

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Posgrados

Detección molecular e identificación de *Babesia* spp. en muestras de sangre de caninos

Mecanismo de Titulación: Tesis en torno a una hipótesis o problema de investigación y su contrastación

Madeleine Karina Benavides Montenegro

**PhD. Verónica Barragán
Director de Trabajo de Titulación**

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

Quito, 31 de marzo del 2025

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

COLEGIO DE POSGRADOS

HOJA DE APROBACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Detección molecular e identificación de *Babesia* spp. en muestras de sangre de caninos

Madeleine Karina Benavides Montenegro

1	Nombre del Director del Programa:	Patricio Rojas Silva
2	Título académico:	Ph.D.
3	Director del programa de:	Maestría en Microbiología
4	Nombre del Decano del colegio Académico:	Carlos Valle
5	Título académico:	Ph.D.
6	Decano del Colegio:	COCIBA
7	Nombre del Decano del Colegio de Posgrados:	Hugo Burgos
8	Título académico:	Ph.D.

Quito, marzo 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: Madeleine Karina Benavides Montenegro

Código de estudiante: 00331860

C.I.: 1050190824

Lugar y fecha: Quito, 31 de marzo 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UNPUBLISHED DOCUMENT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>.

DEDICATORIA

A mis padres, Elvia y Marcelo, que me dieron todo su amor, y pusieron todo su esfuerzo, trabajo y esperanza en mí. Por enseñarme que los sueños si se alcanzan, si se lucha día a día por cumplirlos, y por encaminarme a ser la mujer valiente que hoy en día soy. A mi abuelita Bacha, que desde el cielo me guía y es el ángel de mis días. A mis hermanos y sobrinos, por ser un eje fundamental en mi vida, por ser mi alegría y mi razón de seguir en pie, por nunca abandonarme. A todos, los llevaré siempre en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad San Francisco de Quito y al Instituto de Microbiología por haberme abierto sus puertas, y por creer en mí y en mis capacidades. A Verónica Barragán, mi tutora, por su guía constante y su paciencia en este trayecto. A Patricio Rojas por su apoyo, orientación y confianza durante todo el programa de maestría. A Carolina Sáenz por sus valiosos aportes y por sus palabras de motivación a lo largo de mi investigación. Al Equipo de Bioinformática, por siempre estar dispuestos a enseñar y por su gran apoyo en varios procesos del desarrollo de esta investigación. Al grupo de investigación Leptospira, por el apoyo mutuo y el constante trabajo en equipo, y por compartir conmigo sus conocimientos y experiencias. Siempre les estaré eternamente agradecida.

RESUMEN

Babesia es considerada como un hemoparásito que se transmite principalmente a través de las garrapatas, y su impacto patológico, ya sea agudo o crónico, varía dependiendo de la subespecie del parásito que infecta al hospedero. El objetivo de este estudio fue realizar la detección molecular de *Babesia* spp. en muestras de perros y la identificación molecular de las especies de este hemoparásito utilizando la tecnología de secuenciación Oxford Nanopore, en áreas rurales de Ecuador. El enfoque se centró en profundizar en los detalles técnicos y metodológicos del procesamiento de las muestras clínicas. Se analizaron 363 muestras de sangre venosa de perros, de las cuales se extrajo el ADN. La detección del patógeno se realizó mediante una PCR estándar, utilizando un fragmento conservado del gen *18S ARNr*, mientras que para la identificación de especies se empleó la secuenciación con tecnología Oxford Nanopore. La subespecie identificada fue *Babesia canis vogeli*, la cual, aunque mostró una prevalencia baja, evidencia la escasez de investigaciones sobre este tipo de hemoparásitos en el país. *Babesia canis vogeli* tiene una distribución mundial y una prevalencia más alta en América Latina, representando un riesgo significativo para los animales de compañía y un serio desafío para la salud veterinaria.

Palabras clave: Hemoparásitos, garrapata, reservorio, hospedero, anemia hemolítica, 18S ARNr, genes mitocondriales, PCR estándar, secuenciamiento.

ABSTRACT

Babesia is considered as an hemoparasite primarily transmitted through ticks, and its pathological impact, whether acute or chronic, varies depending on the subspecies of the parasite infecting the host. The aim of this study was to perform molecular detection of *Babesia* spp. in dog samples and molecular identification of the species of this hemoparasite using Oxford Nanopore sequencing technology in rural areas of Ecuador. The focus was on delving into the technical and methodological details of clinical sample processing. A total of 363 venous blood samples from dogs were analyzed, and DNA was extracted from them. Pathogen detection was performed using a standard PCR with a conserved fragment of the *18S rRNA* gene, while species identification was done using Oxford Nanopore sequencing technology. The identified subspecies was *Babesia canis vogeli*, which, although it showed low prevalence, highlights the lack of research on this type of hemoparasites in the country. *Babesia canis vogeli* has a global distribution and higher prevalence in Latin America, representing a significant risk to companion animals and a serious challenge for veterinary health.

Keywords: Hemoparasites, tick, reservoir, host, hemolytic anemia, 18S rRNA, mitochondrial genes, standard PCR, sequencing.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
1. CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL	12
1.1 Clasificación taxonómica y características de <i>Babesia</i> spp.....	12
1.1.1 Hemoparásitos.....	12
1.2 Género <i>Babesia</i> spp. y su rol en la Babesiosis, con un enfoque hacia la Babesiosis canina	13
1.2.1 Introducción a la Babesiosis.....	13
2. CAPÍTULO II: INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA	37
2.1 INTRODUCCIÓN.....	37
2.2 METODOLOGÍA.....	39
2.2.1 Muestras analizadas.....	39
2.2.2 Extracción de ADN a partir de muestras de sangre.....	39
2.2.3 Detección molecular de β -actina en muestras de sangre	41
2.2.4 Detección molecular de <i>Babesia</i> spp.....	43
2.3 RESULTADOS OBTENIDOS.....	49
2.3.1 PCR utilizando los cebadores específicos que amplifican un fragmento del <i>18S ARNr</i> de <i>Babesia</i>	49
2.3.2 Ensayo de secuenciamiento de amplicones e identificación de <i>Babesia</i> spp. ...	55
2.4 DISCUSIÓN.....	69
2.5 CONCLUSIONES.....	79
2.6 PERSPECTIVAS FUTURAS	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Programa y condiciones del termociclador para la amplificación del gen β -actina en muestras de sangre de caninos	42
Tabla 2. Programa y condiciones del termociclador para la detección molecular de Babesia spp. a partir de PCRs	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gel de electroforesis 1 de PCR convencional para la detección molecular de <i>Babesia</i> spp. en muestras de sangre canina	50
Figura 2. Gel de electroforesis 2 de PCR convencional para la detección molecular de <i>Babesia</i> spp. en muestras de sangre canina	51
Figura 3. Gel de electroforesis 3 de PCR convencional para la detección molecular de <i>Babesia</i> spp. en muestras de sangre canina	52
Figura 4. Gel de electroforesis 4 de PCR convencional para la detección molecular de <i>Babesia</i> spp. en muestras de sangre canina	53
Figura 5. Gel de electroforesis 5 de PCR convencional para la detección molecular de <i>Babesia</i> spp. en muestras de sangre canina	53
Figura 6. Gel de electroforesis 6 de PCR convencional para la detección molecular de <i>Babesia</i> spp. en muestras de sangre canina	54
Figura 7. Generación de histogramas en muestras positivas para <i>Babesia</i> spp., mediante la herramienta Amplicon Sorter	57
Figura 8. Generación de histogramas a partir de Amplicon Sorter, Barcode 29	58
Figura 9. Generación de histogramas a partir de Amplicon Sorter, Barcode 30	59
Figura 10. Generación de histogramas a partir de Amplicon Sorter, Barcode 32	60
Figura 11. Generación de histogramas a partir de Amplicon Sorter, Barcode 33	61
Figura 12. Resultados del BLAST con las secuencias consenso generadas con el fragmento 500 pb en la muestra G077	62
Figura 13. Resultados del BLAST con las secuencias consenso generadas con el fragmento 500 pb muestra G080.....	63
Figura 14. Resultados del BLAST para las lecturas con un tamaño de 1000 pb de la muestra G076 y G082	64
Figura 15. Resultados del BLAST con las secuencias consenso generadas en la muestra G079	65
Figura 16. Interfaz de TABLET Viewer Genome® para el barcode 31.	67
Figura 17. Visualización de mismatches muestra G079 barcode 31 Tablet Viewer Genome®.....	68
Figura 18. Construcción de cladograma para la identificación de <i>Babesia</i> spp. usando el gen <i>18S ARNr</i> en el software MEGA 11.0.....	69

1. CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Clasificación taxonómica y características de *Babesia* spp.

1.1.1 Hemoparásitos.

En las últimas décadas, una serie de enfermedades transmitidas por vectores han sido distribuidas globalmente en distintas áreas geográficas, y muchas de ellas han sido provocadas por hemoparásitos o hemoprotozoos (Salih et al., 2015). Los hemoparásitos se caracterizan por ser patógenos que infectan los glóbulos rojos y habitan en la sangre de sus hospederos, incluyen especies de bacterias, protozoarios, helmintos y otro tipo de organismos que usan la sangre como su principal medio de supervivencia (Stuen, 2020).

Los canes tienden a ser infectados por hemoparásitos como *Babesia* spp., *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp., *Hepatozoon* spp., *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., y *Dirofilaria* spp., que son transmitidos por vectores y producen enfermedad en zonas tropicales o subtropicales (Bhattacharjee & Sarmah, 2013; Senthil & Chakravarthi, 2023).

1.1.1.1.1 *Filo Apicomplexa.*

El filo apicomplexa está representado por protozoos parasitarios intracelulares obligados, siendo la principal característica la presencia de una estructura especializada llamada complejo apical, que se ubica en el extremo anterior del cuerpo del parásito y es clave para la fijación y penetración del patógeno a las células del hospedero (Santana & Barbosa, s.f.).

1.1.1.2 *Orden piroplasmida.*

El grupo Piroplasmida recibió su nombre por sus etapas intraeritrocíticas en forma de pera (piriformes) (Jalovecka et al., 2018). Los piroplasmas se consideran protozoarios transmitidos por garrapatas duras (Familia: Ixodidae), que se caracterizan por tener un

exoesqueleto rígido en la parte dorsal, también conocido como escutelo, permitiéndoles resistir la presión y facilitar la adhesión al hospedero durante la alimentación (Pegram et al., 1984). Asimismo, según análisis multigénicos, los piroplasmas incluyen principalmente a los géneros *Babesia*, *Theileria* y *Cytauxzoon* (Tian et al., 2013).

Las especies pertenecientes a este orden comparten muchas estructuras morfológicas y funcionales como el complejo apical, que es una estructura formada por organelos secretores y por elementos del citoesqueleto, siendo esencial para la invasión de las células del hospedero (Dos Santos Pacheco et al., 2020). Igualmente, este orden comparte su forma de reproducción asexual o merogonia en los eritrocitos del hospedero y su reproducción sexual que da lugar a la formación de esporozoitos, en los vectores invertebrados o garrapatas (Hommer et al., 2000).

1.2 Género *Babesia* spp. y su rol en la Babesiosis, con un enfoque hacia la Babesiosis canina

1.2.1 Introducción a la Babesiosis.

En el año 1888, el doctor Víctor Babes, bacteriólogo rumano investigó brotes de enfermedades con síntomas como, hemoglobinuria en el ganado de Rumania, siendo el primero en observar protozoos con cuerpos pequeños dentro de los glóbulos rojos (Angus, 1996). Al principio se pensó que se trataba de una bacteria que fue descrita como *Hematococcus bovis*, la que después sería catalogada como *Babesia bovis*. Posteriormente, el género fue nombrado como “Babesia” en su honor (Laha et al., 2015).

Este descubrimiento inicial abrió el camino para investigaciones más profundas sobre la babesiosis, que con el tiempo ha cobrado relevancia en otras especies, como los caninos. La

ocurrencia de babesiosis canina a nivel global se ha vuelto esencial por su incremento de casos y su amplia distribución geográfica, involucrando también a algunas especies de *Babesia* que actualmente permanecen como no identificadas (Irwin, 2009).

1.2.1.1 Babesiosis canina

1.2.1.1.1 Diversidad de Especies y Subespecies del Género *Babesia* en Caninos

Babesia canis es un protozoo apicomplejo que infecta los glóbulos rojos de caninos y causa babesiosis, una enfermedad grave en perros, que puede provocar anemia, fiebre y letargia (Schnittger et al., 2012). Esta especie se transmite principalmente a través de garrapatas del género *Rhipicephalus* y otros vectores específicos, que facilitan su transmisión entre hospederos caninos (Kuttler, 1988).

La caracterización de *B. canis* se basa en estudios morfológicos y en el análisis de sus ciclos de vida y vectores, en combinación con técnicas moleculares que ayudan a diferenciarla de otras especies de *Babesia* (Cacciò et al., 2002). En su fase intraeritrocítica, *B. canis* puede presentar formas ovaladas, redondas o en tétrada, dependiendo de su ciclo y estadio de desarrollo (Laha et al., 2015; Uilenberg et al., 1989).

Por otra parte, la distribución de especies de *Babesia* depende de las zonas geográficas en donde sea localizado el vector competente, y del hospedero específico al que el patógeno infectará (Vannier & Krause, 2012; Young et al., 2019).

La babesiosis canina es causada por varias especies de *Babesia*: *Babesia canis*, *Babesia gibsoni*, *Babesia conradae*, *Babesia microti*, *Babesia divergens*, *Babesia vulpes*, las cuáles se diferencian morfológicamente, principalmente por su tamaño (Camacho, 2001; Baneth, 2018; Laha et al., 2015; Conrad, 1991; Schnittger et al., 2012).

Babesia canis es un tipo de protozoo grande y piriforme, capaz de ocasionar infección múltiple en un solo eritrocito. Por el contrario, *Babesia gibsoni* representa una forma pequeña de *Babesia* que morfológicamente no es piriforme, sino que sus trofozoítos son ovalados y pueden formar anillos (Laha et al., 2015).

Babesia canis comprende tres subespecies: *B. canis canis*, *B. canis rossi* y *B. canis vogeli* (Carret et al., 1999). Estas subespecies se han clasificado en función de su inmunidad cruzada, pruebas serológicas, especificidad de vector y análisis filogenético molecular. Actualmente, cada una de ellas se considera una subespecie separada debido a sus diferencias genéticas y ecológicas (Zahler et al., 1998).

1.2.1.1.2 Ciclo de vida del patógeno

1.2.1.1.2.1 Especificidad del Hospedero en Babesiosis canina

Los parásitos del género *Babesia* spp. están distribuidos globalmente y requieren de dos tipos de hospederos para su ciclo de vida: uno invertebrado y otro vertebrado. El ciclo de vida de *Babesia* depende de la interacción entre el hospedero definitivo o garrapata, y el hospedero intermediario, que generalmente es un vertebrado, como los perros, albergando las fases asexuales del parásito (Homer et al., 2000). Esta relación entre el parásito y sus hospederos es crucial para su supervivencia y transmisión, y revela la importancia de ambos hospederos en el mantenimiento de la enfermedad (Karasová et al., 2022; Solano-Gallego et al., 2008).

En este contexto, la especificidad de *Babesia canis* hacia los perros se puede entender como un fenómeno resultado de factores evolutivos, moleculares y genéticos que favorecen una interacción estrecha entre el parásito y su hospedero vertebrado. Un claro ejemplo de estos eventos involucra una óptima adaptación en mecanismos de adhesión molecular específica,

ya que se han identificado moléculas de superficie que interactúan particularmente con receptores en los eritrocitos de perros. Esta especificidad asegura la invasión eficiente de los glóbulos rojos y la posterior replicación del parásito en su hospedero. Por esta razón, la identificación precisa de especies, subespecies y genotipos de *Babesia* es fundamental, no solo para comprender la dinámica de la enfermedad, sino también para promover el control y prevención de la babesiosis en perros (Goodswen et al., 2021; Zhang & Yang, 2014).

Los parásitos del género *Babesia* poseen la capacidad de invadir directamente los eritrocitos de su hospedero canino, estableciéndose exclusivamente en esta fase intracelular para llevar a cabo su ciclo de reproducción asexual. Este proceso implica la invasión inicial de los glóbulos rojos, seguida de su desarrollo como trofozoítos y posterior multiplicación mediante fisión binaria, dando paso a merozoitos que eventualmente infectan nuevas células. A diferencia de otros protozoarios, como *Plasmodium*, que requieren la invasión de hepatocitos durante fases iniciales de su ciclo; *Babesia* omite esta etapa, lo que simplifica su ciclo de vida dentro del hospedero vertebrado. Este mecanismo exclusivo refleja una adaptación evolutiva eficiente que le permite al parásito replicarse de manera rápida y específica dentro de su nicho (Hoyte, 1965.; Mosqueda et al., 2002).

La familia de proteínas adhesivas BC28 son responsables de la invasión de las células eritrocíticas del hospedero, siendo el antígeno principal que se encuentra localizado en la superficie de los merozoitos de *Babesia canis*. La proteína recombinante BC28.1 interactúa con componentes específicos en la superficie de los eritrocitos del hospedero canino, aunque los receptores exactos aún no están completamente identificados en los glóbulos rojos caninos (Carcy et al., 2006). Sin embargo, se sabe que BC28.1 facilita la adhesión mediante

mecanismos que se asemejan a los usados por otros parásitos apicomplejos, como los de *Plasmodium* (Depoix et al., 2002.; Yang et al., 2012).

1.2.1.1.2.2 Vectores de *Babesia* en Babesiosis canina

Las garrapatas son especies de ectoparásitos que se alimentan de sangre de animales domésticos y salvajes, se distribuyen globalmente y son capaces de transmitir una variedad de patógenos (Maya-Delgado et al., 2020).

El patógeno *Babesia* es transmitido por ciertas especies de garrapatas, que pertenecen a garrapatas ixodidas, excepto por *Ornithodoros erraticus* garrapata no ixodida y reservorio de *Babesia meri*. (Homer et al., 2000).

Las subespecies de *Babesia canis* dependen de diversos vectores de garrapatas, los cuales son fundamentales para su transmisión y supervivencia en la naturaleza. Por ejemplo, *Babesia canis canis* se transmite principalmente a través de *Dermacentor reticulatus*, que circula mayormente en Europa (Matjila et al., 2008; Oyamada et al., 2005; Sasaki et al., 2007). Por otro lado, *Babesia canis vogeli* utiliza a *Rhipicephalus sanguineus*, conocida como la garrapata marrón del perro, que es común en áreas de clima cálido y en zonas tropicales y subtropicales (Karasová et al., 2022; Solano-Gallego et al., 2008). Finalmente, *Babesia canis rossi*, caracterizada por su alta patogenicidad, se transmite a través de *Haemaphysalis elliptica* o *Haemaphysalis leachi*, en zonas geográficas como Sudáfrica (Karasová et al., 2022).

En particular, *Rhipicephalus sanguineus* se destaca como un vector clave para *Babesia canis* debido a su capacidad para sobrevivir en distintas etapas de su ciclo de vida (huevo, larva,

ninfa y adulto), lo que facilita la persistencia y transmisión de la infección. Este ciclo permite que el parásito pase de una etapa a otra sin abandonar el vector, garantizando una transmisión eficiente cuando la garrapata se alimenta de un hospedero intermedio, como el perro, y luego de un nuevo hospedero (Chao et al., 2017.; Solano-Gallego et al., 2016).

La babesiosis canina se ha distribuido mayormente en varios países de Sudamérica, mientras que en América Central los casos son considerablemente más limitados. *Babesia vogeli* es la subespecie predominante en América Latina y el Caribe; su presencia no se restringe únicamente a zonas tropicales o subtropicales, sino que también se extiende a regiones templadas como Argentina y Chile, influenciada por la elevada prevalencia del vector (Schnittger et al., 2012). También se han reportado casos en Perú debido a que garrapatas vectoras como *Rhipicephalus sanguineus* son altamente prevalentes en esta zona. Sin embargo, los caninos positivos para *Babesia vogeli* no presentaron ningún síntoma compatible con la enfermedad, lo que afirma que, en algunos casos, perros portadores de la enfermedad y con una infección crónica no presentan signos clínicos de babesiosis (Temoche et al., 2018). Por otra parte, en Colombia, se han reportado pocos casos de ocurrencia de *Babesia* en perros, que se han detectado a través de frotis sanguíneos en canes con parasitemias bajas. Sin embargo, mediante pruebas serológicas y moleculares se ha logrado detectar esta subespecie de *Babesia*. Adicionalmente estos casos de Babesiosis canina han sido identificados en la fase aguda de la infección, en donde la parasitemia es más fácil de detectar (Batista Jiménez Alfonso, 1980; Vargas-Hernández et al., 2012).

Babesia canis vogeli ha sido identificado en garrapatas de la especie *Rhipicephalus microplus* en países como Brasil y México, áreas consideradas endémicas donde el parásito circula activamente (Lira et al., 2017; Melo et al., 2016; Rotondano et al., 2015; Silva et al., 2012).

Por otro lado, la distribución geográfica de *Babesia gibsoni* se restringe a América Latina y el Caribe, con reportes del parásito en Costa Rica, Nicaragua y el sur de Brasil (Iwakami et al., 2014; Schoeman, s.f.). Las investigaciones señalan que *Babesia gibsoni* puede transmitirse directamente entre caninos mediante mordeduras, heridas o la ingestión de sangre (Yeagley, 2009).

Hasta el momento, no se han registrado casos de *Babesia canis* ni *Babesia rossi* en América Latina y el Caribe, probablemente debido a la ausencia reportada de sus vectores en estas regiones. No obstante, se han documentado casos de *Babesia canis* en Estados Unidos (Barash et al., 2019).

En América Latina y el Caribe, la prevalencia de *Babesia* presenta variaciones significativas. Aunque los análisis de detección molecular indican una baja prevalencia en ciertas regiones, como Perú (1.4%) (Temoche et al., 2018), Venezuela (2.2%) (Criado-Fornelio et al., 2007), Colombia (5.5%) (Vargas-Hernández et al., 2012) y Argentina (7.7%) (Mascarelli et al., 2016); algunos países destacan por tener prevalencias elevadas, como Nicaragua (15.4%) (Wei et al., 2014) y Brasil (23.4%) (Jojima et al., 2008).

1.2.1.1.2.3 Ciclo de vida de *Babesia* en caninos

El ciclo de vida de *Babesia canis* es complejo e involucra a dos tipos de hospederos: una garrapata como hospedero definitivo (en donde ocurre la reproducción sexual del parásito) y

un mamífero como hospedero intermediario (donde se lleva a cabo la reproducción asexual) (ver Fig. 1) (Jalovecka et al., 2018).

Los protozoarios Apicomplexa generalmente tienen tres estadios de reproducción:

(i) La gamogonia, que es la formación y fusión de gametos en el intestino de la garrapata, (ii) esporogonia que se desarrolla en las glándulas salivales del vector, y (iii) merogonia o reproducción asexual en el hospedero vertebrado (Kakoma et al., 1994).

A diferencia de otros organismos apicomplexa que se replican en los eritrocitos, *Babesia* spp. no cuenta con un estadio pre-eritrocítico. En los glóbulos rojos, *Babesia* spp. cumple varios ciclos repetidos de replicación, salida e invasión, que terminan en la destrucción de los eritrocitos (Jalovecka et al., 2018. ; Mosqueda et al., 2002).

La garrapata infectada introduce el parásito en el torrente sanguíneo del hospedero intermediario al alimentarse de su sangre. Una vez en el cuerpo del mamífero, los esporozoítos de *Babesia* invaden los glóbulos rojos por medio de los antígenos de Glicosilfosfatidilinositol (GPI) de superficie de los merozoítos (MSA) y de proteínas asociadas a la roptría-1 (RAP-1), que son y se desarrollan en trofozoítos, que corresponde a una etapa intracelular del ciclo (Del Carmen Terrón et al., 2016; Sch Etters et al., 1998). Los trofozoítos se dividen asexualmente mediante fisión binaria y forman merozoítos, que salen de los glóbulos rojos para infectar nuevas células, continuando el ciclo asexual (Elsworth & Duraisingh, 2021).

Por el contrario, cuando el vector se alimenta de la sangre de un hospedero infectado, ingiere los glóbulos rojos que contienen los merozoítos. En el intestino de la garrapata, los merozoítos se transforman en gametocitos, que se fusionan para formar un cigoto

(strahlenkörper) que determina la etapa sexual del ciclo, siendo el único estadio diploide del mismo (Mehlhorn et al., 1985). El cigoto penetra las células del intestino de la garrapata, dando paso al desarrollo de un ookinete que luego migra a las glándulas salivales de la garrapata. En las glándulas salivales, el ookinete se convierte en esporozoítos, que estarán listos para ser transmitidos al siguiente hospedero mamífero cuando la garrapata se vuelva a alimentar (Mehlhorn & Schein, 1993).

El mecanismo molecular del desarrollo de *Babesia canis* en el intestino del vector permanece desconocido, sin embargo, se asegura que los esporozoítos usan los mismos procesos moleculares de invasión que los merozoítos. La presencia de MSA-1, MSA-2, y la Proteína 1 asociada a la Roptría RAP-1 ayuda a atrapar a los eritrocitos e invadirlos (Mosqueda, McElwain, & Palmer, 2002).

1.2.1.1.3 Babesiosis canina: Impacto clínico y epidemiológico

1.2.1.1.3.1 Patogenicidad Babesiosis canina

La patogenicidad de *Babesia* en caninos depende de la especie y subespecie del parásito, el estado inmune del hospedero y la carga parasitaria. Las especies más comunes en perros, como *Babesia canis*, *Babesia vogeli* y *Babesia rossi*, se transmiten principalmente a través de vectores garrapatas del género *Rhipicephalus*. (Leisewitz et al., 2023).

Dentro de las subespecies de *Babesia*, *Babesia rossi* es considerada la más patógena, causando babesiosis canina severa en áreas endémicas como África. Esta especie está asociada con tasas de mortalidad más altas y complicaciones graves, como fallo multiorgánico. *Babesia canis* y *Babesia vogeli*, aunque también pueden causar babesiosis, generalmente producen formas menos severas de la enfermedad (Leisewitz et al., 2023).

1.2.1.1.3.1.1 Factores de virulencia: adhesión e invasión eritrocitaria

Los merozoítos de *Babesia* utilizan una serie de moléculas de superficie y estructuras del complejo apical para adherirse e invadir las células del hospedero, facilitados por antígenos, estos procesos son vitales para la supervivencia de *Babesia* (Dubremetz et al., 1998; Sam-Yellowe, 1996). A su vez, estos parásitos han desarrollado mecanismos moleculares que favorecen una variabilidad antigénica, permitiendo evadir el sistema inmunológico del hospedero y perpetuar la infección (Carcy et al., 2006).

En *Babesia canis*, aunque la diversidad antigénica no está completamente caracterizada, se han identificado polimorfismos en los genes *VESA* (antígenos variables de superficie eritrocitaria) y *RAP-1*, que permiten la expresión de proteínas con epítomos únicos, lo que contribuye a la evasión inmune mediante la activación de linfocitos B con receptores específicos (Allred et al., 2000; Dalrymple et al., 1993; Mishra et al., 1992; Skuce et al., 1996). La diversidad antigénica de este parásito está principalmente relacionada con la familia de genes *Bc28*, que al igual que *MSA-2*, codifica proteínas conservadas en su secuencia de aminoácidos, contribuyendo a la persistencia del parásito en el hospedero (Carcy et al., 2006).

1.2.1.1.3.1.2 Respuesta inmune del hospedero

Los factores de patogenicidad de *Babesia canis* están relacionados con una serie de mecanismos moleculares y respuestas inflamatorias que contribuyen al daño celular y tisular en los perros infectados. La proteína BrEMA1 en *Babesia rossi* se considera un factor de virulencia clave, aunque no es expresada en *B. canis canis*, lo que sugiere diferencias en la

virulencia entre especies. En *B. canis*, las interacciones de citoquinas y quimioquinas son cruciales para la patogénesis (Galán et al., 2018).

La babesiosis canina puede causar graves complicaciones, ya que desencadena una respuesta inmune que activa citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias, junto con endotoxinas y el sistema de complemento. Este proceso puede derivar en el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) si no se regula adecuadamente (Goddard et al., 2016; Hack et al., 1992). Además, un desequilibrio de citoquinas como TNF- α , IL-1 β y la IL-10 antiinflamatoria contribuye al SIRS y al síndrome de disfunción de órganos múltiples (SDOM). Los antígenos MCP-1 y KC también juegan un papel importante en el reclutamiento celular, provocando inflamación y posible sepsis (Bossink et al., s.f; Deshmane et al., 2009).

La IL-8, asociada al aumento de TNF- α e IL-1, incrementa en respuesta a factores como productos bacterianos y estrés celular, generando daño tisular y anemia hemolítica debido a la respuesta inflamatoria y hemólisis mediada por anticuerpos. Además, se observa hipoxia tisular debido a especies reactivas de oxígeno y disfunción mitocondrial, que contribuyen al daño renal (Goddard et al., 2016; Hack et al., 1992).

La producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 es crucial para activar la respuesta inflamatoria (Matijatko et al., 2009; Zygner et al., 2023). Estas citoquinas facilitan la migración de leucocitos a través del endotelio, aunque también pueden causar daños en este tejido y contribuir al SIRS, característico en casos severos de babesiosis. La respuesta inflamatoria y la hemólisis provocada por anticuerpos pueden desencadenar problemas como anemia hemolítica y manifestación de otros síntomas graves, mientras que

la liberación de especies reactivas de oxígeno y la disfunción mitocondrial producen hipoxia tisular, influyendo en el daño renal (Dubremetz et al., 1998; Sam-Yellowe, 1996).

1.2.1.1.3.2 Manifestaciones clínicas de Babesiosis canina

Las manifestaciones de la infección son causadas por la fase reproductiva asexual del parásito en los eritrocitos y la lisis de las células. Consecuentemente, el cuadro clínico es amplio y revela el nivel de parasitemia en la sangre (Homer et al., 2000).

En caninos, el período de incubación de *Babesia* puede variar entre 10 a 21 días si es causado por *Babesia canis* y de 14 a 28 días si fue causado por *Babesia gibsoni*. La mortalidad ocasionada por infecciones de *Babesia* tiene un rango de 12% por *B.rossi* y 1% por *B.vogeli* (Homer et al., 2019).

La babesiosis canina es una enfermedad grave que afecta a los perros, caracterizada principalmente por la destrucción de los glóbulos rojos debido a la acción de los parásitos *Babesia* (Solano-Gallego et al., 2016). Esta destrucción lleva a una anemia hemolítica, que se acompaña de diversas complicaciones como fiebre, ictericia, trombocitopenia, y agrandamiento de órganos como los ganglios linfáticos y el bazo (Solano-Gallego et al., 2016).

Otras alteraciones que se pueden detectar incluyen hipoalbuminemia e hiperbilirrubinemia (Solano-Gallego & Baneth, 2011). Dependiendo de la especie infecciosa y el curso de la infección, la anemia puede ser regenerativa, aunque la anemia no regenerativa se asocia más comúnmente con *B. canis*. En todas las especies, la anemia es causada por una combinación de hemólisis intravascular y extravascular, resultado del daño y la ruptura de los glóbulos

rojos por los parásitos, la mayor fragilidad osmótica de las células y la actividad de procesos inmunomediados secundarios (Solano-Gallego et al., 2008).

La liberación de toxinas por los parásitos en el torrente sanguíneo agrava la situación, al igual que la respuesta inmune del hospedero, que implica la liberación de citoquinas, exacerbando la hemólisis y la inflamación, de manera similar a lo observado en la malaria producida por *Plasmodium* spp. (Montero et al., 2022).

La gravedad de la enfermedad aumenta en perros con asplenias o aquellos que sufren de coinfecciones con otros agentes patógenos, lo que complica la respuesta inmunológica y la recuperación (Homer et al., 2000). La severidad de los síntomas clínicos, como la debilidad, la pérdida de apetito, y la anemia, varía según la especie de *Babesia* implicada, siendo más grave en algunos casos como el de *B. rossi*. Además, los signos adicionales de fallo renal, trastornos de coagulación, y complicaciones respiratorias, reflejan la extensión del daño orgánico causado por la infección y la respuesta inmune desmedida. Este conjunto de alteraciones clínicas subraya la complejidad de la babesiosis y su potencial para inducir un daño sistémico grave (Jacobson, 2006).

1.2.1.1.3.3 Epidemiología

La distribución de enfermedades en caninos causadas por vectores se encuentra en constante cambio. Este patrón depende de la prevalencia y frecuencia de las enfermedades en zonas donde el parásito está bien establecido y clínicamente identificado, así como en áreas donde se presentan casos esporádicos, frecuentemente relacionados con perros que se desplazan entre regiones, o con la expansión geográfica del vector (Irwin, 2009).

La propagación de babesiosis está influenciada por diversos factores como la disponibilidad de los hospederos, la presencia de garrapatas que funcionan como vectores, la presencia del patógeno en dichos vectores, y las condiciones propicias tanto del hospedero como del entorno. Estos elementos determinan la expansión de la enfermedad, y en su ausencia, la transmisión de la infección se ve detenida. El parásito *Babesia* depende completamente de los vectores y hospederos para su supervivencia, dado que no tiene la capacidad de mantenerse por sí mismo fuera de estos.

La relación entre estos factores es crucial para entender cómo y por qué la babesiosis se propaga en ciertas regiones. Sin la presencia de los vectores (garrapatas) y de los hospederos susceptibles, la circulación del parásito en el ambiente se interrumpe, y la transmisión de la enfermedad cesa.

Respecto a la distribución de los piroplasmidos caninos, *Babesia rossi* es un parásito con origen en el África subsahariana. *Babesia canis* en Europa y *Babesia vogeli* está ampliamente distribuida en todo el mundo, región Tropical, Subtropical y Mediterránea. La distribución geográfica del microorganismo está determinada por el rango ecológico de sus garrapatas vectoras, excepto para *Babesia gibsoni* para la cual la propagación global es impulsada por transmisión directa entre perros sin intervención de un vector (Jefferies, Ryan, Jardine, Broughton, et al., 2007).

Babesia vogeli es el piroplasma canino más comúnmente distribuido en el mundo, gracias a su vector, la garrapata marrón del perro (*Rhipicephalus sanguineus*), que es considerada cosmopolita. *B. vogeli* se encuentra en regiones tropicales y subtropicales y puede extenderse

a zonas más frías, coexistiendo y confundiéndose con otras especies grandes de *Babesia* (Irwin, 2009).

En regiones no endémicas, los casos de babesiosis suelen ocurrir cuando los caninos entran en contacto con vectores infectados, los cuales pueden haber llegado de hospederos provenientes de zonas endémicas o por la expansión de los vectores debido a cambios ecológicos. Consecuentemente, la movilización migratoria de los canes, el historial de caza y la exposición rural extensa se consideran factores de riesgo para la Babesiosis canina en Europa (Solano-Gallego et al., 2008).

Por otra parte, en Ecuador no existen reportes ampliamente documentados sobre la presencia de babesiosis canina, aunque se han realizado algunas investigaciones limitadas, especialmente en la región litoral, donde las condiciones climáticas favorecen la proliferación de enfermedades parasitarias (Olaya Martínez, 2015; Reyna-Bello Armando, 2022).

Olaya Martínez (2015) señala que *Babesia vogeli* es el único piroplasma identificado molecularmente en perros en la ciudad de Guayaquil. Este hallazgo se obtuvo mediante pruebas hematológicas, como el Test de Woo y la observación de frotis sanguíneos, complementadas con técnicas moleculares que incluyeron la amplificación de tres fragmentos del gen *18S ARNr*. Los resultados indicaron una prevalencia del 5% (Olaya Martínez, 2015).

Para corroborar estos estudios, Reyna-Bello (2022) identificó la presencia de muestras positivas de *Babesia* spp. mediante el análisis de frotis sanguíneos, lo que permitió describir morfológicamente una *Babesia* de gran tamaño. Para complementar estos resultados, se realizaron análisis moleculares que detectaron e identificaron dos subespecies de *Babesia*

canis: *Babesia canis canis* y *Babesia canis vogeli*. En particular, la secuencia obtenida de una muestra positiva en Santo Domingo de los Tsáchilas correspondió a *Babesia vogeli*. Los análisis filogenéticos revelaron que esta secuencia presentaba una alta similitud con otras encontradas en Perú y Colombia (Reyna-Bello Armando, 2022).

A pesar de que algunos estudios apuntan a la necesidad de investigar más sobre esta enfermedad, la falta de censos oficiales y la escasa disposición de los dueños de mascotas para realizar exámenes complementarios dificultan el diagnóstico y tratamiento adecuado de la babesiosis en el país.

1.2.1.1.4 Metodologías de Diagnóstico para Babesiosis canina

1.2.1.1.4.1 Hematología

1.2.1.1.4.1.1 Exámenes de Microscopía

El diagnóstico más simple y accesible se basa en microscopía, técnica que es relativamente sensible en la fase aguda de la infección y es capaz de detectar parásitos intraeritrocíticos en tinciones de Giemsa o Wrights de frotis de sangre. (Irwin, 2009).

Esta técnica se basa en la examinación de frotis sanguíneo para observar la presencia de parásitos en los eritrocitos (Etkind et al., 1980). Los frotis de sangre periférica son procesados con la tinción de Giemsa o tinción de Wright's. En esta fase de infección es más sencillo diferenciar las formas grandes o pequeñas de *Babesia* spp (Irwin, 2009).

Los protozoarios que infestan a los eritrocitos se observan como anillos oscuros y teñidos con un citoplasma de color más claro. Morfológicamente existe una gran variación en las formas de *Babesia* spp., en donde se presentan anillos (anular), trofozoítos en pares o

individuales con forma de pera (piriformes), y la cruz Maltese (tetraédrica), que no es tan frecuente (Homer, 2000).

La duración de la detectabilidad de las parasitemias está en un rango de tres a doce semanas, y en pacientes esplenectomizados se puede alcanzar hasta los 7 meses (Sun et al., 1983; Anderson & Cassaday, s.f.; Ruebush II et al., s.f.).

Además, los análisis de frotis sanguíneos se deben tomar en cuenta que las formas de anillo en los eritrocitos pueden ser confundidas con *Plasmodium falciparum*, sin embargo, tomando en cuenta que las etapas tempranas de *P. falciparum* pueden perder pigmentación, la ausencia del pigmento hemozoína puede distinguir el patógeno *Babesia* spp (Telford & Spielman, 2010). Sin embargo, el diagnóstico de piroplasmosis crónica en animales portadores o infectados representa un reto por niveles de parasitemia bajos o intermitentes y por esta razón se deben considerar otros tipos de diagnóstico (Irwin, 2009).

1.2.1.1.4.1.2 Ensayos serológicos e inmunológicos

1.2.1.1.4.1.2.1 Ensayos de anticuerpos inmunofluorescentes (IFAT)

Se usan para la detección de anticuerpos anti-babesiosis. Es una técnica rápida, sencilla y costo efectiva. La enfermedad de Babesiosis aguda induce la producción de anticuerpos IgG y IgM. El punto de corte para determinar un resultado positivo varía dependiendo del laboratorio, pero para el diagnóstico, el más recomendable está sobre 1:64. Generalmente titulaciones más altas como 1:128 o 1:256 se asocian con diagnósticos más específicos, en donde es muy raro que existan resultados falsos positivos (Homer et al., 2000).

En la fase aguda de la infección los anticuerpos suelen tener valores de 10 o 20 veces más a los requerido en el punto de corte (Pruthi et al., 1995). Los valores de anticuerpos pueden

mantenerse elevados de hasta tres meses a seis años después de la infección. Se debe tomar en cuenta que esta prueba serológica es propensa a generar reacciones cruzadas con otros protozoarios, generando resultados falsos positivos en los procedimientos, especialmente en los valores y detección del anticuerpo IgM. (Persing et al., 1995).

1.2.1.1.4.1.2.2 Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)

La prueba ELISA es útil para diagnosticar infecciones por patógenos que causan babesiosis canina, tanto agudas como crónicas. Dicha prueba se usa para detectar antígenos circulantes de *Babesia canis* en el suero de canes infectados, en donde los antígenos detectados suelen ser proteínas del parásito, como *Bcan 3D7*, *Bm 86* y diversos antígenos de superficie que se encuentran en las formas de desarrollo intraeritrocítico del parásito (Eichenberger et al., 2017)

1.2.1.1.4.1.3 Detección molecular de *Babesia* spp.

1.2.1.1.4.1.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La detección de Babesiosis leve se realiza con técnicas más sensibles como técnicas moleculares incluida la PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Este procedimiento se basa en la amplificación de secuencias altamente conservadas que incluyan regiones que permitan identificar especies del patógeno (Homer, 2000).

1.2.1.1.4.1.3.1.1 PCR convencional para la detección de babesiosis canina

La PCR convencional ha sido ampliamente usada en la detección de *Babesia* por su amplia estandarización y versatilidad. Los genes de ARN ribosomales como el *18S*, *5.8S*, *28S* y el espaciador transcrito interno *ITS* han sido frecuentemente usados para PCRs convencionales, aunque algunos estudios usan otros loci target como *p18/BgTRAP* (Fukumoto et al., 2001).

Para mejorar la detección de la diversidad de patógenos, es fundamental que las secuencias objetivo pertenezcan a regiones lo suficientemente variables, lo que permite reconstruir historias filogenéticas con mayor precisión. En este contexto, las subunidades pequeñas del ARN ribosomal o *18S ARNr* destacan como uno de los marcadores más utilizados, por tener una estructura ampliamente caracterizada, con nueve regiones considerablemente variables. Aunque estas regiones están presentes en todos los organismos y son altamente conservadas, presentan diferencias específicas entre eucariotas y procariotas que pueden ser útiles para estudios filogenéticos (Hadziavdic et al., 2014a; Wuyts et al., 2001).

En múltiples investigaciones, se han amplificado diferentes regiones del gen *18S ARNr*, seleccionando fragmentos que varían en longitud y características específicas. Debido a estas diferencias, ha sido imprescindible desarrollar primers diseñados específicamente para las regiones objetivo de cada análisis (Hadziavdic et al., 2014a; Hong et al., 2009). Esto permite obtener fragmentos amplificados que sean apropiados para cumplir los fines del estudio, como la identificación de especies, el análisis filogenético o la detección molecular precisa de *Babesia* (Adaszek & Winiarczyk, 2008).

1.2.1.1.4.1.3.1.2 Reacción en Cadena de la Polimeras por Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción (PCR-RFLP)

Consecuentemente, las modificaciones de la PCR permiten la identificación de especies, o genotipos, y la diferenciación de piroplasmas. Por ejemplo, técnicas como PCR-RFLP (Reacción en Cadena de la Polimerasa por Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción) y las PCRs anidadas han sido usadas para diferenciar genotipos de *B. vogeli* y *B. gibsoni* (Jefferies, Ryan, & Irwin, 2007). Es así como, el diseño de varios primers usados

en una PCR anidada o PCR semianidada separan claramente amplicones de 342 pb, 546 pb y 746 pb de *B.rossi*, *B.vogeli* y *B.canis* (Duarte et al., 2008).

1.2.1.1.4.1.3.1.3 Amplificación Isotérmica mediada por Bucles (LAMP)

Por otra parte, técnicas como LAMP (Amplificación Isotérmica Mediada por Bucles) son usadas por su velocidad y especificidad para la detección de *B.gibsoni*, aplicando también técnicas como RLB o Ensayo de Hibridación en línea invertida son aplicados en estudios epidemiológicos que analizan el vector del patógeno principalmente (Ikadai et al., 2004).

1.2.1.1.4.1.3.1.4 PCR en tiempo real

Además, las técnicas cuantitativas como qRT-PCR permite la cuantificación de los niveles del patógeno en las muestras de sangre o tejido. La cantidad del producto final de PCR puede utilizarse para deducir el número inicial de moléculas objetivo y, a partir de ello, inferir los niveles de parásitos dentro de un hospedero. Este principio se basa en la amplificación exponencial que ocurre durante la PCR. Si se realiza una PCR cuantitativa (qPCR), que monitorea la cantidad de ADN amplificado en tiempo real, es posible correlacionar la cantidad de ADN del parásito en la muestra con la carga parasitaria en el hospedero (Birkenheuer et al., 2003a; Matsuu et al., 2005).

Aunque la PCR sea capaz de detectar una carga de 50 organismos /ml y 9 parásitos/ul, la PCR no detectará claramente el gen target cuando no se encuentren organismos en la muestra, o cuando la parasitemia sea muy baja o fluctuante (Matsuu et al., 2005). Es por esta razón que se han obtenido resultados falsos negativos en casos de Babesiosis crónica, y es esencial reconocer esta limitación al examinar posibles portadores y perros asintomáticos (Birkenheuer et al., 2003).

1.2.1.1.4.1.3.2 Secuenciamiento de siguiente generación

El secuenciamiento de próxima generación, corresponde a una tecnología avanzada que permite leer de manera simultánea y masiva las secuencias de nucleótidos de ADN o ARN. Facilita el análisis integral de genomas completos, transcriptomas y regiones específicas del genoma en un solo proceso (Frey & Bishop-Lilly, 2015).

Este tipo de secuenciamiento desempeña un papel fundamental en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, ya que permite identificar y caracterizar patógenos de manera rápida, predecir resistencias a medicamentos y rastrear la propagación de infecciones (Didelot et al., 2012). Su capacidad para detectar microorganismos no cultivables, difíciles o imposibles de cultivar en laboratorios, amplía su utilidad frente a las limitaciones de métodos convencionales, lo mismo que la convierte en una herramienta versátil que supera las limitaciones de métodos tradicionales (Seth-Smith et al., 2013).

La tecnología de secuenciación Oxford Nanopore (ONT) pertenece a la categoría de tercera generación. Esta técnica permite realizar lecturas de secuencias de ADN o ARN que superan los 1 Mb, ofreciendo una capacidad de análisis masivo y detallado en comparación con otras tecnologías (Miga et al., 2020). Su principio de funcionamiento se basa en el paso de una hebra de ADN o ARN a través del poro de la proteína α -hemolisina, extraída de *Staphylococcus aureus* (Clarke et al., 2009). Una enzima motora (*Ter*) derivada de la polimerasa de ARN T7, unida al adaptador en la dirección 5' facilita el desplazamiento de la cadena de ADN a través del poro durante el proceso de secuenciación. La identificación de

nucleótidos se basa en el paso de cada nucleótido a través de la proteína poro, lo que produce una alteración en la corriente iónica (Hu et al., 2021).

En el caso específico de *Babesia*, la tecnología de secuenciación Oxford Nanopore, utilizada de forma independiente o en combinación con Illumina, se emplea para analizar amplicones de genes conservados en los piroplasmas, como el *18S ARNr*, citocromo c oxidasa subunidad 1 (*coxI*) y citocromo b (*Cob*). Estos fragmentos genéticos son clave para la identificación y caracterización de *Babesia* (Wang et al., 2022). Tras la amplificación de estos genes, la secuenciación empleando Oxford Nanopore permite obtener datos detallados que facilitan el análisis de la prevalencia y variabilidad genética de las especies de *Babesia* en diversas regiones.

1.2.1.1.5 Tratamiento y prevención de Babesiosis canina

1.2.1.1.5.1 Tratamiento

El tratamiento de la babesiosis canina se ha centrado en medicamentos antipiroplásmicos como el dipropionato de imidocarb y el aceturato de diminazeno, aunque también se han utilizado otros compuestos como el sulfato de quinuronio y el azul de tripano. Sin embargo, el uso de derivados de diamidínico, como el diminazeno, se ha asociado con efectos secundarios tóxicos. Aunque estos tratamientos pueden aliviar los signos clínicos de la babesiosis, no logran erradicar la infección por completo (Irwin, 2009).

En el caso de *Babesia gibsoni*, los tratamientos son aún más complicados debido a la resistencia del parásito. El uso de clindamicina ha mostrado cierto éxito al reducir la parasitemia, pero no elimina el parásito de manera definitiva. Sin embargo, una combinación de clindamicina, metronidazol y doxiciclina ha demostrado ser eficaz al eliminar el ADN de

Babesia gibsoni en sangre periférica y restaurar la salud clínica de los perros (Suzuki et al., 2007).

Más recientemente, la combinación de azitromicina y atovacuna ha sido utilizada, aunque algunos perros aún desarrollan resistencia debido a mutaciones en el gen del citocromo B (Jefferies et al., 2007; Matsuu et al., 2006). Además, estudios in vitro han explorado el uso de extractos de plantas con propiedades anti-babesiales, aunque aún no se han realizado ensayos clínicos en caninos con estos compuestos (Matsuura et al., 2005; Subeki et al., 2005).

1.2.1.1.5.2 Prevención de Babesiosis canina

1.2.1.1.5.2.1 Control de vectores

Para prevenir la babesiosis canina, es esencial evitar la exposición de los perros a las garrapatas mediante un control sistemático y bien planificado de ectoparásitos, especialmente en zonas endémicas. Se recomienda evitar áreas de vegetación densa, como hierba alta y matorrales, donde las garrapatas y sus hospederos, como ciervos y ratones, son comunes (Spielman 1985, Telford et al. 1993).

1.2.1.1.5.2.2 Vacunación

Respecto a la vacunación, se han realizado estudios en ganado y otros animales. La mayoría de intentos se han enfocado en las babesias morfológicamente grandes como *B. bovis*, *B. divergens* y *B. bigemina*, vacunas atenuadas, vacunas que usan antígenos solubles (Montenegro-James et al., 1985) provenientes de cultivos in vitro y vacunas recombinantes ((Barriga, 1994.; Palmer & McElwain, 1995.; Callow et al., s.f.).

1.2.1.2 Babesiosis canina y su riesgo zoonótico

La piroplasmosis canina es una enfermedad hemoprotozoaria severa, causada por diversas especies de los géneros *Babesia* y *Theileria*. En particular, se han identificado aproximadamente 100 especies del género *Babesia*, que afectan principalmente a animales domésticos y ganado (Villalta & Kierszenbaum, 1988).

Aunque no se han registrado casos de babesiosis humana causados por *Babesia canis* o *Babesia gibsoni*, otras especies como *Babesia microti* y *Babesia divergens* pueden infectar a los perros. *Babesia microti*, que prevalece en América del Norte, y *Babesia divergens*, que representa la principal causa de babesiosis en humanos, son capaces de infectar a los caninos, aumentando el riesgo de exposición humana debido a su participación en el ciclo epidemiológico (Checa et al., 2019; Zahler et al., 2000).

Estas especies zoonóticas de *Babesia* son transmitidas por garrapatas del género *Ixodes*, las cuales requieren un hospedero vertebrado para completar su ciclo de vida. La transmisión hacia los humanos puede ocurrir a través de la mordedura de garrapatas infectadas (Piesman & Spielman, 1980), transfusiones sanguíneas contaminadas o de manera transplacentaria, de una madre infectada a su feto (Fox et al., 2006; Leiby, 2011; Lobo et al., 2013). Principalmente, la distribución geográfica de la babesiosis humana está vinculada a la presencia de estos vectores competentes, lo que determina el alcance y la dispersión de la enfermedad (Vannier & Krause, 2012).

2. CAPÍTULO II: INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

2.1 INTRODUCCIÓN

La babesiosis canina es una enfermedad parasitaria causada por protozoarios del género *Babesia*, los cuales infectan los glóbulos rojos de los perros y son transmitidos principalmente a través del vector garrapata (Birkenheuer et al., 2003; Oyamada et al., 2005; Solano-Gallego et al., 2016). Esta patología puede manifestarse en forma aguda o crónica, con síntomas como fiebre, anemia hemolítica, letargia e ictericia, y en casos graves puede ser fatal (Irwin, 2010). Las especies de *Babesia* que afectan a los caninos se clasifican según el tamaño de los piroplasmas observados en frotis sanguíneos, formas grandes de *Babesia* (*Babesia canis*) y formas pequeñas (*Babesia gibsoni*, *Babesia conradae*, *Babesia vulpes*) (Cacciò et al., 2002).

En términos de salud pública, aunque muchas especies de *Babesia* son específicas de sus hospederos, algunas poseen un potencial zoonótico, como *Babesia microti*, que puede infectar a humanos (Bloch et al., 2019; Hildebrandt et al., 2007; Yabsley & Shock, 2013). Aunque las especies más comunes en perros, como *Babesia vogeli*, *Babesia canis*, y *Babesia rossi* no se consideran zoonóticas, su monitoreo y control son esenciales para la salud animal y la comprensión epidemiológica de la babesiosis canina (Irwin, 2009).

El diagnóstico de la babesiosis en perros se realiza comúnmente mediante la observación microscópica de frotis sanguíneos, una técnica sencilla y accesible (Yabsley & Shock, 2013). Sin embargo, esta metodología tiene limitaciones, especialmente en infecciones crónicas o con bajas parasitemias, donde la cantidad de parásitos en sangre es escasa y puede pasar desapercibida (Yabsley & Shock, 2013) En este contexto, las técnicas moleculares, son

herramientas valiosas para detectar al patógeno en estas fases, superando las restricciones de los métodos serológicos y microscópicos (Olaya Martínez, 2015). Esto es particularmente importante para identificar infecciones subclínicas que, de no ser tratadas, pueden actuar como reservorios para la propagación del parásito.

En Ecuador, la babesiosis canina ha sido escasamente explorada, a pesar de que las condiciones climáticas, como la elevada humedad y las altas temperaturas, favorecen la proliferación y propagación del vector. Según datos del Ministerio de Salud Pública (2024) las enfermedades transmitidas por vectores constituyen un desafío creciente, especialmente en regiones tropicales y costeras. Sin embargo, la información específica sobre la incidencia de *Babesia* en perros en el país es limitada, lo que resalta la necesidad de encaminar estudios moleculares para caracterizar las especies presentes y comprender su dinámica epidemiológica (Marsch Martínez et al., 2009; Olaya Martínez, 2015).

Este proyecto tiene como propósito principal realizar la detección molecular de *Babesia* en muestras de sangre de perros, y explorar la posibilidad de identificar las especies de este parásito mediante secuenciación de amplicones utilizando la tecnología de Oxford Nanopore. En este trabajo se ahondará en los detalles técnicos y metodológicos para reflexionar acerca de los métodos correctos para la detección molecular de *Babesia*, y las dificultades que surgieron en relación con la metodología empleada durante el desarrollo del proyecto.

2.2 METODOLOGÍA

2.2.1 *Muestras analizadas*

Se analizaron un total de 363 muestras de sangre no coagulada de perros que se mantenían almacenadas en el laboratorio de genómica de la USFQ. Estas muestras fueron previamente recolectadas por otros investigadores, utilizando EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) para evitar la formación de coágulos. Luego, las mismas muestras se almacenan a -20 °C para asegurar su estabilidad y evitar la degradación de material genético.

Las muestras de sangre venosa son consideradas confiables para detectar *Babesia* porque este parásito infecta principalmente los glóbulos rojos. Este tipo de muestra permite realizar análisis mediante técnicas moleculares, serológicas o microscópicas con alta precisión (Böhm et al., 2006; Chatanga et al., 2021).

2.2.2 *Extracción de ADN a partir de muestras de sangre*

De las 363 muestras de sangre, se extrajo ADN de 20 muestras, ya que las demás ya habían sido previamente extraídas y almacenadas. En esta etapa del proceso básicamente se utilizó el ADN de las muestras de sangre que fueron procesadas anteriormente. Como protocolo general, las muestras de sangre fueron descongeladas y homogeneizadas mediante agitación en vórtex durante 10 segundos antes de iniciar el proceso de extracción de ADN. Para ello, se utilizó el kit comercial PureLink® Genomic DNA, diseñado específicamente para la extracción de material genético de sangre nucleada o no nucleada. A continuación, se detalla el procedimiento de extracción y purificación de ADN llevado a cabo con este kit.

Este método utiliza columnas de centrifugado para la purificación del ADN. El primer paso consistió en preparar un lisado a partir de sangre nucleada y no nucleada. Para ello, se

tomaron 200 μ l de sangre en un tubo de microcentrífuga estéril. En caso de usar un volumen inferior, se ajustó hasta 200 μ l con solución PBS (solución salina tamponada con fosfato), tal como indica el protocolo. Luego, se añadieron 20 μ l de proteinasa K y 20 μ l de ARNasa, mezclando brevemente con un vórtex antes de incubar la muestra a temperatura ambiente durante 2 minutos (PureLink® Genomic DNA Kits, EE. UU.). En este proceso, la proteinasa K se usa para asegurar una lisis de células o tejidos eficiente, que conjuntamente con una formulación de buffer adecuada, proporciona una actividad enzimática óptima. Además, la enzima ARNasa permite la degradación de ARN presente en la muestra, minimizando la contaminación de la misma (PureLink® Genomic DNA Kits, EE. UU.).

Posteriormente, se agregaron 200 μ l de buffer de lisis/unión que permite una mejor unión de los ácidos nucleicos a la columna, y se agitó la mezcla con un vórtex hasta que la solución fuera homogénea. Esta mezcla se incubó a 55 °C durante 10 minutos para favorecer la digestión de proteínas. A continuación, se incorporaron 200 μ l de etanol al 96%-100%, lo cual promovió la adsorción del ADN a la membrana de sílice de la columna y ayudó a desnaturalizar proteínas y otros contaminantes. Tras un vórtex rápido de 5 segundos, el lisado estuvo listo para el siguiente paso (PureLink® Genomic DNA Kits, EE. UU.).

En la etapa de unión del ADN a la membrana de sílica, se cargaron 700 μ l del lisado en la columna PureLink® y se centrifugó a 10,000 RCF durante 1 minuto a temperatura ambiente. Luego, se descartó el tubo colector y se colocó la columna en uno nuevo. La etapa de lavado comenzó añadiendo 500 μ l de buffer de lavado 1, que contiene sales que eliminan contaminantes como proteínas, lípidos y otras moléculas; seguido de centrifugación a 10,000 RCF por 1 minuto. Después, se añadieron 500 μ l de buffer de lavado 2, que contiene etanol

y elimina restos de sales y otros contaminantes solubles en agua, centrifugando a 20,000 RCF durante 3 minutos. Al finalizar, se descartó el tubo colector (PureLink® Genomic DNA Kits, EE. UU.).

Para la elución del ADN que en este punto se encuentra unido a la membrana de sílica, la columna se colocó en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml. Se añadieron 100 µl de buffer de elución PureLink®, incubando a temperatura ambiente durante 1 minuto, seguido de una centrifugación a 20,000 RCF por 1 minuto. Este paso se repitió añadiendo nuevamente 100 µl de buffer de elución, centrifugando por 1.5 minutos. Al terminar, se recuperó el ADN purificado en el tubo, descartando la columna (PureLink® Genomic DNA Kits, EE. UU.).

Finalmente, para preservar la integridad del ADN, se recomienda su almacenamiento a -20 °C para uso a largo plazo. Si se requiere un uso inmediato, puede conservarse a 4 °C para evitar ciclos de congelación y descongelación, que podrían degradar el material genético y disminuir su calidad. Alternativamente, se pueden preparar alícuotas para un manejo más eficiente y evitar degradación (PureLink® Genomic DNA Kits, EE. UU.).

2.2.3 Detección molecular de β -actina en muestras de sangre

Una vez completada la extracción de ADN de las muestras de sangre de caninos, se procede a realizar una PCR convencional para amplificar el gen de β -actina. Este gen es ampliamente utilizado como gen de referencia en estudios moleculares, ya que actúa como un control interno en las reacciones de PCR, asegurando que el sistema de amplificación funcione de manera óptima. En esta investigación, la elección de este gen está respaldada por investigaciones previas (Peleg et al., 2010), y su uso en este estudio se realizó siguiendo protocolos establecidos, como el descrito por Hopwood et al. (1999).

Esta PCR convencional usa primers específicos diseñados para la amplificación de un fragmento del gen que codifica para la β -actina. Además, la amplificación del gen se realiza utilizando la ADN polimerasa proporcionada por Promega; y se lleva a cabo en un volumen de reacción de 10 μ l que contenía 0.05 μ l de taq polimerasa Promega, 0.5 μ l de cada cebador, sentido y antisentido, 2.5 μ l de buffer verde de reacción Promega, 0.75 μ l de cloruro de magnesio ($MgCl_2$), 0.25 μ l de desoxirribonucleótidos, 1 μ l de ADN molde y 4.45 μ l de agua ultrapura para biología molecular. En caso del control negativo, no se añadió ADN molde. Las condiciones usadas en el termociclador para el proceso de amplificación, fueron las siguientes (ver Tabla 1):

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1X
Desnaturalización	95°C	30 seg	
Hibridación	45°C	50 seg	35X
Extensión	72°C	1 min/Kb	
Extensión final	72°C	5 min	1X

Tabla 1. Programa y condiciones del termociclador para la amplificación del gen β -actina en muestras de sangre de caninos

Por otra parte, la amplificación del gen β -actina también se utilizó para la práctica y entrenamiento en PCRs convencionales, basadas en el análisis de cinco folículos capilares distintos, sin poner en riesgo las muestras de sangre canina. Esta implementación al estudio no solo sirvió para garantizar la confiabilidad del sistema de PCR, sino también para desarrollar y perfeccionar las habilidades técnicas necesarias para ejecutar procedimientos de detección molecular, como la preparación y realización de PCR convencionales. Este proceso previo fue crucial para asegurar un dominio técnico adecuado antes de analizar las

muestras de sangre de los caninos. Además, trabajar inicialmente con este procedimiento, permitió minimizar errores técnicos en las etapas de amplificación, reduciendo el riesgo de obtener resultados falsos positivos o negativos en las muestras objetivo.

2.2.4 Detección molecular de *Babesia spp.*

Durante el desarrollo de la metodología, el procesamiento de las muestras se enfocó en la detección molecular de *Babesia*. Para ello, se llevó a cabo la amplificación de un fragmento específico del gen *18S ARNr*, con una longitud de 942 pb, lo que permitió confirmar la presencia de *Babesia spp.* en las muestras de sangre de los perros analizados.

El análisis por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la primera prueba y detección de *Babesia spp.* se realizó utilizando un kit comercial y optimizado disponible (AccuPower® Babesia, República de Corea). El kit AccuPower® Babesia PCR es capaz de detectar 17 especies del género *Babesia* en sangre de animales infectados con este hemoparásito, proporcionando una alta sensibilidad hasta el límite de detección de 10 copias de *Babesia ovate*. Este kit se empleó como herramienta para la primera prueba molecular y detección molecular de *Babesia* en muestras de sangre de perros.

El kit AccuPower® Babesia PCR se utilizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante para detectar un fragmento de 942 pb correspondiente al gen *18S ARNr* del hemoparásito. Cada tubo de reacción del kit contiene una mezcla liofilizada con los componentes esenciales para la PCR, como ADN polimerasa, dNTPs (desoxirribonucleótidos), secuencias de cebadores, buffer de reacción, cloruro de magnesio, y agentes estabilizantes y de liofilización (AccuPower® Babesia, República de Corea).

En este proceso, no se utilizó DEPC (agua de dietilpirocabonato), que actúa como estabilizador y ayuda a eliminar nucleasas como ARNasas, ya que los reactivos del kit están libres de estos contaminantes. Además, se tomaron precauciones en el manejo de las muestras y en el uso de condiciones controladas durante los experimentos. En contraste, para cada muestra se añadió 20 µl de agua ultrapura. En el caso del control negativo, solamente se añadió 20 µl de agua ultrapura a cada uno de los tubos de premix de PCR. Posteriormente, se añadió 2 µl del ADN de la muestra de sangre a cada tubo, y para el tubo de premix del control positivo, se incorporaron 2 µl de control positivo de ADN de *Babesia* diluido 1:10 (AccuPower® Babesia, República de Corea).

La detección molecular de *Babesia* spp. se lleva a cabo utilizando PCR convencional, enfocada en la presencia o ausencia de un fragmento de 942 pb que representa un segmento del gen *18S ARNr* (Gano et al., 2024). Este proceso de detección molecular identifica varias especies del género *Babesia*, y el procedimiento y su función se basan en el kit AccuPower® Babesia PCR de Bioneer, que es capaz de detectar hasta 17 especies de *Babesia*, incluyendo (*Babesia bennetti*, *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, *Babesia caballi*, *Babesia canis*, *Babesia crassa*, *Babesia conradae*, *Babesia divergens*, *Babesia gibsoni*, *Babesia lengau*, *Babesia major*, *Babesia matasi*, *Babesia occultans*, *Babesia odocoilei*, *Babesia ovata*, *Babesia ovis*, *Babesia rodhani*) (AccuPower® Babesia, República de Corea).

En esta PCR convencional, se utilizan primers diseñados para su región diana respectiva (BAB115-F y BAB115-R), descritos por Cho et al. (2016). Las secuencias de dichos primers se detallan en el kit AccuPower® Babesia PCR de Bioneer (Gano et al., 2024) (AccuPower® Babesia, República de Corea).

La detección molecular de *Babesia* spp. se realizó utilizando la polimerasa de ADN Taq Platinum® (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). La amplificación por PCR se llevó a cabo en un volumen de reacción de 10 µl, en donde se usaron los siguientes reactivos con concentraciones en específico: 0.45U de Taq Platinum ADN polimerasa, 0.4 µM de cada cebador sentido y antisentido, buffer de reacción a concentración 1X, 2 mM de cloruro de magnesio, 0.2 mM de desoxirribonucleótidos. Asimismo, el volumen de ADN molde fue de 1 µl y 6.5 µl de agua ultrapura para biología molecular. No se añadió ADN molde al tubo de control negativo. De manera similar, para el control positivo, se añadió 1 µl de ADN de muestras positivas o controles positivos para *Babesia* spp. incluidos en el kit AccuPower® Babesia PCR de Bioneer (AccuPower® Babesia, República de Corea). Las condiciones de termociclador para las reacciones de amplificación se muestran en la Tabla 2.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	2 min	1X
Desnaturalización	94°C	30 seg	
Hibridación	55°C	1 min	35X
Extensión	72°C	1 min/Kb	
Extensión final	72°C	5 min	1X

Tabla 2. Programa y condiciones del termociclador para la detección molecular de *Babesia* spp. a partir de PCRs

2.2.4.1.1 Electroforesis en gel de agarosa para visualizar los fragmentos de ADN de Babesia spp. amplificados

Se generaron aproximadamente 10 µl de amplicones. Los amplicones generados por la reacción en cadena de la polimerasa se visualizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% de grado molecular, debido al tamaño del fragmento de ADN de *Babesia* a

detectar (942 pb), la cuál es una concentración ideal para fragmentos de tamaño mediano. Se utilizaron 4 μ l de amplicón y 1 μ l de BlueJuice™ loading gel buffer (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). Las condiciones del proceso de corrida del gel se ajustaron a un lapso de tiempo de 50 minutos y a una tensión y voltaje correspondiente a 100V.

2.2.4.1.2 Ensayo de secuenciamiento de amplicones utilizando la tecnología Oxford Nanopore para identificar especies de Babesia

Las cinco muestras de sangre que resultaron positivas para la detección molecular de *Babesia* spp. fueron seleccionadas para procedimientos de secuenciación mediante Oxford Nanopore Technologies.

El proceso de secuenciación comienza con la preparación de bibliotecas, donde se acondicionan los extremos del ADN para facilitar la adhesión de adaptadores y códigos de barras (barcodes) correspondientes. Para este procedimiento se utilizaron los reactivos del kit "NEBNext Ultra II End Repair / dA-tailing". Cada tubo de PCR contenía 200 fmol de ADN por muestra, 1 μ l de control de ADN previamente diluido, 1.75 μ l de Buffer de Reacción Ultra II End-prep y 0.75 μ l del mix de enzimas Ultra II End-prep (Oxford Nanopore Technology, EE. UU.).

Tras la incubación de esta mezcla a 20 °C y 65 °C durante cinco minutos, los amplicones fueron purificados usando perlas magnéticas AMPure XP, las cuales se resuspendieron mediante vórtex. Se añadieron 15 μ l de perlas magnéticas AMPure XP a cada tubo con el mix de preparación de extremos de ADN y se incubaron a temperatura ambiente por cinco minutos. Después, los tubos fueron centrifugados para formar un pellet de perlas magnéticas,

el cual se colocó en un rack magnético para pipetear el sobrenadante (Oxford Nanopore Technology, EE. UU.).

Los beads se lavaron con 200 μ l de etanol al 80%, asegurándose de no perturbar el pellet, y se descartaron los residuos de etanol, conservando el pellet. Luego, los tubos se retiraron del rack magnético y el pellet fue resuspendido en 10 μ l de agua libre de nucleasas. Tras una breve centrifugación, se incubó por dos minutos a temperatura ambiente (Oxford Nanopore Technology, EE. UU.).

Es así que, las perlas magnéticas AMPure XP funcionan mediante un mecanismo de afinidad que permite separar fragmentos de ADN en función de su tamaño, logrando purificar el ADN y separarlo de códigos de barras no ligados, fragmentos de ADN cortos y otros reactivos que podrían interferir en pasos posteriores del proceso de secuenciación (Beckman Coulter, EE. UU.).

Los amplicones fueron cuantificados con el kit Qubit™ 1X dsDNA High Sensitivity Kit (Thermo Scientific, Invitrogen, EE. UU.). Posteriormente, para asegurar que todos los amplicones fueran secuenciados de manera uniforme y garantizar la calidad y precisión de los resultados, estas muestras se normalizaron a concentraciones de 20 ng/ μ l (Oxford Nanopore Technology, EE. UU.).

La preparación de la biblioteca se basó en el Oxford Nanopore Native Barcoding Kit 96 V14 (SQK-NBD114-96) y el Ligation Sequencing Kit LSK-109, que usa un enfoque basado en ligación para unir adaptadores específicos a los extremos de las moléculas de ácidos nucleicos, permitiendo que sean reconocidas por los poros de la plataforma de secuenciación.

Oxford Nanopore Native Barcoding Kit 96 V14 fue diseñado para etiquetar múltiples muestras con códigos de barras específicos, lo que posibilita una secuenciación simultánea. Por otra parte, el Ligation Barcoding Kit se utilizó para realizar un proceso de secuenciación múltiple en una sola celda de flujo, permitiendo analizar varias muestras a la vez.

Este kit asigna identificadores únicos, conocidos como códigos de barras moleculares, a cada una de las muestras positivas para *Babesia*. De esta manera, cada secuencia generada durante la secuenciación puede ser rastreada y asociada con su muestra de origen, asegurando una identificación precisa y eficiente dentro del mismo experimento (Oxford Nanopore Technology, EE. UU.). Finalmente, se colocaron 200 fmol, aproximadamente 11.5 µl de amplicón, en una celda de flujo FLO-MIN114 R.10 en el secuenciador GridION GXB04074.

Las lecturas generadas se procesaron con el software MinKNOW 24.02.16, el mismo que controla el dispositivo de secuenciación por nanoporos, recopilando datos de secuenciación en tiempo real (Oxford Nanopore Technology, EE. UU.).

Posteriormente, las secuencias demultiplexadas fueron analizadas con la herramienta Amplicon Sorter® (Oxford Nanopore Technology, EE. UU.), que es capaz de generar secuencias consenso, dependiendo de los parámetros especificados al inicio del análisis. El principio de la herramienta se basa en la clasificación y reorganización de los amplicones según su similitud y longitud con las secuencias de referencia. Considerando el tamaño del gen de interés utilizado para detectar *Babesia* spp., los parámetros utilizados para generar secuencias consenso en la familia Babesiidae fueron diferentes para cada barcode obtenido (Oxford Nanopore Technology, EE. UU.).

2.2.4.1.3 Uso de TABLET®, MEGA versión 11.0 para análisis de secuencias obtenidas

Usando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), las secuencias consenso generadas, se compararon con secuencias importadas a bases de datos como GenBank de NCBI (National Center for Biotechnology Information, 2016).

Se utilizó el software TABLET® (James Hutton Institute, 2021), que permite cargar datos generados por una plataforma de secuenciación (en formatos BAM o SAM) y visualizar cómo las secuencias obtenidas se alinean con un genoma de referencia de *Babesia canis canis*, en este caso. La plataforma TABLET® permite observar y analizar de manera más gráfica qué partes de las lecturas secuenciadas de los amplicones pueden alinearse y coincidir adecuadamente con el genoma de referencia de *Babesia*.

Las secuencias positivas para *Babesia* spp. con la presencia del fragmento del gen *18S ARNr* fueron comparadas y alineadas con secuencias obtenidas de la base de datos GenBank de NCBI. El alineamiento de secuencias se realizó utilizando el software MEGA versión 11.0 y la herramienta CLUSTAL W. La construcción del árbol filogenético y el análisis de distancia evolutiva se llevaron a cabo utilizando el algoritmo de Máxima Verosimilitud (ML), que describe un modelo de sustitución de nucleótidos y se considera un método muy preciso al tener en cuenta la probabilidad de mutaciones o anomalías en el modelo evolutivo.

2.3 RESULTADOS OBTENIDOS

2.3.1 PCR utilizando los cebadores específicos que amplifican un fragmento del 18S ARNr de *Babesia*

Un total de 363 muestras de sangre canina fueron analizadas utilizando el PCR para la detección de *Babesia* spp., específicamente mediante la amplificación de un fragmento de la

secuencia que codifica para el gen *18S ARNr*. De estas, 28 (7.70%) muestras mostraron una amplificación positiva para *Babesia* spp., indicando la presencia del fragmento de 942 pb perteneciente al gen *18S ARNr*. Entre ellos, el amplicon G079 es el que presenta la banda más clara de este fragmento, siendo una referencia adecuada de un amplicon positivo para *Babesia* spp. (ver Figura 1).

Por otra parte, los gels de electroforesis de algunas muestras posiblemente positivas revelan 2 bandas claras, una de ellas que presenta un tamaño de aproximadamente 1000 pb y la otra que presenta un tamaño de 500 pb, como se muestra en el amplicon 77 (ver Figura 1). Estas bandas podrían o no pertenecer a especies de *Babesia*, y es por esto que se decide analizar este factor en procedimientos posteriores.

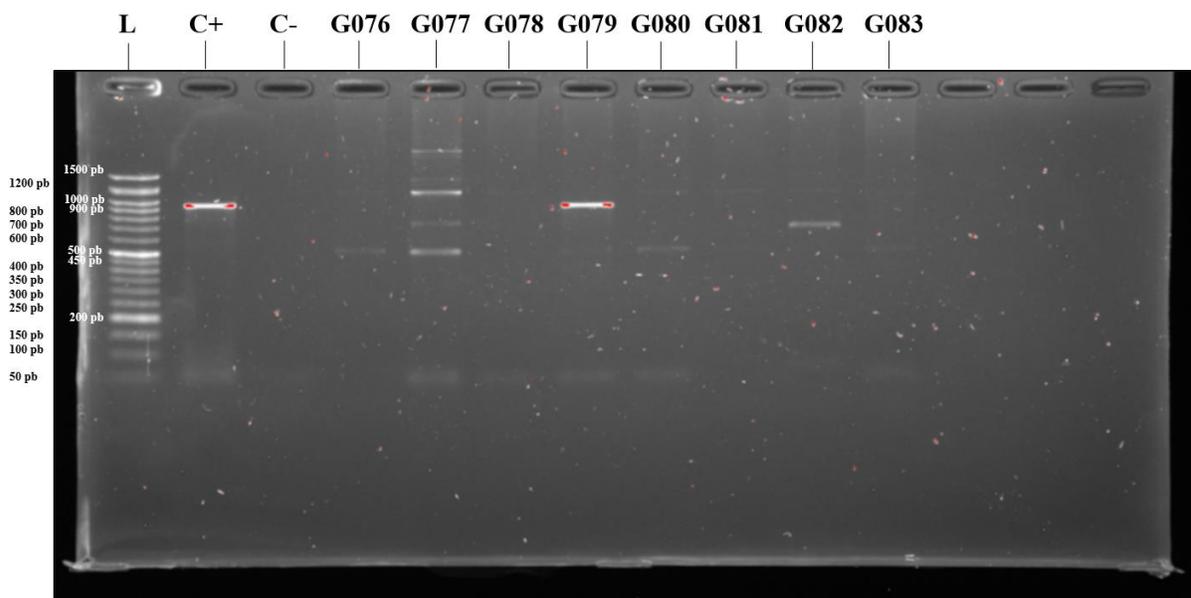


Figura 1. Gel de electroforesis 1 de PCR convencional para la detección molecular de *Babesia* spp. en muestras de sangre canina. El primer carril (L) representa el Ladder abm® de 100 pb. Se observa una banda de 942 pb en el carril control positivo (C+), correspondiente al fragmento del gen *18S ARNr*. El carril 76 tiene 2 bandas, en 500 y 1000 pb. El carril 77 tiene bandas de 500 pb, 600 pb y 1000 pb. El carril 79, perteneciente a

la muestra G079 refleja una banda clara, que representa el fragmento de 942 pb deseado. El carril 80 muestra bandas en 500 pb y 100 pb. Finalmente, el carril 82 refleja dos bandas, en 500 pb y 100 pb.

Posteriormente, las demás muestras que fueron consideradas positivas (V9C, V12, V15D, V15C, V8B, V9B, V9D, V13), reflejan algunas bandas de intensidad variable, lo que podría señalar diferencias en la concentración inicial de ADN o en la eficiencia de la amplificación (ver Fig. 2).

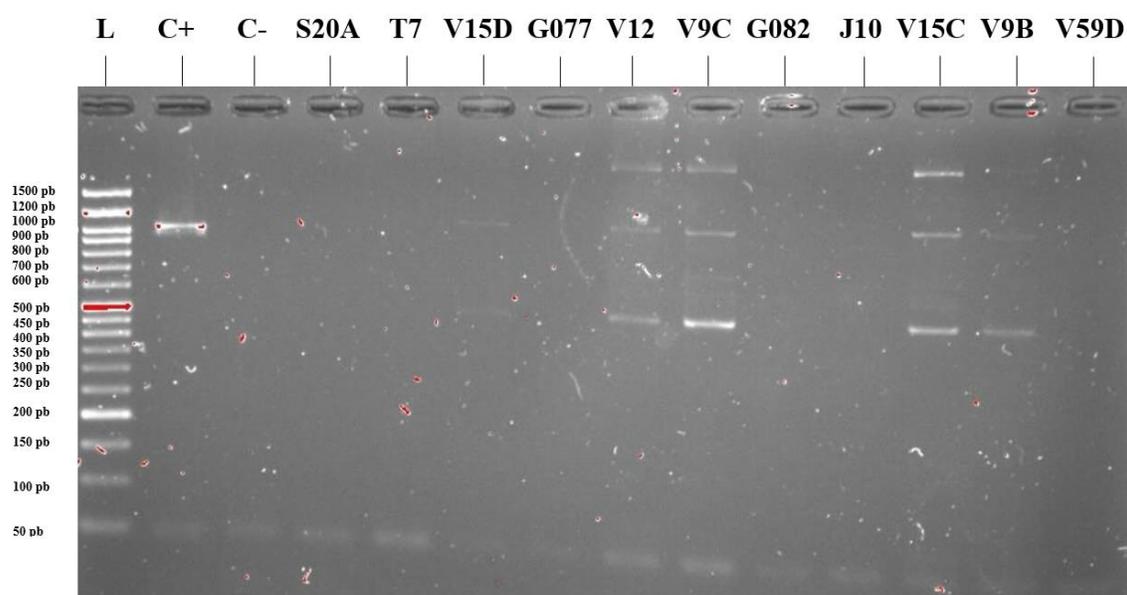


Figura 2. Gel de electroforesis 2 de PCR convencional para la detección molecular de *Babesia* spp. en muestras de sangre canina. El primer carril (L) representa el Ladder abm® de 100 pb. Se observa una banda de 942 pb en el carril control positivo (C+), correspondiente al fragmento del gen *18S ARNr*. Varias muestras presentan bandas en la posición esperada, indicando resultados positivos, mientras que el carril control negativo (C-) no muestra amplificación, confirmando ausencia de contaminación.

Otro grupo de muestras consideradas positivas, pertenecen a G095, G096 y G097, las cuáles amplifican una banda clara, justamente en el tamaño del gen *18S ARNr* deseado (ver Fig.3).

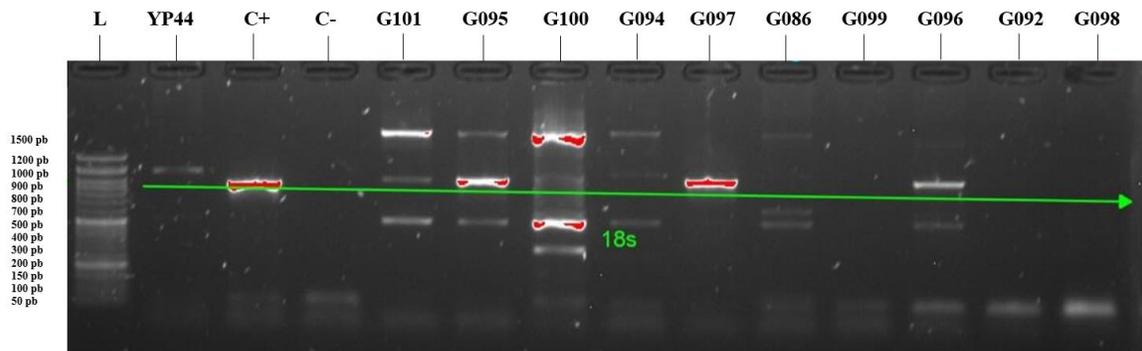


Figura 3. Gel de electroforesis 3 de PCR convencional para la detección molecular de *Babesia* spp. en muestras de sangre canina. El primer carril (L) representa el Ladder abm® de 100 pb. Se observa una banda de 942 pb en el carril control positivo (C+), correspondiente al fragmento del gen *18S ARNr*. El carril G095, que pertenece a la muestra G095 tiene una banda en 942 pb. El carril G097, que representa a la muestra G097 tiene una sola banda 942 pb. El carril G096, perteneciente a la muestra G096 refleja una banda clara, que representa el fragmento de 942 pb deseado. Mientras que el carril control negativo (C-) no muestra amplificación, confirmando ausencia de contaminación.

Adicionalmente, otro grupo de muestras positivas como S20A y V59 reflejan una banda muy tenue, con respecto al control positivo (C+) (Ver Fig 4. y Fig 5.).

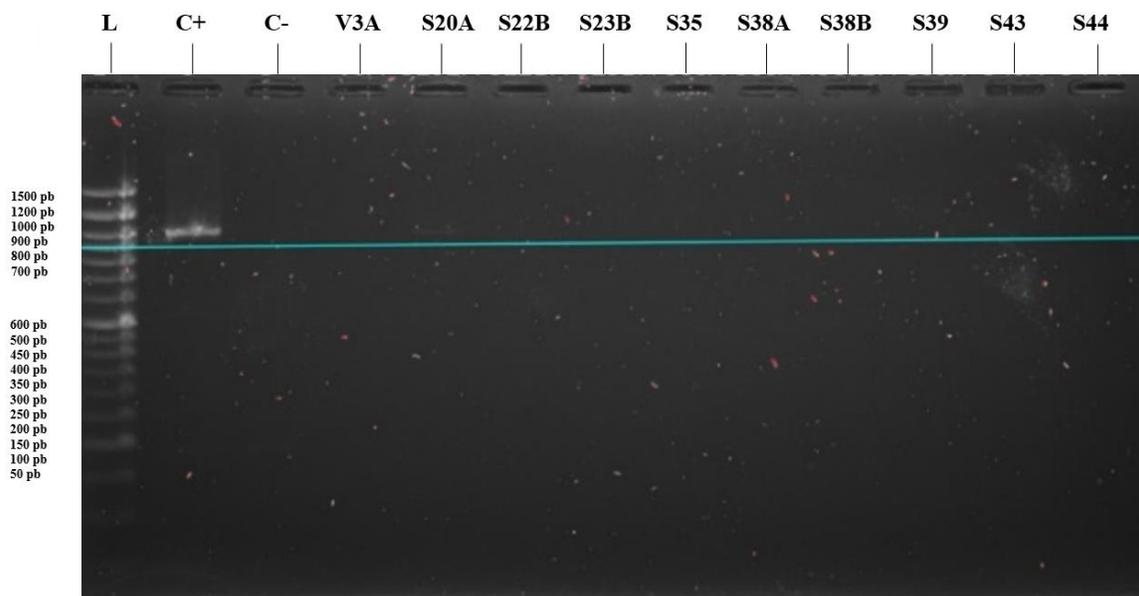


Figura 4. Gel de electroforesis 4 de PCR convencional para la detección molecular de *Babesia* spp. en muestras de sangre canina. A) El primer carril (L) representa el Ladder abm® de 100 pb. Se observa una banda de 942 pb en el carril control positivo (C+), correspondiente al fragmento del gen *18S ARNr*. El carril S20A, que pertenece a la muestra S20A tiene una banda en 942 pb muy tenue y casi indistinguible, pero que podría resultar positiva para *Babesia* spp.



Figura 5. Gel de electroforesis 5 de PCR convencional para la detección molecular de *Babesia* spp. en muestras de sangre canina. El primer carril (L) representa el Ladder abm® de 100 pb. Se observa una banda de 942 pb en el carril control positivo (C+), correspondiente al fragmento del gen *18S ARNr*. El carril V59 también muestra una banda muy tenue en el tamaño del fragmento del gen de interés. Mientras que el carril control negativo (C-) no muestra amplificación, confirmando ausencia de contaminación.

Finalmente, también se considera positiva la muestra T7A, que, a pesar de presentar bandas inespecíficas, refleja una banda clara en el tamaño del fragmento de *18S ARNr* deseado (ver Fig. 6).

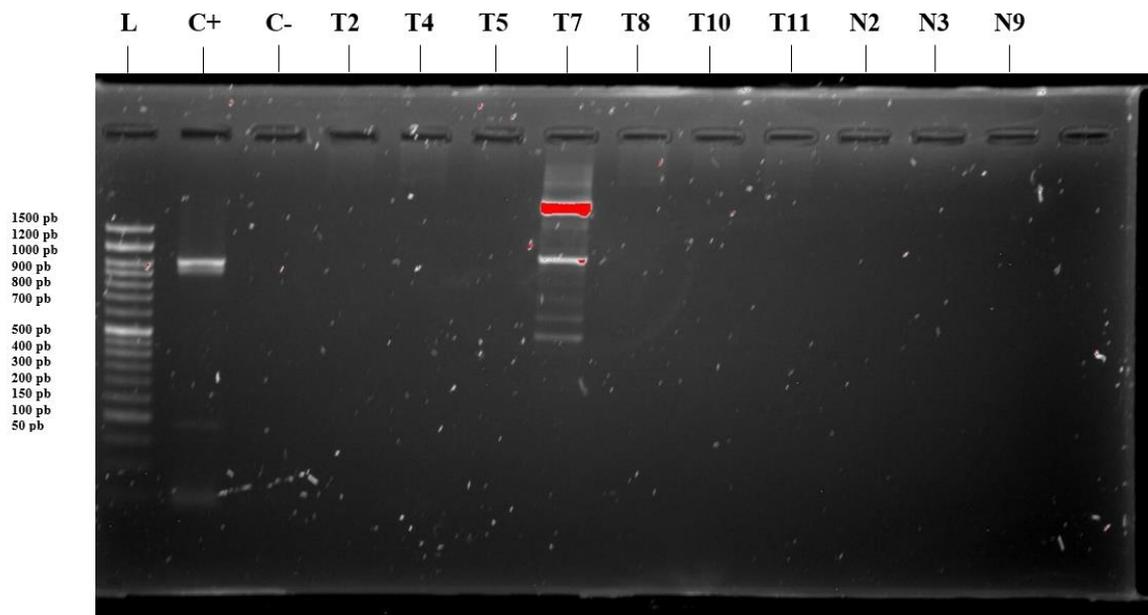
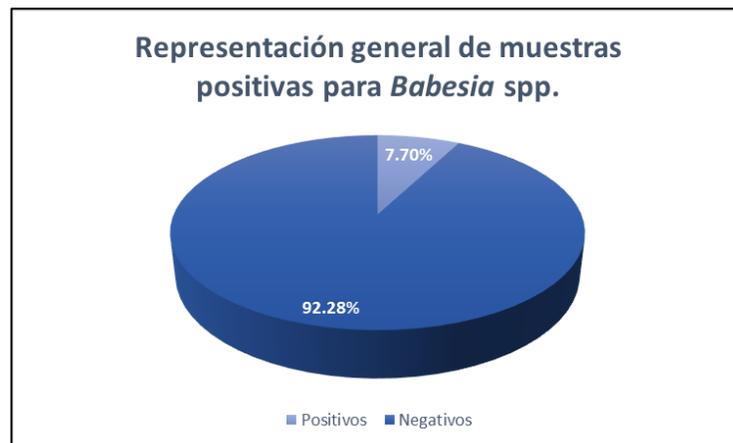


Figura 6. Gel de electroforesis 6 de PCR convencional para la detección molecular de *Babesia* spp. en muestras de sangre canina. El primer carril (L) representa el Ladder abm® de 100 pb. Se observa una banda de 942 pb en el carril control positivo (C+), correspondiente al fragmento del gen *18S ARNr*. El carril T7A, que pertenece a la muestra T7A tiene una banda en 942 pb muy clara y distinguible, a pesar de presentar más bandas inespecíficas. Mientras que el carril control negativo (C-) no muestra amplificación, confirmando ausencia de contaminación.



2.3.2 Ensayo de secuenciamiento de amplicones e identificación de *Babesia* spp.

De las 28 muestras catalogadas como positivas por técnicas de PCR, se secuenciaron amplicones de 5 muestras. Los amplicones obtenidos de las muestras G076, G077, G079, G080, G082, correspondientes a los barcodes 29, 30, 31, 32 y 33; fueron seleccionados por presentar bandas claras en el fragmento de 942 pb del gen *18S ARNr*. Debido a esto, fueron considerados óptimos para el proceso de secuenciamiento (ver Fig.1). De los cinco amplicones secuenciados, el amplicon G079 (barcode 31) es el único que generó una secuencia consenso, teniendo una similitud de 100% con *Babesia canis vogeli*, siendo positivo para *Babesia* spp. (ver Figura 7). Por el contrario, el resto de amplicones no representaban la presencia del hemoparásito.

2.3.2.1 Análisis de amplicones positivos en la herramienta Amplicon Sorter

La secuencia generada por el amplicón G079 fue capaz de generar una secuencia consenso, perteneciendo a la muestra G079. Este hecho fue analizado más a detalle con el Amplicon Sorter y su herramienta de histogramas. En los histogramas, el patrón de distribución de tamaños de fragmentos representa como se distribuyen las longitudes de las lecturas obtenidas en el experimento y permiten evaluar si las lecturas obtenidas corresponden a la longitud esperada. De esta manera se observa que en los barcodes 29, 30, 32 y 33 existe un número insuficiente de lecturas en el rango de tamaño de interés (900-1000 pb), es decir, la cantidad de reads obtenidos no alcanza la cobertura mínima necesaria para generar una secuencia consenso confiable. Cuando la cobertura es menor a 10x-15x e impide la corrección de errores y la reconstrucción precisa del fragmento, se genera un número insuficiente de lecturas (Oxford Nanopore Technologies, 2024). Por el contrario, una cobertura suficiente suele estar en el rango de 30x-50x, lo que permite la generación de una

secuencia consenso fiable (Oxford Nanopore Technologies, 2024) Debido a esta baja cobertura en los barcodes mencionados, no se generan secuencias consenso de los mismos (ver Figura 7).

A diferencia de otros barcodes, el barcode 31 mostró una distribución de tamaños de lecturas que favoreció la construcción de una secuencia consenso confiable. La cantidad y calidad de lecturas dentro del rango esperado permitió una reconstrucción precisa del fragmento de 942 pb del gen *18S ARNr*, minimizando el impacto de errores de secuenciación. En la Figura 8, se observa cómo la distribución de longitudes de lecturas en el barcode 31 difiere de los restantes, mostrando una mayor concentración en el intervalo adecuado.

Además, la distribución en color verde revela que una gran cantidad de lecturas corresponden a fragmentos menores a 1 kb, lo que puede representar un desafío en la generación del consenso. La predominancia de lecturas cortas en algunos barcodes podría explicar la dificultad en la reconstrucción de la secuencia.

Para complementar el análisis es necesario estudiar los valores de N50 de cada histograma. El N50 es una métrica utilizada en secuenciación para evaluar la calidad y distribución de las longitudes de lectura. En este caso, el valor N50 de 0.9 kb indica que al menos la mitad de las bases secuenciadas provienen de lecturas en el rango adecuado (942 pb), lo que favoreció la obtención de una secuencia consenso en el barcode 31; a diferencia de los demás barcodes que presentaron valores N50 de 0.6 kb, 0.5 kb y 0.1 kb.

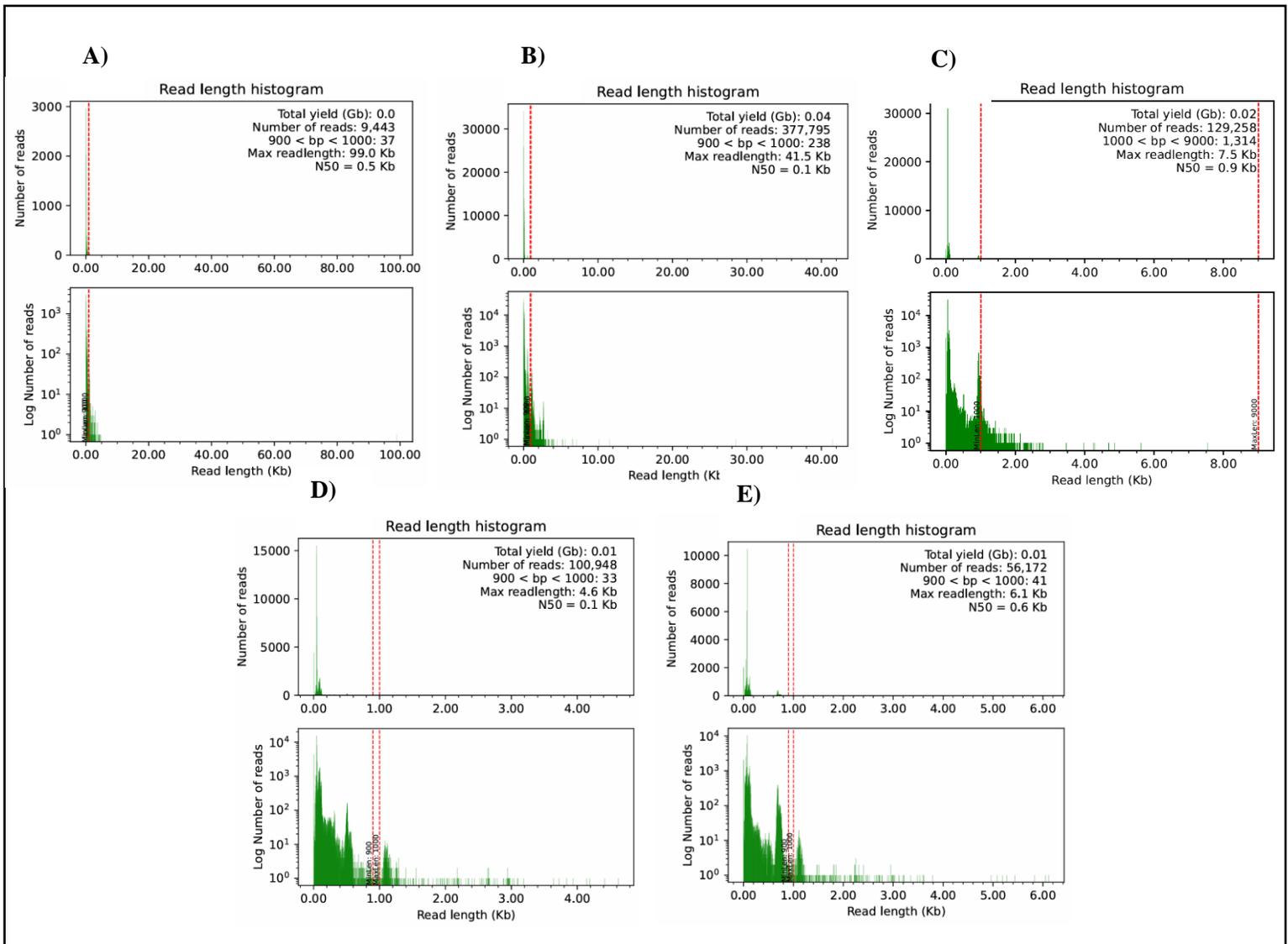


Figura 7. Generación de histogramas en muestras positivas para *Babesia* spp., mediante la herramienta Amplicon Sorter. El eje de las X del histograma al número de lecturas generado, y al logaritmo del número de lecturas generado. El eje de las Y la longitud de las lecturas, en kilobases. Cada histograma presenta parámetros como el número total de lecturas, el rango de tamaño del fragmento del gen en pb que se desea analiza, N50 o parámetro de calidad y la longitud máxima alcanzada por las lecturas generadas. Las frecuencias de color verde representan la frecuencia y número de lecturas que pertenecen al tamaño del fragmento del gen *18S ARNr* deseado. Las líneas de color rojo entrecortadas representan los parámetros de límites superior o

inferior establecidos en los requerimientos. A) Barcode 29, rango de tamaño 900-1000 pb B) Barcode 30, 900-1000 pb. C) Barcode 31, 1000-9000 pb. D) Barcode 32, 900-1000 pb. E) Barcode 33, 900-1000 pb.

En la muestra G076 (barcode 29), las amplificaciones revelaron dos bandas claras: la primera entre 900–1000 pb y la segunda en un rango de 400–600 pb. Se generaron 9443 lecturas en total, de las cuales 1976 lecturas correspondieron a la banda de 500 pb y solo 37 lecturas a la banda de 1000 pb. En ambos casos, el número de lecturas fue insuficiente para generar una secuencia consenso, lo que indica que la muestra G076 no resultó positiva para *Babesia* spp. Al no contar con una secuencia consenso, se realizó un análisis individual de las lecturas, en el que se aclaró que la banda de aproximadamente 1000 pb pertenecía ADN del hospedero, organismo *Canis familiaris* (ver Fig. 8). En cambio, las bandas de 500 pb fueron producto de una contaminación y se identificaron como *Leptospira interrogans*.

A)

B)

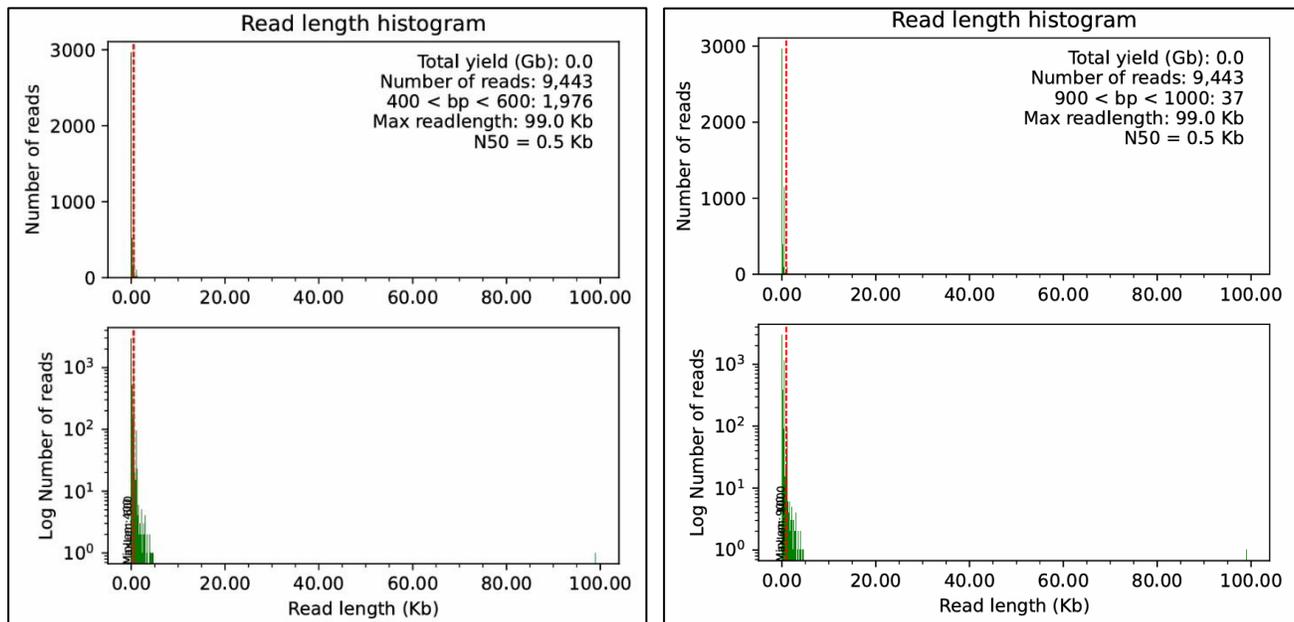


Figura 8. Generación de histogramas a partir de Amplicon Sorter, Barcode 29. A) Barcode 29, rango de tamaño 400-600 pb. B) Barcode 29, 900-1000 pb

En la muestra G077 (barcode 30), se observaron las mismas dos bandas. Se obtuvieron 377 795 lecturas en total, de las cuales 13 633 lecturas correspondieron a la banda de 500 pb. En este caso, se generó una secuencia consenso óptima para el análisis, y al utilizar la herramienta BLAST del NCBI, los resultados apuntaron a *Leptospira* spp. Esto sugiere una contaminación en la herramienta de secuenciación o en la Flow cell utilizado durante el procedimiento (ver Fig 9). En cambio, en el rango de 900-1000 pb se obtuvieron 37 lecturas que pertenecieron a ADN del hospedero, organismo *Canis familiaris*.

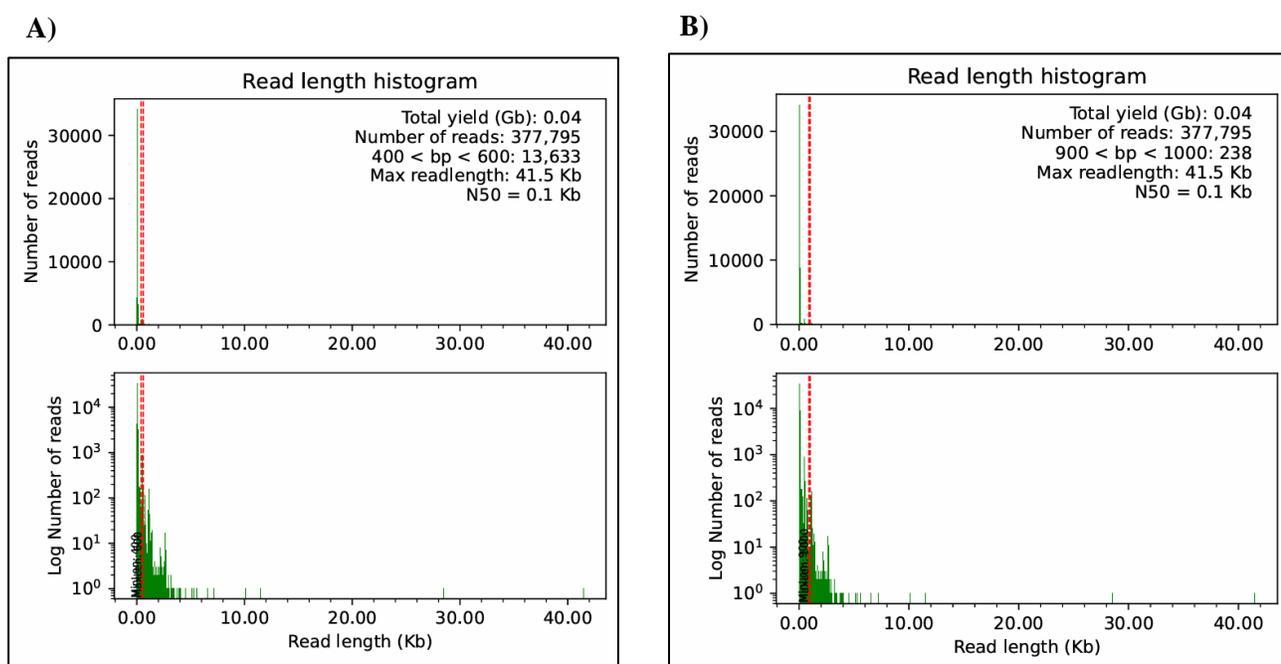


Figura 9. Generación de histogramas a partir de Amplicon Sorter, Barcode 30. A) Barcode 30, rango de tamaño 400-600 pb. B) Barcode 30, 900-1000 pb.

En la muestra G080 (barcode 32), las bandas observadas coincidieron con los rangos previamente mencionados. Se generaron 100 948 lecturas en total, con 2573 lecturas correspondientes a la banda de 500 pb y 33 lecturas a la banda de 1000 pb. Para la banda de

500 pb, la herramienta Amplicon Sorter logró generar una secuencia consenso que, tras un análisis con BLAST del NCBI, también indicó contaminación por *Leptospira interrogans*. Por otro lado, para la banda de aproximadamente 1000 pb se logró identificar como ADN del hospedero, siendo este *Canis familiaris* (ver Fig 10.).

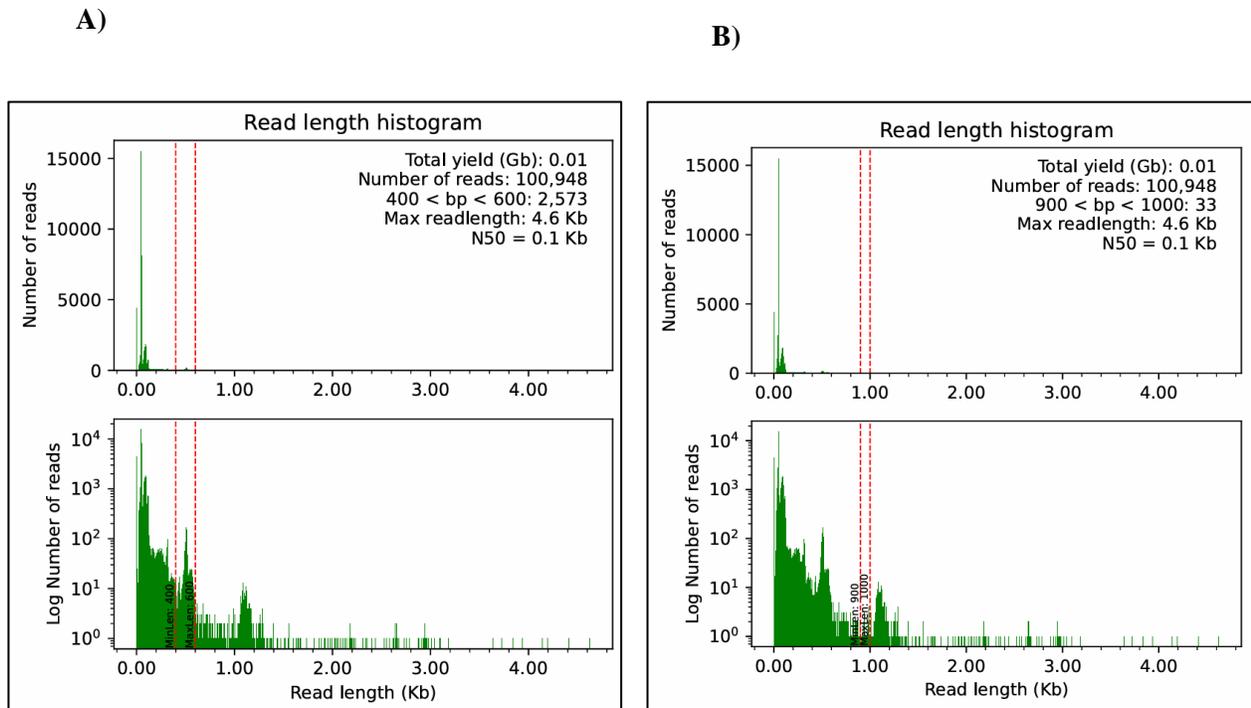


Figura 10. Generación de histogramas a partir de Amplicon Sorter, Barcode 32. A) Barcode 32, rango de tamaño 400-600 pb. B) Barcode 32, 900-1000 pb.

Por último, en la muestra G082 (barcode 33), se identificaron dos bandas de tamaños diferentes: una alrededor de 1000 pb y otra en un rango de 600–700 pb. Se generaron 56 172 lecturas, de las cuales 41 lecturas correspondieron a la banda de 1000 pb y 453 lecturas a la banda de 600 pb. Al igual que en la muestra G076, el número de lecturas no fue suficiente para generar una secuencia consenso, lo que indica que la muestra G082 no resultó positiva para *Babesia* spp. (Ver Fig 11). De igual manera que en el resto de muestras, la banda de 500

pb se identificó como contaminación por *Leptospira interrogans*, mientras que la banda de 1000 pb se identificó como ADN del hospedero, *Canis familiaris*.

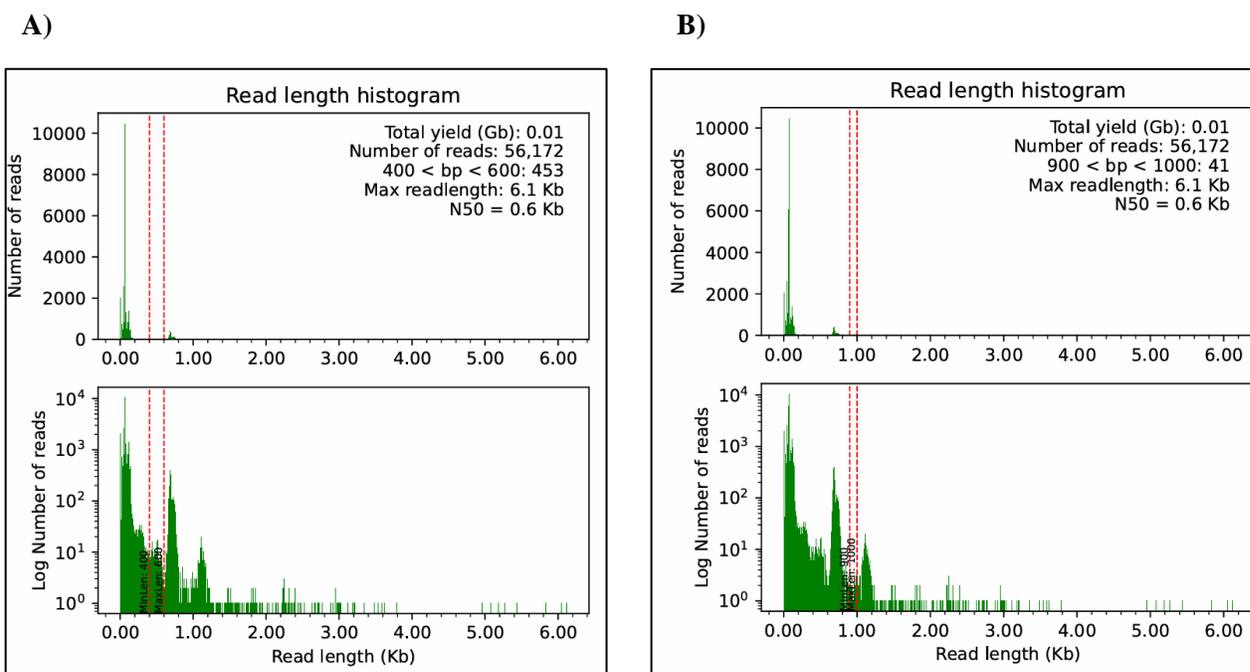


Figura 11. Generación de histogramas a partir de Amplicon Sorter, Barcode 33. A) Barcode 33, rango de tamaño 400-600 pb. B) Barcode 33, 900-1000 pb.

2.3.2.2 Software Tablet Viewer ®

Para el análisis de los alineamientos de las secuencias obtenidas se utilizó el software Tablet Viewer® (James Hutton Institute, 2021), que es una herramienta de visualización altamente gráfica diseñada para explorar datos genómicos y transcriptómicos, y analizar ensamblajes y alineamientos basados en secuenciación de próxima generación. Este software fue usado con el propósito específico de verificar si los fragmentos obtenidos para cada barcode, con un tamaño dentro del rango esperado de 942 pb, que corresponde al gen de interés utilizado para la detección de *Babesia*, efectivamente coincidían con secuencias de *Babesia* spp.

Por secuenciamiento y análisis de las secuencias con BLAST® se puede observar que todos los amplicones analizados, excepto uno, pertenecen a un microorganismo totalmente diferente.

A)

Leptospira interrogans strain Salinem chromosome I, complete sequence
 Sequence ID: [CP130644.1](#) Length: 4391151 Number of Matches: 1

Range 1: 3558441 to 3558851 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
760 bits(411)	0.0	411/411(100%)	0/411(0%)	Plus/Plus
Query 25	TAGAAGAGAAGTTCCACC	GAATGTATAAACCAAAGATCCACCGCCGGAATTAGAGCTCAA		84
Sbjct 3558441	TAGAAGAGAAGTTCCACC	GAATGTATAAACCAAAGATCCACCGCCGGAATTAGAGCTCAA		3558500
Query 85	ATCTAAGAATTTTATAATA	AATAAAGGTGCTAATGCCAAACCTGCAAGAAACATAGCTCC		144
Sbjct 3558501	ATCTAAGAATTTTATAATA	AATAAAGGTGCTAATGCCAAACCTGCAAGAAACATAGCTCC		3558560
Query 145	GGGAAGAGTGATTCTATT	TAACACTTTTTCAATGTATCTTTTGTGTGAGAACC	CGGACG	204
Sbjct 3558561	GGGAAGAGTGATTCTATT	TAACACTTTTTCAATGTATCTTTTGTGTGAGAACC	CGGACG	3558620
Query 205	AATTCTGGAATGAACCCAC	CGTATTTTTCAAATCTCAGCCAATCTGCAGGATTAAA		264
Sbjct 3558621	AATTCTGGAATGAACCCAC	CGTATTTTTCAAATCTCAGCCAATCTGCAGGATTAAA		3558680
Query 265	CTGAATCGCTGTATAAAA	GTAAAGCAAAAGATCAATTAAGCGGTATAAATACGAAATA		324
Sbjct 3558681	CTGAATCGCTGTATAAAA	GTAAAGCAAAAGATCAATTAAGCGGTATAAATACGAAATA		3558740
Query 325	AAATAACGCATGATACAA	ATCTGAGAGAATGGATTAAAAAATCCATAACTACTGCCCA		384
Sbjct 3558741	AAATAACGCATGATACAA	ATCTGAGAGAATGGATTAAAAAATCCATAACTACTGCCCA		3558800
Query 385	TCCAGCCCATCTTGACTAC	TATTAGATAACCATGGAATAATCGTCTGAGG		435
Sbjct 3558801	TCCAGCCCATCTTGACTAC	TATTAGATAACCATGGAATAATCGTCTGAGG		3558851

B)

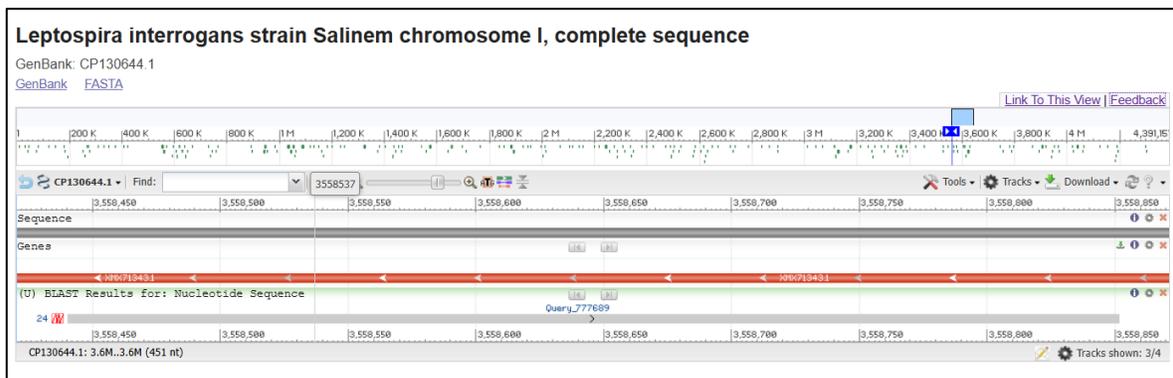


Figura 12. Resultados del BLAST con las secuencias consenso generadas con el fragmento 500 pb en la muestra G077. A) La secuencia mostró una identidad del 100% (411/411 pb) sin gaps con el cromosoma I completo de *Leptospira interrogans* cepa Salinem (Accession ID: CP130644.1). El alineamiento presenta un E-value de 0.0, indicando una coincidencia altamente significativa. Estos resultados sugieren la presencia de contaminación con *Leptospira interrogans* en la muestra, en lugar de la detección esperada de *Babesia* spp. B) Visualización del alineamiento de BLASTn de la secuencia consenso generada a partir del fragmento de 500 pb en la muestra G077 contra el cromosoma I completo de *Leptospira interrogans* cepa Salinem (Accession

ID: CP130644.1). La región alineada está representada en color rojo, indicando una coincidencia exacta dentro de la secuencia de referencia. La ubicación del alineamiento se encuentra entre las posiciones 3,558,658 - 3,558,851 en el genoma de *Leptospira interrogans*. Estos resultados confirman que la secuencia analizada corresponde a *Leptospira interrogans*, sugiriendo contaminación en la muestra o una amplificación inespecífica en la PCR, en lugar de la detección esperada de *Babesia* spp.

A)

Leptospira interrogans strain 16414.47 preprotein translocase subunit SecY (secY) gene, partial cds
 Sequence ID: [KY357064.1](#) Length: 528 Number of Matches: 1
[See 1 more title\(s\)](#) [See all Identical Proteins\(IPG\)](#)

Range 1: 24 to 429 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
739 bits(400)	0.0	405/407(99%)	1/407(0%)	Plus/Minus
Query 4	AGAAGTTCACCGAATGTATAAACCAAGATCCACCGCGGAATTAGAGCTCAAACTAA	63		
Sbjct 429	AGAAGTTCACCGAATGTATAAACCAAGATCCACCGCGGAATTAGAGCTCAAACTAA	370		
Query 64	GAATTTTATAAATAAAGTGCTAATGCCAAACCTGCAAGAACATAGCTCCGGGAAG	123		
Sbjct 369	GAATTTTATAAATAAAGTGCTAATGCCAAACCTGCAAGAACATAGCTCCGGGAAG	310		
Query 124	AGTGATTCTATTTAACACTTTTTCAATGATTCTTTTTGTGTGAGAACCCGGACGAATTC	183		
Sbjct 309	AGTGATTCTATTTAACACTTTTTCAATGATTCTTTTT-GTGTGAGAACCCGGACGAATTC	251		
Query 184	CTGGAATGAACCCACCGTATTTTTCAAATCTCAGCCAATTCGAGGATTAAC TGAA	243		
Sbjct 250	CTGGAATGAACCCACCGTATTTTTCAAATCTCAGCCAATTCGAGGATTAAC TGAA	191		
Query 244	TCGCTGTATAAAAAGTAAGCAAAGAAATACAAATTAAGCGGTATAAAATACGAAATAAAAA	303		
Sbjct 190	TCGCTGTATAAAAAGTAAGCAAAGAAATACAAATTAAGCGGTATAAAATACGAAATAAAAA	131		
Query 304	ACGCATGATACCAAATCTGAGAGAATGGATTAAAAAAAAA TCCATAATCACTGCCATCCAG	363		
Sbjct 130	ACGCATGATACCAAATCTGAGAGAATGGATTAAAAAAAAA TCCATAATCACTGCCATCCAG	71		
Query 364	CCCATTCTTGACTACTATTAGATAACCATTTGAATAATCGTCTGAGGA 410			
Sbjct 70	CCCATTCTTGACTACTATTAGATAACCATTTGAATAATCGTCTGAGGA 24			

B)

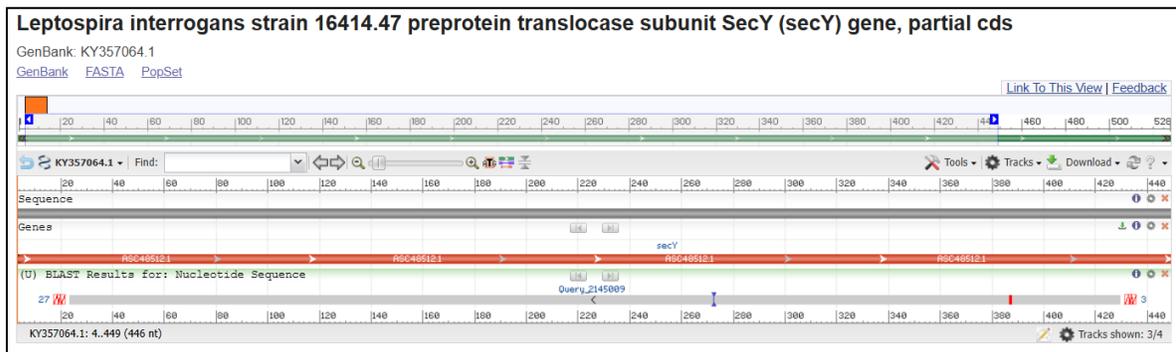


Figura 13. Resultados del BLAST con las secuencias consenso generadas con el fragmento 500 pb muestra G080. A) Alineamiento de BLASTn de la secuencia consenso generada a partir del fragmento de 500 pb en la muestra G080 contra el gen *SecY* (proprotein translocase subunit SecY), parcialmente completo, de *Leptospira interrogans* cepa 16414.47 (Accession ID: KY357064.1). El alineamiento muestra una coincidencia del 99% (405/407) con la secuencia de referencia, con una longitud total de 528 pb. El E-value de 0.0 y la identidad de secuencia del 99% indican una alta especificidad en la comparación, lo que confirma que el fragmento

Canis familiaris, lo que podría indicar la presencia de ADN del hospedero en los fragmentos analizados. B)

Visualización del alineamiento de BLASTn de la secuencia consenso generada a partir del fragmento de 1000 pb en la muestra G076 y G082 con la secuencia completa de *Canis familiaris* (Accession ID: AC205952.8). El alineamiento muestra una coincidencia del 94% (1065/1131) con la secuencia de referencia, representada en color gris en la parte inferior, que abarca el fragmento secuenciado.

A)

Babesia vogeli gene for 18S ribosomal RNA, partial sequence, clone: MoM19
Sequence ID: [LC331058.1](#) Length: 1429 Number of Matches: 1

Range 1: 137 to 1082 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1748 bits(946)	0.0	946/946(100%)	0/946(0%)	Plus/Minus
Query 1	TCACCTCCACCACTAAGAACGGCCATGCACCACCACCAAGAAATCAAGAAGAGCTATC	60		
Sbjct 1082	TCACCTCCACCACTAAGAACGGCCATGCACCACCACCAAGAAATCAAGAAGAGCTATC	1023		
Query 61	AATCTGTCAATCTACCGTTTGTCTGGACCTGGTGAGTTCCCGTGTGAGTCAAAATTA	120		
Sbjct 1022	AATCTGTCAATCTACCGTTTGTCTGGACCTGGTGAGTTCCCGTGTGAGTCAAAATTA	963		
Query 121	AGCCGAGGCTCACGCCCTGGTGGCCCTTCGCTCAATTCCTTAAGTTTCAGCCTTGC	180		
Sbjct 962	AGCCGAGGCTCACGCCCTGGTGGCCCTTCGCTCAATTCCTTAAGTTTCAGCCTTGC	903		
Query 181	GACCACTACCCCCAGAACCCAAAGACTTTGATTTCTCAAGTCTTGAAGGGGTGAG	240		
Sbjct 982	GACCACTACCCCCAGAACCCAAAGACTTTGATTTCTCAAGTCTTGAAGGGGTGAG	843		
Query 241	CAAAACGACGACCTCCAATCACTAGTCGGCATGGTTATGGTTAGGACTACGCGGTATC	300		
Sbjct 842	CAAAACGACGACCTCCAATCACTAGTCGGCATGGTTATGGTTAGGACTACGCGGTATC	783		
Query 301	TGATGCTTTCGATCCCCAATCTTCTGCTTGGTAAATGGAAAGCTCTTGGCAATGC	360		
Sbjct 782	TGATGCTTTCGATCCCCAATCTTCTGCTTGGTAAATGGAAAGCTCTTGGCAATGC	723		
Query 361	TTTCGGAGTAGTCGCTTTTAAACAATCTAAGAATTTCACTCTGACAGTAAATACGAA	420		
Sbjct 722	TTTCGGAGTAGTCGCTTTTAAACAATCTAAGAATTTCACTCTGACAGTAAATACGAA	663		
Query 421	TGCCCCCAACCGTCTTAAACCAATTAAGGTTCAATAACCAACAAATAGAACCAA	480		
Sbjct 662	TGCCCCCAACCGTCTTAAACCAATTAAGGTTCAATAACCAACAAATAGAACCAA	603		
Query 481	AGTCTACTCTATTATTCATGCTGAGTATTCAAGCAAAAAGTCTGCTGAAACACTCT	540		
Sbjct 602	AGTCTACTCTATTATTCATGCTGAGTATTCAAGCAAAAAGTCTGCTGAAACACTCT	543		
Query 541	AATTTTCTCAAGTAAAAAGGAAAAACCAAAAGCAACTCGAAAAAGCAAAAGTGG	600		
Sbjct 542	AATTTTCTCAAGTAAAAAGGAAAAACCAAAAGCAACTCGAAAAAGCAAAAGTGG	483		
Query 601	caaaactcgaacaggctaaaattcaactacgagcttttttaactgcaacaagttaaataac	660		
Sbjct 482	caaaactcgaacaggctaaaattcaactacgagcttttttaactgcaacaagttaaataac	423		
Query 661	GCATTGGAGCTGGAATACCGGGCTGCTGGCACGACTTGCCTTCAATGCTACTCT	720		
Sbjct 422	GCATTGGAGCTGGAATACCGGGCTGCTGGCACGACTTGCCTTCAATGCTACTCT	363		
Query 721	TGGTGGGGTTGGGTCAACCATTCATCAATTACAGACATTAGCCCTGTATTGATTT	780		
Sbjct 362	TGGTGGGGTTGGGTCAACCATTCATCAATTACAGACATTAGCCCTGTATTGATTT	303		
Query 781	CTGTCACTACCTCCCTGTGTCAGGATGGGTAATTTGCGCGCTGCTGCCCTCCTTAGA	840		
Sbjct 302	CTGTCACTACCTCCCTGTGTCAGGATGGGTAATTTGCGCGCTGCTGCCCTCCTTAGA	243		
Query 841	TGTGGTAGCGTCTCTCAGGCTCCCTCCGGAATCGAACCTAATCCCGGTTACCGGT	900		
Sbjct 242	TGTGGTAGCGTCTCTCAGGCTCCCTCCGGAATCGAACCTAATCCCGGTTACCGGT	183		
Query 901	TGCTGCTCGGTAGGCCAATACCTACCGTCAAGCTGATGGGTCAG 946			
Sbjct 182	TGCTGCTCGGTAGGCCAATACCTACCGTCAAGCTGATGGGTCAG 137			

B)

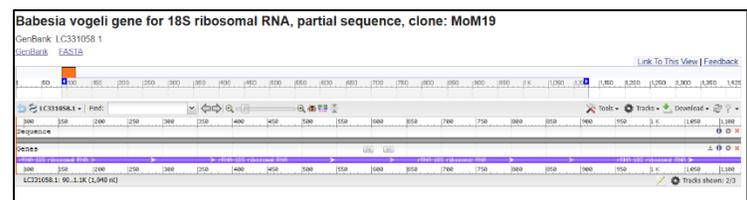


Figura 15. Resultados del BLAST con las secuencias consenso generadas en la muestra G079. A)

Alineamiento de BLASTn de las secuencias consenso generadas a partir de los reads de 946 pb en la muestra G079 con la secuencia *Babesia vogeli* gene for 18S ribosomal RNA, partial sequence, clone: MoM19 (Accession ID: LC331058). El alineamiento muestra una coincidencia del 100% (946/946) entre las secuencias consultadas (query) y la secuencia de referencia *Babesia vogeli*, con un E-value de 0.0, lo que indica una coincidencia significativa y absoluta, tratándose del patógeno *Babesia canis vogeli*. B) Visualización del alineamiento de BLASTn de la secuencia consenso generada a partir del fragmento de 946 pb en la muestra G079 con la

secuencia *Babesia vogeli* gene for *18S ribosomal RNA*, partial sequence, clone: MoM19 (Accession ID: LC331058).

Sin embargo, se usa el software Tablet Viewer® (James Hutton Institute, 2021), para verificar si los amplicones obtenidos de las muestras corresponden al género *Babesia* spp. Consecuentemente, un software como Tablet Viewer® (James Hutton Institute, 2021) requiere de una secuencia de referencia del organismo analizado, en este caso la secuencia de referencia pertenece a un aislado del fragmento del *18S ARNr* de *Babesia vogeli* (*Babesia canis vogeli* isolate RO/FMVB/B/9 *18S ribosomal RNA* gene) (Accession ID: HQ662635.1).

Todos los amplicones secuenciados, a excepción de uno, muestran un bajo número de lecturas coincidentes con el genoma de referencia. Por otro lado, los alineamientos de las lecturas respecto al genoma de referencia se muestran similares, sin embargo, algunas de ellas se alinean fuera de la región más frecuente.

El amplicon G076, barcode 29, presenta nueve lecturas mayormente coincidentes con el genoma de referencia *Babesia canis vogeli* isolate RO/FMVB/B/9 *18S ribosomal RNA* gene, con un porcentaje de 4.9% de mismatches, entre ellos deleciones, sustituciones e inserciones de bases. En cambio, para G077, barcode 30, no se genera ninguna lectura que se alinee o tenga similitud con el genoma de referencia usado. En el caso del amplicón G080, barcode 32, se generan 12 lecturas, con un porcentaje de mismatches del 6.7% en donde se presentan sustituciones e inserciones de bases. Por último, el amplicón G082, barcode 33, genera 6 lecturas coincidentes con el genoma de referencia y presenta un porcentaje de 6.2% de mismatches entre sustituciones e inserciones de bases. En conclusión, los amplicones G076, G077, G079, G080 y G082 presentan un porcentaje alto de mismatches entre las secuencias

analizadas con respecto al genoma de referencia *Babesia canis vogeli* isolate RO/FMVB/B/9 *18S ribosomal RNA* gene.

Mientras que, el análisis del amplicón G079 correspondiente al barcode 31 mostró resultados prometedores con respecto a la identificación de *Babesia* spp. Se analizan un total de 2016 lecturas, y al realizar la comparación de esta secuencia con la referencia del gen *18S ARNr* de *Babesia* spp, se observó que el barcode presentó solo un 2% de mismatches, en donde se observaron deleciones, inserciones y sustituciones (ver Fig. 17). Consecuentemente, se generó una cantidad significativa de lecturas que se alinearon correctamente con el fragmento objetivo (ver Fig. 16).

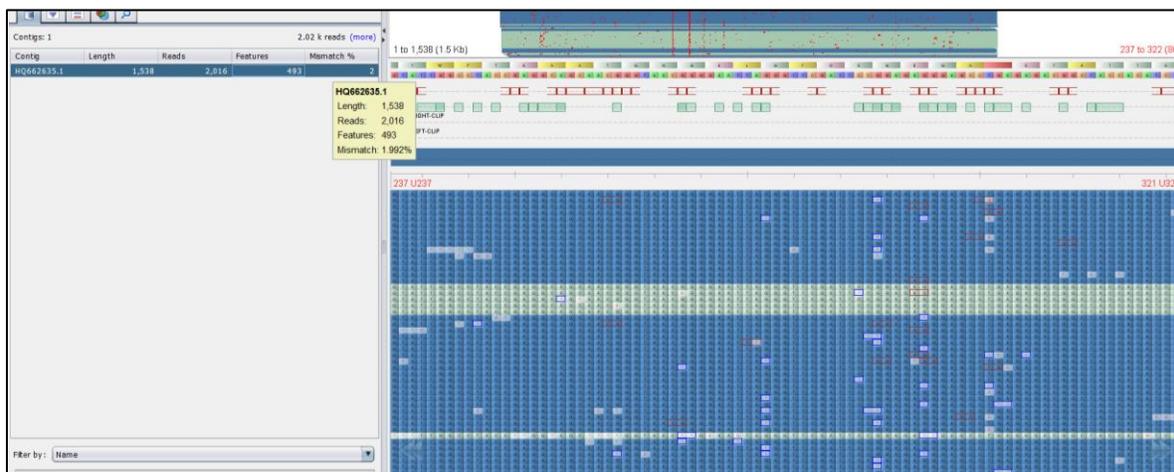


Figura 16. Interfaz de TABLET Viewer Genome® para el barcode 31. El sombreado más oscuro de color azul, sobre las lecturas rastrea todas las lecturas en la misma posición de nucleótido que se desea analizar. La lectura que se encuentra directamente debajo del mouse se resalta y se resume en la información sobre herramientas, junto con una representación gráfica de su secuencia. La figura muestra un análisis de similitudes y generación de mismatches entre la secuencia de referencia y la secuencia de interés (barcode 31).

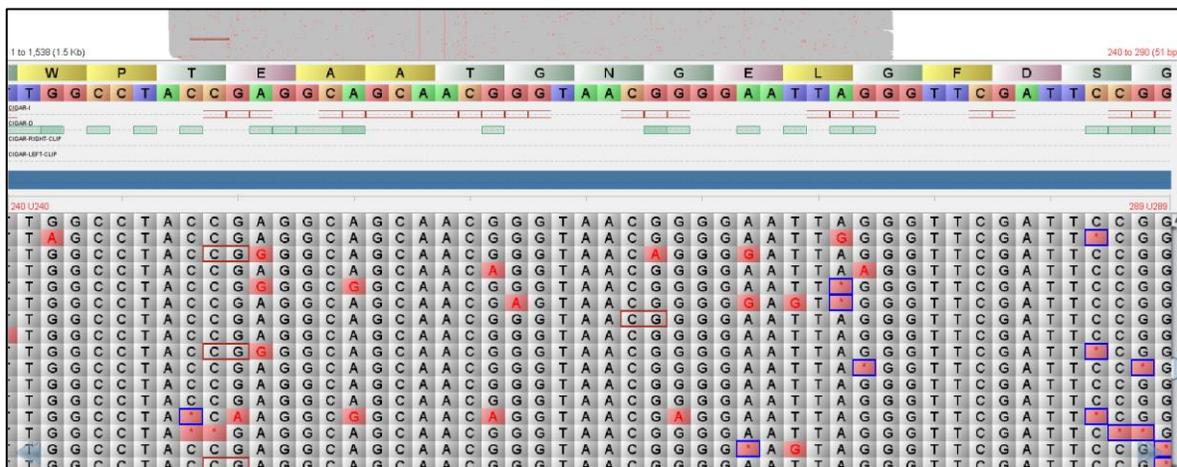


Figura 17. Visualización de mismatches muestra G079 barcode 31 Tablet Viewer Genome®. Representación de variantes entre las lecturas generadas del barcode 31 y el genoma de referencia *Babesia canis vogeli* isolate RO/FMVB/B/9 *18S ribosomal RNA gene*. Los recuadros de color rojo representan deleciones o diferencias importantes respecto a la referencia. Los recuadros azules representan sustituciones de bases. Las letras marcadas con color rojo también muestran sustituciones y se usan para remarcar las bases que son diferentes con el genoma de referencia. Y finalmente los asteriscos rojos muestran inserciones de bases. En general, la muestra G079 tiene un 2% de mismatches respecto al genoma de referencia *Babesia canis vogeli* isolate RO/FMVB/B/9 *18S ribosomal RNA gene*.

2.3.2.3 Verificación de la identificación de la especie de *Babesia* encontrada en la muestra G079 mediante la construcción de un cladograma.

Para verificar la identificación de la secuencia encontrada se construyó un cladograma. utilizando el el software MEGA 11.0, que presenta las relaciones evolutivas entre la secuencia de la muestra G079 y otras secuencias del fragmento del gen *18S ARNr* de *Babesia vogeli*, previamente publicadas y pertenecientes a diversos estudios. Para la generación del cladograma, se usó el fragmento de 942 pb del gen *18S ARNr* de la muestra G079 y otras 27 secuencias descargadas de NCBI. Consecuentemente, se observa que la muestra G079 identificada como *Babesia* está ubicada dentro de un clado bien definido correspondiente a

Babesia vogeli . (ver Fig. 19 y Fig. 20). En MEGA 11.0, el algoritmo usado para generar este cladograma se basa en el algoritmo del modelo estadístico Maximum Likelihood (ML).

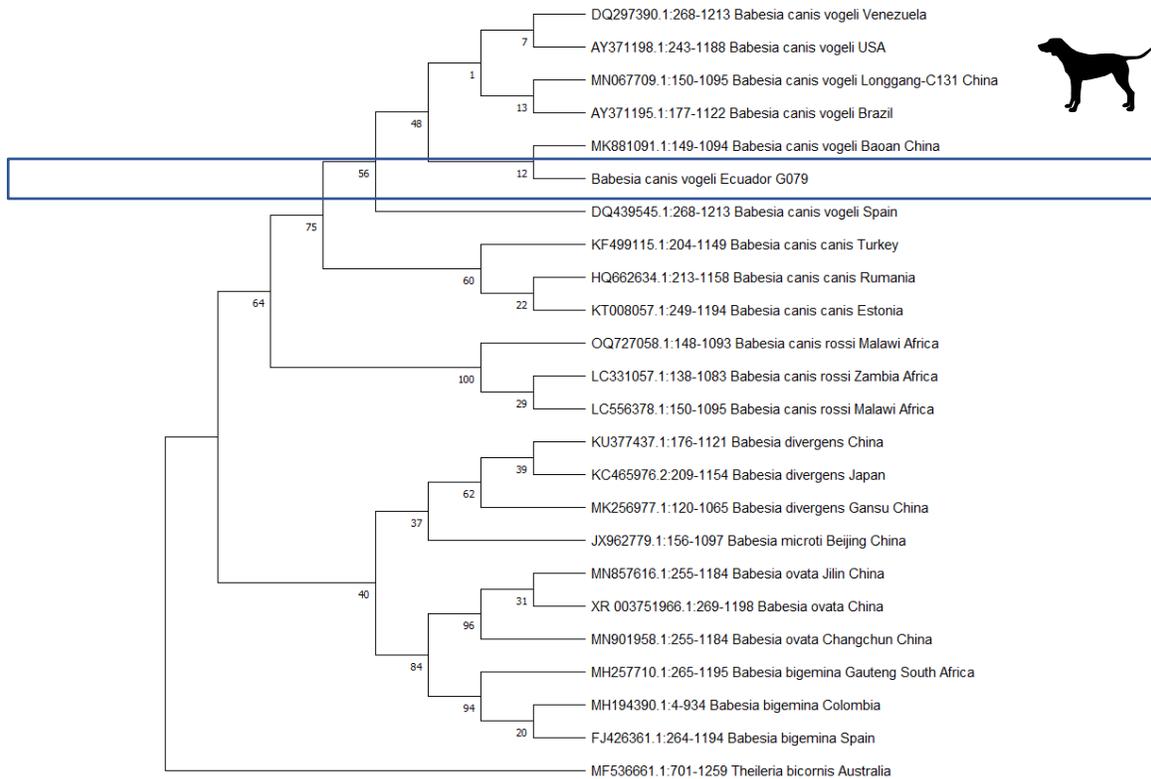


Figura 18. Construcción de cladograma para la identificación de *Babesia* spp. usando el gen *18S ARNr* en el software MEGA 11.0. El recuadro azul representa la muestra G079, identificada molecularmente como *Babesia canis vogeli*, subespecie de *Babesia canis*. El análisis se basa en el algoritmo del modelo estadístico Maximum Likelihood. Modelo evolutivo Tamura-Nei, Bootstrap de 100 y como outgroup se usa la secuencia del piroplasmido *Theileria birconis*.

2.4 DISCUSIÓN

Esta investigación se enfoca en el análisis de muestras clínicas sanguíneas de canes para la detección molecular de *Babesia* spp. Este tipo de estudios son relevantes debido a que el análisis de especímenes clínicos ayuda a detectar el patógeno y puede incluso reflejar la carga

parasitaria en un contexto natural, permitiendo estudiar la interacción del hemoparásito con el hospedero, detectar coinfecciones e identificar las especies del mismo (Srinivasan et al., 2000 ; Wong et al., 2014).

Sin embargo, las muestras de sangre de animales presentan ADN del hospedero, el mismo que se encuentra mayormente concentrado en comparación con el del patógeno, interfiriendo con la detección del mismo y dificultando la amplificación y la interpretación de resultados (Oyola et al., 2013; Auburn et al., 2011). A pesar del desarrollo de métodos alternativos para resolver la escasez de material genético, la contaminación por ADN del hospedero sigue siendo un desafío importante, especialmente en patógenos difíciles de cultivar in vitro (Aird et al., 2011).

Consecuentemente, para superar este problema, se requiere hacer uso de métodos de extracción y purificación de ADN altamente eficientes, que minimicen la contaminación por ADN del hospedero, y que garanticen la calidad del material genético extraído. Este factor es crucial para mejorar la detección de microorganismos patógenos y asegurar la confiabilidad de los resultados (Cruz-Enríquez et al., 2021).

En el contexto de este estudio, se seleccionó el kit PureLink® Genomic DNA de Invitrogen para la extracción de ADN en muestras de sangre, debido a su capacidad para proporcionar resultados consistentes y confiables.

De la misma manera, el uso del kit de extracción QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) representa una alternativa fiable que logra reducir interferencias como el ADN del hospedero, garantizando la extracción eficiente del material genético (Zhou et al., 2019; Liao et al., 2020). Este kit tiene una alta sensibilidad, incluso al trabajar con muestras con baja

carga parasitaria, estudios previos han validado su eficacia y su capacidad para obtener ADN de buena calidad, haciéndolo ideal para trabajar con técnicas como la PCR, que es fundamental para la detección de *Babesia* en caninos (Adaszek & Winiarczyk, 2008b; Annoscia et al., 2017; Földvári et al., 2005).

Asimismo, se generan problemas en el método de detección molecular de *Babesia* spp. en donde en algunos casos se detectó la aparición de productos de amplificación no deseados o ausencia de bandas. A pesar de estos inconvenientes, en algunos casos la amplificación por reacción de PCR puede generar bandas claras y del tamaño esperando, garantizando un procedimiento de detección molecular exitoso (Bentolab, s.f.).

La aparición de productos inespecíficos depende de los efectos relativos de varios parámetros en la amplificación de productos de PCR no específicos (Rubin & Levy, 1996). Un factor que afecta la especificidad de la PCR es el desajuste del cebador con el ADN molde durante la hibridación, la longitud del cebador, el contenido de GC en los cebadores (Benita, 2003), el tamaño del ADN molde y los límites de tamaño del producto de PCR (Beasley et al., 1999).

La generación de productos cortos e inespecíficos depende de la unión de los cebadores a secuencias complementarias similares o a sí mismos. Las amplificaciones no específicas que suceden etapas tardías del ciclo y en bajas concentraciones no suelen ser problemáticas. Sin embargo, si se produce al inicio o con demasiados ciclos, los productos no deseados pueden alcanzar concentraciones altas y dificultar la interpretación de los resultados (Bentolab, s.f.; Fraga et al., 2014).

Además, el éxito de la reacción de PCR depende de las condiciones físicas y químicas de sus componentes. Los iones de Mg^{2+} desempeñan un papel fundamental al encargarse de

estabilizar la unión entre los cebadores y la cadena de ADN molde, reduciendo las repulsiones electrostáticas entre las cadenas de ADN cargadas negativamente. El magnesio actúa como cofactor de la enzima polimerasa, controlando su estabilidad y fiabilidad, afectando directamente la sensibilidad de la PCR. Por otro lado, para evitar productos inespecíficos y maximizar el rendimiento de la reacción, también es crucial seleccionar adecuadamente las temperaturas y tiempos en cada etapa del ciclo de amplificación (Reidar Anderson, 2008).

Para reducir estos problemas, es necesario optimizar la reacción a partir de un ajuste en las concentraciones de reactivos o las condiciones de ciclaje de la PCR. Las bandas inespecíficas aparecen por una baja rigurosidad en la reacción; es por esto que se debería elegir condiciones de PCR que la potencien. Asimismo, es necesario evaluar el contenido de guaninas-citosinas en el producto de PCR (Lorenz, 2012).

Además de la optimización del protocolo, existen herramientas predictivas para mejorar la eficacia de la PCR. Estos sistemas predictivos detectan fallos en la PCR, como la generación de productos inespecíficos, o la falta de amplificación de una banda específica. Este método predictivo constituye una combinación de herramientas bioinformáticas como GenomeMasker y GenomeTester para el análisis de datos genómicos. Además, hace uso de algoritmos predictivos que implementan modelos estadísticos para predecir las probabilidades de fallo en la PCR (Reidar Anderson, 2008).

En cambio, la detección molecular de *Babesia* spp. tiene como factor clave la selección de un marcador molecular adecuado, es por esto que se basa en reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) amplificando el gen *18S ARNr*. Este gen es un marcador altamente

conservado en protozoarios y, en particular, para la detección de piroplasmas como *Babesia* y *Theileria*.

El fragmento de 942 pb del gen *18S ARNr* utilizado en el kit AccuPower Bioneer para la detección de *Babesia* ofrece una combinación óptima de especificidad y sensibilidad (AccuPower® Babesia PCR Kit by BIONEER, Bioneer Global Center, 71, Techno 2-ro, Yuseong-gu, Daejeon 34013, Republic of Korea s. f.). Al ser un segmento de mayor longitud incluye suficientes regiones variables (V1-V9) para distinguir entre especies de *Babesia*, mejorando la precisión en la identificación del patógeno (Gonzalez And & Schmickel, 1986; Bhoora et al., 2009).

Sin embargo, la amplificación por PCR usando este marcador molecular puede ser poco sensible en casos de parasitemia casi indetectable o por uso de cebadores no específicos para las cepas locales de *Babesia* (Kounosu et al., 2019). La homología del gen *18S ARNr* con otras especies de protozoarios o variaciones de *Babesia* puede dificultar la detección precisa de todas las cepas en las muestras de sangre de caninos (Hillis & Dixon, 1991). Además, un fragmento largo requiere de ADN intacto y de alta calidad, lo que puede dificultar la amplificación si el ADN está fragmentado o es escaso (Ficetola et al., 2024). Anteriores indagaciones relacionadas con el género *Babesia* se han basado en la detección molecular de fragmentos pertenecientes al gen *18S ARNr* más pequeños (~400-550 pb) en comparación con el fragmento de 942 pb que se detecta en este estudio (Granziera Spolidorio et al., 2011).

Aunque el gen *18S ARNr* es una herramienta valiosa para la detección de *Babesia*, su alta conservación en ciertas regiones puede dificultar la diferenciación entre especies filogenéticamente cercanas. En tales casos, la reacción de PCR debe complementarse con

técnicas de secuenciación o amplificando genes marcadores alternativos que permitan una identificación más precisa. Asimismo, explorar fragmentos complementarios del gen *18S ARNr*, como las regiones hipervariables V4, V7 o V9, puede facilitar la detección molecular del patógeno y proporcionar una identificación más precisa y profunda, particularmente en especies estrechamente relacionadas (Hanron et al., 2017; Ficaretola et al., 2024; Mthethwa-Hlongwa et al., 2024).

Por consiguiente, en las muestras con bajo contenido de material genético se debe identificar fragmentos de ADN cortos, ya que presentan una mayor eficiencia de amplificación y menor probabilidad de formar estructuras secundarias que puedan interferir con el proceso de PCR (Uluceme et al., 2024). De este modo, el uso de genes marcadores alternativos en estudios basados en muestras clínicas, como la proteína de choque térmico *hsp-70* (Yamasaki et al., 2007) y las regiones intergénicas *ITS-1* e *ITS-2* (Kumar et al., 2012) ha mejorado la resolución taxonómica entre especies de *Babesia* spp. (Krawczak et al., 2023; Qurollo et al., 2017a). Estas estrategias complementan el análisis molecular tradicional y amplían las posibilidades de identificación precisa de patógenos.

A su vez, es posible usar genes marcadores mitocondriales como *cox-1* (citocromo c oxidasa subunidad I), *cox-3* (citocromo c oxidasa subunidad III) (Qurollo et al., 2017), *COI* (citocromo oxidasa subunidad I) y *Cytb* (citocromo B) que indican el origen de los haplotipos de *Babesia*, así mismo como su temporalidad, ayudando a identificar variantes del gen conservado *18S ARNr* (Hrazdilová et al., 2019).

El diagnóstico de *Babesia* spp. a partir de microscopía no permite distinguir entre especies y subespecies del patógeno; y los ensayos serológicos disponibles para piroplasmidos son

escasos. Por consiguiente, se recurre a un diagnóstico basado en técnicas moleculares como PCR convencional, PCR en tiempo real (qPCR), PCR anidada, y secuenciación (Birkenheuer et al., 2003b).

Una reacción de PCR convencional que se optimiza rigurosamente asegura la eficiencia de amplificación del fragmento largo de 942 pb del gen *18S ARNr*, en especial si se analizan muestras clínicas con bajas cargas parasitarias o material genético de baja calidad. Consecuentemente, existen distintas alternativas metodológicas que presentan una mayor sensibilidad a la detección de *Babesia* spp. y que son técnicas alternas a una PCR de punto final. Implementar PCRs en tiempo real ha permitido la identificación de *Babesia* spp. en muestras con valores bajos de parasitemia. Por otra parte, para llegar a un enfoque más especializado en base a la identificación de subespecies de *Babesia* en caninos (*Babesia canis vogeli*, *Babesia canis canis*, *Babesia canis rossi*) ha sido fundamental establecer métodos de detección molecular basados en PCRs anidadas y semi-anidadas.

Respecto a la identificación molecular de *Babesia* spp., fue llevada a cabo usando la tecnología de Nanopore, desarrollada por Oxford Nanopore Technologies. Al ser un método óptimo para la identificación molecular del fragmento largo de 942pb de *Babesia* spp., permite generar lecturas largas. Sin embargo, también se considera propenso a tener una tasa de error mayor debido al mecanismo que usa en el secuenciamiento.

Igualmente, en el contexto de la amplificación de un fragmento de 942 pb del gen *18S ARNr*, la tecnología Illumina tiene una alta sensibilidad, permitiendo detectar variantes de *Babesia* spp. en muestras con baja carga parasitaria. Además, su alta especificidad y baja tasa de error, garantiza una identificación precisa del hemoparásito (Illumina, 2020). En relación a este

estudio, su aplicabilidad permitiría identificar coinfecciones de *Babesia* en una misma muestra sanguínea (Eichenberger et al., 2017). Sin embargo, debido a que genera lecturas cortas, su aplicación podría no ser la más adecuada para secuenciar fragmentos más largos como el estudiado en esta investigación, ya que requeriría un ensamblaje posterior para reconstruir la secuencia completa y esto podría disminuir su tasa de eficiencia.

Seguidamente al proceso de secuenciación, el uso de la herramienta Amplicon Sorter® (Oxford Nanopore Technologies, EE.UU) fue crucial para filtrar y clasificar las secuencias consenso generadas en los barcodes analizados. El uso de Amplicon Sorter permitió clasificar y analizar las secuencias de ADN obtenidas mediante Oxford Nanopore Technologies (ONT), además de organizar las lecturas obtenidas de acuerdo a las características requeridas del producto de la amplificación, facilitando la identificación de variantes genéticas.

En algunas muestras se identificaron problemas de contaminación cruzada que posiblemente fueron derivados del proceso de secuenciación o del flow cell empleado en ese momento (Cibulskis et al., 2011; Yin et al., 2019). La contaminación fue identificada como material genético de *Leptospira* spp, lo que se debió al uso de la misma flow cell en donde se habían cargado distintos amplicones, de distintas muestras y destinados a la detección molecular de diversos patógenos. La eficiencia de la herramienta Amplicon Sorter depende en gran medida de la calidad de las lecturas generadas por el proceso de secuenciamiento, requiriendo además una preparación de librerías adecuada que no comprometa a los resultados posteriores (Vierstraete & Braeckman, 2022).

Por consiguiente, se debe considerar métodos de identificación molecular de *Babesia* spp. más sensibles que permitan obtener mejores resultados. En este contexto, una alternativa

viable es usar el método de captura por hibridación o captura por secuencia dirigida. Este enfoque utiliza sondas específicas para capturar solo las regiones de ADN de interés, lo que permite enriquecer las secuencias objetivo antes del secuenciamiento (Sundararaman et al., 2023). A pesar de que su uso no se ha reportado en el secuenciamiento de *Babesia* y otros piroplasmidos, usarla facilitaría la secuenciación de regiones con alto contenido de guanina-citosina, mejorando la detección de variantes genéticas y coinfecciones, evitando interferencias con el ADN del hospedero u otros patógenos.

El uso de estas tecnologías y nuevos métodos de detección es relevante debido al impacto zoonótico que representa la babesiosis en la actualidad. El contacto frecuente entre humanos y animales resalta la importancia de considerar la prevalencia de ésta y otras enfermedades hemoparasitarias (He et al., 2017; Hsiao, 2019). Los canes al ser animales de compañía, pueden actuar como reservorios de varias zoonosis. Las implicaciones de la babesiosis deben ser analizadas desde el enfoque "One Health", que integra esfuerzos entre veterinaria, medicina humana y gobiernos para mejorar la salud animal, humana y ambiental (Day, 2011).

Alrededor de 100 especies de *Babesia* spp. han sido identificadas por infectar animales domésticos y salvajes, sin embargo, algunas de ellas son capaces de afectar a los humanos. En Ecuador, se han reportado casos de babesiosis humana causada por *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*, lo que evidencia una transmisión activa desde animales domésticos y representando un riesgo constante para los seres humanos (Calvopiña et al., 2023).

Las enfermedades transmitidas por vectores en caninos están determinadas por la distribución geográfica de los vectores y sus hospederos (Rojas et al., 2014). Entre las principales especies patógenas para canes se encuentran *Babesia canis*, *Babesia rossi* y

Babesia vogeli. Aunque *Babesia* spp. tiene una distribución global, *Babesia vogeli* es la única especie descrita en América del Sur. En América Latina, la presencia de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*, principal vector de *Babesia vogeli*, y la proximidad de regiones endémicas explica su distribución en países como Brasil, Venezuela, Argentina, Perú y Ecuador (Di Cataldo et al., 2020).

La prevalencia de la babesiosis canina suele ser baja y está influenciada por factores como el clima, la geografía y la movilidad de los vectores (Di Cataldo et al., 2020). En América Latina se han identificado prevalencias que van desde rangos de 0.2% en Argentina (Eiras et al., 2008) hasta 9.9% en Brasil (Costa-Júnior et al., 2012). En Venezuela, la prevalencia alcanza el 2% (Criado-Fornelio et al., 2007), mientras que en Colombia se reporta un 5.5% (Vargas-Hernández et al., 2012). Aunque estas cifras son menores en comparación con otros hemopatógenos como *Ehrlichia canis* y *Anaplasma* spp., (Rojas et al., 2014) (Navarrete et al., 2016) la prevalencia de *Babesia vogeli* varía según las diferencias ecológicas de los vectores, las condiciones climáticas y los factores ambientales que favorecen su persistencia y reproducción (Schnittger et al., 2012).

Para ello, implementación de un sistema especializado y estudios de babesiosis proporcionarían mayor información sobre las dinámicas de transmisión del parásito y el impacto que podría tener una técnica especializada y estandarizada para su rápida detección (Di Cataldo et al., 2020). La implementación de alternativas para la detección molecular de *Babesia* podría controlar y prevenir la transmisión de enfermedades hemoparasitarias, como la babesiosis, desencadenada por la convivencia cercana entre animales domésticos (perros y ganado bovino) y sus dinámicas eco epidemiológicas (Irwin, 2009c; Young et al., 2019b).

2.5 CONCLUSIONES

Este estudio enfrentó varios desafíos metodológicos que impactaron los resultados obtenidos. Un factor clave fue la selección del método de extracción de ADN de las muestras de sangre canina y la elección de los genes objetivo para la detección molecular de *Babesia* spp., los cuales podrían no haber cubierto todas las variantes genéticas de las especies locales del parásito. Asimismo, la especificidad y el diseño de los primers utilizados en la PCR tal vez no fueron los más adecuados para detectar infecciones con baja parasitemia, típicas de los casos subclínicos.

Estas dificultades, junto con posibles problemas en la calidad de las muestras, como ADN degradado o contaminado, afectaron la sensibilidad del método y podrían haber influido en la precisión de los resultados.

A pesar de estas limitaciones, el estudio resalta la necesidad de mejorar las técnicas de detección molecular, especialmente en áreas con baja prevalencia de la enfermedad. Los resultados obtenidos proporcionan una base valiosa para mejorar los protocolos en futuras investigaciones y representan un primer paso hacia la optimización de métodos diagnósticos más precisos para la babesiosis canina en Ecuador.

2.6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Para optimizar los métodos moleculares y mejorar la sensibilidad en la detección de *Babesia* spp., es fundamental implementar el uso de marcadores genéticos más específicos, que se ajusten a las necesidades particulares de cada investigación; como por ejemplo los marcadores mitocondriales CytB y COI (Hrazdilová et al., 2019). Estos marcadores permitirían un enfoque más preciso en la detección de diferentes especies, subespecies y

variantes de *Babesia*, especialmente en regiones donde la diversidad genética del parásito puede ser amplia.

Asimismo, la implementación de técnicas moleculares avanzadas, como la PCR en tiempo real (qPCR) o métodos de PCRs anidadas y semi anidadas, podría incrementar significativamente la sensibilidad y especificidad de la detección (Birkenheuer et al., 2003; Ulucesme et al., 2024).

Por último, para tener un enfoque más completo y clínicamente relevante, sería ideal realizar la genotipificación de las muestras positivas de *Babesia spp.*. Este análisis permitiría diferenciar las especies y cepas presentes en las infecciones caninas, proporcionando información sobre su patogenicidad y las posibles variaciones en la respuesta al tratamiento. Esto no solo facilitaría el diseño de intervenciones terapéuticas más específicas y efectivas, sino que también contribuiría a una mejor comprensión del cuadro clínico en los pacientes infectados, mejorando las decisiones clínicas y los pronósticos.

REFERENCIAS

- Adaszek, L., & Winiarczyk, S. (2008). Molecular characterization of *Babesia canis canis* isolates from naturally infected dogs in Poland. *Veterinary Parasitology*, *152*(3–4), 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.024>
- Aird, D., Ross, M. G., Chen, W. S., Danielsson, M., Fennell, T., Russ, C., Jaffe, D. B., Nusbaum, C., & Gnirke, A. (2011). Analyzing and minimizing PCR amplification bias in Illumina sequencing libraries. *Genome Biology*, *12*(2). <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-2-r18>
- Auburn, S., Campino, S., Clark, T. G., Djimde, A. A., Zongo, I., Pinches, R., Manske, M., Mangano, V., Alcock, D., Anastasi, E., Maslen, G., MacInnis, B., Rockett, K., Modiano, D., Newbold, C. I., Doumbo, O. K., Ouédraogo, J. B., & Kwiatkowski, D. P. (2011). An effective method to purify plasmodium falciparum dna directly from clinical blood samples for whole genome high-throughput sequencing. *PLoS ONE*, *6*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022213>
- Allred, D. R., Carlton, J. M. R., Satcher, R. L., Long, J. A., Brown, W. C., Patterson, P. E., O'Connor, R. M., & Stroup, S. E. (2000). The ves Multigene Family of *B. bovis* Encodes Components of Rapid Antigenic Variation at the Infected Erythrocyte Surface. *Molecular Cell*, *5*(1), 153–162. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80411-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80411-6)
- Anderson, T. E., & Cassaday, P. B. (s.f.). *Babesiosis in Man Sixth Documented Case*. <http://ajcp.oxfordjournals.org/>

Angus, B. M. (s.f.). *The E-Mary 04' the Cattle Tick tic Austrn~a and Achievements in its Cntral in.*

Annoscia, G., Latrofa, M. S., Cantacessi, C., Olivieri, E., Manfredi, M. T., Dantas-Torres, F., & Otranto, D. (2017). A new PCR assay for the detection and differentiation of *Babesia canis* and *Babesia vogeli*. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 8(6), 862–865. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.07.002>

Baneth, G. (2018). *Babesia* of domestic dogs. In *Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets* (pp. 241–258). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-70132-5_10

Barash, N. R., Thomas, B., Birkenheuer, A. J., Breitschwerdt, E. B., Lemler, E., & Quorollo, B. A. (2019). Prevalence of *Babesia* spp. and clinical characteristics of *Babesia vulpes* infections in North American dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(5), 2075–2081. <https://doi.org/10.1111/jvim.15560>

Batista Jiménez Alfonso. (1980). *Prevalencia de Parásitos Hemáticos en caninos del departamento de Colombia.*

Beasley, E.M., Myers, R.M., Cox, D.R. and Lazzeroni, L.C. (1999) In Innis, M. A., D.H., G. and Sninsky, J. J. (eds.), *PCR Applications: Protocols for Functional Genomics*. Academic Press, San Diego, California, USA, pp. 55–72

Benita, Y. (2003). Regionalized GC content of template DNA as a predictor of PCR success. *Nucleic Acids Research*, 31(16), 99e–999. <https://doi.org/10.1093/nar/gng101>

- Benjamini, Y., & Speed, T. P. (2012). Summarizing and correcting the GC content bias in high-throughput sequencing. *Nucleic Acids Research*, *40*(10). <https://doi.org/10.1093/nar/gks001>
- Bhattacharjee, K., & Sarmah, P. C. (2013). Prevalence of haemoparasites in pet, working and stray dogs of Assam and North-East India: A hospital based study. *Veterinary World*, *6*(11), 874–878. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2013.874-878>
- Bhoora, R., Franssen, L., Oosthuizen, M. C., Guthrie, A. J., Zwegarth, E., Penzhorn, B. L., Jongejan, F., & Collins, N. E. (2009). Sequence heterogeneity in the 18S rRNA gene within *Theileria equi* and *Babesia caballi* from horses in South Africa. *Veterinary Parasitology*, *159*(2), 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.004>
- Birkenheuer, A. J., Levy, M. G., & Breitschwerdt, E. B. (2003). Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(9), 4172–4177. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4172-4177.2003>
- Bloch, E. M., Kumar, S., & Krause, P. J. (2019). Persistence of babesia microti infection in humans. In *Pathogens* (Vol. 8, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030102>
- Bossink, A. W. J., Paemen, L., Jansen, P. M., Hack, C. E., Thijs, L. G., & Damme, J. Van. (s.f.). *Plasma Levels of the Chemokines Monocyte Chemotactic Proteins-1 and-2 Are Elevated in Human Sepsis.*

- Boyko, A. R., Quignon, P., Li, L., Schoenebeck, J. J., Degenhardt, J. D., Lohmueller, K. E., Zhao, K., Brisbin, A., Parker, H. G., vonHoldt, B. M., Cargill, M., Auton, A., Reynolds, A., Elkahloun, A. G., Castelhana, M., Mosher, D. S., Sutter, N. B., Johnson, G. S., Novembre, J., ... Ostrander, E. A. (2010). A simple genetic architecture underlies morphological variation in dogs. *PLoS Biology*, 8(8), 49–50. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000451>
- Buling, A., Criado-Fornelio, A., Asenzo, G., Benitez, D., Barba-Carretero, J. C., & Florin-Christensen, M. (2007). A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Veterinary Parasitology*, 147(1–2), 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.03.031>
- Bustamante–Ordóñez, J. G., Bustamante–Guzmán, D. A., & Rivera–Pirela, S. E. (2024). Molecular and epidemiological analysis of Babesiosis by *Babesia bigemina* in cattle from the Giron Municipality, Azuay, Ecuador. *Revista Científica de La Facultad de Veterinaria*, 34(1). <https://doi.org/10.52973/RCFCV-E34337>
- Cacciò, S. M., Antunovic, B., Moretti, A., Mangili, V., Marinculic, A., Rafaj Baric, R., Slemenda, S. B., & Pieniazek, N. J. (2002). Molecular characterisation of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* from naturally infected European dogs. In *Veterinary Parasitology* (Vol. 106).
- Callow, L. L., Dalgiesht, R. J., & De Vos, A. J. (s.f.). *MILESTONES IN PARASITOLOGY: A History of Effective Living Vaccines Against Bovine Babesiosis-The Longest Field Trial?*
- Calvopiña, M., Montesdeoca-Andrade, M., Bastidas-Caldes, C., Enriquez, S., Rodríguez-Hidalgo, R., Aguilar-Rodríguez, D., & Cooper, P. (2023). Case report: First report on

- human infection by tick-borne *Babesia bigemina* in the Amazon region of Ecuador. *Frontiers in Public Health*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1079042>
- Carcy, B., Précigout, E., Schetters, T., & Gorenflot, A. (2006). Genetic basis for GPI-anchor merozoite surface antigen polymorphism of *Babesia* and resulting antigenic diversity. *Veterinary Parasitology*, *138*(1–2), 33–49. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.038>
- Chávez-Larrea, M. A., Cholota-Iza, C., Medina-Naranjo, V., Yugcha-Díaz, M., Ron-Román, J., Martín-Solano, S., Gómez-Mendoza, G., Saegerman, C., & Reyna-Bello, A. (2021). Detection of *Babesia* spp. in high altitude cattle in Ecuador, possible evidence of the adaptation of vectors and diseases to new climatic conditions. *Pathogens*, *10*(12). <https://doi.org/10.3390/pathogens10121593>
- Checa, R., Fidalgo, L. E., Montoya, A., López, A. M., Barrera, J. P., Gálvez, R., Sánchez De La Nieta, S., Marino, V., Sarquis, J., & Miró, G. (2019). The role of healthy dog carriers of *Babesia microti*-like piroplasms. *Parasites and Vectors*, *12*(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3371-5>
- Cibulskis, K., McKenna, A., Fennell, T., Banks, E., DePristo, M., & Getz, G. (2011). ContEst: Estimating cross-contamination of human samples in next-generation sequencing data. *Bioinformatics*, *27*(18), 2601–2602. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr446>
- Clarke, J., Wu, H. C., Jayasinghe, L., Patel, A., Reid, S., & Bayley, H. (2009). Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. *Nature Nanotechnology*, *4*(4), 265–270. <https://doi.org/10.1038/nnano.2009.12>

- Costa-Júnior, L. M., Ribeiro, M. F. B., Rembeck, K., Rabelo, E. M. L., Zahler-Rinder, M., Hirzmann, J., Pfister, K., & Passos, L. M. F. (2009). Canine babesiosis caused by *Babesia canis vogeli* in rural areas of the State of Minas Gerais, Brazil and factors associated with its seroprevalence. *Research in Veterinary Science*, *86*(2), 257–260. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.07.002>
- Criado-Fornelio, A., Rey-Valeiron, C., Buling, A., Barba-Carretero, J. C., Jefferies, R., & Irwin, P. (2007). New advances in molecular epizootiology of canine hematic protozoa from Venezuela, Thailand and Spain. *Veterinary Parasitology*, *144*(3–4), 261–269. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2006.09.042>
- Cruz, K. B. (s.f.). *Prevalence and intensity of infestation of the brown dog tick, Rhipicephalus sanguineus (latreille) (arachnida: Acari: Ixodidae) in three veterinary facilities.* <https://www.researchgate.net/publication/328869154>
- Cruz-Enríquez, J. A., Espinosa-Padilla, S. E., & Medina-Torres, E. A. (2021). Importancia del adecuado protocolo de extracción de DNA para estudios moleculares. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*, *30*(2), 50–53. <https://doi.org/10.35366/101642>
- Dalrymple, B. P., Casu, R. E., Peters, J. M., Dimmock, C. M., Gale, K. R., Boese, R., & Wright, I. G. (1993). Characterisation of a family of multi-copy genes encoding rhostry protein homologues in *Babesia bovis*, *Babesia ovis* and *Babesia canis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *57*(2), 181–192. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(93\)90194-3](https://doi.org/10.1016/0166-6851(93)90194-3)
- Day, M. J. (2011). One health: The importance of companion animal vector-borne diseases. In *Parasites and Vectors* (Vol. 4, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-49>

- de Waal, T. (2012). Advances in diagnosis of protozoan diseases. *Veterinary Parasitology*, 189(1), 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.033>
- Depoix, D., Carcy, B., Jumas-Bilak, E., Pages, M., Precigout, E., Schetters, T. P. M., Ravel, C., & Gorenflot, A. (s.f.). *Chromosome number, genome size and polymorphism of European and South African isolates of large Babesia parasites that infect dogs*.
- Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S., & Sawaya, B. E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): An overview. In *Journal of Interferon and Cytokine Research* (Vol. 29, Issue 6, pp. 313–325). <https://doi.org/10.1089/jir.2008.0027>
- Di Cataldo, S., Ulloa-Contreras, C., Cevidanes, A., Hernández, C., & Millán, J. (2020). *Babesia vogeli* in dogs in Chile. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(6), 2296–2299. <https://doi.org/10.1111/tbed.13609>
- Didelot, X., Bowden, R., Wilson, D. J., Peto, T. E. A., & Crook, D. W. (2012). Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 13, Issue 9, pp. 601–612). <https://doi.org/10.1038/nrg3226>
- Dos Santos Pacheco, N., Tosetti, N., Koreny, L., Waller, R. F., & Soldati-Favre, D. (2020). Evolution, Composition, Assembly, and Function of the Conoid in Apicomplexa. In *Trends in Parasitology* (Vol. 36, Issue 8, pp. 688–704). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.05.001>
- Duarte, S. C., Linhares, G. F. C., Romanowsky, T. N., Neto, O. J. da S., & Borges, L. M. F. (2008). Assessment of primers designed for the subspecies-specific discrimination among *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli* and *Babesia canis rossi* by PCR assay.

Veterinary Parasitology, 152(1–2), 16–20.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.013>

Dubremetz, J. F., Garcia-Réguet, N., Conseil, V., & Fourmaux, M. N. (1998). Invited review Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *International Journal for Parasitology*, 28(7), 1007–1013. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(98\)00076-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00076-9)

Eichenberger, R. M., Ramakrishnan, C., Russo, G., Deplazes, P., & Hehl, A. B. (2017). Genome-wide analysis of gene expression and protein secretion of *Babesia canis* during virulent infection identifies potential pathogenicity factors. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03445-x>

Elsworth, B., & Duraisingh, M. T. (2021). A framework for signaling throughout the life cycle of *Babesia* species. In *Molecular Microbiology* (Vol. 115, Issue 5, pp. 882–890). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/mmi.14650>

Etkind, P., Piesman, J., Ruebush, T. K., Spielman, A., & Juranek, D. D. (1980). Methods for Detecting *Babesia microti* Infection in Wild Rodents. In *Source: The Journal of Parasitology* (Vol. 66, Issue 1). <http://www.jstor.org>URL:<http://www.jstor.org/stable/3280599>http://www.jstor.org/stable/3280599?seq=1&cid=pdf-reference#references_tab_contents

Ficetola, G. F., Guerrieri, A., Cantera, I., & Bonin, A. (2024). In silico assessment of 18S rDNA metabarcoding markers for the characterization of nematode communities. *PLoS ONE*, 19(4 April). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0298905>

- Földvári, G., Hell, É., & Farkas, R. (2005). *Babesia canis canis* in dogs from Hungary: Detection by PCR and sequencing. *Veterinary Parasitology*, *127*(3–4), 221–226. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.10.016>
- Fox, L. M., Wingerter, S., Ahmed, A., Arnold, A., Chou, J., Rhein, L., & Levy, O. (2006). Neonatal babesiosis: case report and review of the literature. *Pediatric Infectious Disease Journal*, *25*(2), 169–173. <https://doi.org/10.1097/01.inf.0000195438.09628.b0>
- Fraga, D., Meulia, T., & Fenster, S. (2014). Real-Time PCR. *Current Protocols in Essential Laboratory Techniques*, *2014*, 10.3.1-10.3.40. <https://doi.org/10.1002/9780470089941.et1003s08>
- Frey, K. G., & Bishop-Lilly, K. A. (2015). Next-generation sequencing for pathogen detection and identification. In *Methods in Microbiology* (Vol. 42, pp. 525–554). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.mim.2015.06.004>
- Fukumoto, S., Xuan, X., Shigeno, S., Kimbita, E., Igarashi, I., Nagasawa, H., Fujisaki, K., & Mikami, T. (2001). Development of a Polymerase Chain Reaction Method for Diagnosing *Babesia gibsoni* Infection in Dogs. In *J. Vet. Med. Sci* (Vol. 63, Issue 9).
- Galán, A., Mayer, I., Rafaj, R. B., Bendelja, K., Sušić, V., Cerón, J. J., & Mrljak, V. (2018). MCP-1, KC-like and IL-8 as critical mediators of pathogenesis caused by *Babesia canis*. *PLoS ONE*, *13*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190474>
- Goddard, A., Leisewitz, A. L., Kjelgaard-Hansen, M., Kristensen, A. T., & Schoeman, J. P. (2016). Excessive pro-inflammatory serum cytokine concentrations in virulent canine babesiosis. *PLoS ONE*, *11*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150113>

- Gonzalez ' And, I. L., & Schmickel, R. D. (1986). The Human 18S Ribosomal RNA Gene: Evolution and Stability. In *Alm J Hum Genet* (Vol. 38).
- González, J., Echaide, I., Pabón, A., Piñeros, J. G., Blair, S., & Tobón-Castaño, A. (s.f.). *Babesiosis prevalence in malaria-endemic regions of Colombia*. <http://journals.lww.com/jvbd>
- Goodswen, S. J., Kennedy, P. J., & Ellis, J. T. (2021). Applying machine learning to predict the exportome of bovine and canine *Babesia* species that cause babesiosis. *Pathogens*, *10*(6). <https://doi.org/10.3390/pathogens10060660>
- Granziera Spolidorio, M., de Medeiros Torres, M., Neres da Silva Campos, W., Lima Tomé Melo, A., Igarashi, M., Mendes Amude, A., Bahia Labruna, M., & Moura Aguiar, D. (2011). Molecular detection of *Hepatozoon canis* and *Babesia canis vogeli* in domestic dogs from Cuiabá, Brazil Detecção molecular de *Hepatozoon canis* e *Babesia canis vogeli* em cães domésticos de Cuiabá, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet*, *253–255*. <https://doi.org/10.1016/j>
- Hack, C. E., Hart, M., Strack, R. J. M., Schijndel², V., Eerenberg, A. J. M., Nuijens, J. H., Thijs, L. G., & Aarden¹, L. A. (1992). Interleukin-8 in Sepsis: Relation to Shock and Inflammatory Mediators. In *INFECTION AND IMMUNITY* (Vol. 60, Issue 7). <https://journals.asm.org/journal/iai>
- Hadziavdic, K., Lekang, K., Lanzen, A., Jonassen, I., Thompson, E. M., & Troedsson, C. (2014). Characterization of the 18s rRNA gene for designing universal eukaryote specific primers. *PLoS ONE*, *9*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087624>

- Hafez, H. M., Hauck, R., Lüscho, D., & McDougald, L. (2005). Comparison of the specificity and sensitivity of PCR, nested PCR, and real-time PCR for the diagnosis of histomoniasis. *Avian Diseases*, 49(3), 366–370. <https://doi.org/10.1637/7341-020805R.1>
- Hanron, A. E., Billman, Z. P., Seilie, A. M., Chang, M., & Murphy, S. C. (2017). Detection of *Babesia microti* parasites by highly sensitive 18S rRNA reverse transcription PCR. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 87(3), 226–228. <https://doi.org/10.1016/J.DIAGMICROBIO.2016.11.021>
- He, L., Miao, X., Hu, J., Huang, Y., He, P., He, J., Yu, L., Malobi, N., Shi, L., & Zhao, J. (2017). First molecular detection of *Babesia gibsoni* in dogs from Wuhan, China. *Frontiers in Microbiology*, 8(AUG). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01577>
- Hedy, G. (1989). *The impact of cultural and environmental changes on the epidemiology and control of human babesiosis* (Vol. 83).
- Hildebrandt, A., Hunfeld, K. P., Baier, M., Krumbholz, A., Sachse, S., Lorenzen, T., Kiehntopf, M., Fricke, H. J., & Straube, E. (2007). First confirmed autochthonous case of human *Babesia microti* infection in Europe. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 26(8), 595–601. <https://doi.org/10.1007/s10096-007-0333-1>
- Hillis, D. M., & Dixon, M. T. (1991). *THE QUARTERLY REVIEW OF BIOLOGY RIBOSOMAL DNA: MOLECULAR EVOLUTION AND PHYLOGENETIC INFERENCE* (Vol. 66, Issue 4). <http://www.journals.uchicago.edu/t-and-c>

- Hong, S., Bunge, J., Leslin, C., Jeon, S., & Epstein, S. S. (2009). Polymerase chain reaction primers miss half of rRNA microbial diversity. *ISME Journal*, 3(12), 1365–1373. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.89>
- Hrazdilová, K., Myśliwy, I., Hildebrand, J., Buńkowska-Gawlik, K., Janaczyk, B., Perec-Matysiak, A., & Modrý, D. (2019). Paralogs vs. genotypes? Variability of *Babesia canis* assessed by 18S rDNA and two mitochondrial markers. *Veterinary Parasitology*, 266, 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.12.017>
- Hsiao, S. J. (2019). Sources of error in molecular diagnostic analyses. *Accurate Results in the Clinical Laboratory: A Guide to Error Detection and Correction, Second Edition*, 337–347. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813776-5.00021-2>
- Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., & Dinh, A. (2021). Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology*, 82(11), 801–811. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.012>
- Ikadai, H., Tanaka, H., Shibahara, N., Matsuu, A., Uechi, M., Itoh, N., Oshiro, S., Kudo, N., Igarashi, I., & Oyamada, T. (2004). Molecular evidence of infections with *Babesia gibsoni* parasites in Japan and evaluation of the diagnostic potential of a loop-mediated isothermal amplification method. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(6), 2465–2469. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.6.2465-2469.2004>
- Irwin, P. J. (2009). Canine babesiosis: From molecular taxonomy to control. In *Parasites and Vectors* (Vol. 2, Issue SUPPL.1). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-S1-S4>

- Irwin, P. J. (2010). Canine Babesiosis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 40(6), 1141–1156. <https://doi.org/10.1016/J.CVSM.2010.08.001>
- Iwakami, S., Ichikawa, Y., & Inokuma, H. (2014). Molecular survey of *Babesia gibsoni* using *Haemaphysalis longicornis* collected from dogs and cats in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 76(9), 1313–1316. <https://doi.org/10.1292/jvms.14-0210>
- Jacobson, L. S. (2006). The South African form of severe and complicated canine babesiosis: Clinical advances 1994–2004. *Veterinary Parasitology*, 138(1–2), 126–139. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2006.01.047>
- Jalovecka, M., Hajdusek, O., Sojka, D., Kopacek, P., & Malandrino, L. (2018). The complexity of piroplasms life cycles. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 8, Issue JUL). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00248>
- Jefferies, R., Ryan, U. M., & Irwin, P. J. (2007). PCR-RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies. *Veterinary Parasitology*, 144(1–2), 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.09.022>
- Jefferies, R., Ryan, U. M., Jardine, J., Broughton, D. K., Robertson, I. D., & Irwin, P. J. (2007). Blood, Bull Terriers and Babesiosis: Further evidence for direct transmission of *Babesia gibsoni* in dogs. *Australian Veterinary Journal*, 85(11), 459–463. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2007.00220.x>

- Jefferies, R., Ryan, U. M., Jardine, J., Robertson, I. D., & Irwin, P. J. (2007). Babesia gibsoni: Detection during experimental infections and after combined atovaquone and azithromycin therapy. *Experimental Parasitology*, 117(2), 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.03.016>
- Jojima, F. S., Garcia, J. L., Fabretti, A., & Gasparini, M. R. (2008). *Protozzol_017*. <https://www.researchgate.net/publication/51441175>
- Karasová, M., Tóthová, C., Grelová, S., & Fialkovičová, M. (2022). The Etiology, Incidence, Pathogenesis, Diagnostics, and Treatment of Canine Babesiosis Caused by Babesia gibsoni Infection. In *Animals* (Vol. 12, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ani12060739>
- Kattoor, J. J., Nikolai, E., Quorollo, B., & Wilkes, R. P. (2022). Targeted Next-Generation Sequencing for Comprehensive Testing for Selected Vector-Borne Pathogens in Canines. *Pathogens*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/pathogens11090964>
- Kounosu, A., Murase, K., Yoshida, A., Maruyama, H., & Kikuchi, T. (2019). Improved 18S and 28S rDNA primer sets for NGS-based parasite detection. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52422-z>
- Kourout, M., Espich, S., Fisher, C., Tiper, I., Purkayastha, A., Smith, S., Santana-Quintero, L., & Duncan, R. (2024). Multiplex detection and identification of viral, bacterial, and protozoan pathogens in human blood and plasma using an expanded high-density resequencing microarray platform. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2024.1419213>

- Krawczak, F. da S., Calchi, A. C., Neves, L. C., Dias, S. A., da Silva, B. B. F., Paula, W. V. de F., de Paula, L. G. F., Tavares, M. A., Pádua, G. T., de Lima, N. J., Cardoso, E. R. N., Graziani, D., Dantas-Torres, F., & André, M. R. (2023). Phylogenetic Inferences Based on Distinct Molecular Markers Confirm a Novel *Babesia* Species (*Babesia goianiaensis* nov. sp.) in Capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) and Associated Ticks. *Microorganisms*, *11*(8). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11082022>
- Laha, R., Das, M., & Sen, A. (2015a). Morphology, epidemiology, and phylogeny of *Babesia*: An overview. *Tropical Parasitology*, *5*(2), 94. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.162490>
- Leiby, D. A. (2011). This article was published at www.annals.org on 6. In *Ann Intern Med* (Vol. 155). www.cste.org/dnn/LinkClick
- Leisewitz, A. L., Mrljak, V., Dear, J. D., & Birkenheuer, A. (2023). The Diverse Pathogenicity of Various *Babesia* Parasite Species That Infect Dogs. In *Pathogens* (Vol. 12, Issue 12). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/pathogens12121437>
- Leschnik, M., Kirtz, G., Tichy, A., & Leidinger, E. (2008). Seasonal occurrence of canine babesiosis is influenced by local climate conditions. *International Journal of Medical Microbiology*, *298*(SUPPL. 1), 243–248. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2008.03.008>
- Lira, J. J., Alvarez, A., & Pelaez, A. (2017). *First Molecular Detection of Babesia canis vogeli in Dogs and Rhipicephalus sanguineus from Mexico.* <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/blastn>

- Lobo, C. A., Cursino-Santos, J. R., Alhassan, A., & Rodrigues, M. (2013). Babesia: An Emerging Infectious Threat in Transfusion Medicine. *PLoS Pathogens*, 9(7). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003387>
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments*, 63. <https://doi.org/10.3791/3998>
- Malangmei, L., Ajith Kumar, K. G., Nandini, A., Bora, C. A. F., Varghese, A., Amrutha, B. M., Kurbet, P. S., Pradeep, R. K., Nimisha, M., Deepa, C. K., John, L., & Ravindran, R. (2021). Molecular Characterization of Hemoparasites and Hemoplasmas Infecting Domestic Cats of Southern India. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.597598>
- Marsch Martínez, M., Mayo, Z., Manuel, V., Olalde, R., Irepan, J., Moya, S., Rubén, O., & de, S. (2009). Universidad de Guanajuato. *Acta Universitaria*, 19(1), 21–29. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=41613013003>
- Mascarelli, P. E., Tartara, G. P., Pereyra, N. B., & Maggi, R. G. (2016). Detection of *Mycoplasma haemocanis*, *Mycoplasma haematoparvum*, *Mycoplasma suis* and other vector-borne pathogens in dogs from Córdoba and Santa Fé, Argentina. *Parasites and Vectors*, 9(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1920-8>
- Matijatko, V., Kiš, I., Torti, M., Brkljačić, M., Kučer, N., Rafaj, R. B., Grden, D., Živičnjak, T., & Mrljak, V. (2009). Septic shock in canine babesiosis. *Veterinary Parasitology*, 162(3–4), 263–270. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2009.03.011>

- Matsuu, A., Miyamoto, K., Ikadai, H., Okano, S., & Higuchi, S. (2006). Short report: Cloning of the *Babesia gibsoni* cytochrome b gene and isolation of three single nucleotide polymorphisms from parasites present after atovaquone treatment. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 74(4), 593–597. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2006.74.593>
- Matsuu, A., Ono, S., Ikadai, H., Uchide, T., Imamura, S., Onuma, M., Okano, S., & Higuchi, S. (2005). Development of a SYBR green real-time polymerase chain reaction assay for quantitative detection of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) DNA. In 569 *Brief Communications J Vet Diagn Invest* (Vol. 17).
- Maya-Delgado, A., Madder, M., Benítez-Ortíz, W., Saegerman, C., Berkvens, D., & Ron-Garrido, L. (2020). Molecular screening of cattle ticks, tick-borne pathogens and amitraz resistance in ticks of Santo Domingo de los Tsáchilas province in Ecuador. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 11(5). <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101492>
- Medina-Naranjo, V. L., Reyna-Bello, A., Tavares-Marques, L. M., Campos, A. M., Washington, J., Román, R.-, Moyano, J. C., Jarrín-Porras, C., Dayan Sandoval-Morejón, E., & Augusta Chávez-Larrea, M. (s.f.). *Diagnosis of *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma* spp. and *Babesia* spp. by elisa and pcr techniques in three livestock farms of Pastaza Province, Ecuador.*
- Mehlhorn, H., & Schein, E. (1993). The piroplasms: “A long story in short” or “Robert Koch has seen it.” *European Journal of Protistology*, 29(3), 279–293. [https://doi.org/10.1016/S0932-4739\(11\)80371-8](https://doi.org/10.1016/S0932-4739(11)80371-8)

- Melo, A. L. T., Witter, R., Martins, T. F., Pacheco, T. A., Alves, A. S., Chitarra, C. S., Dutra, V., Nakazato, L., Pacheco, R. C., Labruna, M. B., & Aguiar, D. M. (2016). A survey of tick-borne pathogens in dogs and their ticks in the Pantanal biome, Brazil. *Medical and Veterinary Entomology*, *30*(1), 112–116. <https://doi.org/10.1111/mve.12139>
- Merino, O., Alberdi, P., Pérez De La Lastra, J. M., & de la Fuente, J. (2013). Tick vaccines and the control of tick-borne pathogens. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 4, Issue JUL). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00030>
- Miga, K. H., Koren, S., Rhie, A., Vollger, M. R., Gershman, A., Bzikadze, A., Brooks, S., Howe, E., Porubsky, D., Logsdon, G. A., Schneider, V. A., Potapova, T., Wood, J., Chow, W., Armstrong, J., Fredrickson, J., Pak, E., Tigyi, K., Kremitzki, M., ... Phillippy, A. M. (2020). Telomere-to-telomere assembly of a complete human X chromosome. *Nature*, *585*(7823), 79–84. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2547-7>
- Milne, I., Bayer, M., Cardle, L., Shaw, P., Stephen, G., Wright, F., & Marshall, D. (2009). Tablet-next generation sequence assembly visualization. In *Bioinformatics* (Vol. 26, Issue 3, pp. 401–402). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp666>
- Milne, I., Stephen, G., Bayer, M., Cock, P. J. A., Pritchard, L., Cardle, L., Shawand, P. D., & Marshall, D. (2013). Using tablet for visual exploration of second-generation sequencing data. *Briefings in Bioinformatics*, *14*(2), 193–202. <https://doi.org/10.1093/bib/bbs012>
- Ministerio de Salud Pública. (2024). *GACETA-ENF-VECTORIALES-SE-9-2024 MSP*.

- Mishra, V. S., McElwain, T. F., Dame, J. B., & Stephens, E. B. (1992). Isolation, sequence and differential expression of the p58 gene family of *Babesia bigemina*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 53(1–2), 149–158. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(92\)90017-E](https://doi.org/10.1016/0166-6851(92)90017-E)
- Montenegro-James, S., Ristic, M., Toro Benitez, M., Leon, E., & Lopez, R. (1985). HETEROLOGOUS STRAIN IMMUNITY IN BOVINE BABESIOSIS USING A CULTURE-DERIVED SOLUBLE *BABESIA BO VIS* IMMUNOGEN. In *Veterinary Parasitology* (Vol. 18).
- Mosqueda, J., McElwain, T. F., & Palmer, G. H. (2002). *Babesia bovis* merozoite surface antigen 2 proteins are expressed on the merozoite and sporozoite surface, and specific antibodies inhibit attachment and invasion of erythrocytes. *Infection and Immunity*, 70(11), 6448–6455. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.11.6448-6455.2002>
- Mosqueda, J., McElwain, T. F., Stiller, D., & Palmer, G. H. (2002). *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 and rhoptry-associated protein 1 are expressed in sporozoites, and specific antibodies inhibit sporozoite attachment to erythrocytes. *Infection and Immunity*, 70(3), 1599–1603. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.3.1599-1603.2002>
- Mthethwa-Hlongwa, N. P., Amoah, I. D., Gomez, A., Davison, S., Reddy, P., Bux, F., & Kumari, S. (2024). Profiling pathogenic protozoan and their functional pathways in wastewater using 18S rRNA and shotgun metagenomics. *Science of the Total Environment*, 912. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.169602>
- Obeta, S. S., Ibrahim, B., Lawal, I. A., Natala, J. A., Ogo, N. I., & Balogun, E. O. (2020). Prevalence of canine babesiosis and their risk factors among asymptomatic dogs in the

federal capital territory, Abuja, Nigeria. *Parasite Epidemiology and Control*, 11. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2020.e00186>

Oxford Nanopore Technologies. (s.f.). *Data analysis V DATD_5000_v1_revW_11Dec2024*.

Oyamada, M., Davoust, B., Boni, M., Dereure, J., Bucheton, B., Hammad, A., Itamoto, K., Okuda, M., & Inokuma, H. (2005). Detection of *Babesia canis rossi*, *B. canis vogeli*, and *Hepatozoon canis* in dogs in a village of Eastern Sudan by using a screening PCR and sequencing methodologies. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(11), 1343–1346. <https://doi.org/10.1128/CDLI.12.11.1343-1346.2005>

Oyola, S. O., Gu, Y., Manske, M., Otto, T. D., O'Brien, J., Alcock, D., MacInnis, B., Berriman, M., Newbold, C. I., Kwiatkowski, D. P., Swerdlow, H. P., & Quail, M. A. (2013). Efficient depletion of host DNA contamination in malaria clinical sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(3), 745–751. <https://doi.org/10.1128/JCM.02507-12>

Panti-May, J. A., & Rodríguez-Vivas, R. I. (2020). Canine babesiosis: A literature review of prevalence, distribution, and diagnosis in Latin America and the Caribbean. In *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* (Vol. 21). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100417>

Pruthi, R. K., Marshall, W. F., Wiltsie, J. C., & Persing, D. H. (1995). Human Babesiosis. *Mayo Clinic Proceedings*, 70(9), 853–862. <https://doi.org/10.4065/70.9.853>

Quorollo, B. A., Archer, N. R., Schreeg, M. E., Marr, H. S., Birkenheuer, A. J., Haney, K. N., Thomas, B. S., & Breitschwerdt, E. B. (2017). Improved molecular detection of *Babesia*

infections in animals using a novel quantitative real-time PCR diagnostic assay targeting mitochondrial DNA. *Parasites and Vectors*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2064-1>

Rautenbach, Y., Schoeman, J., & Goddard, A. (2018). Prevalence of canine Babesia and Ehrlichia co-infection and the predictive value of haematology. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 85(1). <https://doi.org/10.4102/ojvr.v85i1.1626>

Redfield, R. R., Bunnell, R., Ellis, B., Kent, C. K., Leahy, M. A., Martinroe, J. C., Spriggs, S. R., Yang, T., Doan, Q. M., King, P. H., Starr, T. M., Yang, M., Jones, T. F., Boulton, M. L., Caine, V. A., Daniel, K. L., Fielding, J. E., Fleming, D. W., Halperin, W. E., ... Swanson, M. B. (2011). *Morbidity and Mortality Weekly Report Babesiosis Surveillance-United States, 2011-2015 Surveillance Summaries Centers for Disease Control and Prevention MMWR Editorial and Production Staff (Serials) MMWR Editorial Board.*

Rojas, A., Rojas, D., Montenegro, V., Gutiérrez, R., Yasur-Landau, D., & Baneth, G. (2014). Vector-borne pathogens in dogs from Costa Rica: First molecular description of Babesia vogeli and Hepatozoon canis infections with a high prevalence of monocytic ehrlichiosis and the manifestations of co-infection. *Veterinary Parasitology*, 199(3–4), 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.10.027>

Rotondano, T. E. de F., Almeida, H. K. A., Krawczak, F. da S., Santana, V. L., Vidal, I. F., Labruna, M. B., de Azevedo, S. S., de Almeida, A. M. P., & de Melo, M. A. (2015). Pesquisa de Ehrlichia canis, Babesia spp. e Hepatozoon spp. em cães de uma região

- semiárida do Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 24(1), 52–58.
<https://doi.org/10.1590/S1984-29612015011>
- Ruebush Ii, T. K., Cassaday, P. B., Marsh, H. J., Lisker, S. A., Voorhees, D. B., Mahoney, E. B., & Healy, G. R. (s.f.). *Human Babesiosis on Nantucket Island Clinical Features*.
<http://annals.org/pdfaccess.ashx?url=/data/journals/aim/19517/>
- Salih, D. A., Hussein, A. M. El, & Singla, L. D. (2015). Diagnostic approaches for tick-borne haemoparasitic diseases in livestock. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, 7(2), 45–56. <https://doi.org/10.5897/JVMAH2014>
- Sam-Yellowe, T. Y. (1996). Rhoptry organelles of the apicomplexa: Their role in host cell invasion and intracellular survival. *Parasitology Today*, 12(8), 308–316.
[https://doi.org/10.1016/0169-4758\(96\)10030-2](https://doi.org/10.1016/0169-4758(96)10030-2)
- Sanders, E. R. (2012). Aseptic laboratory techniques: Volume transfers with serological pipettes and micropipettors. *Journal of Visualized Experiments*, 63.
<https://doi.org/10.3791/2754>
- Sasaki, M., Omobowale, O., Tozuka, M., Ohta, K., Matsuu, A., Nottidge, H. O., Hirata, H., Ikadai, H., & Oyamada, T. (2007). Molecular Survey of *Babesia canis* in Dogs in Nigeria. In *J. Vet. Med. Sci* (Vol. 69, Issue 11).
- Sch Etters, T. P. M., Kleuskens, J., & Scholtes, N. (1998). Parasite localization and dissemination in the *Babesia*-infected host. In *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* (Vol. 92, Issue 4).

- Schnittger, L., Rodriguez, A. E., Florin-Christensen, M., & Morrison, D. A. (2012). Babesia: A world emerging. In *Infection, Genetics and Evolution* (Vol. 12, Issue 8, pp. 1788–1809). <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.07.004>
- Senthil, N. R., & Chakravarthi, R. (2023). Epidemiology of Canine Haemoprotozoan Diseases in Chennai, India. *Indian Journal of Animal Research*, 57(3), 372–376. <https://doi.org/10.18805/IJAR.B-4311>
- Seth-Smith, H. M. B., Harris, S. R., Scott, P., Parmar, S., Marsh, P., Unemo, M., Clarke, I. N., Parkhill, J., & Thomson, N. R. (2013). Generating whole bacterial genome sequences of low-abundance species from complex samples with IMS-MDA. *Nature Protocols*, 8(12), 2404–2412. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.147>
- Silva, A. B., Costa, A. P., De Sá, J. C., Costa, F. B., Dos Santos, A. C. G., & De Candanedo Guerra, R. D. M. S. N. (2012). Detecção molecular de Babesia canis vogeli em cães e em Rhipicephalus sanguineus na Mesorregião do Oeste Maranhense, Nordeste Brasileiro. *Ciencia Animal Brasileira*, 13(3), 388–395. <https://doi.org/10.5216/cab.v13i3.18439>
- Simes, P. B., Cardoso, L., Arajo, M., Yisaschar-Mekuzas, Y., & Baneth, G. (2011). Babesiosis due to the canine Babesia microti-like small piroplasm in dogs - First report from Portugal and possible vertical transmission. *Parasites and Vectors*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-50>
- Skuce, P. J., Mallon, T. R., & Taylor, S. M. (1996). Molecular cloning of a putative rhoptry associated protein homologue from Babesia divergens. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 77(1), 99–102. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(96\)02570-4](https://doi.org/10.1016/0166-6851(96)02570-4)

- Solano-Gallego, L., & Baneth, G. (2011). Babesiosis in dogs and cats—Expanding parasitological and clinical spectra. *Veterinary Parasitology*, *181*(1), 48–60. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2011.04.023>
- Solano-Gallego, L., Sainz, Á., Roura, X., Estrada-Peña, A., & Miró, G. (2016). A review of canine babesiosis: The European perspective. In *Parasites and Vectors* (Vol. 9, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1596-0>
- Solano-Gallego, L., Trotta, M., Carli, E., Carcy, B., Caldin, M., & Furlanello, T. (2008). *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease. *Veterinary Parasitology*, *157*(3–4), 211–221. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.07.024>
- Srinivasan, S., Moody, A.H., & Chiodini, P. (2000). Comparison of blood-film microscopy, the OptiMAL dipstick, Rhodamine-123 fluorescence staining and PCR, for monitoring antimalarial treatment. *Annals of tropical medicine and parasitology*, *94* 3, 227-32 .
- Stuen, S. (2020). Haemoparasites—challenging and wasting infections in small ruminants: A review. In *Animals* (Vol. 10, Issue 11, pp. 1–12). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ani10112179>
- Sun, T., Tenenbaum, M. J., Greenspan, J., Teichberg, S., Wang, R.-T., Degnan, T., & Kaplan, M. H. (1983). Morphologic and Clinical Observations in Human Infection with *Babesia microti*. In *THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES* (Vol. 148, Issue 2). <http://jid.oxfordjournals.org/>

- Sundararaman, B., Vershinina, A. O., Hershauer, S., Kapp, J. D., Dunn, S., Shapiro, B., & Green, R. E. (2023). A method to generate capture baits for targeted sequencing. *Nucleic Acids Research*, *51*(13), E69–E69. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad460>
- Suzuki, K., Wakabayashi, H., Takahashi, M., Fukushima, K., Yabuki, A., & Endo, Y. (2007). A Possible Treatment Strategy and Clinical Factors to Estimate the Treatment Response in *Babesia gibsoni* Infection. In *J. Vet. Med. Sci* (Vol. 69, Issue 5).
- Temoche, L. C., Assad, R., Seabra-Junior, E. S., Lemos, T. D., & Almosny, N. (2018). Frequency of *Babesia vogeli* in domestic dogs in the metropolitan area of Piura, Peru. *Acta Veterinaria Brno*, *87*(3), 255–260. <https://doi.org/10.2754/avb201887030255>
- Tian, Z., Luo, J., Zheng, J., Xie, J., Shen, H., Yin, H., Luo, J., Tian, M., Yuan, X., Wang, F., & Liu, G. (2013). Phylogenetic analysis of *Babesia* species in China based on cytochrome b (COB) gene. *Infection, Genetics and Evolution*, *13*(1), 36–40. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2012.09.001>
- Uilenberg, G., Franssen, F. F., Perić, N. M., & Spanjer, A. A. (1989). Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. *The Veterinary Quarterly*, *11*(1), 33–40. <https://doi.org/10.1080/01652176.1989.9694194>
- Uluceme, M. C., Ozubek, S., & Aktas, M. (2024). Development and Evaluation of a Semi-Nested PCR Method Based on the 18S ribosomal RNA Gene for the Detection of *Babesia aktasi* Infections in Goats. *Veterinary Sciences*, *11*(10), 466. <https://doi.org/10.3390/vetsci11100466>

- Vargas-Hernández, G., André, M. R., Faria, J. L. M., Munhoz, T. D., Hernandez-Rodriguez, M., Machado, R. Z., & Tinucci-Costa, M. (2012). Molecular and serological detection of Ehrlichia canis and Babesia vogeli in dogs in Colombia. *Veterinary Parasitology*, 186(3–4), 254–260. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2011.11.011>
- Vierstraete, A. R., & Braeckman, B. P. (2022). Amplicon_sorter: A tool for reference-free amplicon sorting based on sequence similarity and for building consensus sequences. *Ecology and Evolution*, 12(3). <https://doi.org/10.1002/ece3.8603>
- Villalta, F., & Kierszenbaum, F. (1988). Establishment of clones of Trypanosoma cruzi 570-576. and characterization in vitro and in vivo. In *Rev. Inst. Med. Trop. Sa' o Paulo* (Vol. 35, Issue 4).
- Wang, J., Chen, K., Yang, J., Zhang, S., Li, Y., Liu, G., Luo, J., Yin, H., Wang, G., & Guan, G. (2022). Comparative genomic analysis of Babesia duncani responsible for human babesiosis. *BMC Biology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12915-022-01361-9>
- Wei, L., Kelly, P., Ackerson, K., Zhang, J., El-Mahallawy, H. S., Kaltenboeck, B., & Wang, C. (2014). First report of Babesia gibsoni in Central America and survey for vector-borne infections in dogs from Nicaragua. *Parasites and Vectors*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-126>
- Wong, S. S. Y., Fung, K. S. C., Chau, S., Poon, R. W. S., Wong, S. C. Y., & Yuen, K. Y. (2014). Molecular diagnosis in clinical parasitology: When and why? *Experimental Biology and Medicine*, 239(11), 1443–1460. <https://doi.org/10.1177/1535370214523880>

- Wuyts, J., Van De Peer, Y., & De Wachter, R. (2001). Distribution of substitution rates and location of insertion sites in the tertiary structure of ribosomal RNA. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 29, Issue 24). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>.
- Yabsley, M. J., & Shock, B. C. (2013). Natural history of Zoonotic Babesia: Role of wildlife reservoirs. In *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* (Vol. 2, Issue 1, pp. 18–31). <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2012.11.003>
- Yang, Y. S., Murciano, B., Moubri, K., Cibrelus, P., Schetters, T., Gorenflot, A., Delbecq, S., & Roumestand, C. (2012). Structural and functional characterization of Bc28.1, major erythrocyte-binding protein from *Babesia canis* merozoite surface. *Journal of Biological Chemistry*, 287(12), 9495–9508. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.260745>
- Yin, C., Liu, Y., Guo, X., Li, D., Fang, W., Yang, J., Zhou, F., Niu, W., Jia, Y., Yang, H., & Xing, J. (2019). An Effective Strategy to Eliminate Inherent Cross-Contamination in mtDNA Next-Generation Sequencing of Multiple Samples. *Journal of Molecular Diagnostics*, 21(4), 593–601. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2019.02.006>
- Young, K. M., Corrin, T., Wilhelm, B., Uhland, C., Greig, J., Mascarenhas, M., & Waddell, L. A. (2019). Zoonotic Babesia: A scoping review of the global evidence. *PLoS ONE*, 14(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226781>
- Zahler, M., Rinder, H., Schein, E., & Gothe, R. (2000). Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. In *Veterinary Parasitology* (Vol. 89).

- Zhang, L., & Yang, K. (2014). Region-of-interest extraction based on frequency domain analysis and salient region detection for remote sensing image. *IEEE Geoscience and Remote Sensing Letters*, *11*(5), 916–920. <https://doi.org/10.1109/LGRS.2013.2281827>
- Zygner, W., Gójska-Zygner, O., & Norbury, L. J. (2023). Pathogenesis of Anemia in Canine Babesiosis: Possible Contribution of Pro-Inflammatory Cytokines and Chemokines—A Review. In *Pathogens* (Vol. 12, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020166>