

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Posgrados

**Investigación de especies de *Leishmania* y *Borrelia* en perros domésticos
de comunidades rurales del Ecuador**

**Tesis en torno a una hipótesis o problema de investigación y su
contrastación**

Erika Belén Muñoz Salazar

**Verónica Barragán Ph.D.
Patricio Rojas Silva M.D., Ph.D.
Directores de Trabajo de Titulación**

Trabajo de titulación de posgrado presentado como requisito
para la obtención del título de Magister en Microbiología

Quito, 16 de enero del 2025

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE POSGRADOS

HOJA DE APROBACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

**Investigación de especies de *Leishmania* y *Borrelia* en perros domésticos
de comunidades rurales del Ecuador**

Erika Belén Muñoz Salazar

Nombre del Director del Programa:	Patricio Rojas Silva
Título académico:	M.D., Ph.D.
Director del programa de:	Maestría en Microbiología

Nombre del Decano del colegio Académico:	Carlos Valle
Título académico:	Ph.D.
Decano del Colegio:	COCIBA

Nombre del Decano del Colegio de Posgrados:	Darío Niebieskikwiat
Título académico:	Ph.D.

Quito, 16 de enero del 2025

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombre del estudiante: Erika Belen Muñoz Salazar

Código de estudiante: 00331349

C.I.: 1722593793

Lugar y fecha: Quito, 16 de enero de 2025

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETheses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following graduation project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETheses>.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad San Francisco de Quito y al Instituto de Microbiología por recibirme como una dragona más, y permitirme formar parte de esta maestría.

A mis tutores, Patricio Rojas-Silva y Verónica Barragán, por brindarme la libertad y confianza para planificar y ejecutar los ensayos, y tener la paciencia para buscar junto a mí la solución a las diferentes trabas que surgieron en el camino.

Gracias a Gulnara Borja por estar pendiente del proyecto y buscar maneras de que el proyecto salieran adelante conforme estaba originalmente planteado.

Anabel Zabala, gracias por todos estos años de amistad, por tu apoyo y fuerza pese a la distancia.

A Paúl Cárdenas, gracias por la confianza y el apoyo.

A los miembros actuales y pasados del Centro de Bioinformática: Belén Prado, Mateo Carvajal, Rommel Guevara y Denisse Benítez; no se logran imaginar cuánto apoyo sentí de su parte y lo importantes que fueron en este camino.

A los miembros del Team Lepto, Pamela Borja, Giuliana Pazmiño, Daniela Andrade, Sebastián Melo, Diego Guzmán. Gracias por su colaboración durante todo este proceso, su excelente trabajo permitió obtener estas muestras. No solo han sido compañeros de trabajo, son los mejores amigos que uno podría pedir.

A Pamela Mosquera, gracias por su amistad, por estar siempre ahí, dispuesta a escuchar y aconsejarme. Gracias por tu ayuda en el diseño de los primers.

A la Dra. María Echeverry (Universidad Nacional de Colombia) por su amable ayuda proporcionándonos cultivos de *L. braziliensis* y *L. guyanensis*, a la Dra. Vanesa Adaui (Universidad Peruana Cayetano Heredia) y al Dr. Larry Simpson (UCLA), quienes nos ayudaron con los cultivos de *L. mexicana* y *L. tarentolae*; los cuales fueron esenciales como controles positivos en el presente estudio.

A mis abuelitos y a mi mami, nada de esto sería posible sin ustedes, no tengo palabras para agradecer todo lo que han hecho por mí.

Finalmente, gracias a mi esposo. Fuiste mi apoyo y fuerza durante esta maestría, el camino fue duro, pero finalmente logramos culminar esta etapa.

RESUMEN

Los hemoparásitos son agentes infecciosos que invaden las células sanguíneas de sus hospedadores, causando enfermedades con un impacto significativo en la salud animal y humana. A pesar de su relevancia en la salud pública y veterinaria, los hemoparásitos de los géneros *Leishmania* y *Borrelia* han sido poco estudiados en Ecuador, lo que limita el conocimiento sobre su distribución geográfica y prevalencia. Este estudio se enfocó en el análisis de *Leishmania* y *Borrelia* en muestras de sangre de perros domésticos de comunidades rurales del Ecuador, responsables de la leishmaniasis y la enfermedad de Lyme, respectivamente. La detección de *Leishmania* a nivel de género se realizó en 296 muestras colectadas en Santo Domingo (n=25), Morona Santiago (n=43), Orellana (n=117) y Pichincha (n=111), mediante la amplificación por PCR de un fragmento del ADN del kinetoplasto. Se detectó la presencia del ADN de *Leishmania* en 22 muestras (7.43%), en las cuales se intentó amplificar un fragmento del gen del citocromo B para identificar la especie. Empleando la Tecnología de Oxford Nanopore se logró identificar *L. mexicana* en una de las muestras analizadas. Para la detección de *Borrelia*, se colectó muestras de sangre de 481 perros en 3 provincias: Manabí (n=98), Morona Santiago (n=44), y Pichincha (n=339). Inicialmente, se amplificó un fragmento del gen del 16S rRNA específico para la familia *Borreliaceae*, detectándose 101 casos positivos (21%). Estos amplicones fueron secuenciados para lograr diferenciar entre los géneros *Borrelia* (causante de fiebre recurrente) y *Borrelia* (causante de la enfermedad de Lyme). Se obtuvo secuencias para 62 muestras, las cuales lograron ser exitosamente identificadas a nivel de género, siendo asignadas como *Borrelia* spp. Estos resultados destacan la importancia del monitoreo activo de estas enfermedades en nuestro país. Emplear a los perros domésticos como centinelas en la vigilancia de estas enfermedades es crucial para la implementación adecuada de estrategias de control.

Palabras clave: localidades rurales, perros, hemoparásitos, PCR, secuenciación

ABSTRACT

Hemoparasites are infectious agents that invade blood cells of their hosts, causing diseases with a significant impact on both animal and human health. Despite their relevance in public and veterinary health, hemoparasites of the genera *Leishmania* and *Borrelia* have been poorly studied in Ecuador, limiting our understanding of their geographic distribution and prevalence. This study focused on the analysis of *Leishmania* and *Borrelia* in blood samples from domestic dogs in rural communities across Ecuador, responsible for leishmaniasis and Lyme disease, respectively. *Leishmania* detection at the genus level was conducted in 296 samples collected from Santo Domingo (n=25), Morona Santiago (n=43), Orellana (n=117), and Pichincha (n=111) through PCR amplification of a kinetoplast DNA fragment. *Leishmania* DNA was detected in 22 samples (7.43%), and an attempt was made to amplify a fragment of the cytochrome B gene for species identification. Using Oxford Nanopore Technology, *L. mexicana* was successfully identified in one of the samples. For *Borrelia* detection, blood samples were collected from 481 dogs in three provinces: Manabí (n=98), Morona Santiago (n=44), and Pichincha (n=339). Initially, a fragment of the 16S rRNA gene specific to the *Borreliaceae* family was amplified, detecting 101 positive cases (21%). These amplicons were sequenced to differentiate between the genera *Borrelia* (causing relapsing fever) and *Borrelia* (causing Lyme disease). Sequences were obtained for 62 samples, which were successfully identified at the genus level as *Borrelia* spp. These results highlight the importance of active surveillance of these diseases in our country. Using domestic dogs as sentinels for monitoring these diseases is crucial for the effective implementation of control strategies.

Key words: rural communities, dogs, hemoparasites, PCR, sequencing

TABLA DE CONTENIDO

Agradecimientos	6
Resumen	8
Abstract	9
Tabla de contenido	10
índice de TABLAS	2
Table #1. Amplification results for <i>Leishmania</i> spp. detection	2
Table #2. Reference sequences of <i>Leishmania</i> spp. HSP70 gene obtained from NCBI GenBank for phylogenetic analysis	2
Table #3. Amplification results for <i>Borreliaceae</i> PCR	2
Table #4. Reference sequences of <i>Borrelia</i> spp. 16S rRNA gene obtained from GenBank for phylogenetic analysis	2
Table #5. Reference sequences of <i>Borrelia</i> spp. 16S rRNA gene obtained from GenBank for phylogenetic analysis	2
Table #6. SNPs present only in <i>Borrelia</i> genus reference sequences	2
ÍNDICE DE FIGURAS	3
Figura #1. Agarose gel for kDNA minicircles fragment amplification (120 bp)	3
Figura #2. Agarose gel for CytB fragment (965 bp) amplification standardization . 3	
Figura #3. Agarose gel for the cytochrome b fragment amplification (965 bp) in blood samples	3
Figura #4. Agarose gel for the HSP70 fragment (370 bp) amplification standardization	3
Figura #5. Agarose gel for HSP70 fragment amplification (370 bp) in blood samples	3
Figure #6. Phylogenetic tree based on HSP70 fragment	3
Figure #7. Phylogenetic tree based on a 345 bp fragment of 16S rRNA gene	3
Parte I: Introducción GENERAL	4
Leishmaniasis	4
El patógeno: <i>Leishmania</i> spp.	7
Ciclo de transmisión	9
Diagnóstico	10
Enfermedad de Lyme	12
El patógeno: <i>Borrelia</i> spp.	15
El vector: garrapata <i>Ixodes</i>	16
Ciclo de transmisión	18

Diagnóstico.....	19
Scientific Article 1: Molecular detection of <i>Leishmania</i> spp. in domestic dogs from rural areas of Ecuador	2
Introduction	2
Materials and Methods.....	3
Sampled population.....	3
DNA Extraction	3
Molecular detection of genus <i>Leishmania</i>	3
Molecular identification of <i>Leishmania</i> specie.....	4
Nanopore sequencing.....	5
Results	5
Detection of genus <i>Leishmania</i>	5
Identification of <i>Leishmania</i> species	6
Discussion and Conclusions	11
Acknowledgements	12
References	2
Scientific Article 2: MOLECULAR DETECTION OF <i>Borrelia</i> SPP. IN DOMESTIC DOGS FROM RURAL AREAS OF ECUADOR.....	9
Materials and Methods.....	10
Sampled population.....	10
DNA Extraction	10
Molecular detection of <i>Borrelia</i>	10
Genus identification.....	11
Results	11
Discussion	15
Referencias	Error! Bookmark not defined.

ÍNDICE DE TABLAS

TABLE #1. Amplification results for *Leishmania* spp. detection.

TABLE #2. Reference sequences of *Leishmania* spp. HSP70 gene obtained from NCBI GenBank for phylogenetic analysis.

TABLE #3. Amplification results for *Borreliaceae* PCR

TABLE #4. Reference sequences of *Borrelia* spp. 16S rRNA gene obtained from GenBank for phylogenetic analysis.

TABLE #5. Reference sequences of *Borrelia* spp. 16S rRNA gene obtained from GenBank for phylogenetic analysis.

TABLE #6. SNPS present only in *Borrelia* genus reference sequences.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA #1. AGAROSE GEL FOR KDNA MINICIRCLES FRAGMENT AMPLIFICATION (120 BP).

FIGURA #2. AGAROSE GEL FOR CYTB FRAGMENT (965 BP) AMPLIFICATION STANDARDIZATION.

FIGURA #3. AGAROSE GEL FOR THE CYTOCHROME B FRAGMENT AMPLIFICATION (965 BP) IN BLOOD SAMPLES.

FIGURA #4. AGAROSE GEL FOR THE HSP70 FRAGMENT (370 BP) AMPLIFICATION STANDARDIZATION.

FIGURA #5. AGAROSE GEL FOR HSP70 FRAGMENT AMPLIFICATION (370 BP) IN BLOOD SAMPLES.

FIGURE #6. PHYLOGENETIC TREE BASED ON HSP70 FRAGMENT.

FIGURE #7. PHYLOGENETIC TREE BASED ON A 345 BP FRAGMENT OF 16S RRNA GENE.

PARTE I: INTRODUCCIÓN GENERAL

Los hemoparásitos son agentes infecciosos que invaden las células sanguíneas de sus hospedadores, generando enfermedades que pueden tener un impacto significativo tanto en la salud animal como humana. Nuestro país se caracteriza por presentar zonas rurales, donde animales domésticos, como los perros, están en estrecho contacto con sus dueños y con el medio ambiente. Esto, sumado a la presencia de vectores como garrapatas o dípteros hematófagos, favorece la transmisión de estos hemoparásitos. A pesar de su importancia en la salud pública y veterinaria, hemoparásitos de los géneros *Leishmania* y *Borrelia* han sido poco estudiados en nuestro país, lo que limita significativamente el conocimiento sobre su distribución geográfica y prevalencia en diferentes regiones. Esta falta de información dificulta la implementación de estrategias efectivas de prevención, diagnóstico y control, especialmente en las zonas rurales, donde las condiciones favorecen la transmisión de estos patógenos y los recursos para su monitoreo suelen ser limitados.

El presente trabajo se centrará en el estudio de dos géneros de hemoparásitos en muestras de perros de comunidades rurales, *Leishmania* y *Borrelia*, causantes de leishmaniasis y la enfermedad de Lyme, respectivamente.

Leishmaniasis

La leishmaniasis es una enfermedad zoonótica parasitaria, causada por diferentes especies de parásitos unicelulares del clado Excavata, pertenecientes al género *Leishmania* y transmitida principalmente por la picadura de flebótomos¹. Se encuentra clasificada dentro de las enfermedades tropicales desatendidas, por parte de la Organización Mundial de la Salud². Es un problema de salud pública a nivel mundial en cuatro regiones eco-epidemiológicas: las Américas, el este de África, el norte de África y el oeste y sureste de Asia; siendo endémica

en 99 países³. Cuatro de los 10 países con mayor reporte de casos se encuentran en el continente Americano: Brasil, Colombia, Nicaragua y Perú⁴. En Ecuador, en el 2023 se reportaron 1040 casos, y hasta inicios de octubre 2024 se han reportado 710 casos, en 22 de las 24 provincias del país⁵. Es importante mencionar, que estos reportes han sido únicamente de casos de leishmaniasis cutánea y mucocutánea⁵.

El impacto de la leishmaniasis en el Ecuador es significativo, principalmente en las áreas rurales, donde las condiciones socioeconómicas y ambientales favorecen la propagación de la enfermedad⁶. En estas zonas, las viviendas suelen estar cerca de los lugares donde habitan los flebótomos, lo que aumenta el riesgo de transmisión tanto para los humanos como para los animales domésticos⁴. Además, se suma la falta de acceso a servicios básicos de salud, limitaciones en la infraestructura y el desconocimiento de la población sobre la enfermedad, factores que dificultan el control de la enfermedad en estas localidades⁶.

Esta zoonosis se caracteriza por infectar a una gran variedad de hospederos, incluyendo a vertebrados salvajes como los marsupiales americanos (*Didelphidae* spp.), o domésticos como cerdos (*Sus scrofa domesticus*) o perros (*Canis lupus familiaris*)¹. En el contexto de las localidades rurales, los perros desempeñan un papel fundamental en la epidemiología de la leishmaniasis⁷. Debido a su cercanía con el ser humano, los perros infectados pueden actuar como una de las principales fuentes de infección para los flebótomos, incrementando la probabilidad de transmisión del parásito al ser humano⁸. Además, los perros, al estar expuestos continuamente a los vectores en el exterior, tienen más probabilidades de contraer la infección⁹.

Una característica clave de la leishmaniasis, que complica los programas de control, es el amplio espectro de manifestaciones clínicas que puede presentar, incluyendo casos asintomáticos¹⁰. Pese a esto, se ha logrado clasificar a la leishmaniasis en base a su sintomatología, en tres formas clínicas¹. En el ser humano, dependiendo de la especie de

Leishmania y la respuesta inmunitaria del hospedador, la enfermedad puede manifestarse como lesiones cutáneas, mucocutáneas o complicaciones viscerales¹¹. La forma cutánea (LC) es la más común y se caracteriza por la aparición de lesiones en el sitio de la picadura, las cuales inician como pápulas y evolucionan a úlceras indoloras de bordes elevados¹¹. Las úlceras pueden curarse de forma espontánea en el transcurso de semanas a meses, dejando cicatrices desfigurantes o causar complicaciones¹. Las especies *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* y *L. braziliensis* están generalmente asociadas con esta forma clínica⁴. La leishmaniasis mucocutánea (LMC) se desarrolla a causa de la migración del parásito desde una lesión cutánea previa hacia las membranas mucosas de la nariz, boca o garganta¹². Si no es tratada a tiempo, puede causar severas deformaciones en el rostro¹¹. La LMC es más común en las Américas, principalmente en Perú, Bolivia, Brasil y Paraguay¹². Se ha reportado que *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. infantum*, *L. tropica* y *L. major* están asociadas con esta forma clínica^{11,12}. La leishmaniasis visceral, también conocida como kala-azar, es la forma más peligrosa y puede ser mortal sin tratamiento; afecta órganos internos como el hígado, el bazo y la médula ósea, causando fiebre, pérdida de peso, anemia y debilidad general¹. Hasta el momento, el Ministerio de Salud Pública del Ecuador (MSP) no ha confirmado casos de leishmaniasis visceral en el país, sin embargo, esta forma clínica representa un potencial riesgo por su gravedad y alta tasa de mortalidad si no se trata a tiempo.

En cuanto a la leishmaniasis canina, las formas clínicas de la enfermedad se dividen en visceral, cuando hay afectación de los órganos internos como el hígado, riñones o médula ósea; y cutánea, si se presentan lesiones en la piel⁷. Al igual que en el ser humano, la severidad de la enfermedad dependerá de factores como la respuesta inmune del hospedador, el tiempo de infección y la carga parasitaria¹³. La infección canina puede ser asintomática o presentarse como una enfermedad multisistémica con signos clínicos como pérdida de peso,

dermatitis, lesiones cutáneas, fiebre y disfunción renal⁷. Las especies de *Leishmania* reportadas en infecciones en perros varía según la ecología local y de su interacción con los vectores, sin embargo, la más frecuente y de mayor relevancia es *L. infantum*, la principal causante de leishmaniasis visceral¹⁴. Sin embargo, también hay reportes de *L. mexicana*¹⁵, *L. braziliensis*¹⁶, *L. panamensis*^{8,17} y *L. amazonensis*^{18,19}, principalmente.

El patógeno: *Leishmania* spp.

Las especies del género *Leishmania* son parásitos unicelulares clasificado taxonómicamente en el clado Excavata, filo *Euglenozoa*, clase *Kinetoplastea* y orden *Trypanosomatida*²⁰. Pertenece a la familia *Trypanosomatidae*, compartida con otros parásitos como *Trypanosoma cruzi* y *T. brucei*, causantes de la enfermedad de Chagas y la tripanosomiasis africana, respectivamente. Dentro del género *Leishmania* se han identificado 53 especies, sin embargo, únicamente 21 especies han sido reportadas como patógenas para los mamíferos, incluido el ser humano²¹. Inicialmente, estas 21 especies patogénicas se encontraban agrupadas en dos subgéneros: *Leishmania* (*Leishmania*) y *Leishmania* (*Viannia*); sin embargo, en el 2018 se estableció un tercer subgénero, *Mundinia*, el cual agrupa a especies anteriormente clasificadas en el complejo *L. enriettii* y a *L. orientalis*, una especie recientemente identificada asociada con la leishmaniasis cutánea en Tailandia^{22,23}. El subgénero *Leishmania* abarca especies que se encuentran especialmente en el Europa, norte de África, Medio Oriente, Sudeste Asiático y desde el sur de los EEUU hasta el norte de Argentina; se desarrollan en el tubo digestivo anterior del flebótomo y se asocian comúnmente con leishmaniasis visceral y cutánea^{20,24}. Por otro lado, el subgénero *Viannia* está compuesto por especies que se desarrollan en el intestino posterior del vector, principalmente encontradas en América Latina, y están asociadas a las formas cutánea y mucocutánea²⁰.

Anteriormente se creía que las poblaciones de *Leishmania* tenían un genoma diploide; sin embargo, en la actualidad se considera que la aneuploidía en mosaico es la norma en los genomas de estos parásitos, y el grado de aneuploidía varía según la especie²⁵. En términos de su genoma, *Leishmania* presentan variabilidad en el número de cromosomas dependiendo de la especie, siendo generalmente entre 34 y 36 cromosomas lineales²⁶. Por ejemplo, el genoma de *L. infantum* está compuesto por 34 cromosomas, el de *L. braziliensis* de 35, mientras que el de *L. major* por 36²⁵. El genoma presenta una organización policistónica, donde los genes se agrupan en grandes bloques transcritos simultáneamente, sin intrones y con un control pos-transcripcional predominante²⁷. Este modelo genómico, más la variabilidad en el número de cromosomas le brindan a *Leishmania* la capacidad para adaptarse a las condiciones de su entorno, al sistema inmune del hospedador, y rapidez para desarrollar resistencia a fármacos²⁸.

Esta diversidad genética entre las especies de *Leishmania* es notable y tiene importantes implicaciones tanto en el diagnóstico como en el tratamiento de la leishmaniasis²⁶. La variabilidad genética permite a las distintas especies adaptarse a diversos hospedadores y ambientes, lo que se traduce en su capacidad de causar diferentes formas clínicas de la enfermedad²⁶. Estas diferencias genéticas dificultan el diagnóstico, ya que muchas pruebas deben ser específicas para la especie de *Leishmania* causante de la infección, requiriendo técnicas moleculares para detectar las especies individuales de forma precisa.

El correcto tratamiento y control de la leishmaniasis dependen de la aplicación de estrategias efectivas de detección e identificación entre las diferentes especies de *Leishmania*, lo cual puede tornarse complejo al considerar la plasticidad genética del parásito^{29,30}. Sin embargo, en muestras de pacientes, se ha visto que la aplicación de estrategias basadas en PCR ha demostrado ser altamente específicas y sensibles para el diagnóstico de leishmaniasis. En términos de tratamiento, la diversidad genética afecta la respuesta a los medicamentos, dado

que algunas especies presentan resistencia a fármacos específicos, como los antimoniales, que son ampliamente usados en el tratamiento de la enfermedad²⁹.

Ciclo de transmisión

El ciclo de transmisión de *Leishmania* es complejo y generalmente requiere de la picadura de flebótomos infectados, insectos del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en las Américas³¹. El flebótomo ingiere las formas amastigotes de *Leishmania* presentes en a sangre del hospedador vertebrado, que puede ser un humano, un perro o un animal salvaje. Dentro del intestino del flebótomo, los parásitos adquieren su forma promastigote, una forma móvil que se multiplica y migra hacia el aparato bucal³². Cuando el flebótomo pica a un nuevo hospedador, inocula los promastigotes en la piel, donde son fagocitados por macrófagos. Dentro de estas células, los promastigotes se convierten nuevamente en amastigotes, que resisten la fagocitosis, se replican y causan daño celular³¹. En humanos, la infección por *Leishmania* puede provocar leishmaniasis cutánea, mucocutánea o visceral, dependiendo de la especie del parásito y la respuesta inmune del individuo¹. En el caso de animales salvajes, como roedores y marsupiales, estos actúan como reservorios naturales del parásito, permitiendo su persistencia en el ambiente³³.

Con respecto a los cánidos, tanto domésticos como salvajes, se los considera el principal reservorio de *L. chagasi* (Américas) y *L. infantum* (Viejo Mundo)¹⁴. En áreas endémicas de leishmaniasis, los perros domésticos (*Canis lupus familiaris*) desempeñando un papel clave en la transmisión de la enfermedad, siendo los principales reservorios⁸. La infección canina puede ser asintomática o presentarse con signos clínicos como pérdida de peso, dermatitis, lesiones cutáneas, fiebre y disfunción renal¹⁴. La principal vía de transmisión en perros es mediante la picadura del vector, sin embargo, existen otras formas de transmisión menos frecuentes que también contribuyen a la diseminación de la enfermedad. La transmisión

vertical, en la cual una perra infectada puede transmitir *Leishmania* a sus crías a través de la placenta, se ha documentado en algunos casos⁷. Además, el desarrollo de lesiones en los genitales es frecuente en perros con LV, por lo que también se ha reportado, aunque menos frecuentemente, la transmisión por vía sexual⁹. Otra vía de transmisión indirecta puede darse por transfusiones de sangre, ya que los parásitos pueden permanecer en la sangre de un animal infectado y, al ser transfundidos, infectar al receptor³⁴. Los perros de trabajo o de caza que suelen estar expuestos al exterior en zonas endémicas tienen un mayor riesgo de ser picados por flebótomos y, por lo tanto, de infectarse³⁵. En ambientes donde los perros conviven en grandes grupos, como en criaderos o refugios, existe un mayor riesgo de exposición y transmisión. Además, factores como la falta de uso de repelentes o medidas preventivas aumentan las probabilidades de infección³⁵. La convivencia cercana de perros infectados con perros sanos es un factor que facilita la diseminación del parásito.

Diagnóstico

El diagnóstico de leishmaniasis en humanos y animales es complejo, requiere una combinación de técnicas para detectar la presencia del parásito y evaluar la gravedad de la infección. La prueba de referencia o "gold standard" para el diagnóstico es la observación directa del parásito en muestras de tejido mediante microscopía y tinción¹⁰. El método implica la toma de aspirados o biopsias de tejidos donde se sospecha la presencia de amastigotes, como piel, médula ósea, ganglios linfáticos o bazo. Los tejidos se tiñen generalmente con Giemsa, y se observan bajo el microscopio para detectar la forma amastigote del parásito en el interior de las células del hospedador³⁶. En leishmaniasis visceral, la aspiración de médula ósea es el procedimiento preferido, ya que suele tener una mayor sensibilidad comparado con otros tejidos. Esta técnica es altamente específica, sin embargo, su sensibilidad dependerá de la carga parasitaria o la experticia del personal que toma la muestra como del personal de

laboratorio³⁷. Adicionalmente, esta técnica no permite la diferenciación de las diferentes especies de *Leishmania* ya que éstas no presentan diferencias morfológicas que puedan ser detectadas mediante microscopía¹⁰.

Con el fin de mejorar la precisión diagnóstica, se emplean técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), que detecta el ADN del parásito en muestras de sangre o tejido³⁸. Otro método utilizado es el cultivo del parásito en medios especializados, donde los promastigotes pueden crecer. Este procedimiento es laborioso y requiere condiciones de laboratorio específicas¹⁰. También existen técnicas serológicas, como los ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA por sus siglas en inglés) o las pruebas de inmunofluorescencia indirecta, que detectan anticuerpos específicos contra *Leishmania* en el suero de pacientes o animales³⁶. La principal desventaja de estas pruebas es que pueden presentar falsos positivos en individuos expuestos al parásito en el pasado, pero no tienen infección activa. Otro enfoque diagnóstico, es la prueba de Montenegro, el cual mide la respuesta inmunitaria en la piel al inyectar antígenos de *Leishmania*. Su utilidad es limitada en individuos inmunosuprimidos o con leishmaniasis visceral³⁹. En perros, el diagnóstico también se realiza combinando pruebas serológicas y moleculares, debido a la importancia de identificar a los reservorios de la enfermedad⁴⁰. La elección de las técnicas diagnósticas depende de los recursos disponibles, el tipo de leishmaniasis y la especie infectante, y es fundamental para un tratamiento y control efectivos.

Todas las técnicas y pruebas descritas previamente presentan una importante desventaja, no permiten la identificación a nivel de especie. Por este motivo, la secuenciación se convierte en una herramienta clave que permite el diagnóstico más sensible y específico, además de la identificación de la especie del parásito⁴¹. A través del análisis de secuencias de genes específicos, como el gen que codifica para la subunidad del ARN ribosomal (18S rRNA) o

para la proteína de choque térmico 70 (Hsp70), se podría diferenciar entre las diversas especies de *Leishmania*⁴². Esta identificación a nivel de especie es fundamental, ya que como se mencionó previamente, la especie del parásito está asociada con las diferentes formas clínicas de la enfermedad, así como con variaciones en la respuesta al tratamiento. De igual manera, en áreas endémicas donde coexisten múltiples especies de *Leishmania* es fundamental lograr la identificación a nivel de especie ya que podrían impactar la epidemiología de la enfermedad. Además, la secuenciación contribuye al estudio de la resistencia a medicamentos, permitiendo detectar mutaciones asociadas con la resistencia en poblaciones de *Leishmania*⁴¹. En el contexto de la leishmaniasis en perros, la identificación de especies a través de secuenciamiento facilita la implementación de estrategias de control más específicas, limitando el riesgo de transmisión zoonótica.

Enfermedad de Lyme

Dentro de la familia *Borreliaceae* se encuentran clasificados los géneros *Borrelia* y *Borrelia*, los cuales originalmente se encontraban agrupados bajo un solo género (*Borrelia*); sin embargo, conforme han avanzado la tecnología de secuenciamiento y los análisis filogenéticos, se ha logrado identificar diferencias significativas entre estos dos grupos⁴³. El género *Borrelia* agrupa las especies relacionadas con la fiebre recurrente, una enfermedad caracterizada por episodios cíclicos de fiebre alta, escalofríos, dolores musculares y cefalea, seguidos de periodos de aparente recuperación. Esta zoonosis es transmitida por piojos (*Pediculus humanus*) o garrapatas blandas del género *Ornithodoros*⁴⁴. Por otra parte, *Borrelia* se asocia con la enfermedad de Lyme (LD, por sus siglas en inglés), una infección multisistémica que afecta a humanos y otros animales, transmitida por garrapatas duras del género *Ixodes*⁴⁵.

En los últimos años, la enfermedad de Lyme se ha convertido en un problema de salud pública mundial; su incidencia ha aumentado significativamente en las últimas décadas, principalmente en aquellas regiones con climas templados y húmedos donde proliferan las garrapatas portadoras de la bacteria⁴⁶. En América del Norte, Estados Unidos y Canadá son los países más afectados. Estados Unidos, reporta miles de casos nuevos cada año, y se estima que muchos más pasan desapercibidos debido a la variedad de síntomas y a la dificultad para diagnosticarla en sus etapas iniciales⁴⁷. Europa experimenta igualmente una carga significativa de esta enfermedad, principalmente en Europa Occidental, con más de 200,000 casos cada año⁴⁸. La variabilidad en la incidencia a nivel mundial se debe a factores como la distribución de las especies de garrapatas, la densidad de población de los reservorios (principalmente roedores) y las prácticas de prevención.

Si bien tradicionalmente la enfermedad de Lyme estaba asociada a regiones de clima templado como Estados Unidos y Europa, la evidencia sugiere una creciente presencia de la enfermedad de Lyme en diversos países de América del Sur⁴⁹. Aunque los datos son aún limitados y la investigación continúa, se han detectado ya sea la presencia de la bacteria o anticuerpos, en países como Perú⁵⁰, Brasil^{51,52}, Colombia⁵³, y Argentina⁵⁴. La expansión de la enfermedad y el incremento en el número de casos se atribuye a diversos factores, entre ellos el cambio climático, la deforestación y la expansión de las áreas urbanas hacia zonas rurales, lo que favorece la proliferación de las garrapatas portadoras de la bacteria y el contacto con estas²⁴. La falta de conciencia sobre la enfermedad de Lyme en América del Sur es otro desafío importante. Muchos profesionales de la salud no están familiarizados con la enfermedad y pueden subestimar su importancia. Esto dificulta el diagnóstico temprano y la implementación de medidas de prevención y control⁴⁹. Es fundamental fortalecer la vigilancia epidemiológica, la capacitación de los profesionales de la salud y la investigación científica

para comprender mejor la epidemiología y la clínica de la enfermedad de Lyme en América del Sur.

La enfermedad de Lyme puede manifestarse de diversas formas, desde un sarpullido característico (eritema migratorio) hasta problemas neurológicos, cardíacos y articulares. Si no se trata adecuadamente, puede causar complicaciones a largo plazo y afectar significativamente la calidad de vida de los pacientes⁴⁸. La falta de conciencia sobre la enfermedad y la dificultad para diagnosticarla en sus etapas iniciales contribuyen a subestimar su impacto real en la salud pública⁴⁵. La prevención de la enfermedad de Lyme es fundamental y se basa en medidas como el uso de repelentes de insectos, la ropa protectora al caminar en zonas boscosas, la revisión regular del cuerpo en busca de garrapatas y la eliminación rápida de las mismas⁵⁵.

Los perros desempeñan un papel crucial en la enfermedad de Lyme tanto como posibles hospedadores de la bacteria como indicadores epidemiológicos. Al vivir en estrecho contacto con los humanos y frecuentar entornos naturales donde las garrapatas están presentes, los perros actúan como huéspedes incidentales de *Borrelia*^{56,57}. Aunque no son considerados reservorios principales, su exposición frecuente a garrapatas del género *Ixodes* puede convertirlos en un indicador clave de áreas de riesgo para la enfermedad. Sin embargo, en animales se sabe mucho menos sobre la enfermedad de Lyme; en perros se ha reportado que cerca del 5% muestran signos clínicos, lo que podría explicar el sub-diagnóstico de la enfermedad en esta especie⁵⁷. El síntoma clínico más común es la artritis migratoria, que se reporta con mayor frecuencia en razas grandes y jóvenes que llevan un estilo de vida al aire libre. La carditis, glomerulonefritis y neuritis son otros síntomas menos comunes reportados⁵⁶.

El patógeno: *Borrelia* spp.

El género *Borrelia* fue descrito por primera vez en 1883 por el bacteriólogo Amédée Borrel, quien identificó estas bacterias espiroquetas en muestras de sangre de animales infectados. Los primeros casos de la enfermedad de Lyme se reportaron en 1975 en la ciudad de Old Lyme, Connecticut-Estados Unidos; sin embargo no fue hasta 1982 cuando el médico Willy Burgdorfer identificó que el agente causal de esta enfermedad era *Borrelia burgdorferi*, la cual era transmitida al ser humano por la picadura de garrapatas infectadas⁵⁸. Originalmente, dentro del género *Borrelia* se clasificaron las bacterias espiroquetas causante de la fiebre recurrente y la LD. En el 2014, científicos propusieron una reclasificación taxonómica que reflejara mejor las diferencias genéticas entre las especies que conformaban el clado “*Borrelia burgdorferi* sensu lato” y las demás de este género⁵⁹. Como resultado, las especies causantes de la enfermedad de Lyme, que eran biológicamente distintas, se reclasificaron bajo el nuevo género *Borrelia*, mientras que las especies causantes de la fiebre recurrente permanecieron en el género *Borrelia*⁴³. Sin embargo, *Borrelia*, sigue siendo utilizado como basónimo.

El género *Borrelia* se encuentra clasificado dentro del orden *Spirochaetales*, y la familia *Borreliaceae*⁵⁹. Son bacterias Gram-negativas de 10-30 micrómetros (µm) de longitud y aproximadamente 0.2 a 0.5 µm de diámetro. Pese a estar catalogadas como Gram-negativas, la composición y estructura de su membrana externa presentan diferencias significativas, como la ausencia de polisacáridos y la presencia de numerosas lipoproteínas expuestas en la superficie⁶⁰. Estas bacterias son espiroquetas con forma de hélice alargada, son altamente móviles y flexibles debido a que poseen flagelos periplásmicos, situados entre la membrana interna y la externa. Su estructura flexible y motilidad son adaptaciones que les facilitan atravesar tejidos y escapar de la respuesta inmune del hospedador, lo que contribuye a su capacidad para invadir diversos órganos del cuerpo.^{59,60}.

Su genoma presenta interesantes características; pese a presentar un genoma relativamente pequeño (~1.5 Mb), éste se encuentra altamente fragmentado en un cromosoma lineal que varía entre 900 y 920 kb y más de 20 plásmidos (circulares y lineales) que oscilan entre 5 y 84 kb⁶¹. Los plásmidos lineales están presentes en una cantidad aproximada de uno por cada cromosoma y presentan uniformidad en su contenido entre especies de este género. Estudios in-vitro indican que *Boreliellas* cultivadas por periodos prolongados pierden plásmidos y su capacidad de infección, lo que podría indicar que los plásmidos codifican proteínas cruciales para la virulencia⁶².

Los principales determinantes de virulencia asociados con la infección por esta bacteria son las proteínas que facilitan la supervivencia y el crecimiento del patógeno dentro del hospedador mamífero⁶⁰. Estas bacterias son capaces de evadir el sistema inmunológico del hospedador mediante un proceso denominado variación antigénica, que se basa en la capacidad de la bacteria para alterar la expresión de sus proteínas de superficie, particularmente las lipoproteínas variables, como la VlsE (Variable major protein-like sequence expressed)^{59,60}. Este proceso ocurre a través de mecanismos de recombinación genética, donde fragmentos de ADN se intercambian entre el gen *vlsE* y un conjunto de pseudogenes no expresados, generando nuevas variantes antigénicas. Estas modificaciones permiten a *Borrelia* evitar el reconocimiento por anticuerpos específicos y es uno de los motivos por los cuales la infección puede ser crónica y recurrente⁵⁹.

El vector: garrapata *Ixodes*

Las garrapatas duras del género *Ixodes* son el vector de la enfermedad de Lyme; siendo *I. scapularis*, también conocida como la garrapata de patas negras o garrapata del ciervo, el principal vector en América del Norte⁶³, e *I. ricinus*, también llamada garrapata común, en Europa⁶⁴. En América Latina no hay reportes de la presencia de *I. scapularis*, sin embargo, se

encuentran distintas especies como *I. pararicinus*, *I. loricatus* e *I. aragaoi* que se han considerado posibles vectores de LD en países como Argentina y Brasil⁴⁹. Es importante mencionar que, aunque estas garrapatas son más conocidas por transmitir *Borrelia*, pueden ser vectores de diversas enfermedades infecciosas que afectan a animales y humanos, como la anaplasmosis, que es causada por *Anaplasma phagocytophilum* y afecta principalmente a los glóbulos blancos; y la babesiosis, causada por parásitos del género *Babesia*, que afecta los glóbulos rojos y puede provocar fiebre, fatiga y anemia⁶⁵. También pueden transmitir el virus de la encefalitis de las garrapatas, que es común en Europa y Asia, afecta el sistema nervioso central y puede causar síntomas graves como fiebre, dolor de cabeza, rigidez en el cuello y encefalitis⁶⁵.

Estos artrópodos son ectoparásitos que se alimentan de la sangre de mamíferos, aves y reptiles. El ciclo de vida de las garrapatas juega un papel clave en la epidemiología de la enfermedad de Lyme. Las garrapatas de patas negras pueden vivir entre 2 y 3 años, presentando 4 etapas durante su ciclo de vida: huevo, larva, ninfa y adulto⁶⁶. Las larvas y las ninfas se alimentan de sangre para pasar a la siguiente fase de su ciclo, mientras que las hembras adultas lo hacen para completar el proceso de oviposición⁶⁷. La transmisión de la bacteria ocurre principalmente cuando las garrapatas adultas o ninfas infectadas se alimentan de un hospedador susceptible durante periodos largos, generalmente de 16 horas o menos, lo que permite que la bacteria sea transferida^{68,69}. Generalmente se considera que las ninfas son las responsables de la transmisión en roedores ya que la prevalencia de larvas infectadas es baja y las hembras adultas no se alimentan de roedores⁷⁰; en humanos, igualmente las ninfas infectadas son las principales transmisoras, aunque también las hembras adultas de las garrapatas se alimentan de humanos o de perros⁷¹.

Cuando las garrapatas buscan un huésped, trepan por los tallos de las plantas, adoptando una posición conocida como "questing", en la que extienden sus patas delanteras para adherirse a

cualquier animal que pase cerca. Una vez que la garrapata se transfiere al hospedador, busca un lugar adecuado para adherirse, generalmente la cabeza (orejas, cuello) o la ingle⁶⁹. Durante la adherencia, la garrapata inyectará saliva y una mezcla de sustancias para regular la respuesta inmune del hospedador y anticoagulantes que facilitan la ingesta de sangre, provocando una picadura indolora. Este comportamiento de las garrapatas, junto con la constante expansión de sus hábitats debido al cambio climático y la urbanización, ha incrementado el riesgo de transmisión de la enfermedad de Lyme en diversas regiones del mundo⁶³.

Ciclo de transmisión

El ciclo de transmisión de la enfermedad involucra tres elementos principales: el patógeno (*Borrelia*), las garrapatas como vectores, y una variedad de reservorios animales; inicia cuando una garrapata en su etapa de larva se alimenta de la sangre de un animal infectado, generalmente mamíferos pequeños como roedores⁶⁷. Durante esta alimentación, las bacterias pueden ser ingeridas y viajarán por la hemolinfa hasta el intestino medio de las garrapatas, que podrán mantenerlas durante la transición a sus siguientes etapas de desarrollo (ninfa y adulto). Las ninfas buscarán activamente un nuevo huésped adoptando la posición de "questing" en la vegetación baja, donde esperan el paso de un animal o humano para adherirse⁷². Al alimentarse del nuevo huésped, la garrapata transferirá las bacterias a través de su saliva. La bacteria puede ingresar al torrente sanguíneo del hospedador y diseminarse a otros órganos incluyendo articulaciones, corazón y sistema nervioso, causando una variedad de manifestaciones clínicas. Finalmente, las garrapatas hembras adultas depositan huevos no infectados, cerrando el ciclo y reiniciándolo con la siguiente generación de larvas⁷³.

Inicialmente se mencionaba que para un proceso de transmisión eficiente, se requería que la garrapata esté adherida por un periodo superior a 24 horas⁶⁸, sin embargo, estudios han

demostrado que esto podría suceder en periodos menores a 16 horas⁶⁹. Los animales salvajes son claves en el ciclo de la enfermedad; los roedores son de los principales reservorios de la bacteria. Estos animales suelen ser infectados sin mostrar síntomas graves, lo que permite que el ciclo de transmisión continúe. Por otro lado, los ciervos también son clave ya que no suelen desarrollar la enfermedad, pero sí actúan como hospedadores que permiten que las garrapatas se alimenten, maduren y se reproduzcan⁷⁴.

En el ciclo de transmisión, los perros también juegan un papel indirecto al transportar garrapatas infectadas a entornos domésticos, incrementando el riesgo de exposición para los humanos. Las garrapatas que se alimentan de los perros pueden continuar su ciclo de vida en el hogar o jardín, buscando nuevos huéspedes, incluidos los seres humanos⁵⁷. Por esta razón, los perros no solo son afectados por la enfermedad, sino que también pueden amplificar la interacción entre garrapatas y humanos. Este vínculo refuerza la importancia de implementar medidas preventivas, como el uso de collares repelentes, acaricidas tópicos y revisiones periódicas para remover garrapatas, no solo para proteger a los perros, sino también para reducir el riesgo de infección en sus dueños y en la comunidad.

Diagnóstico

El diagnóstico de la enfermedad de Lyme requiere un enfoque integral que combine la evaluación clínica con pruebas de laboratorio específicas. En humanos, la detección se basa principalmente en los síntomas clínicos, como eritema migratorio, fiebre, fatiga, dolores articulares y musculares, además de la exposición a áreas endémicas⁴⁵. Los métodos de laboratorio más comunes incluyen pruebas serológicas, como pruebas ELISA para detectar anticuerpos contra especies específicas (generalmente *B. burgdorferi*), seguido de una prueba de Western blot para confirmar resultados positivos⁷⁵. Aunque estas pruebas son útiles, su

interpretación debe considerar que los anticuerpos pueden tardar semanas en desarrollarse, lo que podría llevar a resultados negativos en etapas tempranas de la enfermedad⁷⁵.

En perros, el diagnóstico de la enfermedad de Lyme también comienza con la evaluación de síntomas, que incluyen fiebre, letargo, inflamación articular, cojera y, en casos más graves, insuficiencia renal. A nivel de medicina veterinaria, las pruebas rápidas de detección de anticuerpos, como SNAP 4Dx, son ampliamente utilizadas. Estas pruebas permiten identificar la presencia de anticuerpos específicos contra dirofilariasis (*Dirofilaria immitis*), enfermedad de Lyme (*B. burgdorferi*), erliquiosis (*Ehrlichia . canis* y *E. ewingii*), y anaplasmosis (*Anaplasma phagocytophilum* y *A. platys*)⁷⁶. Es importante señalar que un resultado positivo no siempre indica infección activa, ya que los anticuerpos pueden permanecer en el torrente sanguíneo mucho tiempo después de la exposición.

Tanto en humanos como en perros, los métodos moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se utilizan para detectar directamente el ADN de *Borrelia* en muestras biológicas, como sangre, líquido sinovial o tejido afectado⁷⁵. Aunque la PCR es altamente específica y útil en algunos casos, su sensibilidad puede ser limitada dado a que el número de espiroquetas en la muestra puede ser muy bajo. La correcta manipulación de las muestras durante la recolección, transporte, almacenamiento y procesamiento del ADN es esencial para obtener resultados confiables de PCR^{77,78}. Por ello, el diagnóstico certero de la LD debe considerar la historia clínica, la exposición a garrapatas y una combinación adecuada de herramientas diagnósticas⁷⁹.

SCIENTIFIC ARTICLE 1: MOLECULAR DETECTION OF *LEISHMANIA* SPP. IN DOMESTIC DOGS FROM RURAL AREAS OF ECUADOR

Introduction

Leishmaniasis is a zoonotic parasitic disease caused by different species of protozoa from the genus *Leishmania*, primarily transmitted through the bite of phlebotomine sandflies¹. The disease is endemic in tropical and subtropical regions, including South America, where it affects both humans and animals². In Ecuador, more than 700 cases have been reported this year to date, in 22 of the 24 provinces⁵. The disease presents a range of clinical manifestations, from cutaneous lesions to potentially fatal visceral leishmaniasis, depending on the infecting *Leishmania* species and the host immune response¹¹. Various animals participate in the transmission cycle of leishmaniasis, depending on the parasite species and geographic location, with wild mammals playing a crucial role in maintaining the parasite in nature¹. Domestic dogs also serve as reservoirs, particularly in urban and rural areas, where they are a primary source of infection for humans^{8,9,80}. Infected dogs often exhibit a range of clinical symptoms, from subclinical infections to severe systemic disease, making diagnosis challenging⁸.

Rural communities in Ecuador face unique challenges in addressing leishmaniasis due to limited access to healthcare, veterinary services, and vector control programs⁸¹. Dogs in these areas often live in close contact with humans and wildlife, increasing their exposure to sandflies vectors and their potential role in disease transmission⁷. Understanding the prevalence of *Leishmania* infection in dogs is therefore crucial for implementing effective control strategies and reducing the burden of the disease. Detecting *Leishmania* parasites in the blood of dogs is an essential step in identifying infected individuals and assessing the extent of transmission in each area. Molecular diagnostic methods, such as polymerase chain reaction (PCR), have become increasingly important for their high sensitivity and specificity in detecting *Leishmania* DNA in blood samples^{10,82,83}. These techniques are particularly valuable in rural areas, where asymptomatic infections in dogs may go unnoticed through traditional diagnostic approaches. Blood-based detection also offers a minimally invasive method for large-scale

epidemiological studies, making it a practical tool for monitoring the spread of leishmaniasis in endemic regions and in asymptomatic population⁸³.

Despite the recognized importance of dogs in the leishmaniasis cycle, studies on canine infection in Ecuador remain scarce⁸⁴⁻⁸⁷. This study aims to detect the presence of *Leishmania* DNA in the blood of dogs from rural communities in Ecuador, shedding light on the prevalence of infection and providing valuable insights for disease surveillance and control efforts in these underserved regions.

Materials and Methods

Sampled population

Dogs from rural communities in Ecuador were included in this study. Blood samples were obtained during several deworming and sterilization campaigns performed from March 2023 to November 2024, by Universidad San Francisco de Quito (USFQ) and Fundación Condor Andino Ecuador (FCA). Only dogs whose owners provided consent were included in the study. A total of 296 dogs were sampled, in 4 provinces: Santo Domingo (n=25), Morona Santiago (n=43), Orellana (n=117) and Pichincha (n=111). Blood samples for all domestic dogs we collected from the cephalic vein in tubes containing EDTA anticoagulant and transported to the Institute of Microbiology at USFQ for further analysis.

DNA Extraction

Two hundred microliters of whole blood were used for DNA extraction with the PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, USA), as described by the manufacturer protocols. To rule out the presence of PCR inhibitors, the beta-actin gene was amplified in all extracted samples.

Molecular detection of genus *Leishmania*

For molecular detection of *Leishmania* spp, a pair of genus specific primers (JW11/JW12) were used to amplify a 120 bp fragment of the kinetoplast DNA (kDNA) minicircles^{88,89}. Amplifications were performed at a final volume of 12.5 µl, containing 1.5 mM MgCl₂, 1x PCR buffer, 0.2 mM dNTPs, 1 U of Taq DNA polymerase, 0.4 µM of primer JW11 (5'- CCTATTTTACACCAACCCCCAGT-3'), 0.4 µM of primer M2 (5'-GGG TAGGGGCGTTCTGCGAAA-3'), 8.32 µl of PCR grade water and 1.5

μl of DNA template. *Leishmania mexicana* DNA extracted from culture was used as positive control, and water as negative control. The thermocycling conditions were programmed as follows: 94° for 3 min, 35 cycles of at 94 °C for 30 s, 58 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s, with a final extension at 72 °C for 5 min. The PCR products were observed on 1.8% agarose gels.

Molecular identification of *Leishmania* specie

For the standardization of the *Leishmania* species PCR conditions, DNA extracted from cultures of *L. mexicana*, *L. tarentolae*, *L. guyanensis* and *L. braziliensis* were used. Initially, a fragment of the cytochrome b (CytB) gene was selected for the molecular identification of *Leishmania* species. A pair of primers that amplify a 965 bp fragment were designed using SnapGene software (version 8.0; Dotmatics, Boston, MA, USA). The amplifications were performed at a final volume of 25 μl, containing 12.5 μl Q5 High-Fidelity 2X Master Mix, 0.5 μM of primer Cytb-designed-F (5'-TTAACTTCAGGTTGTTTATTGCG-3'), 0.5 μM of primer Cytb-designed-R (5'-GCTAAAAWCCACTCATAAATATAC-3'), 8 μl of PCR grade water and 2.5 μl of DNA template. The thermocycling conditions were programmed as follows:

98° for 1 min, 35 cycles of at 98 °C for 10 s, 58 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min, with a final extension at 72 °C for 2 min. The PCR products were observed on 1% agarose gels.

As problems were observed during the standardization process of the CytB amplification conditions, a second target were selected the 70 kilodalton heat shock protein 70 (HSP70)^{90,91}. A pair of primers were selected from bibliography^{90,91}, which amplifies a 370 bp fragment. The same 4 positive controls were used for the standardization. Amplifications were performed at a final volume of 25 μl, containing 12.5 μl Q5 High-Fidelity 2X Master Mix, 8 μl of PCR grade water, 0.5 μM of primer HSP70F (5'-AGGTGAAGGCGACGAACG-3'), 0.5 μM of primer HSP70R (5'-CGCTTGTCATCTTTGCGTC-3') and 2.5 μl of DNA template. The thermocycling conditions were programmed as follows: 98° for 1 min, 35 cycles of at 98 °C for 10 s, 68 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min, with a final extension at 72 °C for 2 min. The PCR products were observed on 1.5% agarose gels.

Nanopore sequencing

Positive PCR amplicons from HSP70 PCR were purified using Agencourt 0.7X AMPure XP Bead (Beckman Coulter Life Sciences, Germany), according to the manufacturer's instructions. The amplicons were quantified using the Qubit™ 1X dsDNA High Sensitivity (Thermo Fisher Scientific, USA) and normalized to equimolar quantities (up to a maximum of 200 fmol per sample). DNA library was prepared with the Native Barcoding Kit 96 V14 (SQK-NBD114.96, Oxford Nanopore Technologies, UK), following the manufacturer's protocol.

A total of 20 fmol of the prepared library were loaded on a R10.4.1 flow cell and sequenced on the ONT GridION device for 16 hours, at the Center for Bioinformatics-USFQ. Super-accurate basecalling model was applied, and Trim Barcode option was selected. Quality control of FASTQ files was performed using a minimum Q-score threshold of 10. The data were then analyzed using the Amplicon Sorter tool (https://github.com/avierstr/amplicon_sorter) which categorizes amplicon-specific reads based on the targeted fragment size and then generates consensus sequences. For HSP70 amplicon analysis we selected reads between 360 and 380 bp.

Results

Detection of genus *Leishmania*

From the 296 blood samples collected, *Leishmania* DNA was detected in 22 samples from 2 provinces as shown in Table 1. Figure 1 shows one agarose gels (1.8%) for the visualization of the PCR amplicons; positive and negative blood samples can be seen.

Table 1. Amplification results for *Leishmania* spp. detection

Province	# blood sampled	# positive samples	Porcentaje
Morona Santiago	43	0	0,00%
Orellana	117	19	16,24%
Pichincha	111	0	0,00%
Santo Domingo	25	3	12,00%
	296	22	7,43%

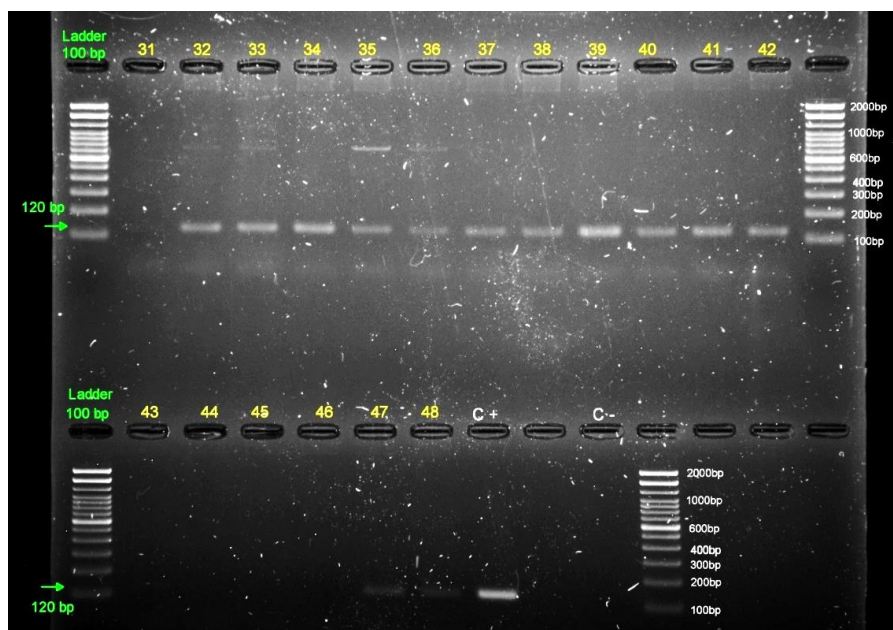


Figure 1. Agarose gel for kDNA minicircles fragment amplification (120 bp). First and last lanes correspond to the 100 bp ladder. Lanes labeled as 31 to 48 correspond to dog blood samples. Lanes labeled as C + and C - correspond to *L. mexicana* DNA and water respectively.

Identification of *Leishmania* species

We faced troubles during the standardization of the CytB amplification using the four positive controls (*L. mexicana*, *L. tarentolae*, *L. guyanensis* and *L. braziliensis* DNA). Even when different annealing temperatures, and DNA concentrations were evaluated, not all the DNA controls amplified.

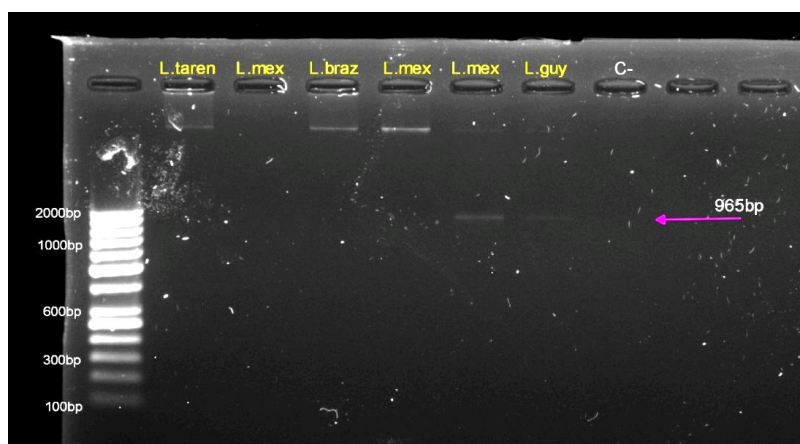


Figure 2. Agarose gel for CytB fragment (965 bp) amplification standardization. First lane corresponds to the 100 bp ladder. Lanes 2, 4 and 7 correspond to *L. tarentolae*, *L. braziliensis*, and *L. guyanensis* DNA respectively. Lanes 3, 5 and 6 correspond to *L. mexicana* DNA from cultures of different dates. Lane labeled as C - correspond to water.

Considering these difficulties with the positive control amplification, we decided to test only 10 of the 22 positive samples. Unspecific amplifications were observed, as shown in Figure 3. Due to these problems, we decided to evaluate the second selected target (HSP70).

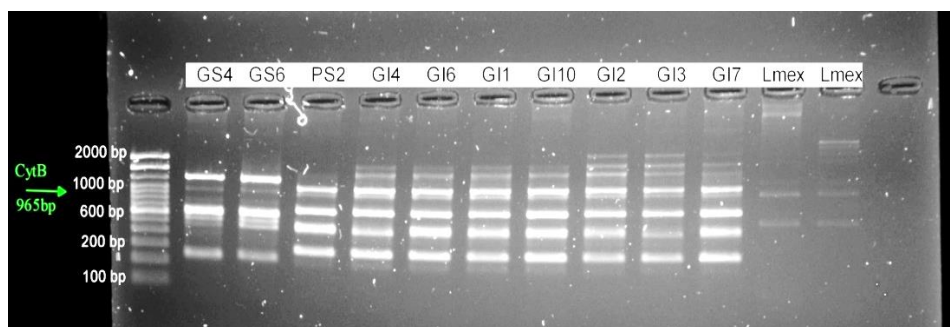


Figure 3. Agarose gel for the cytochrome B fragment amplification (965 bp) in blood samples. First lane corresponds to the 100 bp ladder. Lanes 2 to 11 correspond to blood samples with a positive result for *Leishmania* genus. Lanes 12-13 correspond to *L. mexicana* DNA and lane 14 to negative control (water).

When using HSP70, the 4 positive controls showed the expected amplification band (370bp) as shown in Figure 4.



Figure 4. Agarose gel for the HSP70 fragment (370 bp) amplification standardization. Lanes 2 and 8 correspond to the 100 bp ladder. Lanes 3 to 6 correspond to *L. mexicana*, *L. tarentolae*, *L. guyanensis* and *L. braziliensis* DNA respectively. Lane 7 corresponds to negative control (water).

Unfortunately, when processing the 22 blood samples, multiple unspecific amplifications were observed, as shown in Figure 5.

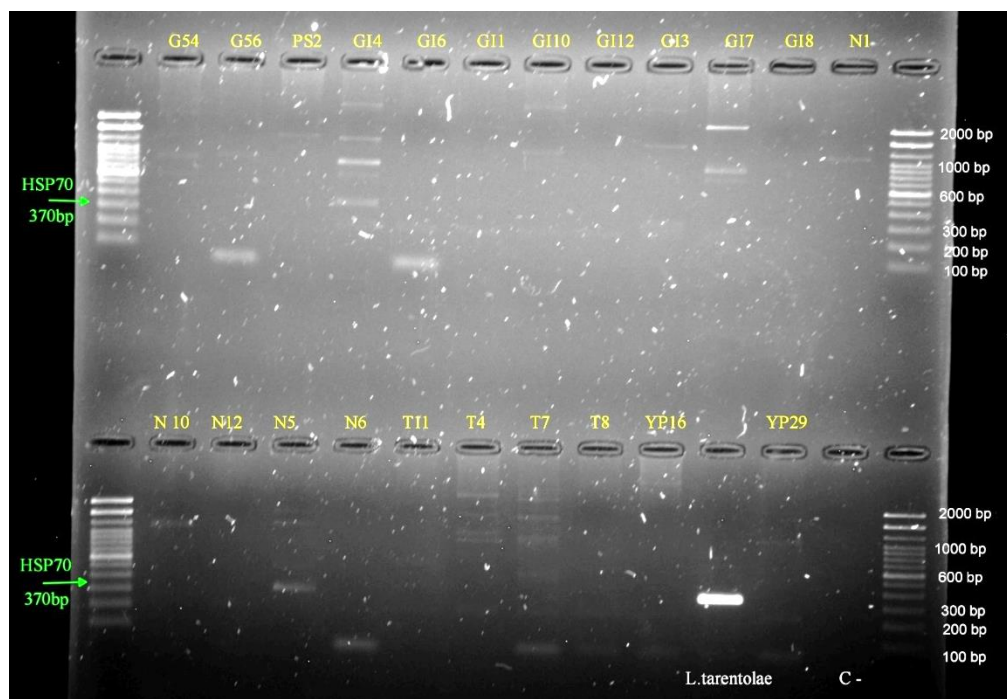


Figure 5. Agarose gel for HSP70 fragment amplification (370 bp) in blood samples. First and last lanes correspond to the 100 bp ladder. Lanes labeled in yellow correspond to the 22 positive *Leishmania* samples. *L. tarentolae* DNA and water were used as positive and negative controls respectively.

For amplicon sequencing, 2 samples showing a band of approximately 370 bp were selected, even if more unspecific bands are present: G104 and N05. The 4 positive controls were also sequenced for confirmation of the species. After 16h of sequencing, 9.74 M reads were generated, with Q score higher than 10. For positive controls, amplicon sorter analysis generated a unique consensus sequence, of 371 bp. Reads from sample N05 generated a 365 bp consensus sequence, which were determined to be closely linked to NCBI- BLAST *Streptomonas maltophilia* with 96.4% of identity and 99% of query coverage.

We performed a search of *Leishmania* 70 KDa heat shock protein sequences in NCBI GenBank, obtaining 26 sequences from 15 different *Leishmania* isolates and strains, which were used for the construction of a phylogenetic tree (Table 2).

Table 2. Reference sequences of *Leishmania* spp. HSP70 gene obtained from GenBank for phylogenetic analysis.

Strain code/isolate	Species	Accession number
MHOM/ET/83/169-83	<i>Leishmania aethiopica</i>	FN395020.1
MHOM/ET/89/GERE	<i>Leishmania aethiopica</i>	FN395018.1
LTB0016	<i>Leishmania amazonensis</i>	L14605.1
MHOM/BR/73/M2269	<i>Leishmania amazonensis</i>	MG029123.1
MHOM/BO/--/CUM180	<i>Leishmania braziliensis</i>	FN395039.1
MHOM/BO/94/CUM29	<i>Leishmania braziliensis</i>	FN395041.1
MCAN/BR/06/MAIKE	<i>Leishmania chagasi</i>	FN395035.1
MHOM/IN/00/DEVI	<i>Leishmania donovani</i>	MN728741.1
MHOM/SD/97/LEM3463	<i>Leishmania donovani</i>	MN728759.1
MHOM/GF/2004/GAE1	<i>Leishmania guyanensis</i>	HF586406.1
guy_MHOM/BR/1975/M4147	<i>Leishmania guyanensis</i>	KX573934.1
PL11	<i>Leishmania guyanensis</i>	MW658405.1
MHOM/MT/85/BUCK	<i>Leishmania infantum</i>	MN728753.1
MHOM/PT/00/IMT260	<i>Leishmania infantum</i>	FN395032.1
MHOM/PE/91/LC1581	<i>Leishmania lainsoni</i>	FN395048.1
L137	<i>Leishmania major</i>	FN395023.1
UQ_8	<i>Leishmania major</i>	FN395022.1
MHOM/MX/85/SOLIS	<i>Leishmania mexicana</i>	HF586401.1
MHOM/PE/02/LH2312	<i>Leishmania mexicana</i>	FN395038.1
MHOM/GF/97/CRE88	<i>Leishmania naiffi</i>	HF586373.1
MDAS/BR/1979/M5533	<i>Leishmania naiffi</i>	GU071183.1
MHOM/PA/71/LS94	<i>Leishmania panamensis</i>	EU599094.1
PA_002	<i>Leishmania panamensis</i>	KX573937.1
IWHI/BR/1985/IM2326	<i>Leishmania shawi</i>	GU071175.1
-	<i>Leishmania tarentolae</i>	AY423868.1
MHOM/IN/79/DD7	<i>Leishmania tropica</i>	FN395025.1

GenBank *Leishmania* HSP70 gene sequences and consensus sequences from positive controls and GI04 sample were aligned and edited using a general-purpose multiple sequence alignment program for DNA or proteins, Clustal W, implemented in the Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MegaX) software. The best-fitting model of molecular evolution for the Maximum-Likelihood (ML) tree was selected based on the Bayesian

information criterion (BIC) using the “Find Best DNA/Protein Model” in MegaX software.

Tamura 3-parameter model and Gamma distributed was selected.

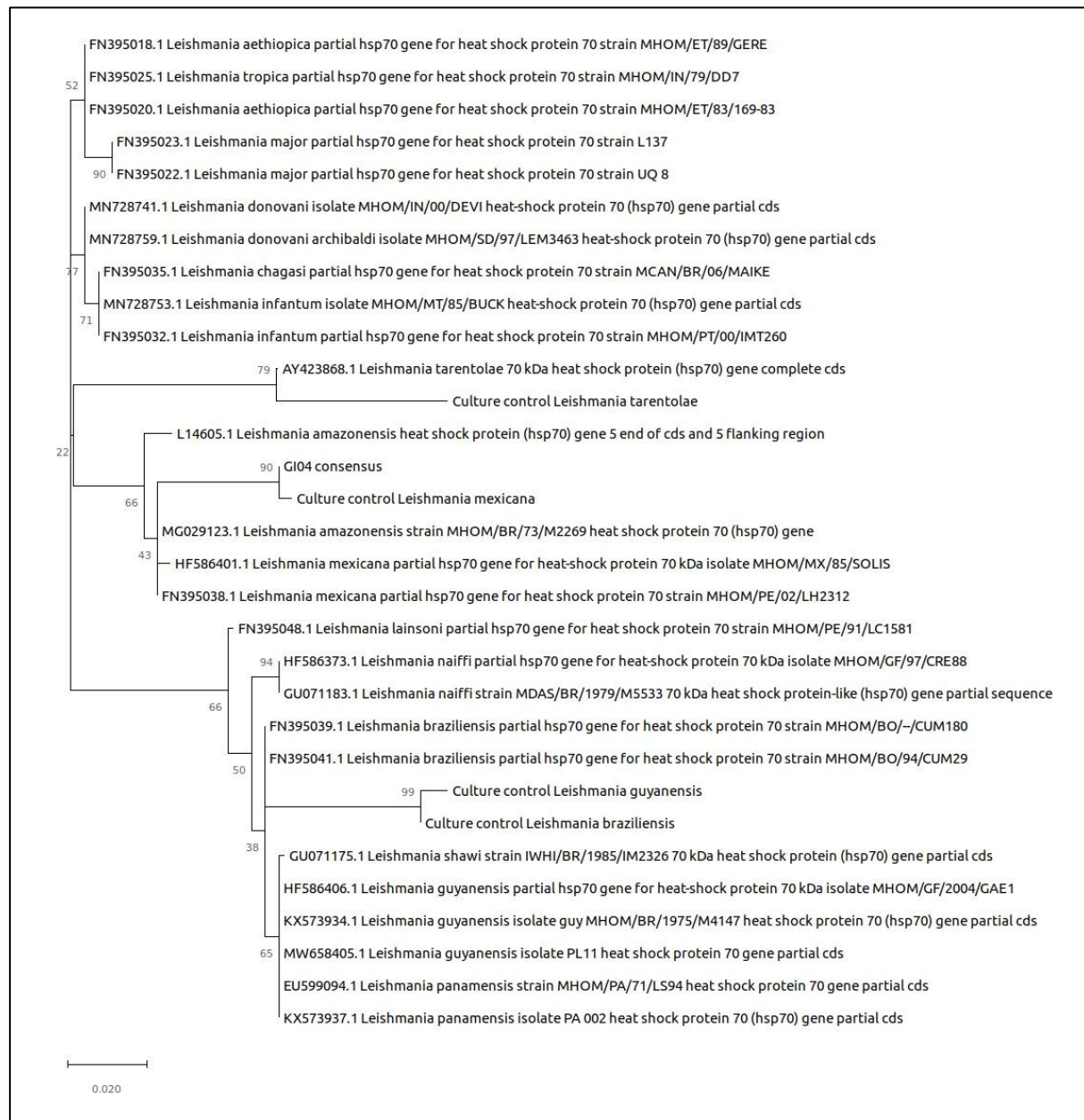


Figure 6. Phylogenetic tree based on HSP70 fragment. Maximum Likelihood method and Tamura 3-parameter model. The tree with the highest log likelihood (-872.85) is shown. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches.

As shown in Figure 7, the positive controls for *L. mexicana*, *L. tarentolae*, *L. guyanensis*, and *L. braziliensis* cluster in the clade corresponding to their respective reference sequences.

Sample GI04 clusters with the *L. mexicana* positive control and reference sequence, suggesting that the species present in this dog's sample corresponds to *L. mexicana*.

Discussion and Conclusions

In Ecuador, research on leishmaniasis is limited. According to the PubMed database, only seven research articles on the vector^{92–98} and nine on human cases^{82,99–106} have been published in the last decade, while no publications are recorded for dogs up to date. A broader search on Google Scholar identified two thesis projects^{85,86} on canine leishmaniasis, one research⁸⁴ and a report of a clinical case involving canine leishmaniasis¹⁰⁷.

The results of the present study highlight the importance of molecular tests application for the diagnosis of leishmaniasis. Out of 269 samples analyzed, parasite's DNA was detected in 22 samples (7.43%), a relatively high percentage compared to values reported using serological tests. Ayala's cross-sectional descriptive study evaluated the presence of *Leishmania* spp. in domestic dogs in Guayaquil, Ecuador. Out of 87 sampled dogs, two positive cases were identified using a serological immunochromatographic test, corresponding to the 2.29%⁸⁶. In Granoble et. al research, blood samples were collected from 30 dogs in Durán, and analyzed using a rapid serological test (Bionote Test), resulting in the detection of one positive case (0.33%)⁸⁴.

Even though, the amplification of the ITS region is commonly used, the present study showed that the amplification of kDNA with primers JW11/JW12 is also a useful tool for leishmaniasis diagnostic. In Bedoya's study, blood samples and swabs from the earwax and conjunctival mucosa were collected from 63 dogs in the localities of Mashpi and Pachijal, in

the northwestern region of Pichincha. The ITS region of *Leishmania* spp. was amplified using nested-PCR; however, no positive cases were detected⁸⁵.

The value of using blood samples instead of biopsies for diagnosis is significant, not only because it is less invasive but also because it allows for the detection of asymptomatic cases. Previous work conducted by our group has demonstrated the effectiveness of detecting leishmaniasis in blood samples from patients, identifying more cases than the gold standard tests (microscopy and staining)⁸².

The fact that the sequenced controls clustered with their respective reference sequences confirms that the selected HSP70 gene fragment is useful for species discrimination.

However, this is only applicable in cases where a pure culture of the parasite is available, as with the controls. For clinical samples, this fragment is not useful, as it amplifies nonspecific fragments, as observed in dog samples. Further studies are needed to identify the most suitable gene target for *Leishmania* species identification in blood samples. Designing primers that specifically amplify the target gene in such samples is complex, as dogs may be infected with multiple pathogens simultaneously.

Acknowledgements

We would like to express our sincere gratitude to Dr. Maria Echeverry (Universidad Nacional de Colombia) for her kind help providing us with *L. braziliensis* and *L. guyanensis* cultures, Dr. Vanesa Adaui (Universidad Peruana Cayetano Heredia), and Dr. Larry Simpson (UCLA) which were essential as positive controls in the present study.

References

1. Mann, S. *et al.* A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. *Current Tropical Medicine Reports* vol. 8 (2021).
2. World Health Organization. Neglected Tropical Diseases. *WHO* <https://openwho.org/channels/ntd> (2021).
3. Pan American Health Organization. Leishmaniasis. *PAHO* <https://www.paho.org/en/topics/leishmaniasis> (2022).
4. López Domínguez, D. M., García Delgado, J. L., Guerrero Caicedo, R. G. & Hernández Bandera, N. Gestión de diagnóstico de leishmaniasis cutánea y mucocutánea en Ecuador 2019- 2020. *Boletín Malariol. y Salud Ambient.* **61**, (2021).
5. Subsecretaria de Vigilancia Prevención y Control de la Salud. *Mapa de Enfermedades Vectoriales por provincia SE 1 a SE 40.* (2024).
6. Morales, D. V. *et al.* Data scarcity and ecological complexity: The cutaneous leishmaniasis dynamics in Ecuador. *J. R. Soc. Interface* **16**, (2019).
7. Morales-Yuste, M., Martín-Sánchez, J. & Corpas-Lopez, V. Canine Leishmaniasis: Update on Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention. *Vet. Sci.* **9**, 387 (2022).
8. Dantas-Torres, F. Canine leishmaniasis in the Americas: etiology, distribution, and clinical and zoonotic importance. *Parasites Vectors* 2024 171 **17**, 1–10 (2024).
9. Ribeiro, R. R. *et al.* Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. *BioMed Research International* vol. 2018 (2018).
10. Gow, I., Smith, N. C., Stark, D. & Ellis, J. Laboratory diagnostics for human Leishmania infections: a polymerase chain reaction-focussed review of detection and identification methods. *Parasites and Vectors* vol. 15 (2022).
11. Aronson, N. *et al.* Diagnosis and treatment of leishmaniasis: Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of America (IDSA) and the American Society of tropical medicine and hygiene (ASTMH). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **96**, (2017).
12. Fischer, T., Fischer, M., Schliemann, S. & Elsner, P. Treatment of mucocutaneous leishmaniasis - A systematic review. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* **22**, 763–773 (2024).
13. Ayele, A. & Seyoum, Z. A Review on Canine Leishmaniasis; Etiology, Clinical Sign, Pathogenesis, Treatment and Control Methods. *Glob. Vet.* **17**, (2016).
14. Ivănescu, L. *et al.* The immune response in canine and human leishmaniasis and how this influences the diagnosis- a review and assessment of recent research. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* vol. 13 (2023).
15. Castillo-Ureta, H. *et al.* First report of autochthonous canine leishmaniasis caused by Leishmania (L.) mexicana in Sinaloa, Mexico. *Acta Trop.* **190**, (2019).
16. Figueredo, L. A., de Paiva-Cavalcanti, M., Almeida, E. L., Brandão-Filho, S. P. & Dantas-Torres, F. Clinical and hematological findings in Leishmania braziliensis-infected dogs from Pernambuco, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* **21**, (2012).
17. Vélez, I. D., Carrillo, L. M., López, L., Rodríguez, E. & Robledo, S. M. An epidemic outbreak of canine cutaneous leishmaniasis in colombia caused by Leishmania braziliensis and Leishmania panamensis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **86**, (2012).
18. Sanches, L. da C. *et al.* Natural canine infection by Leishmania infantum and Leishmania amazonensis and their implications for disease control. *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária* **25**, (2016).
19. Valdivia, H. O. *et al.* Comparative genomics of canine-isolated Leishmania

- (Leishmania) amazonensis from an endemic focus of visceral leishmaniasis in Governador Valadares, southeastern Brazil. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
20. Akhoundi, M. *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *PLoS Neglected Tropical Diseases* vol. 10 (2016).
 21. Gupta, A. K., Das, S., Kamran, M., Ejazi, S. A. & Ali, N. The pathogenicity and virulence of Leishmania - interplay of virulence factors with host defenses. *Virulence* vol. 13 (2022).
 22. Kostygov, A. Y. *et al.* Euglenozoa: Taxonomy, diversity and ecology, symbioses and viruses. *Open Biology* vol. 11 (2021).
 23. Sereno, D. Leishmania (Mundinia) spp.: from description to emergence as new human and animal Leishmania pathogens. *New Microbes New Infect.* **30**, (2019).
 24. Giesen, C. *et al.* The Role of Environmental Factors in Lyme Disease Transmission in the European Union: A Systematic Review. *Trop. Med. Infect. Dis.* **9**, 113 (2024).
 25. Kazemi, B. Genomic organization of Leishmania species. *Iranian Journal of Parasitology* vol. 6 (2011).
 26. Black, J. A., Reis-Cunha, J. L., Cruz, A. K. & Tosi, L. R. O. Life in plastic, it's fantastic! How Leishmania exploit genome instability to shape gene expression. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* vol. 13 (2023).
 27. Grünebast, J., Lorenzen, S. & Clos, J. Genome-wide quantification of polycistronic transcription in Leishmania major. *MBio* e0224124 (2024) doi:10.1128/MBIO.02241-24/SUPPL_FILE/MBIO.02241-24-S0009.XLSX.
 28. Kamran, M., Bhattacharjee, R., Das, S., Mukherjee, S. & Ali, N. The paradigm of intracellular parasite survival and drug resistance in leishmanial parasite through genome plasticity and epigenetics: Perception and future perspective. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* vol. 13 (2023).
 29. Santi, A. M. M. & Murta, S. M. F. Impact of Genetic Diversity and Genome Plasticity of Leishmania spp. in Treatment and the Search for Novel Chemotherapeutic Targets. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* vol. 12 (2022).
 30. Tosi, L. R. O., Denny, P. W., De Oliveira, C. I. & Damasceno, J. D. Editorial: Leishmania genome variability: Impacts on parasite evolution, parasitism and leishmaniases control. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* vol. 13 (2023).
 31. Mathison, B. A. & Bradley, B. T. Review of the Clinical Presentation, Pathology, Diagnosis, and Treatment of Leishmaniasis. *Lab Med.* **54**, (2023).
 32. Teixeira, D. E. *et al.* The Cell Biology of Leishmania: How to Teach Using Animations. *PLoS Pathog.* **9**, (2013).
 33. Azami-conesa, I., Gómez-muñoz, M. T. & Martínez-díaz, R. A. A systematic review (1990–2021) of wild animals infected with zoonotic leishmania. *Microorganisms* **9**, (2021).
 34. Vannucci, V., Gavazza, A., Medina Valentin, A. A., Gori, V. & Lubas, G. Hematological, biochemical, serological, and molecular monitoring of blood donor dogs vaccinated with CaniLeish® for the prevention of Leishmaniosis. *Comp. Clin. Path.* **27**, (2018).
 35. Dantas-Torres, F. Canine leishmaniosis in South America. *Parasites and Vectors* **2**, (2009).
 36. Piyasiri, S. B., Dewasurendra, R., Samaranayake, N. & Karunaweera, N. Diagnostic Tools for Cutaneous Leishmaniasis Caused by Leishmania donovani: A Narrative Review. *Diagnostics* **13**, (2023).
 37. Scarpini, S. *et al.* Visceral Leishmaniasis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment

- Regimens in Different Geographical Areas with a Focus on Pediatrics. *Microorganisms* vol. 10 (2022).
38. de Oliveira, D. M., Lonardoni, M. V. C., Theodoro, U. & Silveira, T. G. V. Comparison of different primers for PCR-based diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Brazilian J. Infect. Dis.* **15**, (2011).
 39. Skraba, C. M. *et al.* Evaluation of the reference value for the Montenegro skin test. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **48**, (2015).
 40. Vital, T. *et al.* Detecting Leishmania in dogs: A hierarchical-modeling approach to investigate the performance of parasitological and qPCR-based diagnostic procedures. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **16**, (2022).
 41. Downing, T. *et al.* Whole genome sequencing of multiple Leishmania donovani clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance. *Genome Res.* **21**, (2011).
 42. Maia de Souza, R. *et al.* Identification of Leishmania species by next generation sequencing of hsp70 gene. *Mol. Cell. Probes* **61**, (2022).
 43. Adeolu, M. & Gupta, R. S. A phylogenomic and molecular marker based proposal for the division of the genus Borrelia into two genera: The emended genus Borrelia containing only the members of the relapsing fever Borrelia, and the genus Borreliella gen. nov. containing the members o. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **105**, (2014).
 44. Tang, T. *et al.* The global distribution and the risk prediction of relapsing fever group Borrelia: a data review with modelling analysis. *The Lancet Microbe* **5**, (2024).
 45. Guérin, M. *et al.* Lyme borreliosis diagnosis: state of the art of improvements and innovations. *BMC Microbiology* vol. 23 (2023).
 46. Kilpatrick, A. M. *et al.* Lyme disease ecology in a changing world: Consensus, uncertainty and critical gaps for improving control. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* vol. 372 (2017).
 47. Westra, S., Goldberg, M. S. & Didan, K. The association between the incidence of Lyme disease in the USA and indicators of greenness and land cover. *Curr. Res. Parasitol. Vector-Borne Dis.* **4**, (2023).
 48. Marques, A. R., Strle, F. & Wormser, G. P. Comparison of lyme disease in the United States and Europe. *Emerging Infectious Diseases* vol. 27 (2021).
 49. Lucca, V. *et al.* Lyme Disease: A Review with Emphasis on Latin America. *Microorganisms* vol. 12 (2024).
 50. Cervantes, J. Enfermedad de Lyme en el Perú. Una revisión clínica y epidemiológica. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica* **35**, (2018).
 51. Jorge, F. R. *et al.* Novel Borrelia Genotypes from Brazil Indicate a New Group of Borrelia spp. Associated with South American Bats. *J. Med. Entomol.* **60**, (2023).
 52. Luz, H. R., Faccini, J. L. H. & McIntosh, D. Molecular analyses reveal an abundant diversity of ticks and rickettsial agents associated with wild birds in two regions of primary Brazilian Atlantic Rainforest. *Ticks Tick. Borne. Dis.* **8**, (2017).
 53. Mancilla-Agrono, L. Y. *et al.* Is Borrelia burgdorferi Sensus Stricto in South America? First Molecular Evidence of Its Presence in Colombia. *Trop. Med. Infect. Dis.* **7**, (2022).
 54. Nava, S. *et al.* Borrelia infection in Ixodes pararicinus ticks (Acari: Ixodidae) from northwestern Argentina. *Acta Trop.* **139**, (2014).
 55. Clark, R. P. & Hu, L. T. Prevention of Lyme Disease and Other Tick-Borne Infections. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **22**, (2008).
 56. Goossens, H. A. T., Van den Bogaard, A. E. & Nohlmans, M. K. E. Dogs as sentinels

- for human Lyme borreliosis in The Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* **39**, (2001).
57. Picado, R. *et al.* Lyme disease in companion animals: an updated state-of-art and current situation in Portugal. *Vet. Res. Commun.* **48**, 3551–3561 (2024).
 58. Elbaum-Garfinkle, S. Close to home: A history of yale and lyme disease. *Yale J. Biol. Med.* **84**, (2011).
 59. Barbour, A. G. & Qiu, W. Borreliella. in *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (2019). doi:10.1002/9781118960608.gbm01525.
 60. Strnad, M., Vancová, M. & Rego, R. O. M. Borrelia (Borreliella) burgdorferi. *Trends Microbiol.* **32**, (2024).
 61. Hepner, S. *et al.* A high fidelity approach to assembling the complex Borrelia genome. *BMC Genomics* **24**, (2023).
 62. Iyer, R. *et al.* Linear and circular plasmid content in Borrelia burgdorferi clinical isolates. *Infect. Immun.* **71**, (2003).
 63. Wolf, M. J., Watkins, H. R. & Schwan, W. R. Ixodes scapularis: Vector to an increasing diversity of human pathogens in the upper midwest. *Wis. Med. J.* **119**, (2020).
 64. Strnad, M., Hönig, V., Růžek, D., Grubhoffer, L. & Rego, R. O. M. Europe-wide meta-analysis of Borrelia burgdorferi sensu lato prevalence in questing Ixodes ricinus ticks. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**, (2017).
 65. Nuttall, P. A. Tick saliva and its role in pathogen transmission. *Wien. Klin. Wochenschr.* **135**, (2023).
 66. Lindsø, L. K., Viljugrein, H. & Mysterud, A. Vector competence of Ixodes ricinus instars for the transmission of Borrelia burgdorferi sensu lato in different small mammalian hosts. *Parasites and Vectors* **17**, (2024).
 67. Centers for Disease Control and Prevention. How Lyme Disease Spreads. <https://www.cdc.gov/lyme/causes/index.html> (2024).
 68. Voordouw, M. J. Co-feeding transmission in Lyme disease pathogens. *Parasitology* vol. 142 (2015).
 69. Cook, M. J. Lyme borreliosis: A review of data on transmission time after tick attachment. *Int. J. Gen. Med.* **8**, (2014).
 70. Van Duijvendijk, G., Sprong, H. & Takken, W. Multi-trophic interactions driving the transmission cycle of Borrelia afzelii between Ixodes ricinus and rodents: A review. *Parasites and Vectors* **8**, (2015).
 71. Little, S. E., Heise, S. R., Blagburn, B. L., Callister, S. M. & Mead, P. S. Lyme borreliosis in dogs and humans in the USA. *Trends Parasitol.* **26**, (2010).
 72. Steinbrink, A., Brugger, K., Margos, G., Kraiczy, P. & Klimpel, S. The evolving story of Borrelia burgdorferi sensu lato transmission in Europe. *Parasitol. Res.* **121**, (2022).
 73. National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (U.S.). Division of Vector-Borne Infectious Diseases. *Lyme disease : a public information guide*. <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/11694> (2011).
 74. Radolf, J. D., Caimano, M. J., Stevenson, B. & Hu, L. T. Of ticks, mice and men: Understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, (2012).
 75. Marques, A. R. Laboratory Diagnosis of Lyme Disease: Advances and Challenges. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **29**, (2015).
 76. Vet Solutions Inc. Test SNAP® 4DX Plus. <http://www.vet-solutions.com/wp/diagnostico-clinica/snap/4dxplus/> (2023).
 77. Nigrovic, L. E. *et al.* The Lyme Disease Polymerase Chain Reaction Test Has Low Sensitivity. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **20**, (2020).

78. Agüero-Rosenfeld, M. E. Lyme Disease: Laboratory Issues. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **22**, (2008).
79. Agüero-Rosenfeld, M. E., Wang, G., Schwartz, I. & Wormser, G. P. Diagnosis of lyme borreliosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 484–509 (2005).
80. Dahmani, A., Ouchene-Khelifi, N. A. & Ouchene, N. Human and Canine Leishmaniasis: Diagnosis and Risk Factors. *World's Vet. J.* **12**, (2022).
81. Bezemer, J. M., Freire-Paspuel, B. P., Schallig, H. D. F. H., de Vries, H. J. C. & Calvopiña, M. Leishmania species and clinical characteristics of Pacific and Amazon cutaneous leishmaniasis in Ecuador and determinants of health-seeking delay: a cross-sectional study. *BMC Infect. Dis.* **23**, (2023).
82. Muñoz, E. B. *et al.* Diagnostic efficacy of molecular techniques for detection and identification of leishmania species in human whole blood and skin samples from Ecuador. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **95**, (2016).
83. Mohammed, R. *et al.* Detection of asymptomatic Leishmania infection in blood donors at two blood banks in Ethiopia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **17**, (2023).
84. Granoble Pincay, M., Macías Litardo, M. & Mendoza Castañeda, G. Seroprevalencia de Leishmania spp., en perros del cantón Durán, provincia del Guayas, Ecuador. *Revista Científica Ecológica Agropecuaria* (2023).
85. Bedoya Jaramillo, C. A. Determinación de leishmaniasis en caninos del noroccidente de Pichincha, a través de la evaluación de técnicas invasivas y no invasivas. (Quito: UCE, 2019).
86. Ayala Rada, D. Estudio de prevalencia de Leishmaniasis canina como problema de salud pública en sector Vía a la Costa de Guayaquil – Ecuador. (Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, 2023).
87. Vargas Cano, O. D. Determinación de Leishmania spp. en perros (Canis Lupus Familiaris) residentes en zonas tropicales de la provincia de Pichincha. (Universidad de Cuenca, 2021).
88. Abbasi, I. *et al.* Evaluation of PCR procedures for detecting and quantifying Leishmania donovani DNA in large numbers of dried human blood samples from a visceral leishmaniasis focus in Northern Ethiopia. *BMC Infect. Dis.* **13**, (2013).
89. Karakuş, M. *et al.* First molecular detection and identification of Leishmania species in small wild rodents from Turkey. *Parasitology* **147**, (2020).
90. Hernández, C. *et al.* Identification of Six New World Leishmania species through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. *Parasites and Vectors* **7**, (2014).
91. González, C. *et al.* Diversity patterns, Leishmania DNA detection, and bloodmeal identification of Phlebotominae sand flies in villages in northern Colombia. *PLoS One* **13**, (2018).
92. Anaguano, D. F., Ponce, P., Baldeón, M. E., Santander, S. & Cevallos, V. Blood-meal identification in phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from Valle Hermoso, a high prevalence zone for cutaneous leishmaniasis in Ecuador. *Acta Trop.* **152**, (2015).
93. Arrivillaga-Henríquez, J. *et al.* Eco-epidemiological aspects, natural detection and molecular identification of Leishmania spp. in Lutzomyia reburra, Lutzomyia barrettoii majuscula and Lutzomyia trapidoi. *Biomedica* **37**, (2017).
94. Hashiguchi, Y. *et al.* Anthropophilic phlebotomine sand fly Lutzomyia species and search for the natural Leishmania infections in an area endemic for cutaneous leishmaniasis in Ecuador. *Acta Trop.* **203**, (2020).
95. Hashiguchi, Y. *et al.* Natural Leishmania (Leishmania) mexicana infection and biting activity of anthropophilic sand fly Lutzomyia ayacuchensis in the Ecuadorian Andes.

- Acta Trop.* **203**, (2020).
96. Tabbabi, A. *et al.* Comparative analysis of bacterial communities in lutzomyia ayacuchensis populations with different vector competence to Leishmania parasites in Ecuador and Peru. *Microorganisms* **9**, (2021).
 97. Hashiguchi, Y. *et al.* Andean cutaneous leishmaniasis (Andean-CL, uta) in Peru and Ecuador: the vector Lutzomyia sand flies and reservoir mammals. *Acta Trop.* **178**, (2018).
 98. Quiroga, C. *et al.* Molecular Identification of Leishmania spp. in Sand Flies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) From Ecuador. *J. Med. Entomol.* **54**, (2017).
 99. Kato, H. *et al.* PCR-RFLP analyses of leishmania species causing cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis revealed distribution of genetically complex strains with hybrid and mito-nuclear discordance in Ecuador. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **13**, (2019).
 100. Domínguez, D. M. L., Delgado, J. L. G., Caicedo, R. G. G. & Bandera, N. H. Diagnostic management of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in ecuador-2020. *Bol. Malariol. y Salud Ambient.* **61**, (2021).
 101. Calvopina, M., Bohórquez Moreira, P., Villacís Ulloa, P. & Encalada, M. Leishmaniasis Cutánea “Úlcera de Chiclero” en la Amazonia, Ecuador. *Práctica Fam. Rural* **5**, (2020).
 102. Calvopina, M. *et al.* Case report: Coinfection of leishmania guyanensis and human immunodeficiency virus-acquired immune deficiency syndrome: Report of a case of disseminated cutaneous leishmaniasis in Ecuador. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **96**, (2017).
 103. Kato, H. *et al.* First Human Cases of Leishmania (Viannia) lainsoni Infection and a Search for the Vector Sand Flies in Ecuador. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, (2016).
 104. Morocho-Yaguana, L. A., Jaramillo-Balcázar, G. S., Román-Cárdenas, F. & Zamora-Gutiérrez, L. Primer informe de Leishmania naiffi en Zamora Chinchipe (Ecuador) utilizando el gen que codifica la proteína HSP70. *CEDAMAZ* **11**, 43–47 (2021).
 105. León, R., Erkelenz, C., Reck, C. & Terán, R. Short review and detection of Leishmaniaparasites in skin biopsies from patients coming from Echeandía, Bolívar Province, Ecuador. *Av. en Ciencias e Ing.* **6**, (2014).
 106. Kato, H. *et al.* Geographic Distribution of Leishmania Species in Ecuador Based on the Cytochrome B Gene Sequence Analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, e0004844 (2016).
 107. Cabrera, A. M., Betancourt, D. A. & Carrillo, N. G. Descripción de un caso clínico de Leishmaniasis canina. *Rev. Vet.* **32**, (2021).
 108. Gupta, R. S. Distinction between Borrelia and Borreliella is more robustly supported by molecular and phenotypic characteristics than all other neighbouring prokaryotic genera: Response to Margos' *et al.* 'The genus Borrelia reloaded' (PLoS ONE 13(12): E0208432). *PLoS One* **14**, (2019).
 109. Madison-Antenucci, S., Kramer, L. D., Gebhardt, L. L. & Kauffman, E. Emerging tick-borne diseases. *Clinical Microbiology Reviews* vol. 33 (2020).
 110. Flor Arévalo, K. M. & Caicedo Pincay, A. G. Prevalencia de borrelia burgdorferi en perros que frecuentan el parque Samanes, cantón Guayaquil, provincia del Guayas, Ecuador. (Universidad de Guayaquil. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 2024).
 111. Loyaga Diaz, F. E., Belén, G., Bersoja, P. & Nacional De Loja, U. Neuroborreliosis de Lyme, Reporte de Caso. *Cienc. Lat. Rev. Científica Multidiscip.* **8**, 4544–4555 (2024).
 112. Gioia, G. V. *et al.* Bovine anaplasmosis and tick-borne pathogens in cattle of the Galapagos Islands. *Transbound. Emerg. Dis.* **65**, (2018).
 113. McCown, M., Monterroso, V. H. & Grzeszak, B. Surveillance of zoonotic and infectious diseases in Ecuador: implications for special operations forces medical

- operations, personnel, and canines. *J. Spec. Oper. Med.* **11**, (2011).
114. Pesquera, C., Portillo, A., Palomar, A. M. & Oteo, J. A. Investigation of tick-borne bacteria (*Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. and *Borrelia* spp.) in ticks collected from Andean tapirs, cattle and vegetation from a protected area in Ecuador. *Parasites and Vectors* **8**, (2015).
 115. Jimenez, I. A., Vega Mariño, P. A., Stapleton, G. S., Prieto, J. B. & Bowman, D. D. Canine vector-borne disease in domestic dogs on Isla Santa Cruz, Galápagos. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports* **19**, (2020).
 116. Rivadeneira-Barreiro, P. E. *et al.* Trypanosoma cruzi co-infections with other vector borne diseases are frequent in dogs from the pacific coast of Ecuador. *Microb. Pathog.* **155**, (2021).
 117. Mena Pérez, R. *et al.* Seroprevalencia de Ehrlichia spp, Anaplasma spp, Borrelia burgdorferi y Dirofilaria immitis en caninos de la ciudad de Guayaquil. *Rev. Investig. Vet. del Perú* **35**, e28267 (2024).
 118. Loyaga, F. E., Pineda, G. B. & Paredes, A. I. Neuroborreliosis de Lyme, Reporte de Caso. *Cienc. Lat. Rev. Científica Multidiscip.* **8**, (2024).

SCIENTIFIC ARTICLE 2: MOLECULAR DETECTION OF *BORRELIELLA* SPP. IN DOMESTIC DOGS FROM RURAL AREAS OF ECUADOR

Within the *Borreliaceae* family the genera *Borrelia* and *Borrelia* are classified, both of which were originally grouped under a single genus (*Borrelia*)⁴³. Advances in sequencing technologies and phylogenetic analyses have revealed significant differences between these two groups, leading to their reclassification¹⁰⁸. The genus *Borrelia* encompasses species associated with relapsing fever, a disease characterized by recurring episodes of high fever, chills, muscle pain, and headaches, followed by periods of apparent recovery⁴⁴. This zoonotic disease is transmitted by lice (*Pediculus humanus*) or soft ticks of the genus *Ornithodoros*⁴⁴. In contrast, *Borrelia* is linked to Lyme disease (LD), a multisystemic infection affecting humans and other animals, transmitted by hard ticks of the genus *Ixodes*⁴⁵.

Currently, Lyme disease is widespread, mainly in temperate regions of North America, Europe, and Asia. The global incidence and prevalence of Lyme disease have been increasing over the past decades, largely due to expanding tick populations driven by environmental and ecological changes⁴⁶. In the United States, the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) estimates approximately 300,000 new cases annually¹⁰⁹. In Europe, LD is also prevalent, over 200,000 cases per year, mainly in western Europe⁴⁸. In South America, reports of the disease are relatively rare, and its true prevalence remains unclear⁴⁹. The bacteria had been detected either in vectors or in patients in countries such as Peru⁵⁰, Brazil^{51,52}, Colombia⁵³, and Argentina⁵⁴, but evidence suggests that the disease may be underdiagnosed or misdiagnosed due to limited awareness and diagnostic capacity⁴⁹.

In Ecuador, specifically, Lyme disease is not widely recognized, and there is a lack of published research on its occurrence^{110–112}. The country's diverse ecosystems, particularly in highland and forested regions, provide favorable conditions for *Ixodes* tick populations and potential wildlife reservoirs. From a One Health perspective, it is essential to recognize that Lyme disease transmission involves intricate interactions among humans, animals, and the environment. Domestic animals, particularly dogs and horses, are integral to the transmission cycle⁵⁷. Dogs, in particular, serve as

potential reservoirs, especially in rural areas where they interact closely with humans and wildlife ⁵⁶. Their close proximity to humans increases the risk of tick bites and subsequent transmission of the pathogen. Dogs can act as hosts for *Ixodes* ticks, which feed on their blood during various stages of the tick life cycle, and then transmit it to other animals or humans in the domestic and peridomestic environment. Additionally, in rural environments, dogs frequently roam freely, interacting with wildlife reservoirs such as rodents and deer, further facilitating the spread of ticks and the bacteria. This work report for the first time DNA of a species of *Borreliaceae* in dogs from Ecuador.

Materials and Methods

Sampled population

Dogs from rural communities in Ecuador were included in this study. Blood samples were obtained during several deworming and sterilization campaigns performed from March 2023 to November 2024, by Universidad San Francisco de Quito (USFQ) and Fundación Condor Andino Ecuador (FCA). Only dogs whose owners provided consent were included in the study. A total of 481 dogs were sampled, in 3 provinces: Manabí (n=98), Morona Santiago (n=44), Pichincha (n=339). Blood samples for all domestic dogs we collected from the cephalic vein in tubes containing EDTA anticoagulant, and transported to the Institute of Microbiology at USFQ for analysis.

DNA Extraction

Two hundred microliters of whole blood were used for DNA extraction with the PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, USA), following the manufacturer's instructions. To rule out the presence of PCR inhibitors, the beta-actin gene was amplified in all extracted samples.

Molecular detection of *Borreliaceae*

Primers M1/M219 were used to amplify a 358 bp fragment of the 16S rRNA gene of *Borreliaceae* family. PCR was performed at a final volume of 10 µl, containing 1.5 mM MgCl₂, 1x PCR buffer, 0.2 mM dNTPs, 0.5 U of Platinum™ Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, USA), 0.4 µM of each primer, as described previously. Synthesized gBlock of the gene fragment was used as positive control, and water as negative control. The thermocycling conditions were programmed as follows:

95° for 2 min, 35 cycles of at 95 °C for 30 s, 58 °C for 30 s, and 72 °C, with a final extension at 72 °C for 7 min. The PCR products were observed on agarose gels.

For positive samples, the PCR was repeated under the same conditions but with a final volume of 35 µl, amplicons were further sequenced using Oxford Nanopore technology (ONT).

Genus identification

Amplicons were purified using Agencourt 0.8X AMPure XP Bead (Beckman Coulter Life Sciences, Germany), following manufacturer's instructions. The amplicons were quantified (Qubit™ 1X dsDNA High Sensitivity, Thermo Fisher Scientific, USA) and normalized to equimolar quantities of PCR amplicons (at a maximum of 200 fmol). DNA libraries were prepared with the Native Barcoding Kit 96 V14 (SQK-NBD114.96, Oxford Nanopore Technologies, UK), as described by the manufacturer protocol. Twenty fmol of the libraries were loaded on a R10.4.1 flow cell and run on the ONT GridION device, at least for 6 hours, at the Center for Bioinformatics-USFQ. Super-accurate basecalling model and Trim Barcode option was selected. FASTQ files were quality-checked using a minimum Q-score threshold of 10 and then analyzed using the Amplicon Sorter tool (https://github.com/avierstr/amplicon_sorter) which facilitates the categorization of amplicon-specific reads based on the targeted fragment size and then generates a consensus sequence. For our analysis we selected reads between 340 and 370 bp.

Since the amplified fragment is shared by both *Borrelia* and *Borrelia* genera, 16S rRNA gene sequences from these genera were retrieved from the NCBI GenBank database to construct a phylogenetic tree and determine the genus to which the sequenced samples belong.

Results

From the 481 dog blood samples, *Borrelia* DNA was detected in 21% of samples as shown in Table 3. The province with highest positivity was Pichincha with 95 positive samples.

Table 3. Amplification results for *Borrelia* PCR

Province	# blood sampled	# positive samples	Percentage
Manabí	98	2	2,0%
Morona Santiago	44	4	9,1%

Pichincha	339	95	28,0%
Total	481	101	21%

After the sequencing PCR for the 101 positive samples was performed, a unique and intense band of approximately 358 bp was visualized in 62 samples, which were used later for the preparation of 3 libraries. Libraries were run for 6 to 12 hours, generating between 1.3-3 M passed reads, with mean Q score of 18 and minimum 10. Amplicon sorter analysis generated a unique consensus sequence, of 357 bp. We performed a search of *Borrelia* and *Borrelia* 16S rRNA gene sequences in NCBI GenBank, which were used for the construction of a phylogenetic tree (Tables 4 and 5).

Table 4. Reference sequences of *Borrelia* spp. 16S rRNA gene obtained from GenBank for phylogenetic analysis.

Accession number	Species	Strain code/isolate
NR 116058.1	<i>Borrelia americana</i>	SCW-41 16S
NR 043413.1	<i>Borrelia garinii</i>	20047
MZ146348.1	<i>Borrelia garinii</i>	TC-T-74
NR 043413.1	<i>Borrelia garinii</i>	20047
NR 044732.2	<i>Borrelia burgdorferi</i>	ATCC 35210
NR 029159.1	<i>Borrelia japonica</i>	HO14
EU135593.1	<i>Borrelia yangtzensis</i>	QLZSP1
EU135595.1	<i>Borrelia yangtzensis</i>	QSYSP3
NR 152696.1	<i>Borrelia mayonii</i>	MN14-1420
NR 152696.1	<i>Borrelia mayonii</i>	MN14-1420
NR 104748.1	<i>Borrelia afzelii</i>	VS461
MZ146347.1	<i>Borrelia valaisiana</i>	TC-T-02
NR 148824.1	<i>Borrelia californiensis</i>	CA446
NR 036806.1	<i>Borrelia lusitaniae</i>	Poti B2
MZ146346.1	<i>Borrelia afzelii</i>	DQ-T-16
NR 074854.1	<i>Borrelia bavariensis</i>	PBi

Table 5. Reference sequences of *Borrelia* spp. 16S rRNA gene obtained from GenBank for phylogenetic analysis.

Accession number	Species	Strain code/isolate
AF107362.1	<i>Borrelia recurrentis</i>	A16

AF307100.1	<i>Borrelia parkeri</i>	6232
NR_102957.1	<i>Borrelia hermsii</i>	DAH
U42284.1	<i>Borrelia anserina</i>	ES-1
AB113315.1	<i>Borrelia duttonii</i>	VS4
HQ610931.1	<i>Borrelia persica</i>	1195
GQ358200.1	<i>Borrelia crocidurae</i>	12TO63
GQ202264.1	<i>Borrelia hispanica</i>	clone 6HOJ06
MH503950.1	<i>Borrelia turicatae</i>	BRP1a
NR_025861.1	<i>Borrelia miyamotoi</i>	HT31

Selected *Borrelia* and *Borrelia* sequences from GenBank, along with the consensus sequences of the samples, were aligned and edited using Clustal W, a general-purpose multiple sequence alignment program for DNA and proteins, implemented in the Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA X) software. This process resulted in a 345 bp fragment of the 16S rRNA gene for phylogenetic analysis.

The Kimura 2-parameter model with Gamma distribution was selected as the best-fitting model of molecular evolution for the Maximum Likelihood (ML) analysis, as determined using the 'Find Best DNA/Protein Model' function in MEGA X. Resulting phylogenetic tree showed that the *Borrelia* reference sequences formed a distinct clade separate from the *Borrelia* reference sequences. The 62 sequenced samples grouped within the *Borrelia* clade, confirming that the bacteria detected in the blood samples of these 62 dogs belong to the *Borrelia* genus (Figure 7).

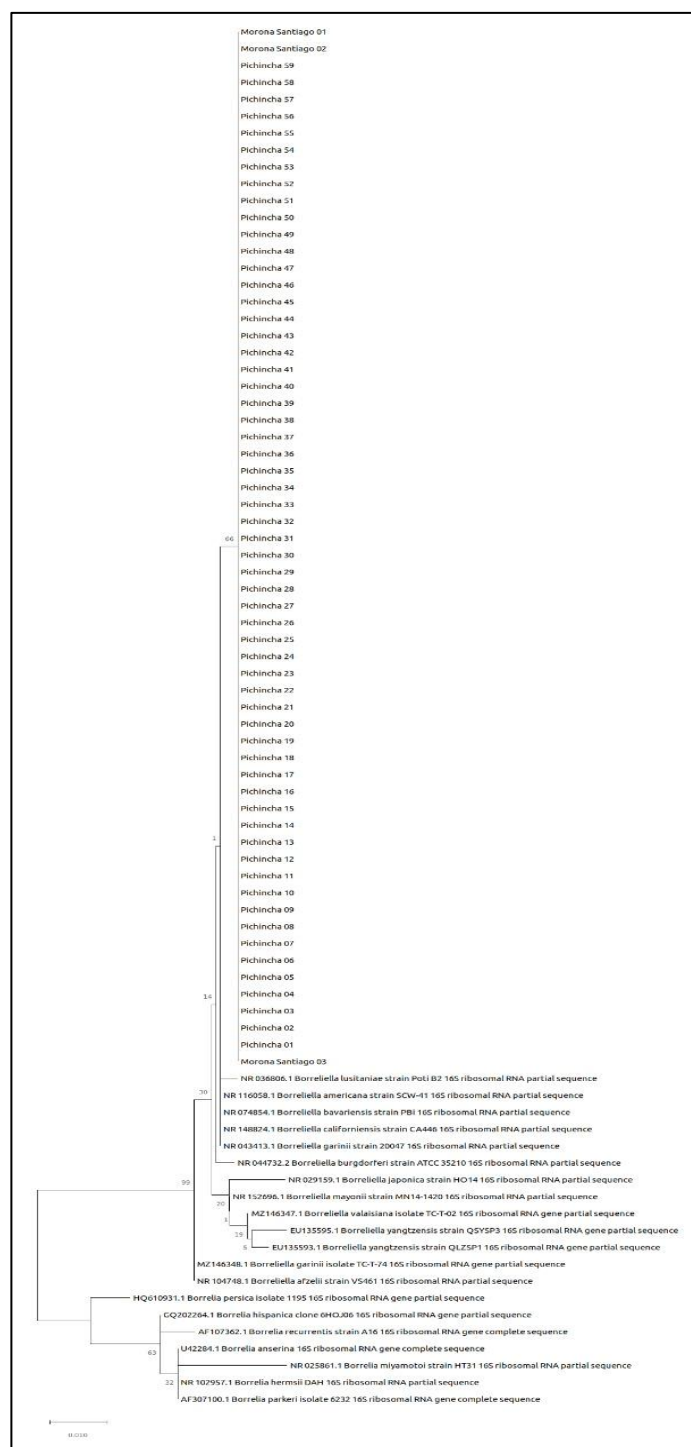


Figure 7. Phylogenetic tree based on a 345 bp fragment of 16S rRNA gene. Maximum Likelihood method and Tamura 3-parameter model. The tree with the highest log likelihood (-872.85) is shown. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches

Based on the alignment of the 345 bp fragment, the presence of nucleotide polymorphisms was assessed, focusing on identifying SNPs characteristic of each genus. Eight SNPs specific to the *Borrelia* reference sequences were identified. None of these SNPs were found in the sequenced samples, further confirming that the 62 analyzed samples belong to the *Borrelia* genus.

Table 6. SNPs present only in *Borrelia* genus reference sequences. Samples from Pichincha and Morona Santiago were compressed as no variation were present among them in these nucleotide positions.

	Nucleotide position	22	24	29	181	221	301	320	336
<i>Borrelia</i>	NR104748.1	C	A	-	T	A	A	T	A
	NR116058.1	.	.	-	.	.	.	.	.
	NR074854.1	.	.	-	.	.	.	.	.
	NR044732.2	.	.	-	.	.	.	.	.
	NR148824.1	.	.	-	.	.	.	.	.
	NR043413.1	.	.	-	.	.	.	.	.
	MZ146348.1	.	.	-	.	.	.	.	.
	NR029159.1	.	.	-	.	.	.	.	.
	NR036806.1	.	.	-	.	.	.	.	.
	NR152696.1	.	.	-	.	.	.	.	.
	MZ146347.1	.	T	-	.	.	.	.	.
	EU135595.1	.	T	-	.	.	.	.	.
	EU135593.1	.	T	-	.	.	.	.	.
<i>Dog Samples</i>	Pichincha 01 to 59	.	.	-	.	.	.	.	.
	Morona Santiago 01 to 03	.	.	-	.	.	.	.	.
<i>Borrelia</i>	U42284.1	T	G	G	C	G	G	A	G
	NR102957.1	T	G	G	C	G	G	A	G
	GQ202264.1	T	G	G	C	G	G	A	G
	NR025861.1	T	G	G	C	G	G	A	G
	AF307100.1	T	G	G	C	G	G	A	G
	HQ610931.1	T	G	A	C	G	G	A	G
	AF107362.1	T	G	G	C	G	G	A	G

Discussion

Monitoring dogs for tick infestations and exposure to Lyme disease etiological agents serves as a valuable tool for identifying transmission hotspots and guiding public health intervention strategies⁵⁶. As sentinels, dogs share similar environments with humans and are often exposed to the same tick populations, making them reliable indicators of tick-borne disease risk^{56,57}. Regular surveillance of canine populations can provide early warnings about areas with high

tick activity and the presence of *Borrelia* spp, and aids in identification of regions of higher risk of transmission risk. Additionally, monitoring dogs helps to better understand the spatial and temporal dynamics of tick infestations and Lyme disease exposure, offering insights that are critical for protecting both animal and human health⁷¹.

To date, only seven published studies have evaluated the presence of *Borrelia* in Ecuador. The first publication analyzed blood samples from 100 dogs in Manta and Guayaquil and found no positive cases for *B. burgdorferi*¹¹³. In 2015, Pesquera et. al. collected 161 ticks from Antisana Ecological Reserve and Cayambe-Coca National Park; however *Borrelia* was not detected in any of the ticks via PCR¹¹⁴. In 2018, 58 dogs presenting to the Darwin Animal Doctors clinic in the city of Puerto Ayora, Galapagos were serologically tested for *B. burgdorferi*; with no cases detected¹¹⁵. In 2021 and 2024, dogs from Portoviejo¹¹⁶ and Guayaquil¹¹⁷, respectively, were tested using the IDEXX SNAP ® 4Dx® Plus Kit, and no cases of *B. burgdorferi* were found. The first report of *B. burgdorferi* in Ecuador in 2024 by Flor & Caicedo, who used the Rapid Immunochromatography Technique to analyze blood samples from 50 dogs in Guayaquil, detecting one positive case¹¹⁰. In the same year, a case of neuroborreliosis was reported in Ecuador; a 16-year-old girl tested positive for IgM antibodies against *B. burgdorferi*¹¹⁸.

The results of our study emphasize the critical need for continued surveillance and research to assess the presence of *Borrelia* and its potential risk to public health. The detection of *Borrelia* in canine blood samples using molecular techniques highlights the role of dogs as sentinels for tick-borne pathogens that may also pose a threat to humans. This finding emphasizes the need for accurate and reliable diagnostic methods. The absence of positive cases in previously mentioned studies is likely due to the use of serological tests, which detect antibodies against specific *Borrelia* species, and may not adequately identify *Borrelia* infections.

A One Health approach, which recognizes the interconnected health of humans, animals, and the environment, is essential for addressing Lyme disease. Domestic animals, particularly dogs, play a crucial role in the transmission cycle. Dogs frequently serve as reservoirs and hosts for *Ixodes* ticks, especially in rural areas where they interact with both humans and wildlife such as deer and rodents. Their role in transmission emphasizes the importance of monitoring domestic animals as sentinel species to detect potential disease hotspots.

Protecting public health requires a comprehensive strategy that integrates ecological surveillance, veterinary monitoring, and human health interventions. Public awareness campaigns and training for healthcare providers are vital for improving diagnostic accuracy and reducing the risk of misdiagnosis. Strengthening diagnostic capacity and fostering collaboration between human and veterinary medicine will enable early detection and the implementation of targeted preventive measures.

By addressing Lyme disease through a One Health framework, Ecuador and other regions can better prepare for emerging tick-borne diseases, safeguarding both public health and ecosystem health. Coordinated efforts to understand the ecological and zoonotic dynamics of Lyme disease are crucial to mitigating its growing threat and protecting at-risk communities.

References

1. Mann, S. *et al.* A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. *Current Tropical Medicine Reports* vol. 8 (2021).
2. World Health Organization. Neglected Tropical Diseases. *WHO* <https://openwho.org/channels/ntd> (2021).
3. Pan American Health Organization. Leishmaniasis. *PAHO* <https://www.paho.org/en/topics/leishmaniasis> (2022).
4. López Domínguez, D. M., García Delgado, J. L., Guerrero Caicedo, R. G. & Hernández Bandera, N. Gestión de diagnóstico de leishmaniasis cutánea y mucocutánea en Ecuador 2019- 2020. *Boletín Malarial. y Salud Ambient.* **61**, (2021).
5. Subsecretaria de Vigilancia Prevención y Control de la Salud. *Mapa de Enfermedades Vectoriales por provincia SE 1 a SE 40.* (2024).
6. Morales, D. V. *et al.* Data scarcity and ecological complexity: The cutaneous leishmaniasis dynamics in Ecuador. *J. R. Soc. Interface* **16**, (2019).
7. Morales-Yuste, M., Martín-Sánchez, J. & Corpas-Lopez, V. Canine Leishmaniasis: Update on Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention. *Vet. Sci.* **9**, 387 (2022).
8. Dantas-Torres, F. Canine leishmaniasis in the Americas: etiology, distribution, and clinical and zoonotic importance. *Parasites Vectors* **2024 171** **17**, 1–10 (2024).
9. Ribeiro, R. R. *et al.* Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. *BioMed Research International* vol. 2018 (2018).
10. Gow, I., Smith, N. C., Stark, D. & Ellis, J. Laboratory diagnostics for human Leishmania infections: a polymerase chain reaction-focussed review of detection and identification methods. *Parasites and Vectors* vol. 15 (2022).
11. Aronson, N. *et al.* Diagnosis and treatment of leishmaniasis: Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of America (IDSA) and the American Society of tropical medicine and hygiene (ASTMH). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **96**, (2017).
12. Fischer, T., Fischer, M., Schliemann, S. & Elsner, P. Treatment of mucocutaneous leishmaniasis - A systematic review. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* **22**, 763–773 (2024).
13. Ayele, A. & Seyoum, Z. A Review on Canine Leishmaniasis; Etiology, Clinical Sign, Pathogenesis, Treatment and Control Methods. *Glob. Vet.* **17**, (2016).
14. Ivănescu, L. *et al.* The immune response in canine and human leishmaniasis and how this influences the diagnosis- a review and assessment of recent research. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* vol. 13 (2023).
15. Castillo-Ureta, H. *et al.* First report of autochthonous canine leishmaniasis caused by Leishmania (L.) mexicana in Sinaloa, Mexico. *Acta Trop.* **190**, (2019).
16. Figueredo, L. A., de Paiva-Cavalcanti, M., Almeida, E. L., Brandão-Filho, S. P. & Dantas-Torres, F. Clinical and hematological findings in Leishmania braziliensis-infected dogs from Pernambuco, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* **21**, (2012).
17. Vélez, I. D., Carrillo, L. M., López, L., Rodríguez, E. & Robledo, S. M. An epidemic outbreak of canine cutaneous leishmaniasis in Colombia caused by Leishmania braziliensis and Leishmania panamensis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **86**, (2012).
18. Sanches, L. da C. *et al.* Natural canine infection by Leishmania infantum and Leishmania amazonensis and their implications for disease control. *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária* **25**, (2016).
19. Valdivia, H. O. *et al.* Comparative genomics of canine-isolated Leishmania (Leishmania) amazonensis from an endemic focus of visceral leishmaniasis in

- Governador Valadares, southeastern Brazil. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
20. Akhoundi, M. *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *PLoS Neglected Tropical Diseases* vol. 10 (2016).
 21. Gupta, A. K., Das, S., Kamran, M., Ejazi, S. A. & Ali, N. The pathogenicity and virulence of Leishmania - interplay of virulence factors with host defenses. *Virulence* vol. 13 (2022).
 22. Kostygov, A. Y. *et al.* Euglenozoa: Taxonomy, diversity and ecology, symbioses and viruses. *Open Biology* vol. 11 (2021).
 23. Sereno, D. Leishmania (Mundinia) spp.: from description to emergence as new human and animal Leishmania pathogens. *New Microbes New Infect.* **30**, (2019).
 24. Giesen, C. *et al.* The Role of Environmental Factors in Lyme Disease Transmission in the European Union: A Systematic Review. *Trop. Med. Infect. Dis.* **9**, 113 (2024).
 25. Kazemi, B. Genomic organization of Leishmania species. *Iranian Journal of Parasitology* vol. 6 (2011).
 26. Black, J. A., Reis-Cunha, J. L., Cruz, A. K. & Tosi, L. R. O. Life in plastic, it's fantastic! How Leishmania exploit genome instability to shape gene expression. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* vol. 13 (2023).
 27. Grünebast, J., Lorenzen, S. & Clos, J. Genome-wide quantification of polycistronic transcription in Leishmania major. *MBio* e0224124 (2024) doi:10.1128/MBIO.02241-24/SUPPL_FILE/MBIO.02241-24-S0009.XLSX.
 28. Kamran, M., Bhattacharjee, R., Das, S., Mukherjee, S. & Ali, N. The paradigm of intracellular parasite survival and drug resistance in leishmanial parasite through genome plasticity and epigenetics: Perception and future perspective. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* vol. 13 (2023).
 29. Santi, A. M. M. & Murta, S. M. F. Impact of Genetic Diversity and Genome Plasticity of Leishmania spp. in Treatment and the Search for Novel Chemotherapeutic Targets. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* vol. 12 (2022).
 30. Tosi, L. R. O., Denny, P. W., De Oliveira, C. I. & Damasceno, J. D. Editorial: Leishmania genome variability: Impacts on parasite evolution, parasitism and leishmaniasis control. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* vol. 13 (2023).
 31. Mathison, B. A. & Bradley, B. T. Review of the Clinical Presentation, Pathology, Diagnosis, and Treatment of Leishmaniasis. *Lab Med.* **54**, (2023).
 32. Teixeira, D. E. *et al.* The Cell Biology of Leishmania: How to Teach Using Animations. *PLoS Pathog.* **9**, (2013).
 33. Azami-conesa, I., Gómez-muñoz, M. T. & Martínez-díaz, R. A. A systematic review (1990–2021) of wild animals infected with zoonotic leishmania. *Microorganisms* **9**, (2021).
 34. Vannucci, V., Gavazza, A., Medina Valentin, A. A., Gori, V. & Lubas, G. Hematological, biochemical, serological, and molecular monitoring of blood donor dogs vaccinated with CaniLeish® for the prevention of Leishmaniosis. *Comp. Clin. Path.* **27**, (2018).
 35. Dantas-Torres, F. Canine leishmaniosis in South America. *Parasites and Vectors* **2**, (2009).
 36. Piyasiri, S. B., Dewasurendra, R., Samaranayake, N. & Karunaweera, N. Diagnostic Tools for Cutaneous Leishmaniasis Caused by Leishmania donovani: A Narrative Review. *Diagnostics* **13**, (2023).
 37. Scarpini, S. *et al.* Visceral Leishmaniasis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment Regimens in Different Geographical Areas with a Focus on Pediatrics. *Microorganisms*

- vol. 10 (2022).
38. de Oliveira, D. M., Lonardoni, M. V. C., Theodoro, U. & Silveira, T. G. V. Comparison of different primers for PCR-based diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Brazilian J. Infect. Dis.* **15**, (2011).
 39. Skraba, C. M. *et al.* Evaluation of the reference value for the Montenegro skin test. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **48**, (2015).
 40. Vital, T. *et al.* Detecting Leishmania in dogs: A hierarchical-modeling approach to investigate the performance of parasitological and qPCR-based diagnostic procedures. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **16**, (2022).
 41. Downing, T. *et al.* Whole genome sequencing of multiple Leishmania donovani clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance. *Genome Res.* **21**, (2011).
 42. Maia de Souza, R. *et al.* Identification of Leishmania species by next generation sequencing of hsp70 gene. *Mol. Cell. Probes* **61**, (2022).
 43. Adeolu, M. & Gupta, R. S. A phylogenomic and molecular marker based proposal for the division of the genus Borrelia into two genera: The emended genus Borrelia containing only the members of the relapsing fever Borrelia, and the genus Borreliella gen. nov. containing the members o. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **105**, (2014).
 44. Tang, T. *et al.* The global distribution and the risk prediction of relapsing fever group Borrelia: a data review with modelling analysis. *The Lancet Microbe* **5**, (2024).
 45. Guérin, M. *et al.* Lyme borreliosis diagnosis: state of the art of improvements and innovations. *BMC Microbiology* vol. 23 (2023).
 46. Kilpatrick, A. M. *et al.* Lyme disease ecology in a changing world: Consensus, uncertainty and critical gaps for improving control. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* vol. 372 (2017).
 47. Westra, S., Goldberg, M. S. & Didan, K. The association between the incidence of Lyme disease in the USA and indicators of greenness and land cover. *Curr. Res. Parasitol. Vector-Borne Dis.* **4**, (2023).
 48. Marques, A. R., Strle, F. & Wormser, G. P. Comparison of lyme disease in the United States and Europe. *Emerging Infectious Diseases* vol. 27 (2021).
 49. Lucca, V. *et al.* Lyme Disease: A Review with Emphasis on Latin America. *Microorganisms* vol. 12 (2024).
 50. Cervantes, J. Enfermedad de Lyme en el Perú. Una revisión clínica y epidemiológica. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica* **35**, (2018).
 51. Jorge, F. R. *et al.* Novel Borrelia Genotypes from Brazil Indicate a New Group of Borrelia spp. Associated with South American Bats. *J. Med. Entomol.* **60**, (2023).
 52. Luz, H. R., Faccini, J. L. H. & McIntosh, D. Molecular analyses reveal an abundant diversity of ticks and rickettsial agents associated with wild birds in two regions of primary Brazilian Atlantic Rainforest. *Ticks Tick. Borne. Dis.* **8**, (2017).
 53. Mancilla-Agrono, L. Y. *et al.* Is Borrelia burgdorferi Sensus Stricto in South America? First Molecular Evidence of Its Presence in Colombia. *Trop. Med. Infect. Dis.* **7**, (2022).
 54. Nava, S. *et al.* Borrelia infection in Ixodes pararicinus ticks (Acari: Ixodidae) from northwestern Argentina. *Acta Trop.* **139**, (2014).
 55. Clark, R. P. & Hu, L. T. Prevention of Lyme Disease and Other Tick-Borne Infections. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **22**, (2008).
 56. Goossens, H. A. T., Van den Bogaard, A. E. & Nohlmans, M. K. E. Dogs as sentinels for human Lyme borreliosis in The Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* **39**, (2001).

57. Picado, R. *et al.* Lyme disease in companion animals: an updated state-of-art and current situation in Portugal. *Vet. Res. Commun.* **48**, 3551–3561 (2024).
58. Elbaum-Garfinkle, S. Close to home: A history of yale and lyme disease. *Yale J. Biol. Med.* **84**, (2011).
59. Barbour, A. G. & Qiu, W. Borreliella. in *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (2019). doi:10.1002/9781118960608.gbm01525.
60. Strnad, M., Vancová, M. & Rego, R. O. M. Borrelia (Borreliella) burgdorferi. *Trends Microbiol.* **32**, (2024).
61. Hepner, S. *et al.* A high fidelity approach to assembling the complex Borrelia genome. *BMC Genomics* **24**, (2023).
62. Iyer, R. *et al.* Linear and circular plasmid content in Borrelia burgdorferi clinical isolates. *Infect. Immun.* **71**, (2003).
63. Wolf, M. J., Watkins, H. R. & Schwan, W. R. Ixodes scapularis: Vector to an increasing diversity of human pathogens in the upper midwest. *Wis. Med. J.* **119**, (2020).
64. Strnad, M., Hönig, V., Růžek, D., Grubhoffer, L. & Rego, R. O. M. Europe-wide meta-analysis of Borrelia burgdorferi sensu lato prevalence in questing Ixodes ricinus ticks. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**, (2017).
65. Nuttall, P. A. Tick saliva and its role in pathogen transmission. *Wien. Klin. Wochenschr.* **135**, (2023).
66. Lindsø, L. K., Viljugrein, H. & Mysterud, A. Vector competence of Ixodes ricinus instars for the transmission of Borrelia burgdorferi sensu lato in different small mammalian hosts. *Parasites and Vectors* **17**, (2024).
67. Centers for Disease Control and Prevention. How Lyme Disease Spreads. <https://www.cdc.gov/lyme/causes/index.html> (2024).
68. Voordouw, M. J. Co-feeding transmission in Lyme disease pathogens. *Parasitology* vol. 142 (2015).
69. Cook, M. J. Lyme borreliosis: A review of data on transmission time after tick attachment. *Int. J. Gen. Med.* **8**, (2014).
70. Van Duijvendijk, G., Sprong, H. & Takken, W. Multi-trophic interactions driving the transmission cycle of Borrelia afzelii between Ixodes ricinus and rodents: A review. *Parasites and Vectors* **8**, (2015).
71. Little, S. E., Heise, S. R., Blagburn, B. L., Callister, S. M. & Mead, P. S. Lyme borreliosis in dogs and humans in the USA. *Trends Parasitol.* **26**, (2010).
72. Steinbrink, A., Brugger, K., Margos, G., Kraiczy, P. & Klimpel, S. The evolving story of Borrelia burgdorferi sensu lato transmission in Europe. *Parasitol. Res.* **121**, (2022).
73. National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (U.S.). Division of Vector-Borne Infectious Diseases. *Lyme disease : a public information guide*. <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/11694> (2011).
74. Radolf, J. D., Caimano, M. J., Stevenson, B. & Hu, L. T. Of ticks, mice and men: Understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, (2012).
75. Marques, A. R. Laboratory Diagnosis of Lyme Disease: Advances and Challenges. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **29**, (2015).
76. Vet Solutions Inc. Test SNAP® 4DX Plus. <http://www.vet-solutions.com/wp/diagnostico-clinica/snap/4dxplus/> (2023).
77. Nigrovic, L. E. *et al.* The Lyme Disease Polymerase Chain Reaction Test Has Low Sensitivity. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **20**, (2020).
78. Agüero-Rosenfeld, M. E. Lyme Disease: Laboratory Issues. *Infect. Dis. Clin. North*

- Am.* **22**, (2008).
79. Agüero-Rosenfeld, M. E., Wang, G., Schwartz, I. & Wormser, G. P. Diagnosis of lyme borreliosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 484–509 (2005).
 80. Dahmani, A., Ouchene-Khelifi, N. A. & Ouchene, N. Human and Canine Leishmaniasis: Diagnosis and Risk Factors. *World's Vet. J.* **12**, (2022).
 81. Bezemer, J. M., Freire-Paspuel, B. P., Schallig, H. D. F. H., de Vries, H. J. C. & Calvopiña, M. Leishmania species and clinical characteristics of Pacific and Amazon cutaneous leishmaniasis in Ecuador and determinants of health-seeking delay: a cross-sectional study. *BMC Infect. Dis.* **23**, (2023).
 82. Muñoz, E. B. *et al.* Diagnostic efficacy of molecular techniques for detection and identification of leishmania species in human whole blood and skin samples from Ecuador. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **95**, (2016).
 83. Mohammed, R. *et al.* Detection of asymptomatic Leishmania infection in blood donors at two blood banks in Ethiopia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **17**, (2023).
 84. Granoble Pincay, M., Macías Litardo, M. & Mendoza Castañeda, G. Seroprevalencia de Leishmania spp., en perros del cantón Durán, provincia del Guayas, Ecuador. *Revista Científica Ecológica Agropecuaria* (2023).
 85. Bedoya Jaramillo, C. A. Determinación de leishmaniasis en caninos del noroccidente de Pichincha, a través de la evaluación de técnicas invasivas y no invasivas. (Quito: UCE, 2019).
 86. Ayala Rada, D. Estudio de prevalencia de Leishmaniasis canina como problema de salud pública en sector Vía a la Costa de Guayaquil – Ecuador. (Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, 2023).
 87. Vargas Cano, O. D. Determinación de Leishmania spp. en perros (Canis Lupus Familiaris) residentes en zonas tropicales de la provincia de Pichincha. (Universidad de Cuenca, 2021).
 88. Abbasi, I. *et al.* Evaluation of PCR procedures for detecting and quantifying Leishmania donovani DNA in large numbers of dried human blood samples from a visceral leishmaniasis focus in Northern Ethiopia. *BMC Infect. Dis.* **13**, (2013).
 89. Karakuş, M. *et al.* First molecular detection and identification of Leishmania species in small wild rodents from Turkey. *Parasitology* **147**, (2020).
 90. Hernández, C. *et al.* Identification of Six New World Leishmania species through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. *Parasites and Vectors* **7**, (2014).
 91. González, C. *et al.* Diversity patterns, Leishmania DNA detection, and bloodmeal identification of Phlebotominae sand flies in villages in northern Colombia. *PLoS One* **13**, (2018).
 92. Anaguano, D. F., Ponce, P., Baldeón, M. E., Santander, S. & Cevallos, V. Blood-meal identification in phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from Valle Hermoso, a high prevalence zone for cutaneous leishmaniasis in Ecuador. *Acta Trop.* **152**, (2015).
 93. Arrivillaga-Henríquez, J. *et al.* Eco-epidemiological aspects, natural detection and molecular identification of Leishmania spp. in Lutzomyia reburra, Lutzomyia barrettoii majuscula and Lutzomyia trapidoi. *Biomedica* **37**, (2017).
 94. Hashiguchi, Y. *et al.* Anthropophilic phlebotomine sand fly Lutzomyia species and search for the natural Leishmania infections in an area endemic for cutaneous leishmaniasis in Ecuador. *Acta Trop.* **203**, (2020).
 95. Hashiguchi, Y. *et al.* Natural Leishmania (Leishmania) mexicana infection and biting activity of anthropophilic sand fly Lutzomyia ayacuchensis in the Ecuadorian Andes. *Acta Trop.* **203**, (2020).

96. Tabbabi, A. *et al.* Comparative analysis of bacterial communities in lutzomyia ayacuchensis populations with different vector competence to Leishmania parasites in Ecuador and Peru. *Microorganisms* **9**, (2021).
97. Hashiguchi, Y. *et al.* Andean cutaneous leishmaniasis (Andean-CL, uta) in Peru and Ecuador: the vector Lutzomyia sand flies and reservoir mammals. *Acta Trop.* **178**, (2018).
98. Quiroga, C. *et al.* Molecular Identification of Leishmania spp. in Sand Flies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) From Ecuador. *J. Med. Entomol.* **54**, (2017).
99. Kato, H. *et al.* PCR-RFLP analyses of leishmania species causing cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis revealed distribution of genetically complex strains with hybrid and mito-nuclear discordance in Ecuador. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **13**, (2019).
100. Domínguez, D. M. L., Delgado, J. L. G., Caicedo, R. G. G. & Bandera, N. H. Diagnostic management of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in ecuador-2020. *Bol. Malariol. y Salud Ambient.* **61**, (2021).
101. Calvopina, M., Bohórquez Moreira, P., Villacís Ulloa, P. & Encalada, M. Leishmaniasis Cutánea “Úlcera de Chiclero” en la Amazonia, Ecuador. *Práctica Fam. Rural* **5**, (2020).
102. Calvopina, M. *et al.* Case report: Coinfection of leishmania guyanensis and human immunodeficiency virus-acquired immune deficiency syndrome: Report of a case of disseminated cutaneous leishmaniasis in Ecuador. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **96**, (2017).
103. Kato, H. *et al.* First Human Cases of Leishmania (Viannia) lainsoni Infection and a Search for the Vector Sand Flies in Ecuador. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, (2016).
104. Morocho-Yaguana, L. A., Jaramillo-Balcázar, G. S., Román-Cárdenas, F. & Zamora-Gutiérrez, L. Primer informe de Leishmania naiffi en Zamora Chinchipe (Ecuador) utilizando el gen que codifica la proteína HSP70. *CEDAMAZ* **11**, 43–47 (2021).
105. León, R., Erkelenz, C., Reck, C. & Terán, R. Short review and detection of Leishmaniaparasites in skin biopsies from patients coming from Echeandía, Bolívar Province, Ecuador. *Av. en Ciencias e Ing.* **6**, (2014).
106. Kato, H. *et al.* Geographic Distribution of Leishmania Species in Ecuador Based on the Cytochrome B Gene Sequence Analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, e0004844 (2016).
107. Cabrera, A. M., Betancourt, D. A. & Carrillo, N. G. Descripción de un caso clínico de Leishmaniasis canina. *Rev. Vet.* **32**, (2021).
108. Gupta, R. S. Distinction between Borrelia and Borreliella is more robustly supported by molecular and phenotypic characteristics than all other neighbouring prokaryotic genera: Response to Margos' et al. 'The genus Borrelia reloaded' (PLoS ONE 13(12): E0208432). *PLoS One* **14**, (2019).
109. Madison-Antenucci, S., Kramer, L. D., Gebhardt, L. L. & Kauffman, E. Emerging tick-borne diseases. *Clinical Microbiology Reviews* vol. 33 (2020).
110. Flor Arévalo, K. M. & Caicedo Pincay, A. G. Prevalencia de borrelia burgdorferi en perros que frecuentan el parque Samanes, cantón Guayaquil, provincia del Guayas, Ecuador. (Universidad de Guayaquil. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 2024).
111. Loyaga Diaz, F. E., Belén, G., Bersosa, P. & Nacional De Loja, U. Neuroborreliosis de Lyme, Reporte de Caso. *Cienc. Lat. Rev. Científica Multidiscip.* **8**, 4544–4555 (2024).
112. Gioia, G. V. *et al.* Bovine anaplasmosis and tick-borne pathogens in cattle of the Galapagos Islands. *Transbound. Emerg. Dis.* **65**, (2018).
113. McCown, M., Monterroso, V. H. & Grzeszak, B. Surveillance of zoonotic and infectious diseases in Ecuador: implications for special operations forces medical operations, personnel, and canines. *J. Spec. Oper. Med.* **11**, (2011).

114. Pesquera, C., Portillo, A., Palomar, A. M. & Oteo, J. A. Investigation of tick-borne bacteria (*Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. and *Borrelia* spp.) in ticks collected from Andean tapirs, cattle and vegetation from a protected area in Ecuador. *Parasites and Vectors* **8**, (2015).
115. Jimenez, I. A., Vega Mariño, P. A., Stapleton, G. S., Prieto, J. B. & Bowman, D. D. Canine vector-borne disease in domestic dogs on Isla Santa Cruz, Galápagos. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports* **19**, (2020).
116. Rivadeneira-Barreiro, P. E. *et al.* Trypanosoma cruzi co-infections with other vector borne diseases are frequent in dogs from the pacific coast of Ecuador. *Microb. Pathog.* **155**, (2021).
117. Mena Pérez, R. *et al.* Seroprevalencia de Ehrlichia spp, Anaplasma spp, Borrelia burgdorferi y Dirofilaria immitis en caninos de la ciudad de Guayaquil. *Rev. Investig. Vet. del Perú* **35**, e28267 (2024).
118. Loyaga, F. E., Pineda, G. B. & Paredes, A. I. Neuroborreliosis de Lyme, Reporte de Caso. *Cienc. Lat. Rev. Científica Multidiscip.* **8**, (2024).