



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Medicina Veterinaria**

**Escuela Profesional de Medicina Veterinaria**

**Identificación molecular de especies del género *Babesia*  
*spp.* en perros con antecedentes de garrapatas del  
distrito de Ventanilla**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

**AUTOR**

Erick Ronaldo ARIAS OTOYA

**ASESOR**

Mg. Luis Antonio HOYOS SIFUENTES

Lima, Perú

2023



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Arias E. Identificación molecular de especies del género *Babesia spp.* en perros con antecedentes de garrapatas del distrito de Ventanilla [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2023.

---

## Metadatos complementarios

<b>Datos de autor</b>	
Nombres y apellidos	Erick Ronaldo Arias Otoyá
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	71329473
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0000-0001-9922-3447">https://orcid.org/0000-0001-9922-3447</a>
<b>Datos de asesor</b>	
Nombres y apellidos	Luis Antonio Hoyos Sifuentes
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	41175479
URL de ORCID	0000-0003-4432-3904
<b>Datos del jurado</b>	
<b>Presidente del jurado</b>	
Nombres y apellidos	María Teresa López Urbina
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09145647
<b>Miembro del jurado 1</b>	
Nombres y apellidos	Luis Antonio Hoyos Sifuentes
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	41175479
<b>Miembro del jurado 2</b>	
Nombres y apellidos	Luis Antonio Gómez Puerta
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	10810335
<b>Miembro del jurado 3</b>	
Nombres y apellidos	Luis Fernando Cerro Temoche
Tipo de documento	DNI

Número de documento de identidad	41341572
<b>Datos de investigación</b>	
Línea de investigación	B.4.1.9. Patología clínica y Biología molecular
Grupo de investigación	Círculo Profesional de Investigación de Enfermedades Zoonóticas transmitidas por vectores del Perú (Zoovec), Facultad de Medicina Veterinaria - Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
Agencia de financiamiento	Laboratorio de Patología Clínica Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria - Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Programa de Promoción de Tesis de Pregrado. A21081341
Ubicación geográfica de la investigación	Lugar: Laboratorio de Patología Clínica, Facultad de Medicina Veterinaria ubicada en Av. Circunvalación 2800, San Borja, Lima-Perú (-12.080729, -76.987032)  Lugar: Hospital Veterinario de Ventanilla ubicado en Av. Pedro Beltrán Calle 6 S/N Urb. Satélite Callao, Lima-Perú (-11.872032735258934, -77.1244071948003)
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2020- 2023
URL de disciplinas OCDE	4.03.01 -- Ciencia veterinaria URI: <a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.01">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.01</a>



## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el Auditorio Principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día **martes 28 de noviembre de 2023**, a las **11:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N°0232-EPMV/FMV-2023, integrado por los siguientes profesores:

<b>MV. Dra. López Urbina María Teresa</b>	<b>Presidente del Jurado</b>
<b>MV. Mg. Hoyos Sifuentes Luis Antonio</b>	<b>Asesor de la Tesis</b>
<b>MV. Mg. Gómez Puerta Luis Antonio</b>	<b>Miembro del Jurado</b>
<b>MV. Dr. Cerro Temoche Luis Fernando</b>	<b>Miembro del Jurado</b>

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, el Bachiller Don: **ERICK RONALDO ARIAS OTOYA**, para optar el Título Profesional de Médico Veterinaria, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

### “IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES DEL GÉNERO *Babesia* spp. EN PERROS CON ANTECEDENTES DE GARRAPATAS DEL DISTRITO DE VENTANILLA”

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria de la Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **dieciocho (18)**.

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las ..... horas, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:

.....  
López Urbina María Teresa: MV. Dra. Prof. Principal DE



Firmado digitalmente por HOYOS  
SIFUENTES Luis Antonio FAU  
20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 30.12.2023 14:18:01 -05:00

.....  
Hoyos Sifuentes Luis Antonio: MV. Mg. Prof. Asociado TC

.....  
Gómez Puerta Luis Antonio: MV. Mg. Prof. Auxiliar TC

.....  
Cerro Temoche Luis Fernando: MV. Dr. Prof. Auxiliar TC



Universidad Nacional Mayor de San Marcos  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
Facultad de Medicina Veterinaria  
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria  
[ep.veterinaria@unmsm.edu.pe](mailto:ep.veterinaria@unmsm.edu.pe)



## CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo Luis Hoyos Sifuentes en mi condición de asesor según consta Dictamen N° 0183-EPMV/FMV-2020 de aprobación del proyecto de investigación, cuyo título es “Identificación molecular de especies del género Babesia spp. en perros con antecedentes de garrapatas del distrito de Ventanilla”, presentado por el bachiller Erick Ronaldo Arias Otoyá para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud del Proyecto de investigación. Según la revisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de 10% de similitud, nivel PERMITIDO para continuar con los trámites correspondientes y para su publicación en el repositorio institucional.

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención título Profesional correspondiente.



Firmado digitalmente por HOYOS  
SIFUENTES Luis Antonio FAU  
20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 14.03.2024 19:22:29 -05:00

---

Firma del Asesor

DNI: 41175479

Mv. Mg. Luis Antonio Hoyos Sifuentes



## **DEDICATORIA**

**Dedico este trabajo completamente a mis padres Patricia y Florentino por todo su amor y soporte que me permiten día a día ser mejor persona y profesional. Así mismo agradezco a mi hermano Leycester por su incondicional apoyo y a mi abuelita así como al “pequeño de cuatro patas” Doggi, por ser los ángeles que me cuidan desde el cielo.**



## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Dr. Luis Hoyos Sifuentes por su apoyo incondicional y la confianza depositada en mí para desarrollar este trabajo bajo su asesoría compartiéndome siempre conocimientos que me hicieron crecer profesionalmente.

Al doctor Miguel Rojas y el Doctor Luis Cerro por sus enseñanzas, tiempo y conocimientos en la parte molecular que me permitieron complementar y terminar este estudio.

Al equipo del laboratorio de Patología clínica, Miguel y Álvaro, por su orientación académica y más que colegas los considero mis amigos; asimismo a mi novia Carol por su amor incondicional y paciencia para continuar este bonito camino proyectado. Por último y no menos importante a Christian y Andrea del laboratorio de Microbiología sección inmunología que me apoyaron junto con el doctor Rojas a culminar la parte molecular

A la Doctora Silvia Pesquera, gerente del Hospital veterinario Municipal “Somos Patas” de Ventanilla y al equipo completo de la veterinaria por permitirme y facilitarme la toma muestras en sus instalaciones para el estudio.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA .....	1
AGRADECIMIENTOS.....	2
ÍNDICE DE CONTENIDO .....	3
RESUMEN .....	5
ABSTRACT .....	6
LISTA DE CUADROS.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE APÉNDICES .....	1
I. INTRODUCCIÓN .....	2
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 BABESIOSIS CANINA .....	5
2.1.1. MORFOLOGÍA.....	5
2.1.2. TAXONOMIA Y ETIOLOGÍA .....	6
2.1.3. EPIDEMIOLOGÍA .....	7
2.1.4. METODOS DIAGNOSTICO .....	14
2.1.5. TRATAMIENTO.....	18
2.1.6. PREVENCIÓN Y CONTROL.....	19
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO .....	21
3.2. LUGAR Y ÉPOCA DE EJECUCIÓN DEL ESTUDIO .....	21
3.3. DESCRIPCIÓN DE MATERIAL EXPERIMENTAL.....	22
3.3.1. SELECCIÓN DE CANES Y TAMAÑO DE MUESTRA.....	22
3.3.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN.....	22
3.3.3. MATERIALES DE TOMA Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS.....	22
3.3.4. MATERIALES DE LABORATORIO PARA EL EXAMEN HEMATOLÓGICO.....	23
3.3.5. MATERIALES DE LABORATORIO PARA EXAMEN MOLECULAR .....	23
3.4. MÉTODOS.....	24
3.4.1. TOMA DE MUESTRA .....	24
3.4.2. EVALUACIÓN HEMATOLOGICA .....	26
3.4.3. IDENTIFICACIÓN DIRECTA DE MICROORGANISMOS COMPATIBLES CON <i>BABESIA</i> SPP.	30

3.4.4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR.....	30
3.5. ANÁLISIS DE DATOS.....	35
3.6. CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	35
IV. RESULTADOS .....	36
V. DISCUSIÓN.....	45
VI. CONCLUSIONES .....	49
VII. RECOMENDACIONES.....	50
VIII. BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	51
IX. APÉNDICE .....	60

## RESUMEN

La babesiosis canina es una parasitosis emergente de importancia mundial, causada por protozoarios del género *Babesia* spp., los cuales son transmitidos por garrapatas. siendo las especies *canis*, *vogeli* y *gibsoni* las de mayor frecuencia. En nuestro país, pese a tener un clima tropical con una alta prevalencia de garrapatas además de múltiples reportes en países colindantes sobre el incremento de casos positivos; existen pocos reportes de la presencia de *Babesia* spp. en perros del Perú. El objetivo del presente estudio fue identificar las especies de *Babesia* spp. en perros del distrito de Ventanilla, Callao mediante el uso de técnicas hematológicas y moleculares. Se colectaron muestras de sangre venosa y capilar de 50 perros aparentemente sanos con antecedentes de garrapatas de al menos 1 mes, provenientes del Hospital Veterinario Municipal “Somos Patas” de Ventanilla (Callao, Perú). Su evaluación se realizó mediante el uso de pruebas hematológicas y moleculares. El hallazgo hematológico evidenció que el 20% (10/50) fueron positivos a *Babesia* spp. (inclusiones intraeritrocíticas piriformes a manera de “gota de agua”). Para la detección molecular se hizo uso del gen *18S ARNr* y la región *ITS-1*, la cual evidenció que el 26% (13/50) del total fueron positivos únicamente a *Babesia vogeli*. El secuenciamiento genético se realizó a dos muestras positivas y mostraron un alto grado de similitud (99-100%) con secuencias de *Babesia vogeli* de aislados de China, India y Brasil depositadas en el GenBank. De esta manera, nuestros resultados evidencian la presencia de *Babesia vogeli* en perros con antecedentes de garrapatas de al menos 1 mes del distrito de Ventanilla, que ayudarán a un mejor entendimiento de la epidemiología de babesiosis canina en Perú y promover un programa de control eficaz, no obstante, se requieren más estudios con mayor número de animales para poder confirmar la presencia de otras especies de *Babesia* en otros distritos y su respectiva prevalencia.

**Palabras clave:** *Babesia* spp., perros, garrapatas, *18S ARNr*, *ITS-1* Ventanilla

## ABSTRACT

Canine babesiosis is an emerging parasitosis of worldwide importance, caused by protozoa of the genus *Babesia* spp., which are transmitted by ticks. In our country despite having a tropical climate with a high prevalence of ticks, in addition to multiple reports in neighboring countries on the increase in positive cases, the *canis*, *vogeli* and *gibsoni* species being the most frequent; there are few reports of the presence of *Babesia* spp. in dogs from Peru. The objective of the present study was identifying the species of *Babesia* spp. in dogs from Ventanilla district, Callao through the use of hematological and molecular techniques. Venous and capillary blood samples were collected from 50 apparently healthy dogs with a history of ticks of at least 1 month, from the Municipal Veterinary Hospital "Somos Patas" in Ventanilla (Callao, Peru). Its evaluation was carried out through the use of hematological and molecular tests. The hematological finding showed that 20% (10/50) were positive for *Babesia* spp. ("water drop" like intraerythrocytic inclusions). For molecular detection, the complete *18S rRNA* and the *ITS-1* region were used, which showed that 26% (13/50) of the total were positive only for *Babesia vogeli*. The genetic sequencing was carried out in two positive samples and they showed a high degree of similarity (99-100%) with *Babesia vogeli* sequences from isolates from China, India and Brazil deposited in GenBank. Thus, our results show the presence of *Babesia vogeli* in dogs with a history of ticks of at least 1 month from the Ventanilla district, that will help to better understand the epidemiology of canine babesiosis in Peru and promote an effective control program, however, further studies with a greater number of animals are required to confirm the presence of other *Babesia* species in other districts and its prevalence.

**Keywords:** *Babesia* spp, dogs, ticks, 18S rRNA, ITS-1 Ventanilla.

## LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1.** Especies de Babesias que afectan al perro a nivel mundial. Adaptado de Irwin (2009).
- Cuadro 2.** Diseño de primers para amplificar fragmentos específicos de la región *ITS-1* del género *Babesia vogeli* y *Babesia gibsoni* mediante PCR multiplex (*Babesia vogeli*=245pb, *Babesia gibsoni*= 454pb).
- Cuadro 3.** Diseño de primers para amplificar el gen completo *18S ARNr* del género *Babesia* mediante PCR (1591pb).
- Cuadro 4.** Datos de aislados de *Babesia canis*, *Babesia vogeli*, *Babesia gibsoni* y *Babesia microti* obtenidos del GenBank e incluidos en el análisis de las secuencias del gen *18S ARNr* y la región *ITS 1*. (\*): hecho en roedores
- Cuadro 5.** Esquema general de los hallazgos hematológicos y moleculares de 50 perros con antecedentes de garrapatas de al menos 1 mes del distrito de Ventanilla (Callao - Perú)

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Morfología de *Babesia* spp.
- Figura 2.** Ciclo Biológico de *Babesia* spp.
- Figura 3.** Preparación de un frotis de sangre capilar obtenida de la punta de la oreja.
- Figura 4.** Técnica del *Buffy Coat*
- Figura 5.** Frotis sanguíneo de inclusiones intraeritrocíticas compatibles con *Babesia* spp. Tinción Wright 1000x
- Figura 6.** Gel de electroforesis de los productos de amplificación de PCR Multiplex usando la región *ITS 1*. 1era etapa
- Figura 7.** Gel de electroforesis de los productos de amplificación de PCR Multiplex usando la región *ITS 1*. 2da etapa
- Figura 8.** Gel de electroforesis de los productos de amplificación de PCR Multiplex usando la región *ITS 1*. 3era etapa
- Figura 9.** Gel de electroforesis de los productos de amplificación de PCR convencional usando el Gen completo *18S ARNr*
- Figura 10.** Alineación de secuencias de nucleótidos del gen completo *18S ARNr* (10a) y la región *ITS 1* (10b) de *Babesia vogeli* de diversas partes del mundo y las muestras obtenidas en este estudio (Muestra 47 y 48).
- Figura 11.** Árbol filogenético generado a partir de la región *ITS 1* del gen *18S ARNr* de los aislados autóctonos de *B. vogeli* “Muestra 47” y “Muestra 48” comparados con otras secuencias de *Babesias* correspondientes del GenBank mediante el método “neighbor-joining” con 1.000 réplicas bootsrap y la distancia evolutiva ajustada mediante el parámetro “Kimura-2”. Los números de acceso de GenBank se muestran en el árbol

## LISTA DE APÉNDICES

**Apéndice 1.** Los niveles celulares de serie roja, blanca y plaquetaria de los 50 perros con antecedentes de garrapatas de al menos 1 mes del distrito de Ventanilla

**Apéndice 2.** Los niveles celulares de serie roja, blanca y plaquetaria que complementen el análisis hematológico

**Apéndice 3.** Consentimiento informado



## I. INTRODUCCIÓN

La babesiosis canina es una enfermedad parasitaria cosmopolita ocasionada por protozoarios del género *Babesia* que afectan a perros de diferente raza, edad y procedencia (*Babesia canis*, *Babesia gibsoni* y *Babesia vogeli*), y accidentalmente al hombre (*Babesia microti* y *Babesia divergens*) (Gray *et al.*, 2010; Araujo *et al.*, 2015; Cerro *et al.*, 2018; Eiras, 2018).

La severidad de la signología está asociada a la especie de *Babesia*, manifestándose clínicamente como una enfermedad relativamente leve a moderada con fiebre, letargia y anorexia (*Babesia canis*, *Babesia vogeli*, *Babesia gibsoni*) o presentar un cuadro agudo súbito con vómitos, diarreas, fallo renal y shock, llevando a la muerte (*Babesia rossi*) (Camacho *et al.*, 2003; Schetters *et al.*, 2009; Solano-Gallego y Baneth, 2011).

El diagnóstico hematológico por frotis sanguíneo que busca revelar la presencia de merozoitos como inclusiones intraeritrocíticas a manera de "gotas de agua" bipolares o en forma piriforme (Passos *et al.*, 2005) ha sido muy empleado y consensuado en diferentes estudios, no obstante, no suele ser una prueba confirmatoria. (Böse *et al.*, 1995). Las pruebas serológicas han sido una de las más empleadas siendo útil para identificar

perros portadores asintomáticos (infección activa) e infecciones crónicas; sin embargo, existe la probabilidad de presentar reacciones cruzadas con otros apicomplexos (Furuta *et al.*, 2009). En ese sentido, las técnicas moleculares actualmente son necesarias para un diagnóstico confirmatorio e identificación de la especie implicada (Araujo *et al.*, 2015; Paulauskas *et al.*, 2014), como lo aplicó Cerro *et al.* (2018) hallando una frecuencia de 1.4% de *Babesia vogeli* en perros del área metropolitana de Piura, a través de análisis molecular.

Ventanilla es uno de los distritos de la Provincia Constitucional del Callao, Lima-Perú con un clima subtropical desértico (Temperatura promedio de 15 °C a 27 °C), que ha experimentado un acelerado desarrollo demográfico que propicia la creación de múltiples viviendas, algunas a medio construir, así como, el inadecuado control sanitario sobre los animales callejeros, resultando así en la creación de microhábitats ideales para la proliferación de garrapatas (García *et al.*, 2007). Rendón *et al.* (2018) realizaron un estudio sobre parámetros demográficos en la población canina de Ventanilla, donde se estimó que el 61.9% de viviendas poseía perros, la relación perro-habitante fue de 1/3.98 y el 23% de encuestados manifestó mantener perros vagabundos en el exterior de sus viviendas a modo de protección.

En la actualidad, la importancia de la babesiosis canina no solo radica en regiones tropicales y subtropicales; sino también en aquellas con climas fríos como Europa y Asia donde los reportes y casos clínicos van en incremento, incluso con nuevas especies de *Babesia* que no coincide con la presencia de la especie de vector en común (Eiras, 2018). Debido a que muchas veces esta enfermedad clínicamente es confundida con infecciones inespecíficas (Solano-Gallego *et al.*, 2016), sumado a que los diagnósticos moleculares no son económicamente factibles, convierten a muchos canes subdiagnosticados en pacientes crónicos de la enfermedad (portadores asintomáticos). Por tal motivo, conocer la epidemiología de las especies de *Babesia* presente en nuestro país, es de vital importancia para la clínica diaria con el fin de brindar un panorama más amplio sobre la presencia de diferentes especies de *Babesia* y poder así realizar un diagnóstico certero. Mas aún en zonas donde las condiciones medioambientales permiten la alta incidencia de garrapatas (vector), donde los tratamientos a Ehrlichiosis canina, la cual se ha convertido en un diagnóstico clínico rutinario, no ofrecen resultados esperados y donde los casos positivos a *Babesia spp.* mediante observación

directa ha sido reportado, a manera de comunicación verbal, en diferentes laboratorios veterinarios procedentes de distintas zonas de Lima. Según lo descrito previamente, el objetivo del presente estudio fue la identificación de especies del género *Babesia* spp. presentes en perros del distrito de Ventanilla (Callao, Perú) mediante el uso de técnicas moleculares. Como hipótesis se plantea que existe evidencia molecular de *Babesia vogeli* en perros de Ventanilla, Perú.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 BABESIOSIS CANINA

La babesiosis canina, es una enfermedad parasitaria de distribución mundial ocasionada por protozoarios del género *Babesia* spp. los cuales son transmitidos por diferentes especies de garrapatas (Irwin, 2009; Dantas-Torres y Figueredo, 2006). Clínicamente, se observa inapetencia, letargia y fiebre, mientras que, en la hematología se evidencia anemia hemolítica, linfopenia y trombocitopenia, aspectos que varía según el género de *Babesia* involucrado (Eiras, 2018).

#### 2.1.1. MORFOLOGÍA

*Babesia* spp. presenta una morfología pleomórfica, variando desde piriforme hasta ameboide; donde la primera se observa como inclusiones eritrocitarias con un extremo afilado y otro redondeado, dependiendo de la variedad genética de este parásito presentes en el mundo, de los cuales 20 especies son de interés veterinario. (Vignau *et al.*, 2005; Matsuu *et al.* 2005)

Vignau *et al.* (2005) sostienen la presencia de un núcleo haploide, ausencia de conoide en el complejo apical y la participación de las roptrias que son cuerpos secretores cuya función principal es facilitar el ingreso a los eritrocitos, asimismo, no forma ooquistes (Vignau *et al.*, 2005). (Figura 1).

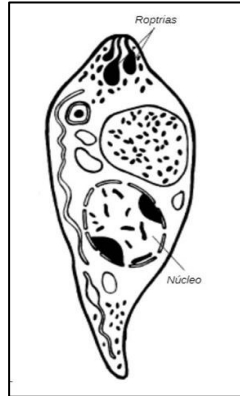


Figura 1. Morfología de *Babesia* spp. (Vignau *et al.*, 2005)

### 2.1.2. TAXONOMIA Y ETIOLOGÍA

*Babesia* pertenece al Phylum Apicomplexa, Clase Aconoidasida y Orden Piroplasmida (Lau, 2009). A inicios del siglo XX, se propuso una clasificación basada en el tamaño de los trofozoítos, donde se estableció el grupo de macrobabesias (tamaño promedio de 3-5µm) como *Babesia canis* y microbabesias (tamaño promedio de 1-3 µm) como *Babesia gibsoni*. No obstante, Reichenow (1935) en aquel entonces ya avizoraba una distinción entre tres subespecies de macrobabesias (*Babesia canis*) en función a su patogenicidad (principalmente entre *B. rossi* y *B. vogeli*). Finalmente, se adaptó una nomenclatura basada en los trabajos de Uilenberg *et al.* (1989), Carret *et al.* (1999) y Allsopp, B. y Allsopp, M., (2006) donde se determinó las diferentes subespecies de *Babesia canis* utilizando como criterios: la biología molecular, patogenicidad, especificidad del vector, serología e inmunidad cruzada, clasificándolas como *B. canis canis*, *B. canis vogeli* y *B. canis rossi*.

Los últimos estudios, basados en la caracterización del gen *18S ARNr*, de los loci del espaciador transcrito interno 1 y 2 (*ITS 1* e *ITS 2*) así como la región codificante 5.8S del gen ARN; demostraron que las subespecies de *Babesia canis* como *B. canis*, *B.*

*rossi* y *B. vogeli* son filogenéticamente diferentes, considerándolas como especies independientes (Carret *et al.*, 1999; Allsopp B. y Allsopp M., 2006).

Hasta la actualidad, se han reportado más de cien especies de *Babesia*, también conocidas como piroplasmas, ya que comparten similitud fenotípica con *Theileria* y *Rangelia* (Irwin, 2009). Las diferencias entre los géneros *Babesia* y *Theileria* se fundamentan en el ciclo evolutivo (*Theileria* posee una fase pre-eritrocítica donde el protozooario comienza su multiplicación en macrófagos y Linfocitos), la forma de transmisión (*Babesia* posee la capacidad de transmisión transovárica y transestadial, mientras que en *Theileria* solo esta última) y la localización de la fase asexual dentro del hospedador vertebrado, no obstante, siempre existen excepciones y continuas actualizaciones (Uilenberg, 2006; Eiras, 2018; Lemos, 2014). Adicionalmente *Theileria* solo ha sido reportado en Brasil y en cánidos silvestres de Venezuela (Criado-Fornelio *et al.*, 2007; Lemos 2014).

Respecto al género *Rangelia* los estudios son limitados, donde se ha descrito solamente la especie *Rangelia vitalii*, transmitido por la garrapata *Amblyomma aureolatum* con distribución en Brasil, noreste de Argentina y Uruguay (Eiras, 2018; Lemos, 2014). *Rangelia vitalii* era confundida con *Babesia canis* por su morfología similar y la manifestación de sus signos clínicos, no obstante, en el año 2011, Soares *et al.* (2011) realizó la primera caracterización molecular de este hemoparásito haciendo uso de los genes *18S ARNr* y *hsp70*, acompañado de un signo característico como es el sangrado espontáneo. Por tal motivo, los diferentes patrones moleculares, clínicos, patológicos y epidemiológicos permitieron la diferenciación entre especies (Lemos, 2014).

### **2.1.3. EPIDEMIOLOGÍA**

La babesiosis canina afecta a perros de diferente edad, raza o procedencia, donde los reportes indican un incremento de casos en las zonas urbanas de América del Sur y Europa (Fraga, 2009). Las especies más reportadas en todos el mundo son cuatro: *Babesia vogeli*, *Babesia canis*, *Babesia gibsoni*, *Babesia rossi*, siendo las primeras tres reportadas en diferentes países de Europa, Asia y América Latina, mientras que esta

última solo reportada en países del África de acorde a la distribución estricta del vector en ese continente (Eiras,2018).

### **2.1.3.1. VECTOR Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA**

La distribución de la babesiosis es cosmopolita, la presencia de una determinada especie depende de la presencia de la garrapata (vector) que se encuentre en la zona geográfica, por su especificidad de vector (Solano-Gallego y Baneth, 2011).

Las garrapatas transmiten una amplia gama de agentes patógenos (algunos de potencial zoonótico), siendo *Rhipicephalus sanguineus* la especie de mayor importancia en América del Sur por su distribución y capacidad de transmisión de *Babesia* spp. (Dantas-Torres *et al.*, 2013; Navarrete *et al.*, 2016). Estares *et al.* (2000) evaluaron la prevalencia de garrapatas en perros de Lima, principalmente en distritos de Independencia, Comas, San Martín de Porras, Ventanilla y San Juan de Lurigancho, calculando una prevalencia de 30% de *Rhipicephalus sanguineus*.

#### ***Babesia canis***

*Babesia canis* es transmitida por la garrapata *Dermacentor reticulatus* y considerada endémica en el norte de Europa y Asia. Su patogenicidad es intermedia en relación a las otras especies, manifestándose apatía, letargia y mucosas pálidas. Las formas severas presentan signos variables como fiebre, epistaxis, vómitos, anemia y presencia de petequias. La mortalidad es baja y muchas veces está asociada a una disfunción multiorgánica (Trotz-Williams y Trees, 2003; Irwin,2009; Wang *et al.*, 2019).

#### ***Babesia vogeli***

*Babesia. vogeli*, transmitida por la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*, está ampliamente distribuido en todo el mundo, con reportes en el sur de Europa, Estados Unidos, África, Japón, Australia. En la última década se ha observado un incremento de casos en América del Sur como Brasil, Argentina y Colombia (Trotz-Williams y Trees, 2003; Jefferies *et al.*, 2007a; Irwin, 2009; Eiras, 2018).

Su amplia distribución está asociada a la distribución de su vector, *Rhipicephalus sanguineus*. Asimismo, alta adaptabilidad de este ectoparásito a diferentes climas es debido a su característica de endofilia que le permite tolerar regiones más frías de

Europa central y las Islas Británicas (Hansford *et al.*, 2014; Solano-Gallego *et al.*, 2016).

De las tres especies de *Babesia* de importancia clínica en América del Sur, es considerada la menos patógena por lo que generalmente es acompañada de anemia y trombocitopenia como alteraciones hematológicas resaltantes, y de signos leves a moderados hasta incluso ser asintomático en el animal. No obstante, en cachorros puede ser llegar a ser mortal debido a la anemia hemolítica que produce en este grupo etario (Fraga, 2009; Solano-Gallego y Baneth, 2011).

### ***Babesia gibsoni***

*Babesia gibsoni* es transmitida por garrapatas *Haemaphysalis bispinosa*, *Haemaphysalis longicornis* y *Rhipicephalus sanguineus*. Ocasiona signos moderados a severos como fiebre, vómitos, diarreas, anemia hemolítica y lesiones como esplenomegalia y hepatomegalia. Es endémica en Asia, África, Europa, con pocos reportes en Nicaragua, EE.UU. y Australia (Birkenheuer *et al.*, 1999, Criado-Fornelio *et al.*, 2007; Irwin, 2009; Wei *et al.*, 2014) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Especies de *Babesias* que afectan al perro a nivel mundial. Adaptado de Irwin (2009).

Tamaño	Especie	Sinónimos	Vector en perros	Distribución geográfica
Macro babesias	<i>Babesia vogeli</i>	<i>Babesia canis vogeli</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Extensa distribución: Zonas tropicales y subtropicales
	<i>Babesia canis</i>	<i>Babesia canis canis</i>	<i>Dermacentor reticulatus</i>	Europa y Asia
	<i>Babesia rossi</i>	<i>Babesia canis rossi</i>	<i>Haemaphysalis elliptica</i>	África del Sur de Sahara y Sudáfrica
Microbabesias	<i>Babesia gibsoni</i>	<i>Babesia gibsoni</i> cepa Asiática ( <i>sensu stricto</i> )	<i>Haemaphysalis sp.</i> <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Asia incluyendo Japón, Bangladesh y esporádico en América del Sur
	<i>Babesia conradae</i>	Cepa California	<i>Haemaphysalis sp.</i> <i>Rhipicephalus sp.</i>	Predominantemente en Asia



### 2.1.3.2.CICLO BIOLÓGICO

*Babesia* spp. presenta un ciclo de vida indirecto con la intervención de una garrapata dura (Ixodidae). El ciclo comienza con el ingreso de los esporozoítos al hospedador vertebrado (canino) a través de la saliva de la garrapata, estos organismos se adhieren a la membrana de los eritrocitos, dentro de ellos se alimentan y dividen por fisión binaria durante varias fases de reproducción asexual formando merozoítos que invaden otros eritrocitos. En una infección crónica, las *Babesias* permanecen en las redes capilares del bazo, hígado y otros órganos, liberándose periódicamente a la circulación, produciendo una parasitemia. Una vez ingeridas por una nueva garrapata, se llevan a cabo procesos de migración y reproducción sexual dentro del intestino de la garrapata (gamogonía y esporogonia), lo que resulta en la formación de esporozoítos en las células de las glándulas salivales (Figura 2). Si bien la transmisión por garrapatas es la principal fuente de infección, la babesiosis canina también puede ocurrir después de una transfusión de sangre infectada, transferencia transplacentaria y por intercambio sanguíneo mediante peleas (Irwin, 2012). En general, *Babesia* spp. se transmiten de manera transtadial de una etapa en el ciclo de vida de la garrapata a la siguiente, sin embargo, también está reportada también la transmisión transovárica a través de los huevos, infectando las nuevas generaciones de garrapatas, (Uilenberg, 2006)

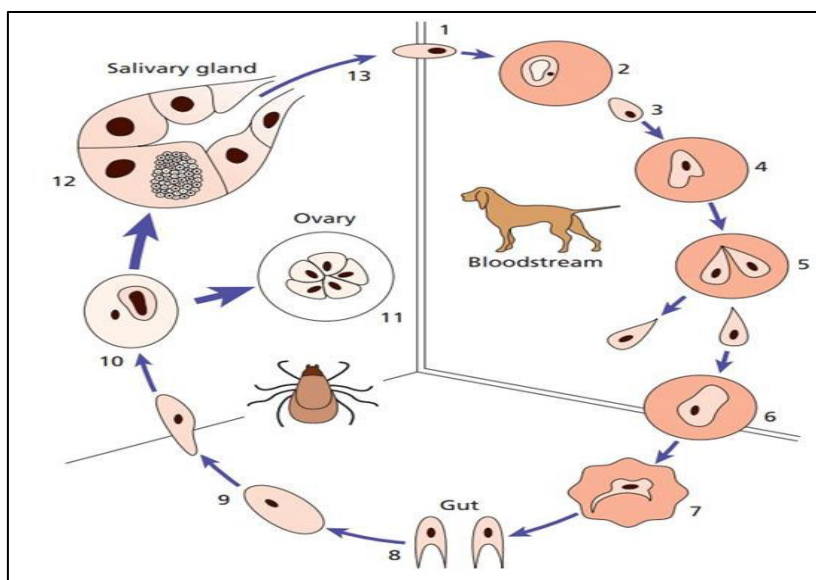


Figura 2. Ciclo Biológico de *Babesia* spp. (1) Los esporozoítos ingresan en el torrente sanguíneo. (2) Trofozoito. (3) Merozoito. (4) Fisión Binaria. (5) Par de trofozoítos. (6) Eritrocitos ingeridos por una nueva garrapata. (7) Lisis de eritrocitos en intestino de

garrapata. (8) Desarrollo y fusión del Gamonte. (9) Formación de Kinete. (10) Migración de Kinete desde el intestino a los ovarios y glándula salival. (11) Desarrollo de esporoquinatos en los ovarios (asegurando la transmisión transovárica). (12) Desarrollo de esporoquinatos para formar un esporonte multinuclear grande (que contiene muchos esporozoitos). (13) Liberación de los nuevos esporozoitos. (Mehlhorn, 1988)

### **2.1.3.3.PREVALENCIA Y FACTORES DE RIESGO**

El primer reporte de babesiosis canina en América del Sur se llevó a cabo en Brasil en 1948, encontrándose una frecuencia de 14% de *Babesia canis* (Paraense y Viana, 1948). Por otro lado, la primera caracterización molecular de *Babesia vogeli*, lo realizó Passos *et al.* (2005) con 5 perros procedentes de Mina Gerais y Sao Paulo, Brasil, mediante PCR y haciendo uso del gen *18S ARNr*, hallando una semejanza del 100% con aislados de España, Francia, Japón, Australia y Sudáfrica.

Un año más tarde, Sá *et al.* (2006) realizó el primer reporte de *Babesia vogeli* en el Estado de Río de Janeiro. Mientras que ese mismo año, Trapp *et al.* (2006) realizó la primera caracterización molecular de *Babesia gibsoni* en 16 perros de Paraná, Brasil mediante el análisis del gen *18S ARNr*. Esta última especie suele ser originario de Asia en relación con su vector la garrapata *Haemaphysalis* spp. como lo reporta Terao *et al.* (2015) donde determinó la primera detección molecular de *Babesia gibsoni* en 50 perros de Bangladesh. No obstante, debido a la capacidad de transmisión y distribución cosmopolita de *Rhipicephalus sanguineus*, el número de reportes en esta parte va en aumento a nivel mundial, como se muestra en EE. UU y Nicaragua (Zahler *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2014; Birkenheuer *et al.*, 2003).

Lemos (2014) identificó las especies de *Babesia* presentes en las regiones montañosas de Río de Janeiro, donde el 68% (34/50) presentaron positividad en la detección directa y a través de PCR se encontró una prevalencia de 8% a *Babesia vogeli*. Por otra parte, Araujo *et al.* (2015), realizó el estudio más actual, en donde evaluó 404 perros del Estado de Petronila, Pernambuco y halló mediante observación microscópica una prevalencia de 0.5% de *Babesia* spp., y por serología (IFA) y pruebas moleculares

(PCR) se determinó que *Babesia vogeli* era la especie implicada con una prevalencia de 57.9% y 6% respectivamente para cada prueba.

*Babesia vogeli* también ha sido identificada en otros países de América del Sur. En Venezuela en el año 2007, se realizó se encontró una prevalencia de 2.24% mediante PCR a través del uso del gen 18S ARNr y cuyo análisis filogenético, demostró que eran idénticos a los aislados de Japón y Brasil (Criado-Fornelio *et al.*, 2007). En el año 2008, en Argentina, se logró la primera detección molecular amplificando el gen *18S ARNr* en 2 perros con signos clínicos compatibles a babesiosis (Eiras *et al.*, 2008).

Por otro lado, en Colombia, Vargas-Hernández *et al.* (2012), identificaron por primera vez a *Babesia vogeli* mediante pruebas serológicas y moleculares (gen *18S ARNr*) en 91 muestras de sangre canina, encontrando una prevalencia de 51,6% y 5% respectivamente. En Ecuador, Olaya (2015) detectó *Babesia* spp. en perros de Guayaquil, hallando una frecuencia de 5% de *Babesia vogeli* mediante PCR y análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP). A nivel nacional, Cerro *et al.* (2018), evaluaron la frecuencia de *Babesia vogeli* en Piura mediante la aplicación de PCR-RFLP de un total de 212 perros hallando una frecuencia de 1.4%.

El riesgo de infección por *Babesia* está asociado principalmente a los antecedentes de garrapatas que guarda una estrecha relación con la estacionalidad del clima, en regiones tropicales y subtropicales. (Eiras, 2018). Asimismo, la transfusión de sangre y el contacto directo de heridas entre individuos infectado y sano son reportados como factores de riesgo (Irwin, 2012).

Adicionalmente Spolidorio *et al.* (2013) y Solano-Gallego *et al.* (2016) mencionaron una mayor prevalencia de babesiosis canina en hembras mestizas, mientras que Birkenheuer *et al.* (2003, 2018) encuentra una mayor predisposición en perros de raza Greyhound y Pit Bull Terrier para las especies *Babesia vogeli* y *Babesia gibsoni* respectivamente. Pese a ello, existen otros estudios que no encuentran diferencias significativas en estas variables antes mencionadas (Eiras, 2018).

#### 2.1.3.4.COINFECCIONES CON OTROS HEMOPARÁSITOS

El diagnóstico de *Babesia spp.* acompañado de otros hemoparásitos es poco reportado en la clínica diaria, no obstante, el uso de pruebas moleculares ha permitido visualizar una mejor perspectiva sobre esta casuística (Solano-Gallego *et al.*, 2016).

Las coinfecciones de hemoparásitos juegan un rol fundamental en la patogenicidad ya que suelen manifestarse con la gravedad de signos clínicos, la dificultad para llegar al diagnóstico, y la reducción en la eficacia del tratamiento (Lemos, 2014; Solano-Gallego *et al.*, 2016). Esta situación se debe a la presencia del mismo vector: *Rhipicephalus sanguineus*. Este ectoparásito es vector múltiples agentes como son *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Hepatozoon canis* y *Babesia spp.* (Santos *et al.*, 2009; Lemos, 2014).

En Colombia, Vargas-Hernández *et al.* (2012) detectó la presencia serológica y molecular de *Ehrlichia canis* y *Babesia vogeli* en 91 perros de la ciudad de Bogotá, Villavicencio y Bucaramanga, donde el 4.4% mostró coinfección, siendo el primer reporte en ese país. En un estudio similar, en la ciudad de Cuiabá - Brasil, Spolidorio *et al.* (2011), mediante técnicas moleculares reportaron la coinfección de *Hepatozoon canis* y *Babesia vogeli* en 5 muestras de caninos con signos de diarrea, vómitos, anorexia, linfadenopatía y fiebre.

Adicionalmente, Lemos (2014) encontró un caso de coinfección de *Rangelia vitalii* y *B. vogeli* mediante técnicas moleculares, el animal presentaba anemia normocítica normocrómica y leucocitosis neutrofílica. En el año 2018, Birkenheuer *et al.* reportaron la coinfección de *B. vogeli* y *B. gibsoni* en un estudio de resistencia antiparasitaria en EE.UU.

Por otra parte, Izzi *et al.* (2013) evidenciaron en Canadá, una triple coinfección de *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys* en un perro macho de 12 meses con signos de anemia, trombocitopenia, diarrea, taquipnea y taquicardia. Adicionalmente se ha informado de una coinfección por *B. rossi* y *B. vogeli* y una triple infección por *B. rossi*, *B. vogeli* y *E. canis* en perros sudafricanos (Matjilla *et al.*, 2008).

#### **2.1.4. METODOS DIAGNOSTICO**

El diagnóstico clínico de babesiosis canina es impreciso, por lo que es necesario la aplicación de diferentes técnicas de laboratorio donde incluyen diagnóstico hematológico, serológico y molecular (Birkenheuer *et al.*, 2003). Incluso usando todas estas pruebas, resulta un verdadero desafío llegar al diagnóstico definitivo debido a los casos de parasitemia bajas que resultan con falsos negativos o casos de reacción cruzada (Irwin, 2009).

##### **2.1.4.1. EXAMEN HEMATOLÓGICO**

Normalmente, la Babesiosis canina ha sido diagnosticada usando técnicas directas para demostrar la presencia de trofozoítos en el interior de los eritrocitos mediante frotis sanguíneos teñidos con las coloraciones habituales (ej. Giemsa o Wright) (Passos *et al.*, 2005; Eiras, 2018). Este método diagnóstico es de uso convencional en la clínica diaria por su simpleza y accesibilidad. No obstante, su sensibilidad depende de la parasitemia al momento de la toma de muestra y la destreza del operario en distinguir artefactos (la parasitemia de los animales infectados puede oscilar entre el 0.0001% y 0.001% de los glóbulos rojos) (Böse *et al.*, 1995; Birkenheuer *et al.*, 2003; Furuta *et al.*, 2009; Irwin, 2009).

Para el diagnóstico hematológico, las muestras de sangre se deben obtener de los capilares por punción auricular o de la garra ya que las propiedades físicas de los glóbulos rojos infectados se alteran, volviéndolos más rígidos por lo que desaceleran su paso a través de las redes capilares y permanecen adheridos a los pequeños vasos con tendencia a auto aglutinarse. (Passos *et al.* 2005; Böhm *et al.*, 2006; Irwin, 2012). En ese sentido, el examen de células debajo de la capa leucocitaria en tubo de hematocrito (*Buffy Coat*) también mejora la probabilidad de encontrar este hemoparásito ya que los eritrocitos parasitados por las especies más grandes de *Babesia* son menos densos y se concentran en una capa inmediata a la capa leucocitaria (Böhm *et al.*, 2006; Irwin, 2012).

Las principales alteraciones hematológicas encontradas en esta enfermedad son trombocitopenia y anemia hemolítica (Dantas-Torres y Figueredo, 2006; Solano-

Gallego *et al.*, 2011; Irwin, 2012). En casos hiperagudos, la anemia es normocrómica y normocítica mientras que en casos crónicos se pueden observar linfocitos reactivos (Irwin, 2012). Adicionalmente, en casos más severos se observa policromasia y poiquilocitosis (Boozer y Macintire, 2003; Guimarães *et al.*, 2004). Respecto a la serie leucocitaria, los hallazgos son variables encontrándose leucocitosis, leucopenia, neutrofilia, neutropenia, linfopenia y monocitosis (Dantas-Torres y Figueredo, 2006; Eiras, 2018)

#### **2.1.4.2. PRUEBAS SEROLÓGICAS**

Las técnicas serológicas más utilizadas son Inmunofluorescencia indirecta (IFI) e Inmunoensayo Enzimático (ELISA) (Solano-Gallego *et al.*, 2016). Estas pruebas detectan anticuerpos y sirven en el diagnóstico de infecciones crónicas donde la parasitemia no es tan alta. Los títulos altos son indicativos de una infección reciente; no obstante, en infecciones hiperagudas suelen haber falsos negativos ya que los anticuerpos se producen a los 8 a 10 días por lo que se recomienda repetir la prueba a los 15 días para determinar seroconversión (Boozer y Macintire, 2003).

Según Costa-Júnior *et al.* (2008) las pruebas de IFI y ELISA son técnicas muy sensibles para la detección de anticuerpos anti- *B. vogeli*; sin embargo, se debe considerar las reacciones cruzadas entre *B. canis* y *B. gibsoni*, así como entre *B. canis* y *B. vogeli* (Falsos positivos) además de otros parásitos apicomplejos como *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum*; (Boozer y Macintire, 2003; Camacho *et al.*, 2003; Solano-Gallego *et al.*, 2016). De acuerdo con lo descrito, la serología no es un método diagnóstico confirmatorio, ya que puede indicar la exposición a *Babesia* sin determinar la especie, no obstante, es utilizada en varios estudios seroepidemiológicos. (Eiras, 2018).

#### **2.1.4.3. PRUEBAS MOLECULARES**

La Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) es la prueba más empleada para el diagnóstico de babesiosis canina por su alta sensibilidad (en comparación con la hematología) y especificidad (en comparación con la serología). (Birkenheuer *et al.*,

2003; Solano-Gallego *et al.*, 2016). Algunas variantes son específicos para una especie sin detectar genotipos por lo que se requiere una secuenciación completa del gen amplificado (Jefferies *et al.*, 2007a).

El PCR hace uso de diferentes marcadores moleculares como son el gen ARN ribosómico 18S, 5.8S, 28S, la proteína de choque térmico 70 (*hsp70*), el gen de la proteína adhesiva relacionada con la trombospondina (*P18* o *BgTRAP*) y las secuencias de los dos espaciadores transcritos internos (*ITS 1* e *ITS 2*) como lo reportan múltiples estudios epidemiológicos (Birkenheuer *et al.*, 2003; Matsuu *et al.*, 2005; Allsopp, B. y Allsopp, M., 2006; Trapp *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2009, Peleg *et al.*, 2010; Duarte *et al.*, 2011; Vargas-Hernández *et al.*, 2012; Araujo *et al.*, 2015)

La PCR, en combinación con el análisis de Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP), mediante el uso de las enzimas de restricción Hinf I, BslII y Taq I, ofrecen un medio eficaz y rápido de discriminación prescindiendo del secuenciamiento (Jefferies *et al.*, 2007a; Criado-Fornelio *et al.*, 2007; Lemos, 2014; Cerro *et al.*, 2018; Eiras, 2018)

Asimismo, se utiliza la técnica de PCR anidada (*nested-PCR*) y PCR semianidada (*seminested-PCR*) capaz de diferenciar el ADN de *B. canis* y *B. gibsoni*, *B. vogeli* y *B. rossi* mediante primers externos e internos según Birkenheuer *et al.* (2003), Criado-Fornelio *et al.* (2007) y Eiras (2018). No obstante, Moraes *et al.* (2014) compara el PCR *semitested* desarrollado por Birkenheuer *et al.* (2013) y un protocolo convencional optimizado, encontrando similar eficacia con una ventaja de practicidad y asequibilidad por el ensayo optimizado.

PCR en tiempo real es utilizado principalmente para la cuantificación del ADN de *Babesia* y permite determinar el grado de infección. Matsuu *et al.* (2005) desarrollaron un protocolo de PCR tiempo real SYBR® Green para la detección de *Babesia gibsoni* (genotipo asiático) utilizando el gen *p18* donde demostrando la detección en parasitemias bajas. Asimismo, Peleg *et al.* (2010) elaboraron un PCR múltiple para la detección de *Ehrlichia canis* y *Babesia vogeli* a través de la proteína de choque térmico 70 (*hsp70*). Debido a la gran diversidad genética de *Babesias* es necesario elegir el gen correcto a caracterizar para la detección de cada especie (Eiras, 2018).

### ***Gen 18S ARNr***

Los genes de ARN ribosómico (ARNr) poseen una de las tasas de sustitución más bajas además de no existir evidencia de transferencia lateral de genes a través de distintos linajes. El gen *18S ARNr* (subunidad menor) es ampliamente utilizado como marcador molecular. Asimismo, comprende regiones conservadas y variables, la primera permite un alineamiento de secuencia inequívoco y la segunda proporciona una diferenciación filogenética (Allsopp, B. y Allsopp, M., 2006).

Las secuencias conservadas cercanas a los extremos 5' y 3' del gen *18S ARNr* tienen la ventaja práctica de permitir el diseño de primers. Las alineaciones se pueden hacer a partir de genes de longitud completa, aunque algunos trabajadores truncan las alineaciones para eliminar las regiones donde las alineaciones son equívocas o difíciles. Es por todo ello que el secuenciamiento del gen *18S ARNr* ha permitido detectar diferencias entre las especies de *Babesias* para un diagnóstico específico (Carret *et al.*, 1999; Allsopp, B. y Allsopp, M., 2006; Jefferies *et al.*, 2007a; Eiras, 2018)

### ***Región ITS 1***

La región del espaciador transcrito interno 1 (*ITS 1*) es un fragmento genómico situado entre la matriz repetida de los genes nucleares 5.8S, 18S y 28S (para la subunidad pequeña y el de la subunidad grande) y demuestra una marcada diferencia entre especies e incluso entre cepas una misma especie (Liu *et al.*, 2016).

Los genes de ARNr, que tienen las regiones *ITS 1*, son marcadores genéticos versátiles utilizados para el análisis filogenético, la evaluación del proceso evolutivo y para la determinación de similitudes taxonómicas (Zahler *et al.*, 1998). Esto ha hecho que el gen *18S ARNr*, que es uno de los genes que posee la región *ITS 1*, sea ampliamente utilizado para el establecimiento de relaciones filogenéticas y para la diferenciación de genotipos o subespecies de *Babesia canina* (Liu *et al.*, 2016)

Estudios previos revelaron que la región *ITS 1* está altamente conservado en *B. gibsoni* entre los aislados de India, Japón, Taiwán, Australia y EE. UU (Kjemtrup *et al.*, 2000;



Bostrom *et al.*, 2008). Sin embargo, Bostrom *et al.* (2008) plantearon la hipótesis de que el aislado único de *B. gibsoni* de Japón usado en dicho estudio no era determinante para descartar una posible variabilidad genética de la región *ITS 1*.

### ***Gen Citocromo b***

El gen citocromo b (Cytb) es un gen involucrado en la cadena respiratoria mitocondrial, es de rápida evolución sin estar sujeto a una presión selectiva para acumular polimorfismo (Escalante *et al.*, 1998). Normalmente, se encuentra ubicado en un elemento extracromosómico (también llamado ADN episómico o ADN mitocondrial lineal) en los organismos apicomplexos. En ese sentido, este gen es un objetivo interesante para los estudios taxonómicos (Criado-Fornelio *et al.*, 2006).

Sakuma *et al.* (2012) y Birkenheuer *et al.* (2018) investigaron el polimorfismo y mutaciones en este gen para los casos de Babesiosis canina causados por *Babesia gibsoni* en Japón y EE. UU respectivamente, ya que en los últimos años los casos han aumentado y existe una poca eficacia con los tratamientos de Atovacuona (ATV).

### **2.1.5. TRATAMIENTO**

El tratamiento de Babesiosis canina consiste en el uso de doxiciclina y clindamicina; no obstante, la eficacia está asociada a la especie de *Babesia* involucrada (Eiras, 2018). Por otra parte, el Dipropionato de Imidocarb es considerado la droga de elección para macrobabesias siendo la dosis recomendada de 6.6 mg/kg por vía intramuscular (IM) o subcutánea (SC) con repetición de la dosis a los 15 días (Solano-Gallego *et al.*, 2016).

El mecanismo de acción del Dipropionato de Imidocarb es la interferencia con la producción y utilización de poliaminas por la inhibición de la entrada de inositol en los eritrocitos infectados. Asimismo, produce la inhibición de la glucólisis anaeróbica y la síntesis de ácidos nucleicos; bloqueando la síntesis de purina y pirimidinas, lo cual produce una degeneración estructural del parásito (Dantas-Torres y Figueredo, 2006).

Los efectos adversos documentados por la aplicación de este fármaco incluyen dolor en el sitio de aplicación, vómitos, sialorrea, cólicos y diarrea; sin embargo, suelen desaparecer rápidamente. Así también, sobredosis generan nefrotoxicidad (Dantas-Torres y Figueredo, 2006; Solano-Gallego *et al.*, 2016).

El tratamiento para las microbabesias consiste en la combinación de atovacuona y azitromicina, principalmente en casos de parasitemia por *B. gibsoni* (Birkenheuer *et al.*, 2003; Jefferies *et al.*, 2007b). La atovacuona es un antiparasitario que inhibe la acción del citocromo b, su dosis terapéutica es de 13.5 mg/kg, vía endovenosa (IV) cada 8 horas y en combinación con azitromicina a 10 mg/kg vía endovenosa (IV) durante 10 días; sin embargo, recientemente, los tratamientos son inconsistentes y la infección persiste durante meses por lo que se busca una mutación en el gen citocromo b que explique la resistencia a este fármaco (Krause *et al.*, 2000; Sakuma *et al.*, 2012; Solano-Gallego *et al.*, 2016; Birkenheuer *et al.*, 2018).

Debido a los casos de resistencia, los perros que se recuperan de la etapa aguda, se convierten en portadores crónicos sirviendo como fuentes de infección. (Matsuu *et al.*, 2003). Los casos sospechosos de babesiosis canina con antecedentes de exposición reciente a garrapatas deben de tratarse, incluso si no hubiese un diagnóstico confirmatorio y dependiendo de la gravedad de la enfermedad, será necesaria una terapia de soporte, (Guimarães *et al.*, 2004; Dantas-Torres y Figueredo, 2006).

#### **2.1.6. PREVENCIÓN Y CONTROL**

La prevención de la babesiosis canina se fundamenta principalmente en el control de garrapatas. La utilización de acaricidas tópicos y ambientales acompañado de baños de manera periódica es la mejor forma de reducir la exposición a las garrapatas y así evitar la transmisión de estos patógenos (Solano-Gallego y Baneth, 2011; Eiras, 2018). El uso de las pipetas, pastillas y collares en base a formulaciones con isoxazolin, avermectinas y piretroides son los medios más populares y eficaces para controlar casos de infestaciones (McTier *et al.*, 2016; Gallego, 2019).

Asimismo, se ha propuesto la utilización de vacunas para el control de la babesiosis canina. Algunos estudios previos *in vitro* han utilizado sobrenadante de cultivos y

antígenos solubles de parásitos (SPA) de animales infectados que demostraron protección contra la exposición de *Babesia canis* y *Babesia Rossi* (Schetters *et al.*, 2007). No obstante, la vacuna Novibac Piro® que se basaba en estos estudios de usar un cultivo de orígenes heterólogos con una cepa europea de *B. canis* en adición con una cepa de *B. rossi* de Sudáfrica, ya no están autorizados para ser distribuidos según la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) (Solano-Gallego y Baneth, 2011; Eiras, 2018). Asimismo, no existen vacunas disponibles para ninguna forma de *B. gibsoni*, sin embargo, estudios prometedores evidencian que mediante un régimen de exposición de un plásmido recombinante y un virus vacuna (los cuales expresaron el gen P50 de *Babesia gibsoni*), muestran un alto nivel de anticuerpos y un descenso significativo del nivel de parasitemia de *B. gibsoni* en caninos, no obstante encontraron poca protección contra los efectos producidos por este hemoparásito como la anemia por lo que se requieren mayores estudios (Fukumoto *et al.*, 2007). En la actualidad solo se encuentran disponibles vacunas contra *B. canis* derivados de una cepa homóloga (Eurican Piro®) en algunos países de Europa (Moreau *et al.*, 1989; Solano-Gallego y Baneth, 2011).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO**

El estudio fue de carácter explorativo, descriptivo no representativo, con un muestreo por conveniencia. Este consistió en identificar hematológicamente a *Babesia spp.* y luego mediante la técnica de PCR y secuenciamiento se determinaron las especies haciendo uso del gen *18S ARNr* y la región *ITS 1* en perros con antecedentes de garrapatas de al menos 1 mes provenientes del Hospital Veterinario Municipal “Somos Patas” de Ventanilla (Callao, Perú).

#### **3.2. LUGAR Y ÉPOCA DE EJECUCIÓN DEL ESTUDIO**

El proyecto se realizó en las instalaciones del Hospital Veterinario Municipal “Somos Patas” del distrito de Ventanilla (Provincia del Callao, Perú) durante los meses de enero a febrero del 2021. Este distrito se encuentra en la costa norte a 47msnm, posee una latitud sur de 11° 52' 14" y longitud oeste de 77° 7' 17". Su clima es subtropical árido con un rango promedio de temperatura de 15 °C a 27 °C con una humedad del 71%.

El manejo y análisis de las muestras se realizó en el Laboratorio de Patología Clínica Veterinaria (técnicas hematológicas) y en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, Sección de Virología (técnicas moleculares) de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (San Borja, Lima)

### **3.3. DESCRIPCIÓN DE MATERIAL EXPERIMENTAL**

#### **3.3.1. SELECCIÓN DE CANES Y TAMAÑO DE MUESTRA**

Este estudio es de carácter explorativo. Para ello se colectaron muestras de sangre venosa y capilar de un total de 50 perros con presencia de garrapatas o antecedentes de estas de al menos 1 mes y que no estuvieran recibiendo un tratamiento previo al momento de la toma de muestra. Todos ellos provenientes del Hospital Veterinario Municipal “Somos Patas” de Ventanilla (Callao, Perú).

#### **3.3.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN**

El criterio de inclusión fue todo perro aparentemente sano con antecedentes de mordeduras de garrapatas de al menos un mes o con la presencia de éstas al momento de su evaluación, sin distinción de edad, sexo y raza. El criterio de exclusión fueron pacientes que estuvieron recibiendo un tratamiento previo a la toma de muestra

#### **3.3.3. MATERIALES DE TOMA Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS**

- Mesa de aluminio
- Aguja 21G x 1”
- Aguja 25G x 0.5”
- Cooler
- Gel pack refrigerante
- Tubos Vacutainer® con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)
- Láminas portaobjetos
- Gradillas
- Marcador indeleble
- Cinta adhesiva
- Agua oxigenada
- Guantes de látex
- Algodón y Tijera Mayo

### **3.3.4. MATERIALES DE LABORATORIO PARA EL EXAMEN HEMATOLÓGICO**

- Microscopio óptico – Leica DM500
- Centrífuga para tubos capilares
- WBC counter (Contador hematológico de Leucocitos)
- Aceite de inmersión
- Tubos capilares sin heparina (azul)
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Caja de viales
- Caja de portaobjetos
- Viales de plástico de 1.5 ml
- Agua destilada
- Colorante Wright
- Secadora
- Tabla de hematocrito (CRIPTOCAP)
- Lápiz carboncillo
- Canaletas de portaobjetos

### **3.3.5. MATERIALES DE LABORATORIO PARA EXAMEN MOLECULAR**

- Kit de extracción comercial (PureLink® Genomic ADN Mini Kit)
- DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)
- Microcentrifuga
- Termociclador Biosystems
- Vortex
- Agarosa 100g
- Bromuro de Etidio
- Etanol 96%
- Matraz de Erlenmeyer

- Caja de punta de Tips de 20  $\mu$ l, 50 $\mu$ l, 200 $\mu$ l y 500  $\mu$ l
- Tubos eppendorf de 1.5ml
- Buffer TBE
- Marcador Peso Molecular LADDER
- Cámara de electroforesis.
- Fotodocumentador UV (Life technologies thermo fisher scientific, USA)

### **3.4. MÉTODOS**

#### **3.4.1. TOMA DE MUESTRA**

Se colectó muestras de sangre periférica (venosa y capilar) por cada animal. Se siguió el protocolo del “Manual práctico de toma de muestra en caninos y gatos” (Gordillo, 2010) descritos a continuación:

##### ***Sangre venosa periférica***

1. Un ayudante externo se encargó de la sujeción del perro en posición decúbito esternal. Este ayudante con una mano tomó la cabeza y con la otra la articulación del codo, con el fin de exponer la región dorsal del miembro anterior para la asepsia y venopunción
2. Se procedió a realizar la desinfección de la región dorsal del miembro anterior y a continuación se colocó una ligadura sobre la articulación del codo, con el fin de realizar hemostasia.
3. La venopunción se realizó con un agua hipodérmica estéril 21G x 1” (formando un ángulo de 45° y el bisel hacia arriba). Se prefiere la extracción de sangre directamente en un tubo de vacío en comparación a la extracción de sangre con una jeringa y su transferencia a un tubo de vacío. Este método reduce la agregación plaquetaria y la formación de coágulos

4. Se extrajo aproximadamente 3 ml de sangre en tubos con EDTA, que fueron homogenizados y debidamente rotulados con el nombre del animal, edad y el número asignado para este estudio.
5. Posteriormente, se colectó con un tubo capilar sin heparina (azul), una muestra del tubo de sangre con EDTA y se colocó una gota en una lámina portaobjetos. Se realizó el extendido del frotis sanguíneo con su respectivo rótulo con la ayuda de un lápiz carboncillo y el rápido secado.
6. En forma paralela, se selló un extremo del tubo capilar y se llevó a una centrifuga para realizar la determinación del hematocrito
7. Posteriormente se realizó la técnica del *Buffy Coat* a partir del tubo capilar centrifugado.
8. A continuación, se realizó la coloración con tinción Wright de cada frotis sanguíneo (1 frotis de sangre periférica y 1 frotis del *Buffy Coat*) para su posterior lectura en el laboratorio de Patología clínica Veterinaria.
9. Las muestras de sangre con EDTA se almacenaron en un cooler con una temperatura aproximada de 4°C con ayuda de varios geles refrigerantes, y fueron enviadas para su procesamiento al Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, Sección de Virología (Técnicas moleculares) de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM.

### ***Sangre capilar***

1. El mismo ayudante externo se encargó de la sujeción del perro en posición decúbito esternal sujetando con una mano la cabeza del animal hacia su pecho.
2. A los animales con pelaje largo, se cortó el pelo de la punta del pabellón auricular con una tijera Mayo.
3. Luego con algodón y alcohol se desinfectó dicha zona y se realizó una ligera presión en la oreja con el fin de poder realizar la hemostasia



4. A continuación, se efectuó una punción suavemente con una aguja fina hipodérmica estéril 25G x 0.5” en el extremo de la oreja y se aplicó una ligera presión para obtener una gota de sangre que se dejó caer directamente en el borde del portaobjeto (Figura 3) y se realizó el extendido sanguíneo.
5. Posteriormente se procedió al secado, al rótulo según el número asignado para el estudio y la coloración con la tinción Wright para finalmente ser almacenado en la caja portaobjetos para su respectiva lectura en el laboratorio de Laboratorio de Patología Clínica Veterinaria

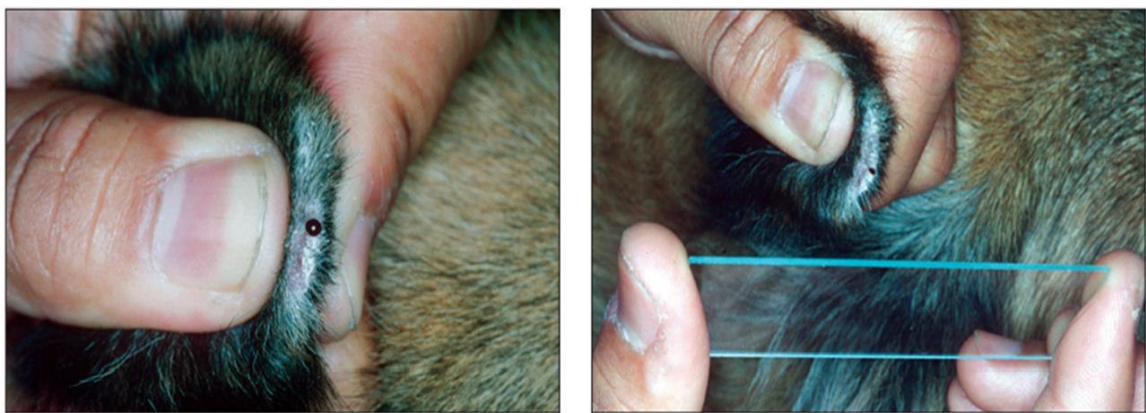


Figura 3. Preparación de un frotis de sangre capilar obtenida de la punta de la oreja (Irwin, 2012)

Los extendidos sanguíneos y coloraciones de las 3 láminas obtenidas de la sangre venosa periférica (1 lámina), sangre capilar (1 lámina) y del *Buffy Coat* (1 lámina) de cada animal, se realizaron inmediatamente después de haber tomado la muestra de sangre en el hospital veterinario municipal de Ventanilla.

### **3.4.2. EVALUACIÓN HEMATOLOGICA**

Los procedimientos se realizaron según las guías establecidas por el Laboratorio de Patología Clínica Veterinaria de la FMV-UNMSM y las recomendaciones descritas en “*Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas*” (Harvey, 2011) descritos a continuación:

### **3.4.2.1. RECUENTO DE ERITROCITOS**

El recuento de glóbulos rojos comenzó con la homogenización de la muestra mediante movimientos giratorios rotativos por unos segundos. Posteriormente, se llenó la pipeta de Thoma para eritrocitos hasta 0.5  $\mu$ l con la muestra de sangre y se completó hasta la marca de 101  $\mu$ l (pasando por el bulbo) con el dilutor para eritrocitos (solución isotónica no lisante, NaCl 0.85%). Posteriormente se llevó en forma horizontal un agitador por 40 segundos y una vez homogenizado se eliminaron las primeras 2 a 3 gotas y se procedió al llenado en uno de los extremos de la cámara de Neubauer. Finalmente se contabilizaron los eritrocitos que se encontraron en los 4 extremos y el centro de los cuadrantes y la sumatoria se multiplicó por 10'000 expresándose como número de eritrocitos/ $\mu$ l de sangre (Harvey, 2011).

### **3.4.2.2. DETERMINACIÓN DE HEMATOCRITO (HTO)**

Para la determinación de hematocrito, se colectó con un tubo capilar sin heparina (azul), una muestra del tubo de sangre con EDTA (previamente homogenizada) hasta llenar aproximadamente las  $\frac{3}{4}$  partes. Seguidamente se selló el extremo de la franja azul cerca de las llamas de un mechero Bunsen. Una vez sellado, se centrifugó durante 5 minutos a 10.000 rpm. Posteriormente se hizo la lectura del hematocrito expresado en porcentajes (%) con ayuda de la tabla de lectura (CRIPTOCAP) (Harvey, 2011).

### **3.4.2.3. DETERMINACIÓN DE HEMOGLOBINA (HB)**

La determinación de Hemoglobina (Hb) se calculó mediante el método de la Cianometahemoglobina, que se fundamenta en la medición fotocolorimétrica de la oxidación de la hemoglobina a metahemoglobina y su posterior conversión a cianometahemoglobina al interactuar con el ferrocianuro de potasio (Reactivo Drabkin). Para su determinación se llenó 5ml de reactivo Drabkin en un tubo de ensayo y se le agregó 20  $\mu$ l de la muestra de sangre previamente homogenizada, con ayuda de la pipeta de Sahli (una manguera de goma conectada en el extremo posterior). Luego se homogenizó suavemente y se dejó reposar por 10 minutos (Harvey, 2011).

Durante la espera, se calibró el espectrofotómetro a una longitud de onda de 546 nm con un factor de 37.00 y utilizando la opción CF (factor). Se llevó a 0 con 1 ml del Reactivo de Drabkin y pasado los 10 minutos se realizó la lectura con 1 ml de la muestra problema, obteniendo el resultado expresado en g/dl.

#### **3.4.2.4. RECUENTO DE PLAQUETAS (PLT)**

El recuento de plaquetas (PLT) se evaluó en la zona de la monocapa (localizada entre el cuerpo y la cola del frotis) de cada frotis sanguíneo. Se contabilizó el número de plaquetas visualizadas en 10 campos aplicando un promedio, cuyo resultante se multiplicó por 15'000 (factor) expresándose el resultado en Número de plaquetas/ $\mu$ l de sangre (Harvey, 2011).

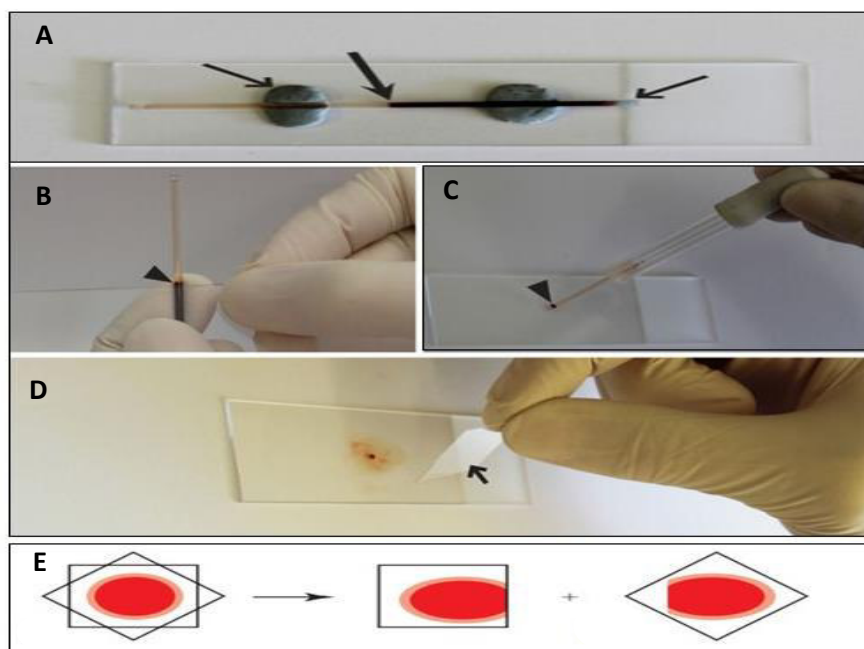
#### **3.4.2.5. RECUENTO DE LEUCOCITOS**

Para el recuento de Leucocitos se siguió el mismo procedimiento que se usó para el recuento de eritrocitos con algunas variaciones. Se homogenizó la muestra de sangre con EDTA y se aspiró 0.5  $\mu$ l con la pipeta de Thoma, manteniendo siempre la posición horizontal y limpiando cada exceso o excedente de sangre con algodón. Posteriormente se completó hasta 11 $\mu$ l con el dilutor (HCl 1%) obteniendo una dilución final de 1:200. Se procedieron a homogenizar con ayuda de un agitador por 40 segundos y seguido a ello se eliminaron las 2 a 3 primeras gotas. Se colocó 1 gota en uno de los lados de la cámara de Neubauer y se esperó 1 a 2 minutos la sedimentación y observación al microscopio para su recuento. Se contabilizaron los 4 cuadrantes y el total se multiplicó por el factor 50, obteniendo el resultado final como recuento de leucocitos expresado en glóbulos blancos /  $\mu$ l de sangre (Harvey, 2011).

El recuento diferencial se realizó en la zona de monocapa de cada uno de los frotis sanguíneos. Para lograr la diferenciación celular, se contabilizó un total cien células leucocitarias con ayuda del WBC counter (Contador hematológico de Leucocitos) para así obtener los valores relativos (porcentuales) de cada línea celular (Harvey, 2011).

### 3.4.2.6. BUFFY COAT

La técnica de *Buffy Coat* es una técnica muy empleada para el diagnóstico de babesiosis canina. Para ello, se realizó un corte cuidadoso de a 1 a 2 mm entre la capa flogística y el paquete globular de cada tubo capilar obtenido luego de la centrifugación y lectura del hematocrito. Este corte se realizó con el borde afilado de un portaobjetos de vidrio nuevo y se procedió a depositar la pequeña gota de sangre junto con la capa leucocitaria en el portaobjetos para su extendido en cruz del frotis sanguíneo con su respectivo secado y rótulo (Figura 4) (Harvey, 2011).



#### **3.4.2.7. TINCIÓN WRIGHT**

Se vertió la solución colorante Wright sobre cada frotis cubriéndose completamente y se dejó reposar por 4 minutos (en este tiempo es donde ocurre la fijación). Luego se agregó el mismo volumen de solución buffer (agua destilada) homogenizando la mezcla hasta observar un característico brillo metálico sobre la mezcla y se dejó reposar 5 minutos. Luego de ello, se lavó la lámina con agua corriente para eliminar todo excedente de la mezcla y visualizar una coloración rosácea de la lámina. Se dejó secar la lámina a temperatura ambiente y se ayudó con una secadora. Posteriormente se remitió la muestra al laboratorio para realizar la visualización al microscopio (Harvey, 2011).

#### **3.4.3. IDENTIFICACIÓN DIRECTA DE MICROORGANISMOS COMPATIBLES CON *BABESIA* SPP.**

La identificación de microorganismos compatibles con *Babesia* spp. se realizó en cada frotis sanguíneo (sangre venosa periférica, sangre capilar y *Buffy coat*) de cada animal. Se revisaron con énfasis en diez campos aleatorios de la monocapa de cada frotis. Esta lectura se realizó hasta en tres oportunidades bajo el objetivo 1000X.

Finalmente, a nivel hematológico se consideró como positivo a *Babesia* spp. a aquellos animales que presentaron microorganismos compatibles este hemoparásito, siguiendo las características descritas en estudios previos (Vignau *et al.*, 2005; Passos *et al.*, 2005)

#### **3.4.4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR**

Se separó en viales de plástico, una alícuota de aproximadamente 1.5ml de cada una de las muestras de sangre periférica colectadas en los tubos con EDTA y se mantuvieron a -20°C hasta el momento de ser remitidas al Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, Sección de Virología para la aplicación de las técnicas moleculares.

#### 3.4.4.1. EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción de ADN se realizó con la ayuda de Kit de extracción comercial (PureLink® Genomic ADN Mini Kit) (Invitrogen, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante detalladas a continuación:

Para la extracción de ADN, se siguió un protocolo dividido en cuatro fases: La primera de ellas consistió en el lisado, donde las muestras de sangre (200  $\mu$ l) fueron sometidas a un proceso de lisis mediante la adición de 20  $\mu$ l de Proteinasa K a la muestra. Luego se adicionó 20  $\mu$ l de *RNasa A*, se llevó a vortex y se encubó a temperatura ambiente por 2 minutos. Después se adicionó 200  $\mu$ l de *Buffer* de Lisis / Unión, se homogenizó con un vortex e incubó a 55°C por 10 minutos para promover la digestión proteica. Para terminar este proceso, se adicionó 200  $\mu$ l de etanol a 96% y se homogenizó en un vortex.

La segunda fase consistió en la Unión de ADN. Se comenzó colocando una columna de sílica dentro del tubo colector del Mini kit y dentro de esta columna se adicionó el material lisado (640  $\mu$ l). Se centrifugó la columna a 10'000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente y la columna de sílica fue pasado a un nuevo tubo colector del Mini Kit.

La tercera fase consistió en dos procesos de lavado consecutivos del ADN que se encuentra unido a la sílica. Para ello se adicionó 500  $\mu$ l de la solución de Lavado 1 del Kit (posee etanol) y se centrifugó la columna a 10'000 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se descartó el tubo colector y se colocó uno nuevo repitiéndose el mismo procedimiento anterior a diferencia que se centrifugó a 12,000 rpm esta vez, descartándose por último el tubo colector.

Finalmente se procedió a la última fase de liberación del ADN de las columnas de sílica, para la cual se colocó este último dentro de un tubo estéril de microcentrífuga de 1.5ml y se añadió 50  $\mu$ l de una solución de elución. Posteriormente se centrifugó la columna a 12,000 rpm por 1 minuto y se descartó la columna, quedando el material de ADN libre dentro del tubo estéril de microcentrífuga.

Una vez extraído el ADN, las muestras fueron identificadas y acondicionadas en congelador a -20°C hasta el momento de su utilización para la PCR.

#### 3.4.4.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

El análisis molecular se realizó mediante el uso de PCR Multiplex usando un protocolo previamente estandarizado en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, Sección de Virología (M. Rojas, datos no publicados). Para ello se hizo uso la región *ITS 1* con primers específicos para diferenciar las especies *Babesia vogeli* y *Babesia gibsoni* (Cuadro 2) obteniendo un producto de 245 pb de ser positivo para *B. vogeli*, y 454 pb de ser positivo para *B. gibsoni*.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen total de 25  $\mu$ l. Cada tubo contenía una mezcla de 6.75 $\mu$ l de Agua molecular libre de nucleasas, 12.5 $\mu$ l de PCR Mastermix Green (dNTP 200  $\mu$ M, MgCl<sub>2</sub> 3,0 mM), 0.25 $\mu$ l de *18S – ITS.1F*, 0.25 $\mu$ l de *B. vogeli. ITS1.R*, 0.25 $\mu$ l de *B. gibsoni.ITS1. R* y finalmente 5 $\mu$ l de ADN genómico.

Asimismo, se incluyó un control negativo, en la que el ADN problema en la mezcla era sustituido por el mismo volumen de agua y un control positivo para *B. vogeli*. La preparación de las mezclas y la adición final del ADN genómico se realizó en una cámara de flujo laminar.

Las temperaturas y ciclos empleados en el termociclador fueron: 95°C por 5 minutos para luego ser aplicados 35 ciclos consistentes en 94°C por 40 segundos (Desnaturalización), 50°C por 1 minuto (Alineación) y 72°C por 1 minuto y 20 segundos (Extensión). Culminado el número de ciclos se ingresó a la fase de extensión final a 72°C por 7 minutos.

Cuadro 2. Diseño de los primers para amplificar fragmentos específicos de la región *ITS 1* del género *Babesia vogeli* y *Babesia gibsoni* mediante PCR multiplex (*Babesia vogeli*=245pb, *Babesia gibsoni*= 454pb)

Especificidad	Nombre	Secuencia del Primer
<i>B. vogeli</i>	18S-ITS1.F	5- GAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTA -3
<i>B. gibsoni</i>		
<i>B. gibsoni</i>	<i>B. gibsoni</i> . ITS1.R	5-TTCTGTCATCAACTTGAAAACCTCAA-3
<i>B. vogeli</i>	<i>B. vogeli</i> . ITS1.R	5- CGGAAACCAACGGAATCCAC-3

Posteriormente a las nuestras negativas, se realizó una segunda PCR convencional, amplificando el gen completo *18S ARNr* con primers específicos para *B. canis* y *B. vogeli* y *B. gibsoni* (Cuadro 3) obteniendo un producto de 1591 pb de ser positivo a cualquiera de las tres especies.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen total de 51 µl. Cada tubo contenía una mezcla de 19µl de Agua molecular libre de nucleasas, 25 µl de PCR 2X Mastermix Green (dNTP 200 µM, MgCl<sub>2</sub> 3,0 mM), 0.5µl de *Babesia*. F1, 0.5µl de *Babesia*. R1 y finalmente 6µl de ADN genómico.

Asimismo, se incluyó un control negativo o blanco, en la que el ADN problema en la mezcla era sustituido por el mismo volumen de agua y un control positivo para *B. canis*. La preparación de las mezclas y la adición final del ADN genómico también se llevaron en una cámara de flujo laminar.

Las temperaturas y ciclos empleadas en el termociclador fueron: 95°C por 5 minutos para luego ser aplicados 40 ciclos consistentes en 94°C por 40 segundos (Desnaturalización), 54°C por 1 minuto (Alineación) y 72°C por 2 minutos y 30 segundos (Extensión). Culminado el número de ciclos se ingresó a la fase de extensión final a 72°C por 10 minutos.



Cuadro 3. Diseño de primers para amplificar el gen completo *18S ARNr* del género *Babesia* mediante PCR (1591pb).

Especificidad	Nombre	Secuencia del Primer	Posición de Alineamiento	T°C
<i>B. canis</i>				
<i>B. vogeli</i>	Babesia. F1	5- CTAAGTACAAGCTTTTTACGGTG -3	59-81	51.8
<i>B. gibsoni</i>				
<i>B. canis</i>				
<i>B. vogeli</i>	Babesia. R1	5- TCACAAAACCTTCCGARGCWAAAC -3	1626-1649	55.3
<i>B. gibsoni</i>				

#### 3.4.4.3. ELECTROFORESIS EN AGAR GEL

Los productos amplificados fueron evaluados por Electroforesis en Agar gel. Se preparó 1.5 g de Agarosa (1.5%) disuelta en 650 ml de buffer TBE a temperatura de 60-70°C. Posteriormente se agregó de Bromuro de Etidio a la mezcla y comenzó el proceso de gelificación luego de pasado 45 minutos a temperatura ambiente. Esta mezcla se solidificó en la cámara de electroforesis y se agregaron 5µl del producto amplificado y 5µl de un marcador de Peso Molecular Ladder (PM) de 100 pares de base en cada celda del gel.

Una vez solidificado el gel, se conectó la cámara de electroforesis a una fuente de poder de 120 voltios produciendo la migración de las muestras de ADN en dirección del cátodo al ánodo en un tiempo de 80 minutos. Posteriormente, se colocó el gel en el fotodocumentador UV (Life technologies thermo fisher scientific, USA) para realizar la lectura y se tomó la foto de las bandas de ADN en la Campana de campo oscuro.

#### **3.4.4.4. SECUENCIAMIENTO GENÉTICO**

Se enviaron solo dos muestras positivas por PCR para confirmar los resultados por secuenciamiento del gen completo *18S ARNr* y la región *ITS 1*. Estos fragmentos fueron purificados y enviados a la plataforma de secuenciamiento de Macrogen Korea, ubicada en Corea del Sur. Las secuencias obtenidas fueron editadas usando el programa Chromas (<https://technelysium.com.au/wp/chromas/>). Para el alineamiento de secuencias y el análisis filogenético se utilizó el programa Mega 7 (<http://www.Megasoftware.net/>). La herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST) se usó para obtener las secuencias de nucleótidos disponibles en el Gen Bank y evaluar su similitud con las secuencias obtenidas en este estudio

#### **3.5. ANÁLISIS DE DATOS**

Se aplicó estadística descriptiva mediante tablas de la hematología y PCR para la detección de babesiosis canina con antecedentes de garrapatas del distrito de Ventanilla (Callao – Perú) utilizando el programa SPSS Statistics v. 20.

#### **3.6. CONSIDERACIONES ÉTICAS**

Se contempló y respetó las normas éticas para la investigación señaladas por el Comité de Ética y Bienestar Animal (CEBA) de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM siguiendo los Principios Directrices Internacionales para la Investigación Biomédica que Implice el Uso de Animales. A su vez, se solicitó a los dueños de los animales que firmen un formulario de consentimiento informado libre antes de la recolección de datos y de sangre.

#### IV. RESULTADOS

Del total de 50 perros con antecedentes de garrapatas, a nivel hematológico el 20% (10/50) evidenciaron inclusiones intraeritrocíticas piriformes a manera de “gota de agua” compatibles con trofozoítos de *Babesia* spp en cada uno de los frotices obtenidos de sangre venosa periférica (1 frotis), sangre capilar (1 frotis) y del *Buffy Coat* (1 frotis) por cada animal. Estas se presentaron de distintas formas (pleomorfismo) y presentaciones, ya sea solo una, en par o inclusive hasta 4 inclusiones por eritrocito (Figura 5a, 5b,5c, 5d, 5e). Asimismo, se encontró una muestra sospechosa de coinfección con *Ehrlichia* spp. mediante microscopía óptica, no obstante, no se pudo confirmar su positividad mediante pruebas complementarias.

El análisis molecular mediante PCR Multiplex haciendo uso de la región *ITS 1* evidenció que el 26% (13/50) fueron positivos a *Babesia vogeli* amplificando un tamaño de banda de 245pb (Figura 6, Figura 7, Figura 8). El análisis molecular mediante el PCR convencional haciendo uso del gen completo *18S ARNr* de las muestras negativas (37/50) descartó la presencia de la especie *Babesia canis* (Figura 9a, Figura 9b).

El secuenciamiento genético se realizó a dos muestras (Muestra 47 y 48) las cuales presentaron un alto grado de infección de eritrocitos en la evaluación de los frotices sanguíneos y un alto grado de intensidad de banda en la PCR. El gen completo *18S ARNr* y la región *ITS 1* se amplificaron para confirmar aún más las muestras positivas e identificar y caracterizar mejor la *Babesia* spp.

Los resultados de este secuenciamiento permitieron confirmar la identificación de *Babesia vogeli* y mediante la búsqueda de similitud de secuencias en BLAST del gen completo *18S ARNr*, se evidenció un alto grado de similitud (99-100%) entre ambas muestras (Muestra 47 y Muestra 48) con los aislados de *Babesia vogeli* de China (HM590440.1), Venezuela (DQ297390.1), Japón (AY077719), Brasil (AY371196.1), España (AF394534.1), Egipto (AY371197.1) y otros aislados del resto del mundo. Con respecto los resultados de secuenciamiento en base a la región *ITS 1* y su posterior búsqueda de similitud mediante la herramienta BLAST, se identificó un alto grado de similitud (99-100%) con aislados de *Babesia vogeli* de China (MK881128.1), India (MN190278.1) y Brasil (FJ588003.1)

Para el análisis filogenético de ambos genes, se incluyeron aislados en base a la región *ITS 1* de *Babesia canis*, *Babesia vogeli*, *Babesia gibsoni* y *Babesia microti* de diversos estudios cuyas secuencias se obtuvieron del GenBank (Cuadro 4), los cuales fueron elegidos porque se agrupan del mismo lado de *B. vogeli* en la filogenia propuesta por Lack *et al.* (2012). Dichas secuencias obtenidas fueron alineadas con las secuencias del presente estudio (Figura 10a, 10b). El análisis inferido por Neighbor-joining generó un árbol en base al gen completo *18S ARNr* y otro en base a la región *ITS 1*. El primero de ellos (*18S ARNr*) determinó una distinción de *Babesia vogeli* en dos distintas clases: Una representada por las secuencias de Perú (Muestra 47 y 48), China (a), Japón (a), Brasil (a), España(a) y Egipto(a); y una segunda clase, por las secuencias de EE. UU, Venezuela, Perú (L98) y Argentina (Figura 11a). El segundo árbol generado en base a la región *ITS1* determinó una distinción de dos distintas clases compuestas la primera por *Babesia vogeli* compuesto por aislados de la India, Brasil (b), China (b), España (b) y Perú (Muestra 47 y 48); y una segunda clase representada por las secuencias de *B. canis*, *B.gibsoni* y *B. microti*

Finalmente, en un esquema representativo sobre la identificación hematológica y molecular de 50 perros con antecedentes de garrapatas de al menos un mes proveniente del distrito de Ventanilla (Callao, Perú), se encontró un 20% positivos por hematología y positivos por PCR, 6% negativos por hematología y positivos por PCR, y un 74% negativos tanto por hematología como por PCR (Cuadro 5). Adicionalmente, los hallazgos hematológicos de los 13 perros (20%) diagnosticados con babesiosis canina se compararon con los parámetros hematológicos establecidos por el Laboratorio de

Patología Clínica Veterinaria de la FMV-UNMSM, encontrándose una leve reducción en los niveles de eritrocitos, hemoglobina, hematocrito, leucocitos y plaquetas. (Apéndice 2). En el estudio del frotis sanguíneo se observó poiquilocitosis y policromasia en los eritrocitos (5b,5c y 5d).

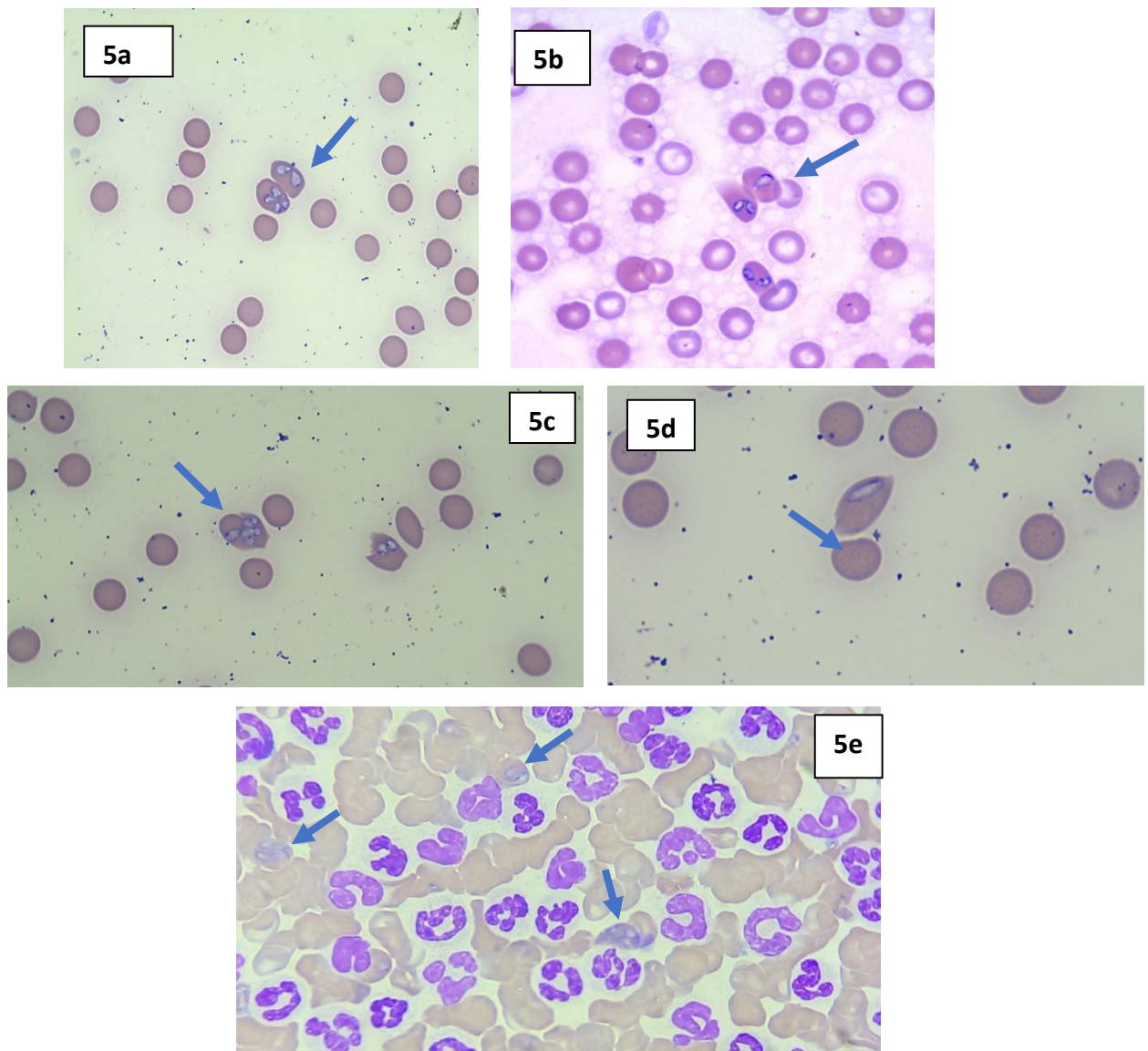


Figura 5. Frotis sanguíneo de sangre periférica con inclusiones intraeritrocíticas piriformes compatibles con *Babesia* spp (5a, 5c, 5d). Frotis sanguíneo de sangre capilar con inclusiones intraeritrocíticas piriformes compatibles con *Babesia* spp (5b). Frotis sanguíneo del *Buffy Coat* con inclusiones intraeritrocíticas piriformes compatibles con *Babesia* spp (5e). Tinción Wright 1000X

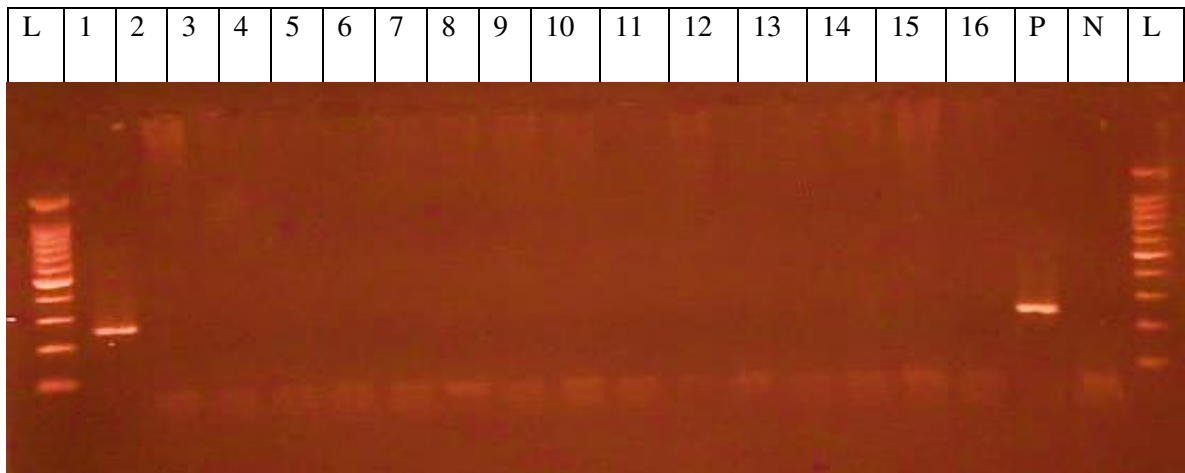


Figura 6. Gel de agarosa al 1.5%. de los productos de amplificación de PCR Multiplex de las 50 muestras haciendo uso región *ITS1* del *gen 18S ARNr*. Las muestras fueron positivas a *Babesia vogeli* con un tamaño molecular de 245 pares de base. L: Marcador de peso molecular Ladder de 100 pares de base, P: Control positivo para *B. vogeli*. N: Control negativo.

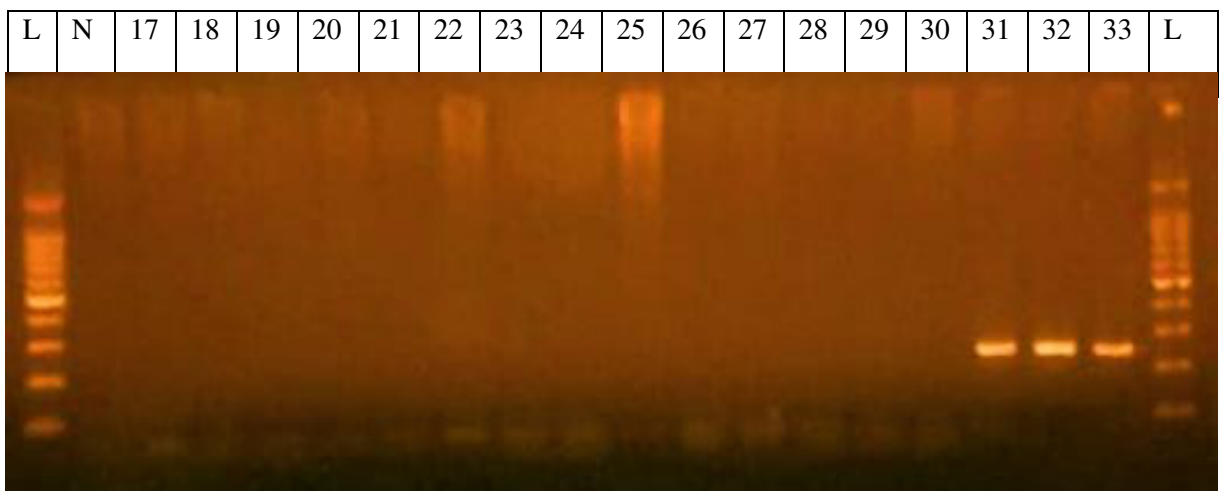


Figura 7. Gel de agarosa al 1.5%. de los productos de amplificación de PCR Multiplex de las 50 muestras haciendo uso región *ITS1* del *gen 18S ARNr*. Las muestras fueron positivas a *Babesia vogeli* con un tamaño molecular de 245 pares de base. L: Marcador de peso molecular Ladder de 100 pares de base. N: Control negativo.

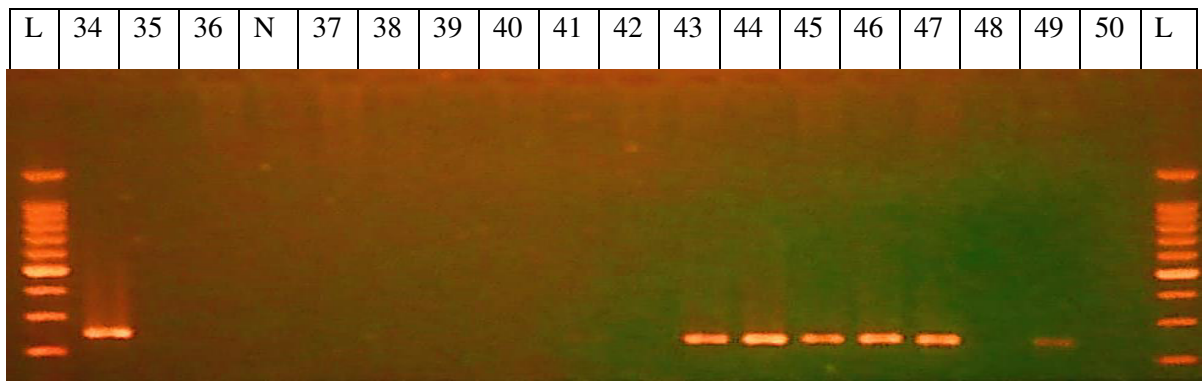


Figura 8. Gel de agarosa al 1.5%. de los productos de amplificación de PCR Multiplex de las 50 muestras haciendo uso región *ITS1* del *gen 18S ARNr*. Las muestras fueron positivas a *Babesia vogeli* con un tamaño molecular de 245 pares de base. L: Marcador de peso molecular Ladder de 100 pares de base. N: Control negativo

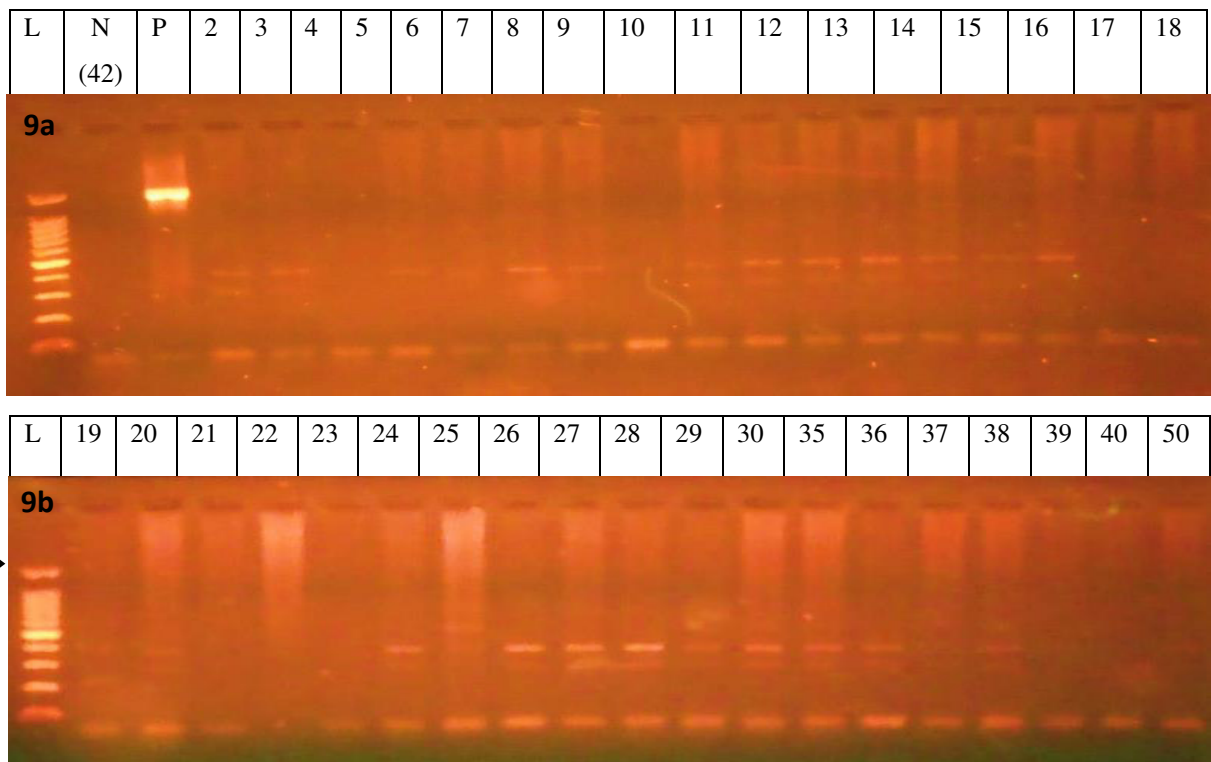


Figura 9a, 9b. Gel de electroforesis de los productos de amplificación del PCR convencional de las muestras negativas usando el Gen *18S ARNr*. L: Marcador de peso molecular Ladder de 100 pares de base. N: Control negativo. P: Control Positivo

10a

Species/Abbrv	Group Name	
1. secuencia_de_la_muestra_47_gen_ADN_ribosomal_18_S_parcial_1550 pt		-- TTTTTCAGGTGAAACTGGGAATGGCTCATTACAACAGTTATAAGTTTATTTGGTAT
2. secuencia_de_la_muestra_48_gen_ADN_ribosomal_18_S_parcial_1550 pt		-- TTTTTCAGGTGAAACTGGGAATGGCTCATTACAACAGTTATAAGTTTATTTGGTAT
3. secuencia_Babesia_vogeli_isolate_Guangdong_(HM590440.1)		-- TTTTTCAGGTGAAACTGGGAATGGCTCATTACAACAGTTATAAGTTTATTTGGTAT
4. secuencia_Babesia_vogeli_Venezuela_(DQ297390.1)		GC TTTTTCAGGTGAAACTGGGAATGGCTCATTACAACAGTTATAAGTTTATTTGGTAT
5. secuencia_Babesia_sp_isolate_Okinawa_(AY077719)		-- TTTTTCAGGTGAAACTGGGAATGGCTCATTACAACAGTTATAAGTTTATTTGGTAT
6. sequence_Babesia_vogeli_Brasil_Passos_(AY371196.1)		-- TTTTTCAGGTGAAACTGGGAATGGCTCATTACAACAGTTATAAGTTTATTTGGTAT
7. sequence_Babesia_vogeli_isolate_Spain_(DQ439545.1)		-- TTTTTCAGGTGAAACTGGGAATGGCTCATTACAACAGTTATAAGTTTATTTGGTAT
8. sequence_Babesia_vogeli_isolate_Egypt_(AY371197.1)		-- TTTTTCAGGTGAAACTGGGAATGGCTCATTACAACAGTTATAAGTTTATTTGGTAT
9. sequence_Babesia_vogeli_USA_(AY371198.1)		GC TTTTTCAGGTGAAACTGGGAATGGCTCATTACAACAGTTATAAGTTTATTTGGTAT
10. sequence_Babesia_vogeli_isolate_L98_Penu_(KY349103.1)		.....
11. Babesia_vogeli_isolate_Argentina1_(EU362993.1)		.....

10b

Species/Abbrv	Group Name	
1. Babesia_vogeli_Muestra_47_fragmento_ITS_1_217 pb		..... ** * * *
2. Babesia_vogeli_Muestra_48_fragmento_ITS_1_219 pb		..... G G A G C C G G C G A C T
3. Babesia_vogeli_clon_Longhua_17_China(a)_(MK881128.1)		..... G G A G C C G G C G A C T
4. Babesia_vogeli_isolate_bc27_India_(MN190278.1)		..... G G A G C C G G C G A C T
5. Babesia_vogeli_Spain(a)_(AF394534.1)		..... G G G G C C G G C G A S T
6. Babesia_vogeli_isolate_Recife_Brazil(a)_(FJ588003.1)		..... G G A G C C G G C G A C T
7. Babesia_gibsoni_isolate_Asia_2_(AF175301.1)		CC A G A G T A A C A A T T G G A G G G C A A G T C T G G T G C C A G C A G C C G G T A A T T C C A G C T C C A A T A G C G
8. Babesia_microti_isolate_AaAO401_Japan_(AB243680.1)		CC A G A G T A T C A A T T G G A G G G C A A G T C T G G T G C C A G C A G C C G G T A A T T C C A G C T C C A A T A G C G
9. Babesia_canis_isolate_BCD203_Egypt_(MN625891.1)		CC A G A G T A G C A A T T G G A G G G C A A G T C T G G T G C C A G C A G C C G G T A A T T C C A G C T C C A A T A G C G

Figura 10a, 10b. Alineación de secuencias de nucleótidos del gen completo *18S ARNr* (10a) y la región *ITS 1* (10b) de *Babesia vogeli* de diversas partes del mundo y las muestras obtenidas en este estudio (Muestra 47 y 48)



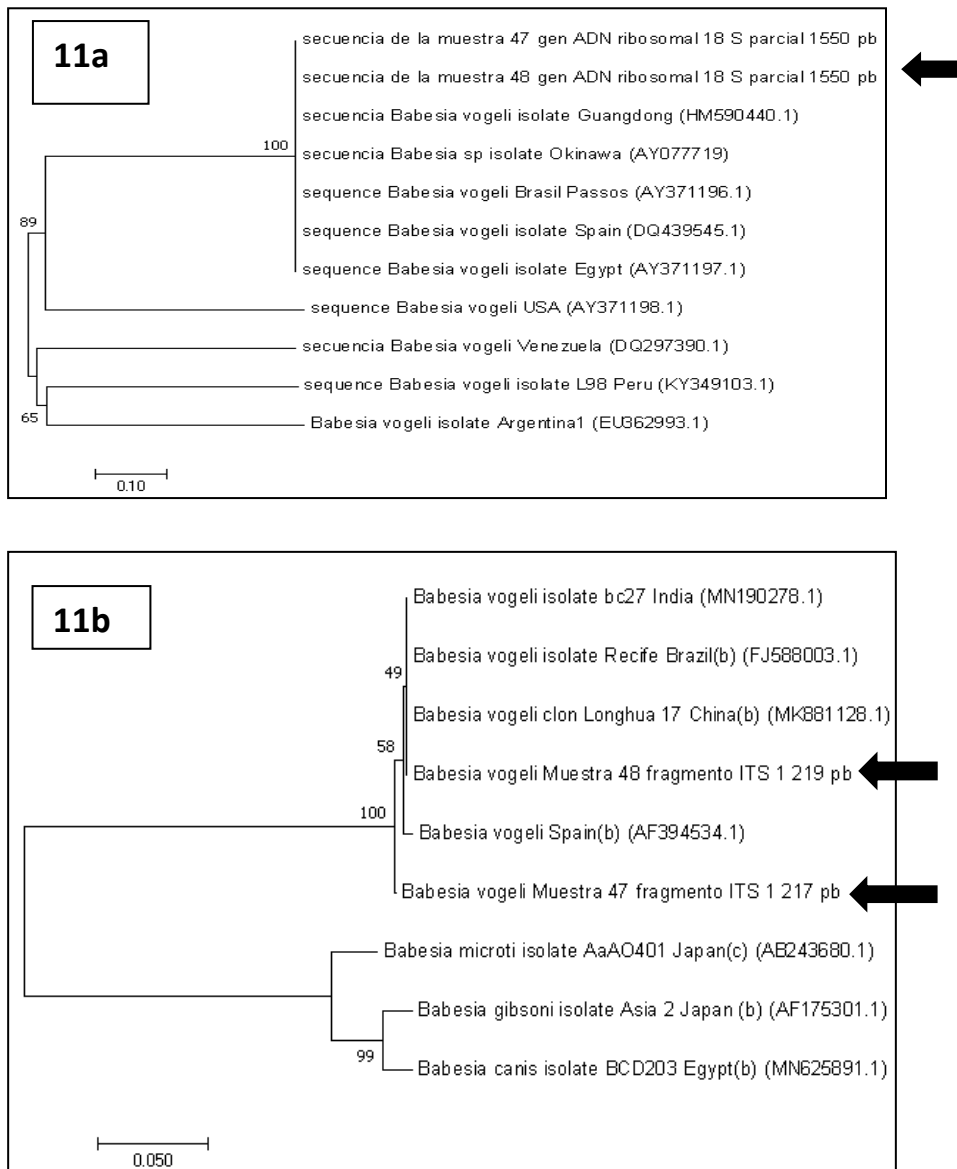


Figura 11a, 11b. Árbol filogenético generado a partir de la secuencia del gen completo 18S *ARNr* (11a) y de la región *ITS 1* (11b) de los aislados autóctonos de *B. vogeli* “Muestra 47 y 48” comparados con otras secuencias de *Babesias* (*Babesia canis*, *Babesia vogeli*, *Babesia gibsoni* y *Babesia microti*) correspondientes del GenBank mediante el método “neighbor-joining” con 1’000 réplicas bootstrap y la distancia evolutiva ajustada mediante el parámetro “Kimura-2”. Los números de acceso de GenBank se muestran en el árbol

Cuadro 4. Datos de aislados de *Babesia canis*, *Babesia vogeli*, *Babesia gibsoni* y *Babesia microti* obtenidos del GenBank e incluidos en el análisis de las secuencias del gen *18S ARNr* y la región *ITS 1*. (\*): hecho en roedores

Nº	CÓDIGO	LOCALIDAD	PAÍS	SECUENCIA	SIMILITUD (%)	
1	Muestra 47	Ventanilla	Perú		100	
2	Muestra 48	Ventanilla	Perú		100	
4	<i>Babesia_vogeli_isolate_Guangdong</i>	Cantón	China (a)	(HM590440.1)	100	Gen <i>18 ARNr</i>
5	<i>Babesia_vogeli_Venezuela</i>	Falcón	Venezuela	(DQ297390.1)	100	
6	<i>Babesia_sp_isolate_Okinawa</i>	Okinawa	Japón (a)	(AY077719)	100	
7	<i>Babesia_vogeli_Brasil_Passos</i>	Minas Gerais	Brasil (a)	(AY371196.1)	100	
8	<i>Babesia_vogeli_isolate_spain(a)</i>	No disponible	España (a)	(DQ439545.1)	99.5	
9	<i>Babesia_vogeli_isolate_Egypt</i>	No disponible	Egipto (a)	(AY371197.1)	99.8	
10	<i>Babesia_vogeli_USA</i>	No disponible	USA	(AY371198.1)	99.8	
11	<i>Babesia_vogeli_isolate_L98_Peru</i>	Piura	Perú (L98)	(KY349103.1)	99	
12	<i>Babesia_vogeli_isolate_Argentina1</i>	Buenos Aires	Argentina	(EU362993.1)	99	
13	<i>Babesia_canis_vogeli_clon_Longhua_17</i>	Longhua	China (b)	(MK881128.1)	99.5	
14	<i>Babesia_canis_vogeli_isolate_bc27</i>	No disponible	India	(MN190278.1)	99.5	
15	<i>Babesia_canis_vogeli_isolate_Recife</i>	Recife	Brasil (b)	(FJ588003.1)	99.05	
16	<i>Babesia_gibsoni_isolate_Asia_2</i>	No disponible	Japón	(AF175301.1)	-	
17 *	<i>Babesia_microti_isolate_AaAO401_Japan</i>	No disponible	Japón	(AB243680.1)	-	
18	<i>Babesia_canis_isolate_BCD203_Egypt</i>	El Cairo	Egipto	(MN625891.1)	-	
19	<i>Babesia_canis_vogeli_spain(b)</i>	Tenerife	España (b)	(AF394534.1)	100	

Cuadro 5. Esquema general de los hallazgos hematológicos y moleculares de 50 perros con antecedentes de garrapatas de al menos 1 mes del distrito de Ventanilla (Callao – Perú)

<b>Hallazgos hematológicos</b>	<b>PCR</b>		<b>Total</b>
	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	
<b>Positivo</b>	10 (20%)	0 (0%)	10 (20%)
<b>Negativo</b>	3 (6%)	37 (74%)	40 (80%)
<b>Total</b>	13 (26%)	37 (74%)	50 (100%)

## V. DISCUSIÓN

La frecuencia de infección por *Babesia vogeli* de este estudio mediante el uso de técnicas hematológicas y moleculares es de las más altas (26%) reportadas en América del Sur comparada por los reportes de Argentina (0.25%), Venezuela (2.24%), Colombia (5%), Ecuador (5%) y Brasil (6-8%) (Criado-Fornelio *et al.*, 2007; Vargas-Hernández *et al.*, 2012; Lemos, 2014; Araujo *et al.*, 2015; Olaya, 2015; Eiras *et al.*, 2018). Asimismo, este estudio confirma el trabajo previo realizado por Cerro *et al.* (2018) indicando que *Babesia vogeli* está presente en perros del Perú con una frecuencia mucho mayor (26%) comparado con el estudio antes mencionado (1.4%). Esto puede explicarse a que, si bien este estudio se realizó en perros con antecedentes de garrapatas de al menos 1 mes, eran animales que acudían a un centro veterinario, algunos recién adoptados de la calle y otros sin ningún control sanitario previo de vacunación ni desparasitación externa e interna. Adicionalmente, los canes al momento de la inspección poseían una moderada cantidad de garrapatas en diferentes zonas, siendo las orejas y los espacios interdigitales las de mayor frecuencia. No obstante, enfatizamos en que este estudio no es representativo sobre la tasa real de infección frente a este hemoparásito ya que se evaluó únicamente a perros domésticos con antecedentes de garrapatas de 1 mes; sin embargo, podemos afirmar la presencia de *Babesia vogeli* en la población de perros de Ventanilla. En ese sentido, se requieren mayores estudios, con un mayor número de animales e inclusive estudios que puedan detectar la presencia de este agente en su vector (garrapatas)

para poder confirmar la presencia de esta y otras especies de *Babesia* en el Perú con su respectiva prevalencia y análisis filogenético que permita establecer las rutas de los vectores.

El distrito de Ventanilla, donde se realizó el estudio, se caracteriza por tener un acelerado crecimiento demográfico a zonas periurbanas y rurales además de poseer una abundante cantidad de perros callejeros (Rendón *et al.*, 2020), que sumado a los resultados de este estudio, los convierte como posibles focos de infección de *Babesia vogeli* por lo que es necesario establecer protocolos de diagnóstico, tratamiento y prevención por parte de las autoridades sanitarias contra la enfermedad producida por este agente según lo establecido por Solano-Gallego *et al.* (2016).

El total de muestras positivas por hematología (10/50) resultaron también positivas por técnicas moleculares, no obstante 3 muestras que resultaron negativas por hematología (3/50), resultaron positivas con el uso de PCR, evidenciando un 6% de falsos negativos para *Babesia spp.* mediante el uso de técnicas hematológicas. Esto demuestra la ventaja del uso de técnicas moleculares para el diagnóstico de Babesiosis canina ya que la sensibilidad del método de examen microscópico (hematología) para su diagnóstico está muy vinculado al nivel de parasitemia al momento de la obtención de muestra, ya que el límite de detección es de aproximadamente el 0.001% de parasitemia acompañado de la destreza del operario. (Böse *et al.*, 1995; Birkenheuer *et al.*, 2003; Furuta *et al.*, 2009; Irwin, 2009). No obstante, algunos reportes indican la presencia de falsos negativos en perros con babesiosis crónica ya que su nivel de parasitemia es fluctuante, haciendo incluso difícil el diagnóstico con el uso de técnicas moleculares (Birkenheuer *et al.*, 2004).

La visualización directa de *Babesia spp.* por microscopía óptica (hematología) en cada animal positivo, se evidenció en cada uno de los frotices sanguíneos obtenidos por animal (sangre venosa periférica, sangre capilar, y *Buffy Coat*). Esto muestra la importancia de la colección de sangre capilar y la realización del *Buffy Coat* para el diagnóstico de hemoparásitos, así como su rápido procesamiento dentro de las 2 horas posteriores a la toma de muestra (Passos *et al.* 2005; Irwin, 2009; Chagas *et al.*, 2020).

Asimismo, como hallazgos hematológicos secundarios de los perros positivos a *Babesia vogeli*, se encontró que el 61.5% (8/13) presentó anemia de leve a moderada con presencia de poiquilocitosis y policromasia. Respecto a serie blanca se encontraron resultados muy variables ya que el 7.6% (1/13) presentó leucopenia moderada a severa mientras que el 23% (3/13) presentaron leucocitosis. En serie plaquetaria, el 69.2% (9/13) presentó trombocitopenia de las cuales el 53.8% (7/13) fueron de moderada a severa y el 15% (2/13) solamente leves. Si bien es cierto, todos estos cambios coinciden con la literatura de diversos estudios las cuales afirman que anemia hemolítica regenerativa y trombocitopenia son las alteraciones hematológicas más frecuentes de encontrar en una infección causada por *Babesia vogeli*; la presencia de otros hemoparásitos que también pudieran producirlos, no fue posible descartarlo en las muestras del presente estudio, por lo que no es atribuible estos hallazgos encontrados a *Babesia vogeli*. (Boozer y Macintire, 2003; Guimarães *et al.*, 2004; Dantas-Torres y Figueredo, 2006; Salem y Farag, 2014). Adicionalmente debemos considerar que 3 perros (6%) que resultaron falsos negativos en la hematología a *Babesia vogeli* y presentaron estas alteraciones hematológicas en la evaluación del frotis sanguíneo, se encontraban clínicamente sanos, por lo que se puede sospechar de la presencia de perros “portadores” en una etapa subclínica o crónica de la enfermedad lo cual explicaría el resultado negativo por microscopía óptica (hematología) debido a su nivel de parasitemia fluctuante ya que en una infección crónica, las *Babesias* quedan atrapadas dentro de las redes capilares del bazo, hígado y otros órganos, desde donde se liberan periódicamente a la circulación y que solamente desencadenarán algún signo de babesiosis canina, ante la aparición de un evento inmunosupresor. (Salem y Farag, 2014; Solano- Gallego *et al.*, 2016; Cerro *et al.*, 2018).

El análisis filogenético de este estudio, en base a la caracterización y secuenciamiento del gen completo *18S ARNr* sugieren una diseminación global de este hemoparásito en países de América del Sur como Argentina, Brasil, Venezuela; así como de todo el mundo (China Egipto, España) y marcan una posible divergencia entre aislados de *B. vogeli*, no obstante, este estudio no se centró en determinar la matriz de divergencia intraespecífica por lo que se hace necesario futuros trabajos de investigación en base a este tema. Por otro lado, en el análisis de la región *ITS1* del gen *18S ARNr*, permite determinar una clara diferencia entre aislados de *B. vogeli* obtenidos de todo el mundo

con las especies de *B. gibsoni*, *B. canis* y *B. microti*, apoyando la idea que son regiones altamente conservadas y que permite la diferenciación de especies de *Babesia* según propuesto por los trabajos de Uilenberg *et al.* (1989), Carret *et al.* (1999), Allsopp, B. y Allsopp, M., (2006) y Lack *et al.* (2012), no obstante cabe señalar la insuficiencia de este marcador (*ITS1*) para determinar la divergencia entre especies, pero sí su correcto uso para la diferenciación e identificación de las mismas (Zahler *et al.*, 1998). Es por ello que se hace necesario considerar esta región *ITS 1* del gen *18S* para futuros estudios de identificación de las diferentes especies *Babesia* (Sá *et al.*, 2006; Criado-Fornelio *et al.*, 2007; Vargas-Hernández *et al.*, 2012; Araujo *et al.*, 2015; Eiras *et al.*, 2008)

## VI. CONCLUSIONES

- La identificación hematológica permitió saber que un 20% de perros con antecedentes de garrapatas del distrito de Ventanilla presentaron inclusiones intraeritrocíticas compatibles con *Babesia* spp.
- La identificación molecular permitió saber que el 26% de perros con antecedentes de garrapatas del distrito de Ventanilla fueron positivos a *Babesia vogeli*
- Las secuencias de la región *ITS 1* del gen *18S ARNr* de las 2 muestras del presente estudio resultaron 100% idénticas con los aislados de *Babesia vogeli*
- Las secuencias del gen completo *18S ARNr* de las 2 muestras del presente estudio resultaron 100% idénticas con los aislados de Brasil, Japón España, China y Egipto
- Las alteraciones hematológicas más frecuentes en perros positivos a *Babesia vogeli* fueron anemia y trombocitopenia



## **VII. RECOMENDACIONES**

- En la rutina del médico veterinario, principalmente en zonas con un alto crecimiento demográfico y alta prevalencia de garrapatas, es indispensable la realización del hemograma completo que incluya el examen del frotis sanguíneo con el fin de poder observar y descartar la presencia de algún hemoparásito. En caso de ser positivo, pese a no presentar ningún signo clínico, es necesario realizar el tratamiento oportuno. Y en caso de ser negativo, poder repetir el hemograma cada 15 días

## VIII. BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. **Allsopp M, Allsopp B. 2006.** Molecular Sequence Evidence for the Reclassification of Some *Babesia* Species. Rev Ann NY Acad Sci 1081: 509-517. doi: 10.1196/annals.1373.076
2. **Araujo A, Silveira J, Azevedo S, Nieri-Bastos F, Ribeiro M, Labruna M, Horta M. 2015.** *Babesia canis vogeli* infection in dogs and ticks in the semiarid region of Pernambuco, Brazil. Rev Pesq Vet Bras 35: 451-461. doi: 10.1590/S0100-736X2015000500012
3. **Birkenheuer A, Levy M, Savary K, Gager R, Breitschwerdt E. 1999.** *Babesia gibsoni* infections in dogs from North Carolina. Rev Am Anim Hosp Assoc 35: 125–8. doi: 10.5326/15473317-35-2-125
4. **Birkenheuer A, Levy M, Breitschwerdt E. 2003:** Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. J Clin Microbiol 41: 4172-4177. doi: 10.1128/jcm.41.9.4172-4177.2003
5. **Birkenheuer A, Levy M, Breitschwerdt E. 2004.** Efficacy of combined atovaquone and azithromycin for therapy of chronic *Babesia gibsoni* (Asian genotype) infections in dogs. J Vet Intern Med. 18:494-498.

6. **Birkenheuer A, Marr H, Wilson J, Breitschwerdt E, Quorollo B. 2018.** *Babesia gibsoni* cytochrome b mutations in canine blood samples submitted to a US veterinary diagnostic laboratory. *J Vet Intern Med.* 1–5. doi: 10.1111/jvim.15300
7. **Boozer A, Macintire D. 2003.** Canine babesiosis. *J. Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 33(4):885-904. doi: 10.1016/s0195-5616(03)00039-1
8. **Bostrom B, Wolf C, Greene C, Peterson D. 2008.** Sequence conservation in the rRNA first internal transcribed spacer region of *Babesia gibsoni* genotype Asia isolates. *Vet. Parasitol.* 152: 152–157. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.11.024
9. **Böhm M, Leisewitz A, Thompson P, Schoeman J. 2006.** Capillary and venous *Babesia canis rossi* parasitaemias and their association with outcome of infection and circulatory compromise. *Rev. Vet Parasitol.* 141:18-29. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.05.002
10. **Böse R, Jorgensen W, Dalglish R, Friedhoff K, De Vos A. 1995.** Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Rev Vet Parasitol.* 57:61–74. doi: 10.1016/0304-4017(94)03111-9
11. **Camacho A, Pallas E, Gestal J, Fraga J, Olmeda A, Telford S, Spielman A. 2003.** *Babesia microti*-like en un perro inmunocompetente. *Rev Clin Vet Pequeños An (AVEPA).* 23(2): 97-99. Disponible en <https://ddd.uab.cat/pub/clivetpeqani/11307064v23n2/11307064v23n2p97.pdf>
12. **Carret C, Walas F, Carcy B, Grande N, Piuigout E, Moubri K, Schetters T, Gorenflot A. 1999.** *Babesia canis canis, Babesia canis vogeli, Babesia canis rossi*: Differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46:3. doi: 10.1111/j.1550-7408.1999.tb05128. x.
13. **Cerro L, Assad R, Seabra-Junior E, Didonet T, Almosny N. 2018.** Frequency of *Babesia vogeli* in domestic dogs in the metropolitan area of Piura, Peru. *Rev. Acta Vet Brno.* 87: 255-260. doi: <https://doi.org/10.2754/avb201887030255>
14. **Chagas C, Binkienė R, Ilgūnas M, Lezhova T, Valkiūnas G. 2020.** The buffy coat method: a tool for detection of blood parasites without staining procedures. *J Parasites Vectors.* 13:104. doi: [doi.org/10.1186/s13071-020-3984-8](https://doi.org/10.1186/s13071-020-3984-8)
15. **Criado-Fornelio A, Martinez J, Buling A, Barba J, Jefferies R, Irwin P. 2006.** New data on epizootiology and genetics of piroplasms based on sequences of small

- ribosomal subunit and cytochrome b genes. *Rev Vet Parasitol* 142(3-4): 238-47. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.07.004
16. **Criado-Fornelio A, Veleiron C, Buling A, Barba J, Jefferies R, Irwin P. 2007.** New advances in molecular epizootiology of canine hematic protozoa from Venezuela, Thailand and Spain. *Rev Vet Parasitol* 144: 261-269. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.09.042
  17. **Costa-Junior L, Ribeiro M, Rembeck K, Rabelo E, Zahler M, Hirzmann J, Pfister K, Passos L. 2008.** Canine babesiosis caused by *Babesia canis vogeli* in rural areas of the State of Minas Gerais, Brazil and factors associated with its seroprevalence. *Rev. Vet Sci.* 86: 257-260. doi: 10.1016/j.rvsc.2008.07.002
  18. **Dantas-Torres F, Figueredo L. 2006.** Canine babesiosis: A Brazilian perspective. *Rev Vet Parasitol* 141: 197–203. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.07.030
  19. **Dantas-Torres F, Latrofa M, Annoscia G, Giannelli A, Parisi A, Otranto D. 2013.** Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* from the New and Old Worlds. *J Parasite Vector* 6: 213–213. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.07.037
  20. **Duarte S, Parente J, Pereira M, Soares C, Linhares G. 2011.** Phylogenetic characterization of *Babesia canis vogeli* in dogs in the state of Goiás, Brazil. *Rev Bras Parasitol V* 20(4): 274-280
  21. **Eiras D, Basabe J, Mesplet M, Schnittger L. 2008.** First molecular characterization of *Babesia vogeli* in two naturally infected dogs of Buenos Aires, Argentina. *Rev Vet Parasitol* 157: 294-298. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.07.037
  22. **Eiras D. 2018.** Aspectos diagnósticos y epidemiológicos de la piroplasmosis canina en áreas urbanas del sur del Gran Buenos Aires. Tesis de Doctorado en Medicina Veterinaria en la Universidad Nacional de La Plata. Argentina: Universidad Nacional de La Plata
  23. **Estares L, Chavez A, Casas E. 2000.** Ectoparásitos en caninos de los distritos de la zona climática norte de lima metropolitana. *Rev Inv Vet Perú* 11(1):72-76
  24. **Escalante A, Freeland D, Collins W, Lal A. 1998.** The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome b from the linear mitochondrial genome. *J Proc Natl Acad Sci.* 95: 8124–8129. doi: 10.1073/pnas.95.14.8124

25. **Fraga E. 2009.** Estudio clínico, laboratorial y ecográfico de la babesiosis canina en Galicia. Tesis de Doctorado en Medicina Veterinaria en la Universidad de Santiago de Compostela. España: versidad de Santiago de Compostela
26. **Fukumoto S, Tamaki Y, Okamura M, Bannai H, Yokoyama N, Suzuki T, Igarashi I, Suzuki H, Xuan X. 2007.** Prime-boost immunization with DNA followed by a recombinant vaccinia virus expressing P50 induced protective immunity against *Babesia gibsoni* infection in dogs. J. Elsevier. 25: 1334–1341. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.09.083
27. **Furuta I, Oliveira T, Teixeira M, Rocha A, Machado R, Tinucci-Costa M. 2009.** Comparison between a soluble antigen-based ELISA and IFATT in detecting antibodies against *Babesia canis* in dogs. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 18: 41–45. doi: doi.org/10.4322/rbpv.01803007
28. **Gallego N. 2019.** Actualización bibliográfica sobre los principios activos imidacloprid, permetrina, moxidectina, spinosad, afloxolaner, sarolaner y fluralaner, que se encuentran en antiparasitarios pour-on y tabletas orales para canino. Tesis de Título en Medicina Veterinaria de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A. Colombia: Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A
29. **García M, Moissant E, Pérez A, Quijada J, Somies D, García H. 2007.** Comportamiento natural de las fases no parasíticas de *Rhipicephalus sanguineus* (latreille, 1806) (acari: ixodidae) en un bioterio canino de Venezuela. [Internet], [28 de diciembre del 2017]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/959/95911668003.pdf>
30. **Gray J, Zintl A, Hildebrandt A, Hunfeld K, Weiss L. 2010.** Zoonotic babesiosis: overview of the disease and novel aspects of pathogen identity. Ticks and Tick-borne Diseases. Rev Ticks Tick Borne Dis 1: 3–10. Doi: 10.1016/j.ttbdis.2009.11.003
31. **Guimarães J, Albernaz A, Machado J, Junior O, García L. 2004.** Aspectos clínicos y de laboratorio de la babesiosis canina en la ciudad de Campos do Goytacazes. Rev Bras Parasitol. 13(1): 229.
32. **Gordillo E. 2010.** Manual práctico de toma y manejo de muestras en perros y gatos. Tesis de título en Medicina Veterinaria de la Universidad Veracruzana. Mexico: Universidad Veracruzana

33. **Harvey J. 2011.** Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas. En: Hematology Procedures. 1<sup>era</sup> ed. Netherlands: Elsevier Health Sciences. p 11-32
34. **Hansford K, Pietzsch M, Cull B, Medlock J. 2014.** Importation of *Rhipicephalus sanguineus* into the UK via dogs: tickborne diseases. J Vet Rec. 175(15): 385-6
35. **Irwin P. 2009.** Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. J Parasites Vectors. 2(1). doi: 10.1186/1756-3305-2-S1-S4
36. **Irwin P. 2012.** BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine. En: BSAVA. Babesiosis and Cytauxzoonosis. 2da ed. Inglaterra: British Small Animal Veterinary Association. P 77-95.
37. **Izzi S, Martin D, Chan R, Leutenegger C. 2013.** *Babesia canis vogeli*, *Ehrlichia canis*, and *Anaplasma platys* infection in a dog. J. Vet Clin Pathol. 42(4): 471–475. doi: 10.1111/vcp.12090
38. **Jefferies R, Ryan U, Irwin P. 2007a.** PCR–RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies. Rev Bras Med Vet 38: 63-67.
39. **Jefferies R, Ryan U, Jardine J, Robertson I, Irwin P. 2007b.** *Babesia gibsoni*: Detection during experimental infections and after combined atovaquone and azithromycin therapy. 117:115–23. doi: 10.1016/j.exppara.2007.03.016
40. **Kjemtrup A, Kocan A, Whitworth L, Meinkoth J, Birkenheuer A, Cummings, Boudreaux M, Stockham S, Irizarry-Rovira A, Conrad P. 2000.** There are at least three genetically distinct small piroplasms from dogs. Int. J. Parasitol. 30: 1501–1505.
41. **Krause P, Lepore T, Sikand V, Gadbow J, Burk J, Telford G, Brassard P, Pearl D, Azlanzadeh J, Christianson D, McGrath D, Spielman A. 2000.** Atovaquone and azithromycin for the treatment of babesiosis. J N Engl J Med. 343: 1454–1458. Doi: 10.1056/NEJM200011163432004
42. **Lack J, Reichard M, Van Den Bussche R. 2012.** Phylogeny and evolution of the piroplasmida as inferred from 18S rRNA sequences. Int J Parasitol 42: 353-363. doi: 10.1016/j.ijpara.2012.02.005
43. **Lau A. 2009.** An overview of the *Babesia*, *Plasmodium* and *Theileria* genomes: a comparative perspective. J. Mol. Biochem. Parasitol. 164: 1–8.
44. **Lemos T. 2014.** Caracterização molecular e avaliação dos parâmetros clínicos e hematológicos de cães naturalmente infectados por piroplasmas – *rangelia vitalii* e

- babesia vogeli – em cidades serranas do estado rio de janeiro. Tesis de Doctorado en Medicina Veterinaria de la Universidad Federal de Fluminense. Brasil: Universidad Federal de Fluminense. 109p
45. **Liu M, Cao S, Vudriko P, Suzuki H, Soma T, Xuan X. 2016.** *Babesia gibsoni* internal transcribed spacer 1 region is highly conserved amongst isolates from dogs across Japan. J. Vet. Med. Sci. 78(5): 863–865. doi: 10.1292/jvms.15-0483
  46. **Matjila P, Leisewitz A, Jongejan F, Penzhorn B. 2008.** Molecular detection of tick-borne protozoal and ehrlichial infections in domestic dogs in South Africa. J Vet Parasitol. 155: 152–7. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.04.012
  47. **Matsuu A, Ono S, Ikadai H, Uchide T, Imamura S, Onuma M. 2005.** Development of a SYBR green real-time polymerase chain reaction assay for quantitative detection of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) DNA. J Vet Diagn Invest. 17: 569–73. doi: 10.1177/104063870501700608
  48. **Mehlhorn H. 1988.** Parasitology in Focus: Facts and Trends. Springer Verlag. 6ta ed. Berlin: Springer-Verlag. p 79-80.
  49. **McTier T., Chubb N., Curtis M.P., Hedges L., Inskip G.A., Knauer C.S., Menon S., Mills B., Pullins A., Zinser E., Woods D.J., Meeus P. 2016.** Discovery of Sarolaner: A novel, orally administered, broad-spectrum, isoxazoline ectoparasiticide for dogs. J Vet Parasitol. 222: 3-11. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.02.019
  50. **Moraes P, Rufino C, Reis T, Aguiar D, Meneses A, Gonçalves E. 2014.** Optimization of a molecular method for the diagnosis of canine babesiosis. Rev. Bras. Parasitol. 23(1): 105-108. doi: 10.1590/S1984-29612014017
  51. **Moreau Y, Vidor E, Bissuel G, Dubreuil N. 1989.** Vaccination against canine babesiosis: an overview of field observations. J Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 83: 95–96. doi: 10.1016/0035-9203(89)90611-1
  52. **Navarrete M, Cordeiro M, Silva C, Pires M, Riveiro C, Cabezas- Cruz A, Massard C, Lopez E, Foseca A. 2016.** Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia canis vogeli* in *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* ticks from Cuba. Rev Bras Med Vet. 38(3): 63-67. Obtenido de: <https://rbmv.org/BJVM/article/view/881>
  53. **Olaya E. 2015.** Diagnóstico hematológico y caracterización de patógenos transmitidos por vectores en caninos de la ciudad de Guayaquil, Ecuador. Tesis de

- especialización en diagnóstico de laboratorio veterinario. Guayaquil: Universidad Nacional de la Plata. 34p
54. **Paraense W, Viana Y. 1948.** Algumas observações sobre a babesiose dos cães no Rio de Janeiro. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 46: 603 p.
  55. **Passos L, Geiger S, Barbosa M, Pfister K, Zahler-Rinder M. 2005.** First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. Rev Vet Parasitol 127: 81-85. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.07.028
  56. **Paulauskas A, Radzijeuskaja J, Karveliėne B, Grigonis A, Aleksandraviciėne A, Zamokas G, Babickaite L, Sabuna V, Petkevicius S. 2014.** Detection and molecular characterization of canine babesiosis causative agent *Babesia canis* in the naturally infected dog in Lithuania. Rev Vet Parasitol 205: 702-706. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.09.001
  57. **Peleg O, Baneth G, Eyal O, Inbar J, Harrus S. 2010.** Multiplex real-time qPCR for the detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia canis vogeli*. J Vet Parasitol. 173: 292–9. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.06.039
  58. **Reichenow E. 1935.** Übertagungsweise und Entwicklung der Piroplasmen. Zbl Bakt I Orig. 135:108-199.
  59. **Rendón D, Quintana E, Door I, Vicuña F, León D, Falcón N. 2018.** Parámetros demográficos en la población de canes y gatos domésticos en asentamientos humanos del distrito de Ventanilla, Callao-Perú. Rev Inv Vet. 29(1): 217-225. doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v29i1.14191>
  60. **Sá A, Cerqueira A, O'dwyer L, Macieira D, Abreu F, Ferreira R, Pereira A, Velho P, Almosny N. 2006:** Detection and molecular characterization of *Babesia canis vogeli* from naturally infected Brazilian dogs. Int J Appl Res Vet M 4(2): 163-168.
  61. **Sakuma M, Fukuda K, Takayama K, Kobayashi Y, Shimokawa M, Setoguchi A, Endo Y. 2012.** Molecular Epidemiological Survey of the *Babesia gibsoni* cytochrome b Gene in Western Japan. J Vet Med Sci. 74(10): 1341–1344. doi: 10.1292/jvms.12-0140
  62. **Salem N, Farag H. 2014.** Clinical, Hematologic, and Molecular Findings in Naturally Occurring *Babesia canis vogeli* in Egyptian Dogs. J. Vet Med Int. 1: 6. doi: [doi.org/10.1155/2014/270345](http://doi.org/10.1155/2014/270345)
  63. **Santos F, Coppede J, Pereira A, Oliveira L, Roberto P, Benedetti R, Zucoloto L, Lucas F, Sobreira L, Marins M. 2009.** Molecular evaluation of the incidence of



- Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. *J. The Veterinary*. 179: 145-14. doi: 10.1016/j.tvjl.2007.08.017
64. **Schettters T, Strydom T, Crafford D, Kleuskens J, Van de Crommert J, Vermeulen A. 2007.** Immunity against *Babesia rossi* infection in dogs vaccinated with antigens from culture supernatants. *J Vet Parasitol*. 144 :10–9. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.09.026
65. **Soares J, Girotto A, Brandão P, Da Silva A, Franca R, Lopes S, Labruna M. 2011** Detection and molecular characterization of a canine piroplasm from Brazil. *J Vet Parasitol*. 180: 3-4. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.03.024
66. **Solano-Gallego L, Baneth G. 2011.** Babesiosis in dogs and cats-Expanding parasitological and clinical spectra. *Rev Vet Parasitol* 181: 48-60. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.04.023
67. **Solano-Gallego L, Sainz A, Roura X, Estrada-Peña A, Miró A. 2016.** A review of canine babesiosis: the European perspective. *J Parasite Vector*. 9: 336. doi: 10.1186/s13071-016-1596-0
68. **Spolidorio M, Torres M, Campos W, Melo A, Igarashi M, Amude A, Labruna M, Aguiar D. 2011.** Molecular detection of *Hepatozoon canis* and *Babesia canis vogeli* in domestic dogs from Cuiabá, Brazil. *Rev Bras Parasitol*. 20(3): 253-55. doi: 10.1590/s1984-29612011000300015
69. **Spolidorio M, Minervino A, Valadas S, Soares H, Neves K, Labruna M, Ribeiro M, Gennari S. 2013.** Serosurvey for tick-borne diseases in dogs from the Eastern Amazon, Brazil. *Rev Bras Parasitol*. 22(2): 214-219. doi: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612013005000023>
70. **Terao M, Akter S, Yasin M, Nakao R, Kato H, Alam M, Katakura K. 2015.** Molecular detection and genetic diversity of *Babesia gibsoni* in dogs in Bangladesh. *J Infect Genet Evol*. 31:53-60. doi: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.01.011>
71. **Trapp SM, Messick JB, Vidotto O, Jojima FS, de Moraes HS. 2006.** *Babesia gibsoni* genotype Asia in dogs from Brazil. *Rev Vet Parasitol* 141: 177–180. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.04.036
72. **Trotz-Williams L, Trees A. 2003.** Systematic review of the review of the distribution of the major vector-borne parasitic infections in dogs and cats in Europe. *Veterinary Record*. 152: 97-105 doi: 10.1136/vr.152.4.97

73. **Uilenberg G, Franssen J, Perié M, Spanjer M. 1989.** Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. J. Veterinary quarterly. 11:1, 33-40. doi: 10.1080/01652176.1989.9694194
74. **Uilenberg G. 2006.** *Babesia* - a historical overview. J Vet Parasitol. 138: 3-10. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.01.035
75. **Vargas-Hernández G, André M, Faria J, Munhoz T, Hernandez-Rodriguez M, Machado R, Tinucci-Costa M. 2012:** Molecular and serological detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in dogs in Colombia. Rev Vet Parasitol 186: 254– 260. doi: doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.011
76. **Vignau M, Venturini L, Romero J, Eiras D, Basso W. 2005.** En: Parásitología práctica y modelos de enfermedades parasitarias en los animales domésticos. 1ª ed. Argentina: DIAP. p13-33
77. **Wang J, Liu J, Yang J, Liu Z, Wang X, Li Y, Luo J, Guan G, Yin H. 2019.** Molecular detection and genetic diversity of *Babesia canis canis* in pet dogs in Henan Province, China. J Parasitol Int. 71: 37-40. doi: doi.org/10.1016/j.parint.2019.03.011
78. **Wei L, Kelly P, Ackerson K, Zhang J, El-Mahallawy H, Kaltenboeck B, Wang C. 2014.** First report of *Babesia gibsoni* in Central America and survey for vector-borne infections in dogs from Nicaragua. J. Parasites Vectors. 7:126. doi: doi.org/10.1186/1756-3305-7-126
79. **Zahler M, Schein E, Rinder H. 1998.** Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. J. Parasitol Res. 84: 544-548. doi: http://doi.org/10.1007/s004360050445
80. **Zahler M, Rinder H, Zwegarth E, Fukata T, Maede Y, Schein E, Gothe R. 2000.** '*Babesia gibsoni*' of dogs from North America and Asia belong to different species. J. Parasitol Res. 120(4): 365-369. doi:10.1017/s0031182099005557

## IX. APÉNDICE

**Apéndice 1.** Los niveles celulares de serie roja, blanca y plaquetaria de los 50 perros con antecedentes de garrapatas de al menos 1 mes del distrito de Ventanilla

ID	ROJA			BLANCA							TROMBOCÍTICA	Presencia de Babesia	
	ERIT	HB	HTO	LEUC	ABAS	SEG	LINF	MON	EOS	BASO	PLAQ		
1	5.31	11.7	35	23800	0	60	35	0	5	0	390000	Positivo	LINDA
2	8.71	17.7	53	11100	0	88	11	0	1	0	45000	Negativo	ARGENIS
3	3.99	8	24	9400	2	87	10	1	0	0	151500	Negativo	CANELA
4	3.1	7.9	23	4600	0	81	15	1	3	0	105000	Negativo	ADAMMO
5	5.13	11.9	37	14600	0	90	9	1	0	0	200500	Negativo	MONCHITA
6	5.86	15.3	46	4500	0	77	22	1	0	0	67500	Negativo	JACK
7	4.61	11.7	35	12600	2	71	21	5	1	0	207000	Negativo	MOMO
8	2.55	6	17	7200	0	83	15	1	1	0	73500	Negativo	NICOLAS
9	5.4	11.7	35	9000	0	76	21	1	2	0	82000	Negativo	HACHI
10	4.69	10	30	10500	0	80	16	1	1	0	60000	Negativo	BLANCA
11	2.41	8	24	37300	0	87	12	0	1	0	504000	Negativo	CANDY
12	6.54	13.3	40	13600	0	58	37	3	2	1	204000	Negativo	SHAILON
13	2.31	5	18	15100	2	69	26	2	1	0	121500	Negativo	KUKY
14	5.54	13	38	16900	0	61	35	1	3	0	282000	Negativo	ARCHI
15	4.4	9.4	30	10700	3	65	27	1	2	0	120000	Negativo	NERÓN
16	3.82	7.7	24	11700	1	80	15	2	1	0	90000	Negativo	SCOTT
17	4.82	9	27	11500	0	81	18	1	0	0	120000	Negativo	VOLTON
18	8.16	16.3	49	17400	0	67	30	1	2	0	220000	Negativo	THOR

19	2.06	6.3	19	75800	6	68	20	3	3	0	40000	Negativo	BALÚ
20	1.91	7	20	20900	1	85	12	2	0	0	136500	Negativo	EEVEE
21	5.59	13.3	40	2200	1	25	60	8	6	0	181500	Negativo	CORAL
22	4.15	9.6	29	18000	0	90	9	1	0	0	220000	Negativo	JENAL
23	7.72	15.3	46	15100	0	62	28	7	3	0	170000	Negativo	HANNA
24	7.27	10	32	19200	0	76	20	3	1	0	230000	Negativo	CHARLIE
25	5.27	11	33	10600	0	76	21	0	3	0	220000	Negativo	NERON
26	8.02	14	42	8000	0	78	16	3	3	0	250000	Negativo	ROCCO
27	6.41	17	52	8900	0	75	24	0	1	0	215000	Negativo	GARU
28	7.39	13.3	40	11800	0	71	22	2	5	1	357500	Negativo	SAMANTHA
29	7.19	15.3	46	12300	0	70	25	1	4	0	320000	Negativo	ROMEO
30	7.14	14.6	44	11200	0	63	35	2	0	0	210000	Negativo	ZEUS
31	8.52	17	50	12200	0	73	22	3	2	0	250000	Positivo	DAVID
32	7.99	17	51	14800	0	75	19	3	3	0	270000	Positivo	CYBORG
33	3.26	8	23	12400	0	42	52	6	0	0	60000	Positivo	CHAMI
34	5.15	17.6	43	3000	0	35	56	8	1	0	199000	Positivo	SUSY
35	6.91	16.3	50	8300	1	89	4	5	2	0	350000	Negativo	SPOCK
36	4.71	10.3	31	20700	0	50	47	2	1	0	520000	Negativo	BOBBY
37	6.82	14	42	8300	0	77	18	4	1	0	288000	Negativo	KAZUMI
38	3.93	9	27	11000	0	79	12	6	3	0	70000	Negativo	CELESTE
39	4.76	11.3	34	2700	0	81	16	3	0	0	60000	Negativo	DAKOTA
40	5.42	12.3	37	8900	2	60	30	6	2	0	75000	Negativo	LAZY
41	5.83	14.3	43	19600	0	81	12	2	4	0	530000	Positivo	PELUSA
42	4.36	9.6	29	21100	0	76	18	4	2	0	540000	Negativo	KACHITO
43	3.29	9	27	9000	0	70	25	5	0	0	50000	Positivo	CHIKI
44	2.34	6.3	19	10700	0	52	44	4	0	0	77000	Positivo	NEGRA
45	3.53	10	31	8000	0	74	24	1	1	0	65000	Positivo	RUFINO ACOSTA
46	2.65	7	20	9600	0	60	38	0	2	0	53000	Positivo	LOBO ESPINOZA
47	4.2	10.2	33	9600	0	76	23	1	0	0	86000	Positivo	MANCHITAS

48	3.8	6.9	25	8300	0	68	29	3	0	0	70000	Positivo	LAYKA
49	6.36	12	38	12000	0	56	44	0	0	0	190000	Positivo	TEO
50	2.31	8.3	26	11400	0	79	18	3	0	0	120000	Negativo	TOMMY

ID: Código de cada perro

ERIT: Número de eritrocitos

HB: Número de Hemoglobina

HTO: Número de Hematocrito

LEUC: Número de Número de Leucocitos

ABAS: Número de Abastoados

PLAQ: Número de Plaqueta

SEG: Segmentados

LINF: Número de Linfocitos

MON: Número de Monocitos

EOS: Número de Eosinófilos

BASO: Número de Basófilos

**Apéndice 2.** Los niveles celulares de serie roja, blanca y plaquetaria que complementen el análisis hematológico: Los valores hematológicos referenciales para caninos fueron establecidos por el Laboratorio de Patología Clínica Veterinaria de la FMV-UNMSM.

Parámetro Hematológico	Valores Referenciales de Caninos	Babesia positivos N=13			Babesia negativos N=37		
		PROMEDIO	DS	I.C. (95%)	PROMEDIO	DS	I.C. (95%)
<b>Recuento de glóbulos rojos (GR/ul.)</b>	5'000'000 - 7'000'000 / ul	4'780'000	1'960	3'5 - 5'9	5'170'000	1'878'000	4'56 - 5'77
<b>Determinación de hemoglobina (Hb)</b>	12-18 g/dl	11.3	4.04	8.8- 13.7	11.3	3.35	10.2 - 12.3
<b>Porcentaje de hematocrito (Hto)</b>	37-55%	33.7	10.8	27.1-40.2	34.2	10	30.9 - 37.4
<b>Recuento de leucocitos (GB/ul.)</b>	8'000 - 13'000 / ul	11'769	5'301	8'56 -14'97	14'160	12,190	10'23- 18'09
<b>Recuento plaquetario(Pl/ul.)</b>	200'000 - 400'000 / ul	176'150	150'500	85'195- 267'104	195'324	130'566	153'2 - 237'3

### Apéndice 3. Carta de consentimiento informad

#### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo \_\_\_\_\_ con DNI N° \_\_\_\_\_ con domicilio en \_\_\_\_\_, teléfono \_\_\_\_\_ propietario de mi mascota \_\_\_\_\_ identificado con el N° \_\_\_\_\_

Manifiesto que he recibido y entendido la información sobre la toma de muestra de sangre al que voluntariamente autorizo que se someta a mi mascota, teniendo conocimiento de los datos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos en el proyecto de tesis: "Identificación molecular de especies del género *Babesia* spp. en perros de Ventanilla" del estudiante de pregrado Erick Arias Otoyá (código de estudiante: 14080017), cuyo asesor de tesis recae sobre el Mv. Mg. Luis Hoyos Sifuentes

\_\_\_\_\_  
Propietario

