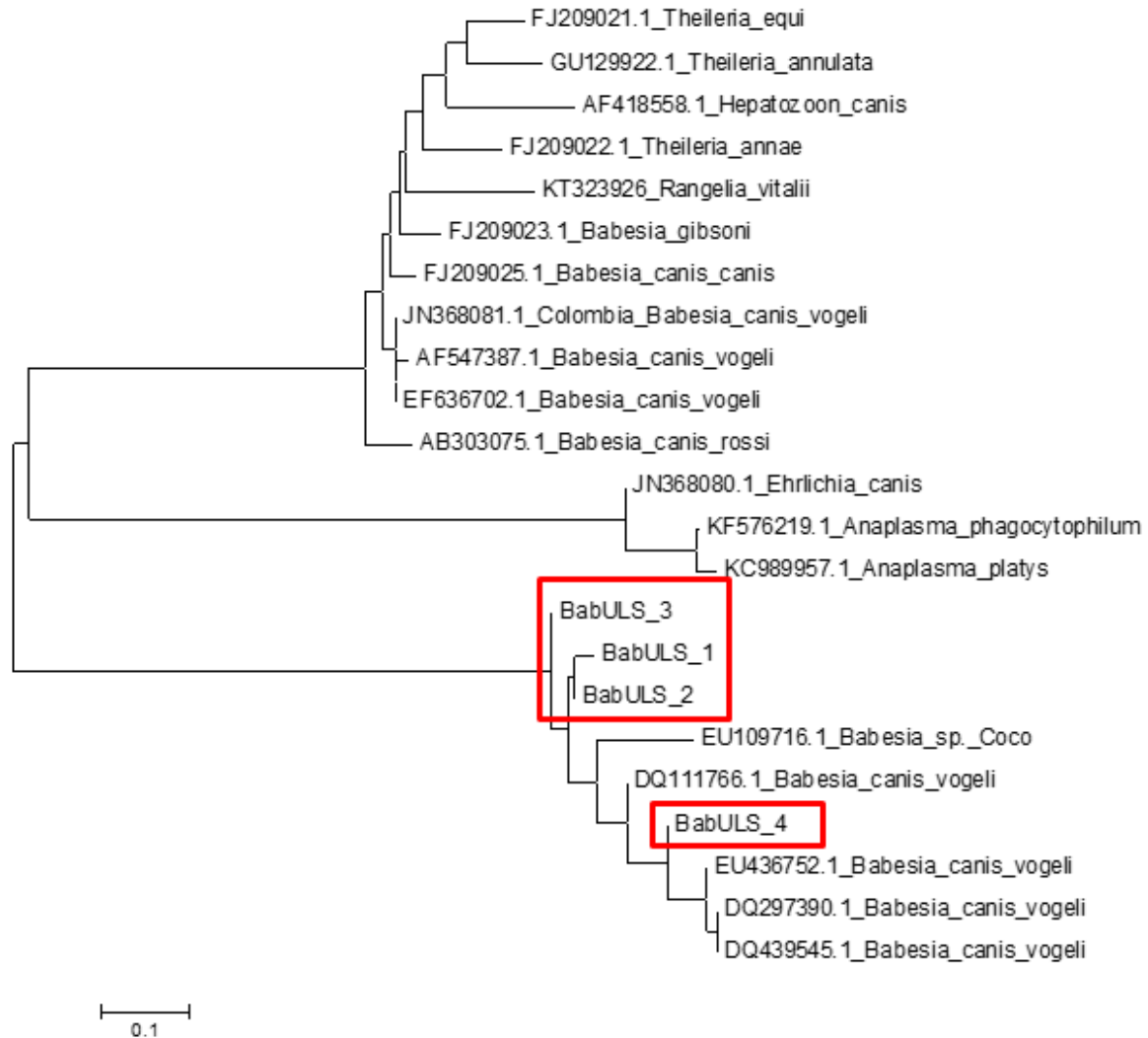


Figura 11. Relaciones filogenéticas entre las secuencias de hemoparásitos registradas en el GenBank y las secuencias detectadas por este estudio (BabULS1, BabULS2, BabULS 3 y BabULS 4), basado en secuencias parciales del gen 18S rRNA. Se empleó el método de distancias de “unión de vecinos” y “la prueba de arranque” con 1000 réplicas para estimar los patrones de ramificación del árbol.

Discusión

En el presente estudio se logró a través de herramientas moleculares obtener y analizar las secuencias parciales de nucleótidos de cuatro aislamientos de *B. canis* obtenidas de extracciones de ADN de muestras de sangre canina con diagnóstico presuntivo de hemoparasitismo provenientes de la ciudad de Ibagué (Colombia). Según Vargas-Hernández et al. (2012) hay pocos reportes con respecto a la identificación mediante técnicas moleculares de *Babesia* sp. en perros de Colombia, a excepción de algunos reportes de identificación de los piroplasmas en extendidos sanguíneos, como es el caso de Batista (1980) donde reportaron una prevalencia de *B. canis* de 0.93% en el Departamento de Córdoba y Piedrahita (2011) en el piedemonte llanero quien reportó una frecuencia de positividad del 68% de *B. canis* en perros parasitados asintomáticos; sin embargo, estos estudios previos no discriminan entre las subespecies de *B. canis*. En el presente estudio se reportó una frecuencia de positividad de 8% y se logró discriminar y confirmar la presencia de *B. c. vogeli* en las muestras evaluadas.

La primera detección molecular de *B. c. vogeli* fue realizada en el país por Vargas-Hernández et al. (2012) de muestras obtenidas de animales provenientes de Bogotá, Bucaramanga y Villavicencio. La presente investigación demostró la presencia de *B. c. vogeli* en otra región de Colombia, fortaleciendo la geografía de este agente y por consiguiente se convierte en una base para inferir el comportamiento epidemiológico de la enfermedad en el país.

En el presente estudio se analizó una región del gen 18S rRNA de *Babesia* spp, el cual es útil para la identificación de microorganismos por ser un gen altamente conservado entre

especies (Teal, Habura, Ennis, Keithly y Madison-Antenucci, 2011 y Birkenheuer, Levy y Breitschwerdt, 2003). Adicionalmente, la región seleccionada para ser amplificada con los iniciadores *Bab f* y *Babesia common* permite la diferenciación adecuada de subespecies de *B. canis* mediante secuenciación y posterior construcción del árbol filogenético (Martín et al., 2005). Según Eguiarte et al. (2007), el fragmento del gen ssu-rDNA es adecuado para la secuenciación en este tipo de estudios, debido a que se encuentra en todos los tipos de vida conocidos (16S para procariotas y 18S para eucariotas) al codificar para la formación de la unidad pequeña ribosomal (indispensable para la síntesis de proteínas a nivel celular). Este gen posee regiones muy conservadas, y otras de secuencia variable, en estas últimas y debido a cambios evolutivos se puede realizar seguimiento y discriminar entre especies. Otras ventajas del análisis de este gen, son la facilidad de su amplificación por PCR y la posibilidad de estudiar y caracterizar microorganismos que requieren condiciones especiales al interior de los laboratorios para su cultivo, lo cual no está disponible en todos los centros o las instituciones interesadas en este grupo de patógenos.

Después de secuenciar los fragmentos de ssu-rDNA de *B. canis* obtenidas de extracciones de ADN de muestras de sangre en perros de Ibagué, se evidenció 99% de similitud con *B. c. vogeli*. de Venezuela (DQ297390.1), España (DQ439545.1), Brasil (EU436752.1), China (KJ939326.1) y Sudan (DQ111766.1). Así mismo, se identificó que el porcentaje de similitud entre las cuatro secuencias obtenidas por este estudio fue superior al 99.8% por lo que se considera son de la misma especie solo que presentan pequeñas diferencias no significativas al momento de la identificación. Los hallazgos de esta investigación son similares a los reportados por Vargas-Hernández et al. (2012) en Colombia, Ramos et al. (2010) en Brasil, Eiras et al. (2008) en Argentina y Criado-Fornelio et al. (2007) en Venezuela. Lo que se puede explicar debido a que el vector (*R. sanguineus*) se encuentra

ampliamente distribuido en toda Sur América (Trapp et al., 2006 y Benavides, 2011). Actualmente no se conoce la presencia de otros vectores como *Dermacentor* spp identificada en Europa y Asia o *Haemaphysalis* spp reportada en África y Asia (Uilenberg, Fransenn, Perie y Spanjer, 1989). Esta información refuerza lo mencionado anteriormente con respecto a la presencia del protozoario debido a que no se encuentra en el continente el vector de otros tipos de *B. canis*.

Para cumplir los objetivos de la investigación referentes a la identificación genética del agente, las cadenas de iniciadores fueron evaluadas con la herramienta BLAST la cual permitió identificar que *Bab f* y *Babesia common* se adhieren con una alta afinidad al gen de la subunidad pequeña ribosomal 18S de *B. canis* lo que aumenta la especificidad y sensibilidad de la prueba al momento de identificar al hemoparásito. Este hallazgo a través de la utilización de herramientas bioinformáticas fue corroborado en los geles de electroforesis en los cuales se observó una única banda de 344 pb. Las dos metodologías anteriores demuestran el potencial que tiene la prueba molecular para el diagnóstico directo del agente, particularmente en los casos en que se requiera realizar un seguimiento previo y posterior a la administración de una medida terapéutica. Según Boozer y Macintire (2003) el diagnóstico de la babesiosis puede ser complicado debido a que no siempre se tienen organismos visibles en los extendidos de sangre en animales infectados. Con respecto a la serología se ha reportado alta sensibilidad pero moderada especificidad ya que pueden encontrarse resultados negativos en etapas tempranas de la infección debido a la poca cantidad de anticuerpos presentes, así como, se sabe que existe reacción antigénica cruzada con otros tipos como la *B. gibsoni* (Fukumoto et al., 2001). Sousa et al. (2013) reportaron 3.3% de positividad por detección molecular de *B. c. vogeli*, mientras que por serología encontraron 81.6% lo que puede sugerir contacto previo, mas no la presencia del agente en sangre. La PCR es considerada una técnica diagnóstica sensible y

específica en especial en casos de baja parasitemia, mientras que según Vargas-Hernández et al. (2012) la serología es la técnica diagnóstica indicada para identificar procesos crónicos ya que detecta contacto con el agente a través de la detección de anticuerpos específicos. En el presente estudio las muestras hacen parte del banco de tejidos y ADN para estudios moleculares preservados en el laboratorio GENMEJOR de la Universidad de La Salle. La preservación y el tiempo transcurrido deterioran la muestra para estudios serológicos y extendido; sin embargo, este material biológico criopreservado es ideal para la identificación molecular.

La diferenciación genética entre las subespecies de *B. canis* es indispensable para entender la epidemiología de la enfermedad, así como, es de vital importancia para reducir las fallas en campo de futuras vacunas debido a que la reacción cruzada entre las diferentes subespecies parece ser baja (Carret et al., 1999). Sin embargo, se requieren realizar estudios similares de secuenciación en regiones diferentes del país como es el caso del estudio realizado por Vargas-Hernández et al. (2012) en las ciudades de Bucaramanga, Villavicencio y Bogotá para corroborar este hecho. Así mismo, se sabe que *B. c vogeli* es un organismo de mediana o baja patogenicidad lo que implica que puede presentar alta incidencia de pacientes asintomáticos o levemente sintomáticos incluso en el pico de la enfermedad (Schoeman, 2008). Este estudio junto al de Vargas-Hernández et al. (2012) confirman que, al menos por el momento, esta es la única sub especie de *B. canis* que afecta a los caninos en el país.

De las muestras positivas a *B. canis* en esta investigación provenientes de animales sintomáticos, el signo clínico reportado en la historia clínica con mayor presentación fue linfadenopatía (36%) seguido por pérdida de peso (24%) y mucosas pálidas (24%). Otros signos fueron uveítis, tiempo de llenado capilar lento y hemorragias petequiales y equimóticas. Según Lobetti (2006), todos son signos compatibles con enfermedad transmitida por vectores,

algunos como la pérdida de peso, la uveítis y el síndrome nefrótico (Guerra, Ardila y López, 2012) de fase crónica atribuidos a la formación de complejos antígeno-anticuerpo (Shelly, 2011), y otros de la fase aguda como las hemorragias petequiales, equimóticas y las mucosas pálidas. La infección por *B. canis* puede cursar con diferentes grados de severidad, dependiendo de la subespecie infectante, la edad del huésped, el estado inmune y las co-infecciones con otros patógenos transmitidos por el mismo vector (Kordick, Breitschwerdt y Hegarty, 1999).

Luego de analizar la historia clínica de los pacientes positivos a *B. c. vogeli* en esta investigación, se encontró que presentaron signos clínicos como linfadenopatía, fiebre, petequias, membranas mucosas pálidas. Esto está acorde con lo reportado por Schoeman (2008), donde esta sub especie, reportada a nivel mundial, causa una enfermedad leve a moderada e incluso en ocasiones subclínica en perros adultos, por lo que puede pasar desapercibida.

En este estudio se identificó la presencia concomitante de *B. c. vogeli* y *Ehrlichia* sp., lo que coincide con la investigación de Vargas-Hernández et al. (2012) quienes reportaron infección mixta en perros procedentes de las ciudades de Bucaramanga, Bogotá y Villavicencio; Krawczak et al. (2015) quienes reportaron evidencia serológica de co-infección en perros de Minas Gerais (Brasil) y el estudio de Izzi, Martin, Chan y Leutenegger (2013) quienes también se reportaron el caso de un canino con triple infección positivo a PCR para *E. canis*, *B. canis* y *A. platys*. Según Pantchev et al. (2015), *R. sanguineus* es el vector implicado en la transmisión de varios agentes que infectan a los caninos aparte de *Babesia* sp; es el caso de *A. platys*, *E. canis* y *H. canis*, por lo que no es extraño encontrar infecciones mixtas.

Este estudio aporta información a través de la detección molecular de *B. vogeli* en perros procedentes de Ibagué, Colombia. Este trabajo junto con el realizado por Vargas-

Hernández et al. (2012) fortalece la investigación de la distribución geográfica del parásito y demuestran la utilidad diagnóstica de la PCR para la detección en sangre del hemoparásito por ser una prueba simple, eficiente, rápida y sensible. Las pruebas moleculares pueden ser implementadas por laboratorios nacionales para el diagnóstico de la enfermedad y adicionalmente abre las puertas para un seguimiento de la enfermedad, e incluso la vigilancia de la llegada de sub especies exóticas en el país como es el caso de *B. c. rossi* y *B. c. canis*.

Conclusiones

En la presente investigación se logró caracterizar cuatro secuencias parciales de nucleótidos de la ssu-rDNA de *B. canis* obtenidas de extracciones de ADN de muestras de sangre de caninos con diagnóstico presuntivo de hemoparasitismo, a través de herramientas moleculares.

Los iniciadores, los protocolos utilizados para realizar la PCR, la subsecuente secuenciación de nucleótidos de los amplicones de las detecciones positivas por PCR al gen ssu-rDNA de *B. canis* y los análisis usados en este estudio fueron definitivos para la detección y caracterización de secuencias parciales de nucleótidos de *B. c. vogeli* para la ciudad de Ibagué (Colombia).

El uso de herramientas informáticas como BLAST, Bioedit[®] y MEGA6[®] permitieron la comparación, el alineamiento y el análisis de las secuencias parciales de nucleótidos identificadas en el estudio con las reportadas en el GenBank; de esta forma, se identificaron secuencias similares y se logró determinar que la identidad de las muestras de estudio corresponde a *B. c. vogeli*.

El presente estudio utilizó como material de trabajo secuencias parciales de *B. canis* reportadas en el GenBank, debido a que no hay reportes de la secuencia completa del gen o del genoma de las subespecies en las bases de datos internacionales. La secuenciación realizada en este estudio es válida para predecir similitudes genéticas entre especies; sin embargo, una secuenciación completa es importante para realizar un análisis más completo, lo que deja un espacio para nuevas investigaciones relacionadas con la secuenciación del genoma de *B. canis*.

En el país la identificación molecular es poco utilizada para el diagnóstico rutinario, a pesar de que es la única herramienta que permite diferenciar claramente entre las subespecies.

Sin embargo, no parece existir evidencia epidemiológica de la ocurrencia de otros tipos de babesiosis canina en Colombia, por esta razón se recomienda la implementación de la PCR y solamente en casos particulares realizar la secuenciación. Adicionalmente las características clínicas de cada una de las subespecies se consideran una forma adecuada de identificación en campo, pero en el caso de co-infecciones con otros hemoparásitos no es confiable. Aunque el tratamiento de la babesiosis canina es el mismo independiente de la subespecie infectante, el pronóstico de la enfermedad varía significativamente entre éstas.

Esta investigación aporta información relevante para comprender la distribución geográfica del agente en el país, a través de la detección molecular de *B. c. vogeli* en perros procedentes de Ibagué, Colombia. Este estudio también se presenta como un aporte a la capacidad diagnóstica de los laboratorios del país, debido a que se validaron metodologías moleculares con los dos juegos de iniciadores más reportados en la literatura, demostrando así la utilidad diagnóstica de la PCR para la detección en sangre del hemoparásito.

Lista de referencias

- Barker, E., Langton, D., Helps, C., Brown, G., Malik, R., Shaw, S. y Tasker, S. (2012). Haemoparasites of free-roaming dogs associated with several remote aboriginal communities in Australia. *Veterinary Research*, 8 (55),1-7.
- Batista, J., (1980). Prevalencia de parásitos hemáticos en caninos del departamento de Córdoba. Tesis (Maestría) –Universidad Nacional de Colombia /Instituto Colombiano Agropecuario, Bogotá. 79-82.
- Beck R, Vojta L, Mrljak V, Marinculić A, Beck A, Zivicnjak T, Cacciò S. (2009) Diversity of *Babesia* and *Theileria* species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. *Internal Journal of Parasitology* 39 (7):843–848
- Benavides, E. (2011). Perspectiva tropical de rickettsias y otros agentes transmitidos por garrapatas en mascotas. *Biomédica: Instituto Nacional de Salud*. 31(1):54-60
- 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. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9): 4172–4177
- Birkenheuer, A., Neel, J., Ruslander, D., Levy, M. y Breitschwerdt, E. (2004). Detection and molecular characterization of a novel large *Babesia* species in a dog. *Veterinary Parasitology*, 124, 151–160
- Boozer A, Macintire D. (2003) Canine babesiosis. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*. 33 (4), 885-904.

- Camacho, A., Guitian, F., Pallas, E., Gestal, J., Olmeda, S., Goethert, Telford, S 3rd y Spielman, A. (2005). Serum protein response and renal failure in canine *Babesia annae* infection. *Veterinary Research*, 36, 713-722.
- Carret, C., Walas, F. Carcy, B. Grande, N., Précigout, E, Moubri, K. Schetters, T. y 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, *Journal. Of Eukariotic Microbiology*, 46 (3), 298-303.
- Center for Disease Control and Prevention. (2014); Babesiosis. Global Health-Division of Parasitic Diseases and Malaria. Recuperado de <http://www.cdc.gov/parasites/Babesiosis>
- Chauvin, A. Moreau, E. Bonnet, S. Plantard, O. y Malandrin, L. (2009); *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Veterinary Research*, 40:37
- Claerebout, E., Losson, B., Cochez, C., Casaert, S., Dalemans, AC., De Cat, A., Madder, M., Saegerman, C., Heyman, P. y Lempereur, L. (2013). Ticks and associated pathogens collected from dogs and cats in Belgium. *Parasites & Vectors*, 6(183), 2-9.
- Criado-Fornelio, A., Rey-Valeiron, C., Buling, A., Barba-Carretero, J.C., Jef-feries, R., y Irwin, P. (2007). New advances in molecular epizootiology of canine hematic protozoa from Venezuela, Thailand and Spain. *Veterinary Parasitology*. 144 (3-4), 261–269.
- Couto, G (Octubre de 2007). Como utilizar el hemograma en el diagnóstico de la anemia. Proceedings Of The Sevc-Avepa Conference Barcelona, España.

- Dantas-Torres, F (2008a). The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control, *Veterinary Parasitology* 152 (3-4): 173–185.
- Dantas-Torres, F. (2008b). Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasites & Vectors*, 1 (25) 1-17.
- Day, M. (2011) The immunopathology of canine vector-borne diseases. *Parasites & Vectors*, 4(48) 1-13
- Eguiarte, L., Sousa, V., y Aguirre, X. (2007). Ecología molecular. Mexico D.E: *Instituto Nacional De Ecología*. 17, 517-536.
- Eiras, F., Basabe, J., Mesplet, M., Schnittger, L. (2008). First molecular characterization of *Babesia vogeli* in two naturally infected dogs of Buenos Aires, Argentina. *Veterinary Parasitology*. 157 (3-4) , 294–298.
- Eiras, D., Craviotto, M., Baneth, G. y Moré, G. (2012) Primer descripción de *Rangelia vitalii* (Protozoa, Piroplasmida) en la especie canina en Argentina. Memorias de la XIX Reunión científico técnica, AAVLD, 338-339.
- França, R., Da Silva. A., Loretto A., Mazzanti C. y Lopes S., (2014). Canine rangellosis due to *Rangelia vitalii*: from first report in Brazil in 1910 to current day - a review. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 5(5), 466-74.
- Fukumoto, S., Xuan, X., Shigeno, S., Kimbita, E., Igarashi, I., Nagasawa, H., Fujisaki, K., Mikami, T (2001). Development of a Polymerase Chain Reaction method of diagnostic *Babesia gibsoni* infection in dog. *Journal of Veterinary Medicine Sciences* 63(9):977-981

- Genbank. (13 De 11 De 1995). Pubmed. Recuperado El 13 De 3 De 2014, De www.ncbi.nlm.nih.gov/Nuccore/L19079.1
- Gonçalves, J., D'Elia, M., de Oliveira, I., Ribeiro, L., Andrade, H., Ferreira, D., Barbosa, M., dos Santos, W. y Ecco, R. (2016). *Rangelia vitalii* in a free-ranging maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and co-infections. *The International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife (IJP-PAW)*. 5: 280-285
- Guerra, M., Ardila, C., López, C. (2012) Síndrome nefrótico ocasionado por *Babesia* spp en un canino: reporte de caso. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 5(1): 91-98
- Hernández. D. y Peralta. S. (1999) *Aislamiento, estudio morfológico y seguimiento clínico de cepas de Babesia canis y Haemobartonella canis inoculadas en perros esplectomizados*. Tesis (Médico veterinario) Universidad de la Salle. Facultad de Medicina Veterinaria
- Homer, M., Aguilar-Delfin, I., Telford III, S., Krause, P. y Persing, P (2000). Babesiosis. *American Society for Microbiology. Clinical Microbiology Reviews* (2000) July 13(3)
- Irwin, P (2009). Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasites & Vectors*, 1-9.
- Izzi, S., Martin, D., Chan, R., y Leutenegger, C. (2013). *Babesia canis vogeli, Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* infection in a dog. *Veterinary Clinical Pathology* 42 (4): 471–475
- Jojima, F., Garcia, J., Vidotto, M., Balarin, M., Fabretti, A., Gasparini, M., Coelho, A. y Vidotto, O. (2008) Ocorrência e caracterização molecular de espécies de *Babesia* em

Cães de uma população hospitalar da região de londrina. *Revista. Brasileira de Parasitología Veterinaria*, 17 (1): 277-283

Kamani, J., Baneth, G., Mumcuoglu, K., Waziri, N., Eyal, O., Guthmann, Y. (2013). Molecular detection and characterization of tick-borne pathogens in dogs and ticks from Nigeria. *Plos Neglected Tropical Disease*, 7 (3): 1-7.

Kirtz, G., Leschnik, M., Hooijberg, E., Tichy, A. y Leidinger, E. (2012). In-clinic laboratory diagnosis of canine babesiosis (*Babesia canis canis*) for veterinary practitioners in Central Europe. *Tierärztliche Praxis Kleintiere*, 40(2):87-94.

Kordick S, Breitschwerdt E y Hegarty B. (1999). Co-infection with multiple tickborne pathogens in a Walker Hound kennel in North Carolina. *Journal of Clinical Microbiology*, 37. 2631–2638.

Krawczak, F., Reis, I., Reis, J., Moreira, D., Marcelino, A., Werneck, W., Bahia, M., Fontes (2015). *Leishmania*, *Babesia* and *Ehrlichia* in urban pet dogs: co-infection or cross-reaction in serological methods?. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 48 (1):64-68

Kuttler, K. (1988). World-wide impact of babesiosis. In *Babesiosis of Domestic Animals and Man* (Ristic, M., ed.), *CRC Press* 1–22,

Lack, J; Reichard, M. y Van Den Bussche, R. (2012), Phylogeny and evolution of the *Piroplasmida* as inferred from 18s rRNA sequences. *International Journal Of Parasitology*. 42 (4), 353–363.

- Leander, B. (2007). Marine Gregarines: evolutionary prelude to the apicomplexan radiation. *Trends in Parasitology*. 24 (2), 60–67.
- Levine N, editor. (1988) The protozoan phylum *Apicomplexa*. Boca Raton (FL): CRC Press;. 154.
- Lobetti, R (2006). Update on the complications on the management of canine babesiosis. *World Congress Wsava/Fecava/Csava*, (Págs. 484-486). Praga, Republica Checa.
- López, A (2016). Evaluación de la presencia de *Ehrlichia canis* en caninos sospechosos de enfermedad hemoparasitaria en la ciudad de Ibagué mediante la técnica PCR. Tesis (Maestría) Universidad de La Salle. Facultad de Ciencias Agropecuarias.
- Lord, C. (2001). *Entomology y Nematology*. Recuperado el 16 de 06 de 2015, de http://entnemdept.ufl.edu/creatures/urban/medical/brown_dog_tick.htm
- Loretti, A. y Barros, S., (2005). Hemorrhagic disease in dogs infected with an unclassified intra-endothelial piroplasm in southern Brazil. *Veterinary Parasitology*. 134 (3), 193-213.
- Martín, A., Dunstain, R., Toberts, T. y Brown, G. (2006). *Babesia canis vogeli*: A novel PCR for its detection in dogs in Australia. *Experimental Parasitology*. 112 (1); 63–65.
- Máthé, A., Vorós, K., Papp, L., y Reiczigel, J (2006). Clinical manifestations of canine babesiosis in Hungary (63 Cases). *Acta Veterinaria Hungarica*, 54(3), 367-385.

Matijatko V., Torti M. y Shelters, T. (2012) Canine babesiosis in Europe: how many diseases?.

Trends in parasitology. 28 (3), 99–105

Matjila, P., Carcy, B., Leisewitz, L., Schetters, T., Jongejan, F. y Gorenflot, A. (2009).

Preliminary evaluation of the bremal gene as a tool for associating *Babesia canis rossi* genotypes and clinical manifestation of canine babesiosis. *Journal Of Clinical Microbiology*, 47(11), 3586-3592.

Mierzejewska, E., Welc-Faleciak, R., Bernarska, M., Rodo, A., Bajer, A.,(2014). The first

evidence for vertical transmission of *Babesia canis* in a litter of Central Asian Shepherd dogs. *Annual Agricola Environment Medicine*, 21(3):500-3

Otranto, D., Testini, G., Dantas, F., Latrofa, M., Paiva, V. D., Caprariis, D. (2010). Diagnosis

of canine vector-borne diseases in young dogs:a longitudinal study. *Journal Of Clinical Microbiology*, 48 (9), 3316–3324.

Pantchev, N., Schnyder,M., Globokar,M., Schaper, R., Tsachev, I. (2015). Current Surveys of

the Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Leishmania infantum*, *Babesia canis*, *Angiostrongylus vasorum* and *Dirofilaria immitis* in Dogs in Bulgaria. *Parasitology Research* 11 (1), 117-130.

Penzhorn, B (2011). Why is Southern African canine babesiosis so virulent? An Evolutionary Perspective. *Parasites & Vectors*, 4 (51).

Piedrahita, D. (2011). Presencia y frecuencia de ectoparásitos y hemoparásitos en caninos en áreas rurales del piedemonte de Casanare, Colombia, Tesis (Médico veterinario) Universidad de la Salle. Facultad de Ciencias Agropecuarias.

Prieto. M. (Octubre de 2003). Estudio de la analítica sanguínea en perros con Babesiosis e

influencia de la infección simultánea por *Ehrlichia* y *Borrelia* . XXXVIII Congreso Nacional de AVEPA. Sevilla- España.

QIAamp DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook (2003), QIAGEN

Ramos, R., Ramos, C., Araújo, F., Oliveira, R., Souza, I. (2010). Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (north-eastern Brazil). *Parasitology Research*. 107(5), 1115–1120.

Rodríguez-Mallon, A., Bechara, G., Zacarias, R., Benavides-Ortiz, E., Soto-Rivas, J., Gómez-Ramírez, A., Jaimes-Olaya, J. y Estrada-García, M. (2013) Inhibition of *Ehrlichia canis* and *Babesia canis* transmission among ticks fed together on dogs vaccinated with Bm86 antigen. *Open Journal of Animal Sciences*. 3(3), 24-32

Rozej-Bielicka, W., Stypułkowska-Misiurewicz, H. y Gołąb, E., 2015. Human babesiosis. *Przeegl Epidemiology*, 69: 489 - 494

Salem. N. y Farag, H. (2014). Clinical, hematologic, and molecular findings in naturally occurring *Babesia canis vogeli* in egyptian dogs. *Veterinary Medicine International*. 2014, 1-6

Schettters, T. (2005) Vaccines against canine babesiosis. *Trends in Parasitology*. 21, 179-184

Schoeman, J (Agosto de 2008). Canine babesiosis: an update. *Proceedings Of The 33rd World Small Animal Veterinary Congress*. Dublin, Ireland: 331-334.

Schnittger, L; Rodriguez, A; Florin-Christensen, M. y Morrison, D (2012). *Babesia*: A world emerging. *Infection, Genetics and Evolution*. 12, 1788–1809

Shelly, V. (2011). Glomerular disease. *Topics in Companion Animal Medicine* 26, 128-134.

Shortt, H., (1973). *Babesia canis*: The life cycle and laboratory maintenance in its arthropod

- and mammalian hosts. *International Journal for Parasitology*, 3, 119-148.
- Simões, P., Cardoso, L., Araújo, M., Yisaschar-Mekuzas, Y. y Baneth, G. (2011). Babesiosis due to the canine *Babesia microti*-like small piroplasm in dogs - first report from Portugal and possible vertical transmission. *Parasites & Vectors*, 4 (50), 1-6.
- Smith R., (1978). Ciclo biológico de la *Babesia* en la garrapata. Departamento de Hemoprotozoarios. *Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias SARH*. 2, 234-260.
- Soares, J., Giroto, A., Brandão, P., Da Silva, A., Franca, R., Lopes, S. (2011). Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. *Veterinary Parasitology*, 180, 203–208.
- Sousa Carstens Marques de K, André, M., Herrera, H., de Andrade, G., Gomes, M., dos Santos, L., Gomes, W., Machado, R. y Pereira, G., (2013) Molecular and serological detection of tick-borne pathogens in dogs from an area endemic for *Leishmania infantum* in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 22(4):525-531.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A. y Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular. Biology. Evolution*. 30(12):2725–2729
- Teal, A., Habura, A., Ennis, J., Keithly, J. y Madison-Antenucci, S., (2011). A New Real-Time PCR Assay for Improved Detection of the Parasite *Babesia microti*. *Journal of Clinical Microbiology*. 50(3),903–908

- Trapp, S., Dagnone, S., Vidotto, O., Freire, R., Amude, A., Autran De Morais, H. (2006). Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. *Veterinary Parasitology*. 140, 223–230.
- Uilenberg, G., Fransenn, E., Perie, N. y Spanjer, A. (1989). Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. *Veterinary Quaterly*. 11, 33-40.
- Van De Maele, I., Savary-Bataille, K., Gielen, I., y Daminet, S (2008). An unusual form of canine babesiosis. *Canine Veterinary Journal*. 49, 283-286.
- Vargas-Hernández, G., André, M., Faria, J., Munhoz, T., Hernandez-Rodriguez, M., Machado, R., y Tinucci-Costa, M., (2012). Molecular and serological detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia canis vogeli* in dogs in Colombia. *Veterinary Parasitology*. 186, 254–260.
- Wei, L., Kelly, P., Ackerson, K., Zhang, J., Mahallawy, H., Kaltenboeck, B. y Wang, C (2014). First report of *Babesia gibsoni* in Central America and survey for vector-borne infections in dogs from Nicaragua. *Parasites and Vectors*. 7, 126
- Yabsley, M. y Shock, B. (2013). Natural History of Zoonotic *Babesia*: Role of Wildlife Reservoirs. *International Journal For Parasitology: The International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife (IJP-PAW)*. 2, 18–31
- Zygner, W., Baska, P., Wisniewski, M., y Wedrychowicz, H. (2010). The molecular evidence of *Babesia microti* in hard ticks removed from dogs in Warsaw (Central Poland). *Polish Journal Of Microbiology*, 59(2), 95-97.