

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

*BABESIA* SPP. EN PERROS DENTRO Y FUERA DEL VALLE CENTRAL  
DE COSTA RICA: PREVALENCIA EN SANGRE Y GARRAPATAS,  
SEROPREVALENCIA Y FACTORES DE RIESGO

Tesis sometida a consideración de la comisión del Programa de Estudios  
de Posgrado en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e  
Inmunología para optar al grado y título de Maestría Académica en  
Microbiología

ANDREA GARCIA QUESADA

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2017

## **Dedicatoria**

A Dios por darme la fuerza y perseverancia para concluir un proceso más de vida.

A mi esposo por su comprensión y ayuda incondicional.

A mi hijo que es una de mis razones para superarme.

A mis padres por enseñarme el valor de la responsabilidad, perseverancia y empuje para alcanzar las metas que la vida nos presenta.

## **Agradecimientos**

A Dios.

A mi familia.

A mi profesora tutora Gaby Dolz Wiedner, a mis lectores Juan José Romero Zúñiga y Ana Jiménez Rocha.

A Donald Arguedas Cortés.

A Anthony Solórzano Morales y todo el personal del Laboratorio de Entomología, Parasitología y Zoonosis de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional.

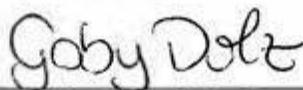
Y a todas aquellas personas que de una u otra forma apoyaron para la realización de este trabajo.

"Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Microbiología."



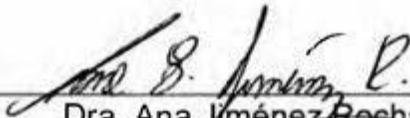
---

M.Sc. Norman Rojas Campos  
**Representante del Decano  
Sistema de Estudios de Posgrado**



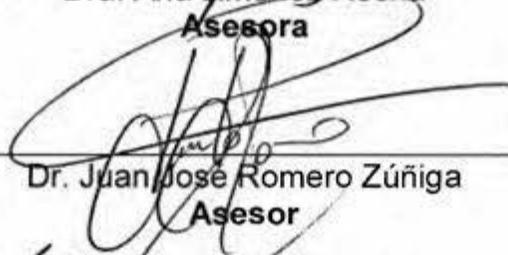
---

Dra. Gaby Dolz Wiedner  
**Directora de Tesis**



---

Dra. Ana Jiménez Recha  
**Asesora**



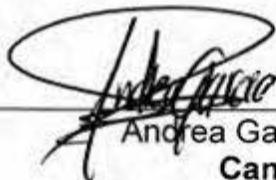
---

Dr. Juan José Romero Zúñiga  
**Asesor**



---

Dra. Adriana Troyo Rodríguez  
**Representante del Director Programa de Posgrado en Microbiología,  
Parasitología, Química Clínica e Inmunología**



---

Andrea García Quesada  
**Candidata**

## Cuadro de contenidos

Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Hoja de aprobación.....	iv
Cuadro de contenidos.....	v
Resumen.....	vii
Abstract.....	viii
Lista de cuadros .....	ix
Lista de figuras.....	x
Lista de abreviaciones .....	xi
1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes y definición.....	1
1.2 Etiología, importancia y distribución de babesiosis en caninos.....	1
1.3 Transmisión y ciclo de vida del agente.....	5
1.4 Patogénesis y manifestaciones clínicas en caninos.....	7
1.5 Diagnóstico.....	10
1.6 Justificación.....	14
1.7 Hipótesis.....	16
1.8 Objetivos.....	16
1.9 Objetivo general.....	16
1.10 Objetivos específicos.....	16
2. Metodología.....	18
2.1 Tipo de estudio.....	18
2.2 Procedencia, tipo y tamaño de la muestra.....	18
2.3 Diagnóstico serológico.....	20
2.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	21
2.4.1 PCR punto final para <i>Babesia</i> spp. en sangre y garrapatas de caninos y secuenciación.....	21
2.4.2. qPCR para <i>B. canis vogeli</i> en sangre y garrapatas de caninos.....	22
2.4.3 Análisis estadístico.....	23
3. Resultados.....	25
3.1 Población analizada.....	25

3.2. Resultados del diagnóstico serológico y caracterización de los perros seropositivos.....	29
3.3. Valores hematológicos de los caninos seropositivos a <i>B. canis vogeli</i> y diferencias significativas con respecto a caninos seronegativos.....	31
3.4 Factores asociados a caninos seropositivos a <i>B. canis vogeli</i> .....	33
3.5 Resultados del PCR en punto final de los caninos positivos a <i>Babesia</i> spp.....	35
3.5 Secuenciación y árbol filogenético.....	35
3.6 Resultados del qPCR para <i>B. canis vogeli</i> .....	36
3.7 Valores hematológicos de los caninos positivos a <i>B. canis vogeli</i> y diferencias significativas con respecto a caninos negativos.....	39
3.8 Factores asociados a <i>B. canis vogeli</i> de los caninos positivos en qPCR.....	40
3.9 Resultados de la qPCR de los caninos con garrapatas positivas a <i>B. canis vogeli</i> .....	41
3.10 Resultados de los caninos seropositivos y qPCR negativos, seropositivos y qPCR positivos, y qPCR positivos y seronegativos.....	43
4. Discusión.....	47
4.1 Diagnóstico serológico.....	47
4.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	52
4.3 Situación epidemiológica de la babesiosis canina en Costa Rica.....	59
5. Conclusiones.....	61
6. Recomendaciones.....	63
7. Bibliografía.....	65
8. Anexos.....	79

## RESUMEN

La babesiosis canina es una enfermedad producida por un parásito del género *Babesia*, que ocasiona la destrucción de los glóbulos rojos, causando manifestaciones clínicas sistémicas que van desde leves hasta severas. El objetivo del presente trabajo fue determinar la seroprevalencia y la prevalencia de *Babesia spp.* en caninos dentro y fuera del Valle Central de Costa Rica, establecer la presencia de *Babesia spp.* en garrapatas, e identificar los factores de riesgo y las alteraciones en los valores hematológicos asociados a la babesiosis canina.

Mediante Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) se determinó una seroprevalencia de *B. canis vogeli* de 5% (24/453) a nivel nacional, 2% (5/253) dentro del Valle Central y 10% (19/200) fuera del Valle Central. Los caninos seropositivos presentaron trombocitopenia, monocitopenia y anemia ( $p \leq 0.05$ ) en comparación con los caninos seronegativos. Los siguientes factores se asociaron a caninos seropositivos a *Babesia canis vogeli*: vivir fuera del Valle Central, talla mediana, vivir con más de tres perros, grado de infestación con garrapatas, presencia de garrapatas y presencia de la especie *Rhiphicephalus sanguineus* s.l. y 1 de la especie *Amblyomma ovale*, presentar en el pasado anorexia, fiebre, debilidad, pérdida de pelo, problemas respiratorios y picazón y presentar fiebre en el examen objetivo general.

Mediante PCR en tiempo real (qPCR) se determinó una prevalencia de *B. canis vogeli* global de 31% (125/400), 21% (47/220) dentro del Valle Central, y 43% (78/180) fuera del Valle Central, mientras que un 30% (42/142) de garrapatas recolectadas sobre los perros resultaron infectadas, 41 de la especie *R. sanguineus* s.l. Los siguientes factores de riesgo fueron asociados a caninos qPCR positivos a *B. canis vogeli*: vivir fuera del Valle Central, tener propietario, vivir con solamente una o con más de cuatro personas, y grado de infestación con garrapatas. Se identificaron 111 caninos con infección temprana, 7 caninos con infección activa y 12 caninos con infecciones pasadas. Se determinó que la PCR en punto final no fue específica para identificar el género *Babesia* en perros y sus garrapatas. Se estableció únicamente una especie de *Babesia* presente en sangre de perros y sus garrapatas: *B. canis vogeli*.

## ABSTRACT

Canine babesiosis is a disease caused by a parasite of the genus *Babesia*. This is characterized by the destruction of the red blood cells, resulting in mild or severe systemic manifestations. The following research is a study whose aim was to determine the seroprevalence and the prevalence of *Babesia* spp in dogs inside and outside the Central Valley of Costa Rica. Also, the presence of *Babesia* spp in ticks, the risk factors and the hematological alterations associated with canine babesiosis.

Indirect Immunofluorescence (IFI) determined a seroprevalence of 5% (24/453) of *Babesia canis vogeli* at national level, 2% (5/253) in the Central Valley and 10% (19/200) outside the Central Valley. Seropositive canines presented thrombocytopenia, monocytopenia and anemia ( $p \leq 0.05$ ). The following risk factors were associated with seropositive canines to *B. canis vogeli*: living outside the Central Valley, being of medium size, living with more than three other dogs, presenting degree of infestation with ticks, presenting ticks, presenting ticks of the species *Rhiphicephalus sanguineus* s.l, presenting anorexia, fever, weakness, hair loss, breathing problems, itching in the past and presenting fever in the general objective exam. Real-time PCR (qPCR) determined a global prevalence of *B. canis vogeli* of 31% (125/400), 21% (47/220) in the Central Valley, 43% (78/180) outside the Central Valley, while 30% (42/142) of ticks collected on dogs were infected, 41 of them with the species *R. sanguineus* s.l. and 1 with *Amblyomma ovale*. The following risk factors were associated with canine qPCR positive *B. canis vogeli*: living outside the Central Valley, having an owner, living with only one person, or more than four people, and degree of infestation with ticks. 111 canines were identified with early infection, 7 canines with active infection and 12 canines with past infections. It was determined that the endpoint PCR was not specific to identify the genus *Babesia*. Only one species of *Babesia* was detected in the blood of dogs and their ticks: *B. canis vogeli*.

## Lista de Cuadros

<b>Cuadro 1.</b> Morfología, sinonimia, vectores, tamaño, <del>aparencia citológica</del> , distribución geográfica y relevancia zoonótica de las diferentes especies de piroplasmas que infectan a la especie canina.....	4
<b>Cuadro 2.</b> Iniciadores utilizados en el estudio para determinar <i>Babesia</i> spp. y <i>B. canis vogeli</i> .....	23
<b>Cuadro 3.</b> Cantidad de perros analizados dentro y fuera del Valle Central por provincia, cantón y región .....	26
<b>Cuadro 4.</b> Características de la población canina analizada dentro y fuera del Valle Central.....	27
<b>Cuadro 5.</b> Algunas variables analizados en la población canina dentro y fuera del Valle Central.....	28
<b>Cuadro 6.</b> Seroprevalencias y prevalencias a <i>B. canis vogeli</i> en caninos y porcentajes de infección en garrapatas de caninos, distribuidas por provincias.....	29
<b>Cuadro 7.</b> Títulos de las sueros caninos seropositivos a <i>B. canis vogeli</i> según procedencia (dentro y fuera del Valle Central).....	30
<b>Cuadro 8.</b> Diferencias significativas entre valores hematológicos de perros seropositivos y seronegativos a <i>B. canis vogeli</i> .....	33
<b>Cuadro 9.</b> Factores asociados a caninos seropositivos a <i>B. canis vogeli</i> determinado mediante regresión logística.....	34
<b>Cuadro 10.</b> Resultados de las secuencias del gen ARNr 18S de sangre y garrapatas de perros y la base de datos GenBank del NCBI utilizando el algoritmo Blastn y de la comparación entre la qPCR.....	36
<b>Cuadro 11.</b> Diferencias significativas entre valores hematológicos de perros qPCR positivos y negativos a <i>B. canis vogeli</i> determinado mediante prueba t	40
<b>Cuadro 12.</b> Factores asociados a caninos positivos a <i>B. canis vogeli</i> , determinado mediante regresión logística.....	41
<b>Cuadro 13.</b> Diferencias estadísticamente significativas entre valores hematológicos de los perros según los resultados obtenidos en la IFI y en la qPCR mediante prueba de ANOVA.....	46

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida general del género <i>Babesia</i> .....	7
<b>Figura 2.</b> Curva estándar en el qPCR desarrollado para identificar <i>B. canis vogeli</i> .....	37

## Lista de Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico  
ANOVA: Análisis de varianza  
ARNr: Ácido ribonucleico ribosomal  
cADN: ADN complementario  
CHCM: Concentración de hemoglobina corpuscular media  
CID: Coagulación intravascular diseminada  
DE: Desviación estándar  
ELISA : Ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas  
IC: Intervalo de confianza  
ID: Identificación  
IFI: Inmunofluorescencia indirecta  
IgG: Inmunoglobulina G  
LI: Límite inferior  
LS: Límite superior  
n: Número de individuos analizados.  
NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica.  
OR: razón de posibilidades  
P: Probabilidad calculada  
PBS: Buffer fosfato salino  
PCR anidada: Reacción en cadena de la polimerasa anidada  
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa  
qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real  
Ref: variable usada como valor de referencia  
TBE: Tris Base, Ácido Bórico, EDTA

## 1. Introducción

### 1.1 Antecedentes y definición

A finales del siglo XIX Babes identificó microorganismos presentes en eritrocitos de ganado en Rumanía como la causa de hemoglobinuria o la llamada fiebre roja del agua. Más tarde Babes encontró organismos similares en eritrocitos de ovejas (Babes, 1888). Estos agentes fueron seguidamente llamados *Babesia bovis* y *Babesia ovis*, respectivamente, y el género fue llamado *Babesia* en honor a Babes (Solano-Gallego y Baneth, 2011).

En 1893 Smith y Kilbourne establecieron al Piroplasma como el agente causal de la fiebre del ganado de Texas, al cual se le llamó *Babesia bigemina* (Smith y Kilbourne, 1893), un hallazgo significativamente histórico, debido a que este piroplasma fue el primer patógeno conocido de vertebrados transmitido por artrópodos (Hunfeld *et al.*, 2008).

Más de 100 especies de *Babesia* infectan un amplio rango de animales domésticos y silvestres, de las cuales principalmente dos especies se han asociado a la babesiosis humana, *Babesia divergens* y *Babesia microti* (Vannier y Krause, 2012; Solano-Gallego *et al.*, 2016).

La babesiosis es producida por un protozoario que pertenece al género *Babesia*, al phylum Apicomplexa, a la clase Piroplasmae y al orden Piroplásmida (Rodríguez-Morales, 2007; Solano-Gallego y Baneth 2011). La babesiosis en perros fue inicialmente encontrada en 1895 en Italia, donde los investigadores Piana y Galli Valerio observaron el parásito en la sangre de éstos (Piana y Galli-Valerio, 1895). La babesiosis canina se caracteriza por la destrucción de los glóbulos rojos causando manifestaciones clínicas sistémicas que van desde leves hasta severas (Solano-Gallego y Baneth, 2011).

### 1.2 Etiología, importancia y distribución de babesiosis en caninos

Durante mucho tiempo se asumió la existencia de únicamente dos especies capaces de infectar a perros, una de gran tamaño y otra de pequeño tamaño, *Babesia canis* y *Babesia gibsoni*, respectivamente (Boozer y Macintire 2003). La introducción de técnicas moleculares permitió el diagnóstico de nuevas especies, imposibles de determinar morfológicamente. De este modo, la forma

grande (*B. canis*), inicialmente se subdividió en tres subespecies: *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi* y *Babesia canis canis*, posteriormente se descubrió otro piroplasma grande a la que se refirió como la forma grande *Babesia* spp. (Suárez-Rey *et al.*, 2011). *B. canis vogeli*, *B. canis rossi* y *B. canis canis* son idénticas morfológicamente pero se ha demostrado que presentan variaciones importantes en cuanto a los signos clínicos, la distribución geográfica, la especificidad vectorial y las características genéticas, por lo que actualmente se consideran especies separadas (Solano y Baneth 2011).

Dentro de los pequeños piroplasmas, aparte de *B. gibsoni*, también se ha descrito a *Babesia conradae* (Kjemtrup y Conrad, 2006; Kjemtrup *et al.*, 2006), *Babesia microti-like* (Zahler *et al.*, 2000), a la cual también se le ha llamado *Theileria annae* (Zahler *et al.*, 2000; Camacho-García, 2006). Estudios recientes proponen nombrar a *T. annae* y sinónimos como *Babesia vulpes* sp. nov. debido a que no presenta una fase en los leucocitos como *Theileria* y no infecta a humanos ni roedores como *B. microti* por lo que filogenéticamente se clasifica como una especie separada. Además, se nombra así por su hospedero natural el zorro rojo *Vulpes vulpes* (Baneth *et al.*, 2015).

La distribución geográfica de estos protozoarios está limitada por los rangos ecológicos de sus garrapatas vectores. A excepción de *B. gibsoni*, cuya rápida y reciente distribución se le atribuye a la transmisión de canino a canino sin mediar un vector (Irwin, 2009), *B. canis rossi* es transmitida por *Haemaphysalis leachi* y se encuentra en Suráfrica y el este de Sudán, y es la especie más patogénica cuando se compara con *B. canis vogeli* y *B. canis canis*. Por otra parte, la infección por *B. canis canis* es transmitida por *Dermacentor reticulatus* y se distribuye en Europa y Asia. La infección por *B. canis vogeli* es transmitida por *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato y está distribuida en el norte y sur de América, en Europa, en el este y sur de África, Australia y Japón (Solano-Gallego *et al.*, 2008; Solano-Gallego y Baneth, 2011). En el Cuadro 1 se detalla la morfología, la sinonimia, los vectores, el tamaño, la apariencia citológica, la distribución geográfica y la relevancia zoonótica de las diferentes especies de piroplasmas encontradas en perros (Solano-Gallego y Baneth, 2011; Suárez-Rey *et al.* 2011).

En América Latina se han reportado casos de infección por diferentes especies de *Babesia* en perros. Un estudio llevado a cabo por Friche-Passos *et al.* (2005) determinó mediante caracterización molecular que en Brasil la babesiosis canina es causada por el protozoo *B. canis vogeli*. Además, Maia *et al.* (2007) determinaron una seroprevalencia de *B. canis vogeli* de 18.8% (95/505), mediante el ensayo de inmunofluorescencia indirecto (IFI) en el estado de Minas Gerais de Brasil.

En Buenos Aires de Argentina un estudio publicado por Eiras *et al.* (2008) indicó una prevalencia de 0.2% de caninos infectados con piroplasmas grandes de *Babesia* mediante observación directa de frotis sanguíneos. En Venezuela, se estudiaron muestras de sangre de 134 caninos y se encontraron 2.24% caninos infectados con *B. canis vogeli* mediante la amplificación (PCR convencional) y secuenciación del gen ARNr 18S (Criado-Fornelio *et al.*, 2007). En Colombia, Vargas-Hernández *et al.* (2012) estudiaron caninos de las ciudades de Bogotá, Villavicencia y Bucaramanga, provenientes de albergues animales, clínicas veterinarias y perros usados para la detección de explosivos y reportaron una seroprevalencia de *B. canis vogeli* de 51.6% mediante la IFI y un 5.5% de muestras positivas para *Babesia* spp. mediante la amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional del gen ARNr (ARN ribosomal) subunidad pequeña. En Nicaragua, Wei *et al.* (2014), reportaron una prevalencia de 26% (10/39) de *Babesia* spp., 4 eran *B. gibsoni* y 6 *B. canis vogeli*.

En Costa Rica se han reportado estudios sobre presencia y prevalencia de babesiosis bovina y equina (Hermans *et al.*, 1994; Pérez *et al.*, 1994; Álvarez *et al.*, 1996; Pérez *et al.*, 1996; Pineda, 1998; Posada, 2012; Shebish *et al.*, 2012). Recientemente, un estudio realizado por Rojas *et al.* (2014) indicó una prevalencia de un 8% (12/146) de *B. canis vogeli* en caninos de cuatro diferentes regiones de Costa Rica (San Ramón de Alajuela, Chomes de Puntarenas, Liberia

**Cuadro 1.** Morfología, sinonimia, vectores, tamaño, apariencia citológica, distribución geográfica y relevancia zoonótica de las diferentes especies de piroplasmas que infectan a la especie canina.

Morfología	Especie	Sinónimos	Vector	Tamaño (µm)	Apariencia citológica	Distribución geográfica	Relevancia zoonótica
Grande	<i>Babesia vogeli</i>	<i>Babesia canis vogeli</i>	<i>R. sanguineus</i> s.l.	2.5 × 4.5	Solos o en parejas	Mundial	Baja?
	<i>Babesia canis</i>	<i>Babesia canis canis</i>	<i>Dermacentor</i> spp. y <i>R. sanguineus</i> s.l.	2×5	Usualmente en parejas	Sur y centro de Europa hasta el Báltico	Baja?
	<i>Babesia rossi</i>	<i>Babesia canis rossi</i>	<i>Haemaphysalis leachi</i>	2×5	Usualmente en parejas	Sudáfrica, Nigeria y Sudán	Baja?
	La forma grande <i>Babesia</i> spp.	No conocido	No conocido	2x6	Ameboides o piriformes en parejas	Este de los Estados Unidos	No conocido
Pequeño	<i>Babesia gibsoni</i>	<i>Babesia gibsoni</i> genotipo asiático	<i>Haemaphysalis longicornis</i> , <i>Haemaphysalis bispinosa</i> , <i>R. sanguineus</i> s.l.	1×3	Usualmente solos	Mundial	Baja
	<i>Babesia conradae</i>	<i>Babesia gibsoni</i> genotipo californiano	<i>R. sanguineus</i> s.l.	0.3-3	En anillos, tétradas o ameboides	California	No conocido
	<i>Babesia microti-like</i> sp	<i>Theileria annae</i>	<i>Ixodes hexagonus</i> , <i>Ixodes ricinus</i> , <i>R. sanguineus</i> s.l.	1×2.5	Usualmente solos	España (Galicia), Croacia y Estados Unidos	No conocido
	<i>Theileria</i> spp.	No conocido	No conocida	Detección molecular solamente	No conocido	Suráfrica	No conocida

? Datos inciertos. Tomado de Otranto *et al.*, (2009), Solano-Gallego y Baneth (2011) y Suárez-Rey *et al.* (2011).

de Guanacaste y Kékoldi de Limón), mediante la técnica de PCR convencional y PCR en tiempo real, identificando el gen ARNr 18S. Wei *et al.* (2015) realizaron un estudio en 40 perros sanos del noroeste de Costa Rica y encontraron una prevalencia de un 25% de *Babesia* spp. mediante PCR en tiempo real. Además, hallaron dos especies de *Babesia*, una de gran tamaño y una de pequeño tamaño, *B. canis vogeli* y *B. gibsoni*, respectivamente.

No se han reportado hasta la fecha infecciones humanas con especies de *Babesia* que infectan a los perros y gatos, sin embargo, estos animales de compañía son fuente de infección de garrapatas para humanos (Lempereur *et al.*, 2011). Hasta la fecha existe controversia sobre el potencial zoonótico de las especies *B. canis rossi*, *B. canis vogeli* y *B. canis canis* (Dantas-Torres y Aguiar, 2006; Otranto *et al.*, 2009).

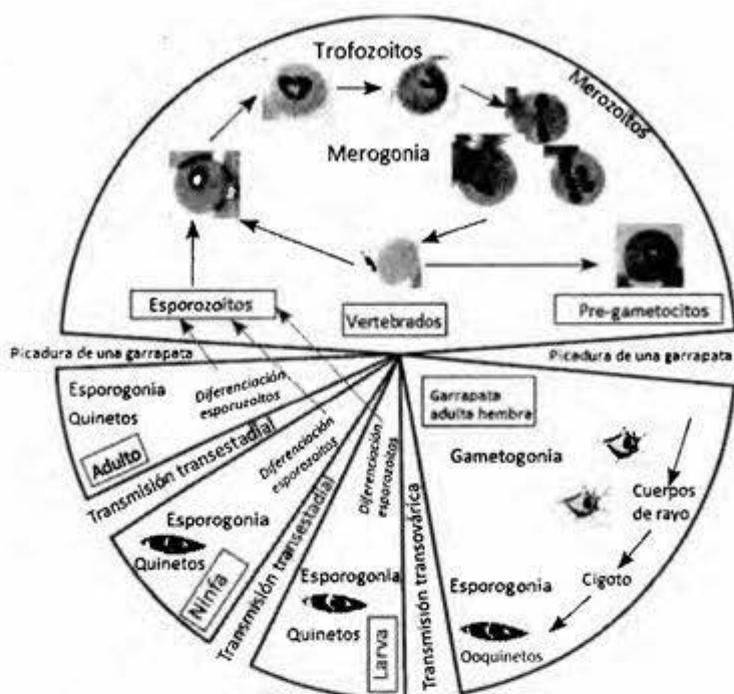
### **1.3 Transmisión y ciclo de vida del agente**

El ciclo de vida de *Babesia* consiste de tres fases: 1) la merogonia, 2) la gametogonia y 3) la esporogonia. La merogonia ocurre en el hospedador vertebrado (hospedador definitivo). Hospedador definitivo se define como un organismo en donde un parásito alcanza su completo desarrollo, estado adulto o fase sexual y es el encargado de brindarle al parásito alimento y protección. La gametogonia y la esporogonia se desarrollan en el vector (hospedador invertebrado, garrapata), que se define como un hospedador capaz de mantener un parásito, que en la mayoría de los casos no mostrará síntomas de la enfermedad, y que es capaz de transmitirlo (Figura 1) (Quirós-Romero, 2005; Chauvin *et al.*, 2009).

La ruta por la cual la mayoría de los perros son infectados con especies de *Babesia* ocurre cuando las garrapatas se alimentan de sus hospedadores caninos (Figura 1), momento en el cual se transmiten los esporozoitos en las glándulas salivales de las garrapatas al tejido subcutáneo y la sangre del hospedador (Irwin, 2010). Una vez que los esporozoitos se encuentran en los eritrocitos, se inicia la merogonia, se diferencian en trofozoitos, los cuales se dividen asexualmente por fisión binaria en dos o algunas veces cuatro merozoitos. Los merozoitos salen del eritrocito e invaden nuevos eritrocitos,

continuando el ciclo de replicación en el hospedador. Unos pocos merozoitos cesan su división y se transforman en pregametocitos. Cuando los pregametocitos son tomados por las garrapatas, éstas se diferencian dentro del intestino en gametocitos, por lo que esta fase se denomina gametogonia. Unas pocas horas después de la ingestión, aparecen cuerpos elongados semejantes a rayos con forma de punta de flecha llamados cuerpos de rayo o *Strahlenkörper*, se cree que estos cuerpos son gametos. Seguidamente, en el lumen del intestino los cuerpos de rayo se fusionan formando un cigoto diploide con una organela con forma de punta de flecha que facilita la penetración en la célula (Irwin, 2010; Montes-Farah *et al.*, 2012; Schnittger *et al.*, 2012). Una vez que los cigotos penetran las células, la organela con forma de punta de flecha se desintegra y los cigotos son transformados mediante meiosis en un estado móvil llamado ooquistos, los cuales escapan del intestino e invaden los tejidos del cuerpo de la garrapata; la invasión del ovario en las garrapatas hembra resulta en muchos huevos infectados con *Babesia* (transmisión transovárica) (Chauvin *et al.*, 2009).

El desarrollo posterior de *Babesia* se lleva a cabo mediante multiplicación asexual en la fase de esporogonia donde se desarrollan numerosos quinetos o esporoquinetos. La fase de esporogonia se desarrolla en cada fase del ciclo de vida de la garrapata (larvas, ninfas y adultos) y la infección pasa de un estadio a otro (transmisión transestadial). Algunos quinetos también invaden las glándulas salivales de las garrapatas. Aquí el parásito forma un esporoblasto multinucleado. Nuevamente se desarrollan esporozoitos que serán inyectados dentro del hospedador con la saliva de la garrapata durante la alimentación con sangre del hospedador. Los esporozoitos representan la fase infecciosa del parásito, es decir, la forma en que éste se introduce en los hospedadores (Chauvin *et al.*, 2009; Hunfeld *et al.*, 2008). Otras vías por las cuales los perros se pueden infectar con *Babesia* son las que ocurren como resultado de la transmisión transplacentar de la madre a los neonatos y por la transfusión de sangre infectada (Jacoby *et al.*, 1980; Irwin, 2010; Herwaldt *et al.*, 2011).



**Figura 1.** Ciclo de vida general del género *Babesia*.

La fase de merogonia en los hospedadores vertebrados es asincrónica y pueden aparecer varios estadios de división al mismo tiempo en la sangre: formas anaplasmoides (aparecen justo después de la penetración en los eritrocitos), formas ovoides o redondeadas (trofozoitos), formas en división y merozoitos que resultan de la fisión binaria, los cuales tienen forma de pera y se unen por sus extremos puntiagudos. La fase de la gamogonia ocurre en las células del intestino de la garrapata. Los quinetos o esporoquinetos formados por división asexual de ooquistos ocurre en varios órganos de la garrapata (fase de esporogonia). La diferenciación final de esporozoitos ocurre en las glándulas salivales de la garrapata. Tomado de Chauvin *et al.*, 2009.

#### **1.4 Patogénesis y manifestaciones clínicas en caninos**

Los efectos de la enfermedad producida por el género de *Babesia* en los perros puede ir desde condiciones subclínicas a severas, e inclusive enfermedades fatales. La determinante crítica de esta patogénesis variable es la especie de piroplasma que infecta al animal, aunque otros factores, tales como edad o inmunidad del hospedero canino, así como, infecciones concomitantes pueden jugar un papel importante en la variabilidad de la patogenicidad de la enfermedad (Brandão *et al.*, 2003; Irwin, 2009; Irwin, 2010). La mayoría de caninos con babesiosis desarrollan anemia hemolítica y trombocitopenia junto con grados variables de apatía, letargia, anorexia, palidez de las membranas mucosas, hipertermia, hemoglobinuria e ictericia, deshidratación, pérdida de

peso, dolor abdominal y sensibilidad de los riñones a las palpitaciones (Dantas-Torres y Aguiar, 2006; Ionita *et al.*, 2012).

La severidad de la anemia en babesiosis no es proporcional al grado de parasitemia, ya que, inclusive en el estado agudo de la infección éste generalmente permanece bajo. Se conoce que la presencia de una combinación de hemólisis extravascular e intravascular no solamente es resultado del daño directo inducido por el parásito en los glóbulos rojos, sino también por el incremento de la fragilidad osmótica de las células infectadas, por el daño mediado por inmunidad secundaria y por el daño oxidativo producto de ciertas toxinas hemolíticas en la membrana del eritrocito (Irwin, 2009; Irwin, 2010).

Se conoce que *B. canis rossi* causa las manifestaciones más severas de la enfermedad, entre las especies de *Babesia* grandes que infectan perros. Los perros infectados con *B. canis rossi* pueden presentar manifestaciones clínicas que han sido categorizadas como: (1) no complicada o con una afectación no comprometida o relativamente comprometida del sistema circulatorio (con un buen pronóstico) o (2) complicada o con una circulación sanguínea comprometida (con un pobre pronóstico). Si en la enfermedad categorizada como con un buen pronóstico, la anemia es moderada o leve y no hay evidencia clínica de disfunción o daño de órganos, los perros son tratados con drogas antibesias (las más utilizadas son aceturato de diminaceno y el dipropionato de imidocarb), y si es necesario también con transfusiones sanguíneas, usualmente recobran la salud y tienen una alta tasa de sobrevivencia. Por el contrario, en los casos categorizados con un pobre pronóstico y donde las manifestaciones clínicas son complicadas, se presenta daño de órganos caracterizada por anemia severa y hemoconcentración o disfunción de órganos; y se requerirá tratamiento intensivo en un centro de atención médico de emergencia veterinaria (Jacobson, 2006; Solano-Gallego y Baneth, 2011).

Las manifestaciones clínicas que causa la enfermedad no complicada son fiebre, letargia, anorexia, palidez de las membranas mucosas y esplenomegalia. Entre las manifestaciones clínico-patológicas están anemia leve o moderada, fuerte respuesta inflamatoria, trombocitopenia, leucocitosis pigmentaria,

bilirrubinemia y bilirrubinuria (Reyers *et al.*, 1998; Solano-Gallego, Trotta *et al.*, 2008; Solano-Gallego y Baneth 2011).

Entre las manifestaciones clínicas presentes en la enfermedad complicada están: anuria, ictericia, hipotensión, síndrome de dificultad respiratoria aguda, vómito, diarrea, pancreatitis, mialgia, rabdomiolisis, ascitis, edema pulmonar, afectación renal y cerebral, manifestaciones hiperagudas y shock. Entre las manifestaciones clinicopatológicas se encuentran alteraciones respiratorias acido-base y metabólica mixta (acidosis metabólica y alcalosis respiratoria), azotemia renal, coagulopatía, coagulación intravascular diseminada (CID), anemia hemolítica inmunomediada, hipoglicemia e hiperlactemia (Leisewitz, *et al.*, 2001; Keller *et al.*, 2004; Jacobson, 2006; Solano-Gallego y Baneth, 2011).

*B. canis canis* causa una enfermedad que va desde severa a leve, en la cual la parasitemia es a menudo baja y no está necesariamente correlacionada con la severidad de la enfermedad clínica. Los principales signos clínicos son fiebre, anorexia, letargia, deshidratación e ictericia. La mayoría de perros infectados con *B. canis canis* presentan trombocitopenia severa a media, anemia regenerativa normocrómica y no normocrómica de moderada a leve, anemia regenerativa infrecuente, neutropenia, pigmenturia, bilirrubinemia y bilirrubinuria (debido a hemólisis) (Solano-Gallego *et al.*, 2008; Solano-Gallego y Baneth, 2011).

*B. canis vogeli* usualmente causa una enfermedad clínica, moderada, leve o subclínica, la cual a menudo acompaña a otras enfermedades o afecta a perros esplenectomizados. La anemia hemolítica severa o fatal es posible en perros jóvenes y cachorros. Se han encontrado perros adultos galgos en los Estados Unidos sero-reactivos para *B. canis vogeli* que son comúnmente categorizados como clínicamente saludables. Los principales signos clínicos encontrados en infecciones con *B. canis vogeli* son fiebre, letargia, anorexia e ictericia, y las anormalidades de laboratorio más importantes encontradas son anemia hemolítica regenerativa mediada por inmunidad, anemia no regenerativa, leucocitosis, leucopenia y trombocitopenia (Solano-Gallego y Baneth, 2011). En Costa Rica, Rojas *et al.* (2014) determinaron que el 100% de los perros infectados con *B. canis vogeli* presentaron anemia, un 29% valores bajos de

empaquetado de volumen celular (PCV) y una asociación significativa entre la infección con el patógeno y la infestación con *R. sanguineus* s.l.

### **1.5 Diagnóstico**

El diagnóstico de infecciones con *Babesia* se basa usualmente en la detección del parásito en frotis de sangre periférica teñida con el método de Giemsa o Wright (Dantas-Torres y Aguiar 2006; Oyamada *et al.*, 2005; Skotarczak, 2007). Este método es el más ampliamente usado como diagnóstico rutinario en medicina veterinaria, debido a que posee muchas ventajas, tales como simplicidad, alta especificidad y bajo costo (Dantas-Torres y Aguiar 2006), sin embargo, posee baja sensibilidad y requiere de un profesional con experiencia para diferenciar entre especies (Oyamada *et al.*, 2005; Skotarczak 2007). Otra desventaja que presenta esta técnica es que se necesita una alta cantidad de parásitos en la sangre para que sea detectada, lo cual es solamente posible en casos agudos. En casos crónicos o subclínicos la confirmación parasitológica fundamentada en métodos basados en morfología no es posible (Dell' Porto *et al.*, 1993). Además, se debe poner especial atención en la fuente de sangre recolectada, ya que la sangre periférica es útil solamente para detectar especies como *B. bigemina*, *Babesia divergens* o *B. gibsoni*, las cuales no se adhieren al endotelio vascular. Las especies *B. canis canis*, *B. canis vogeli* y *B. canis rossi* se adhieren a las células del endotelio y su diagnóstico usando este método es solamente factible si la muestra de sangre es tomada directamente de sangre capilar de la oreja o de la piel de la cola, ya que ésta contiene un alto porcentaje de eritrocitos infectados con esta especie (Mosqueda *et al.*, 2012).

Cuando el número de parásitos de *Babesia* en sangre es muy bajo para ser detectado, la búsqueda de anticuerpos en la sangre ha demostrado ser una herramienta confiable para identificar a los portadores infectados o animales previamente expuestos (Ristic y Sibinovic, 1964; Todorovic, 1975). Por lo tanto, los ensayos serológicos se utilizan para identificar perros portadores asintomáticos, diagnosticar infecciones crónicas e infecciones pasadas. El ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISA) son las técnicas más utilizadas, son altamente

sensibles y específicas para la detección de anticuerpos en caninos (Dantas-Torres y Aguiar 2006).

La IFI es fácil de llevar a cabo, pero requiere una buena calidad del antígeno, lo cual, algunas veces es difícil de obtener. Además, requiere de un profesional experimentado y de un microscopio de fluorescencia, con esta técnica no se puede diferenciar entre especies de *Babesia* ya que se han reportado reacciones cruzadas (Goodger, 1971; Mosqueda *et al.*, 2012). Cuando se procesan grandes cantidades de muestras de suero, IFI consume mucho tiempo, principalmente porque la lectura de cada muestra puede tomar varios minutos (Bose y Peymann, 1994).

El método ELISA tiene la ventaja de ser un ensayo no subjetivo, capaz de leer un gran número de muestras fácilmente y presenta una mayor especificidad que la IFI. Existen diversas versiones de ELISA desarrollada en laboratorios para detectar diferentes especies de *Babesia*, tales como *B. divergens*, *B. bigemina*, *Babesia caballi*, *B. bovis* y *B. canis* (*B. canis vogeli*, *B. canis rossi* y *B. canis canis*) (Purnell *et al.*, 1976; O'Donoghue *et al.*, 1985; Weiland, 1986; Waltisbuhl *et al.*, 1987; Furuta *et al.*, 2009). En sus inicios el método ELISA usaba antígeno crudo purificado de sangre infectada, lo que ocasionaba mucha reacción cruzada (Morzaria *et al.*, 1992). Actualmente se han desarrollado antígenos recombinantes que aumentan la especificidad al disminuir la unión y la señal inespecífica (Bose y Peymann, 1994; Ikadai *et al.*, 2000), como por ejemplo la metodología desarrollada por Fukumoto *et al.* (2001) que detecta la presencia de anticuerpos contra *Babesias* permitiendo diferenciar entre sueros de perros infectados con *B. gibsoni* y sueros de perros infectados con *B. canis*. Actualmente se cuenta con un ELISA comercial para detectar *B. canis* (AFOSA, 2017).

Es importante señalar que después de la infección, se pueden presentar anticuerpos específicos contra el parásito por varios meses, o tales anticuerpos pueden tomar días o semanas para desarrollarse en un animal infectado. Por lo tanto, el valor diagnóstico del ensayo serológico es pobre en ausencia de signos clínicos y datos del historial clínico del paciente (Oyamada *et al.*, 2005; Mosqueda *et al.*, 2012). En este caso los métodos moleculares dirigidos a

detectar ácidos nucleicos han sido muy útiles. Técnicas moleculares, como la PCR y el análisis de secuencias, han sido usados para el diagnóstico laboratorial, para estudios epidemiológicos y análisis filogenéticos de *Babesia*. Las ventajas de los métodos moleculares sobre el frotis sanguíneo son su alta sensibilidad y especificidad para la detección del patógeno de interés en sangre. Al usar esta técnica molecular se puede determinar y diferenciar entre diversas especies de *Babesia* (Oyamada *et al.*, 2005). La primera detección de *Babesia* mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) fue reportada en 1992 para las especies *B. bovis* (Fahrimal *et al.*, 1992), *B. bigemina* (Figueroa *et al.*, 1992) y *B. microti* (Persing *et al.*, 1992). Sin embargo, se le han realizado adaptaciones a esta técnica que han aumentado la especificidad, como por ejemplo la PCR anidada, en la cual dos pares de iniciadores son usados en dos amplificaciones de PCR sucesivas, y el segundo par es destinado para amplificar un blanco secundario que se encuentra dentro del primer producto amplificado. La PCR anidada es más sensible pero más costosa, consume más tiempo y el riesgo de autocontaminación es más alto que el protocolo de PCR de un solo paso. La PCR anidada ha sido efectiva para la detección de animales portadores infectados con *B. bigemina* y *B. microti*, aunque la sensibilidad para detectar esta especie ha sido baja (Mosqueda *et al.*, 2012).

La PCR convencional y la PCR anidada son técnicas prácticas para detectar y diferenciar infecciones con *Babesia* spp y son herramientas sensibles para evaluar los resultados de un tratamiento (Birkenheuer *et al.*, 2003; Duarte *et al.*, 2008). Algunos autores han propuesto a la PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR) como una metodología que podría reemplazar la PCR de punto final (convencional y anidada) y los métodos de secuenciación en el diagnóstico, ya que permite detectar ADN específico en una muestra, de forma aún más sensible, precisa y reproducible que el PCR de punto final (Costa *et al.*, 2012).

La PCR en tiempo real o qPCR fue desarrollada en 1992 por Higuchi *et al.* Esta técnica está basada en la PCR convencional y se usa para cuantificar y amplificar moléculas de ADN o cADN (ADN complementario) (Kubista *et al.*, 2006; Vinuesa, 2009). La qPCR detecta una señal fluorescente emitida durante

la reacción de PCR, indicando la producción de la secuencia que está siendo generada en cada ciclo (Mosqueda *et al.*, 2012). El método de PCR de punto final como técnica analítica tiene algunas limitaciones, como por ejemplo que no es posible la cuantificación del agente, que consume mucho más tiempo al utilizar geles de agarosa, además, los resultados se basan en la discriminación por tamaños, lo cual puede ser no preciso y finalmente, que el proceso no es automatizado. Una de las ventajas más importantes de la qPCR sobre la PCR punto final es su rapidez, además, de que los equipos utilizados permiten un flujo mucho mayor de muestras y de ensayos y al utilizar sistemas cerrados, el riesgo de contaminación disminuye de forma importante (Costa, 2004).

La primer metodología de PCR en tiempo real reportada para la cuantificación de *Babesia* fue desarrollada en el 2003 y fue usada para detectar *B. bigemina* (Suárez *et al.*, 2003). Se han publicado diversos protocolos para la cuantificación de diferentes especies de *Babesia*, tales como *B. canis canis*, *B. canis vogeli* y *Babesia microti*, entre otros (Peleg *et al.*, 2009; Mosqueda *et al.*, 2012; Rojas *et al.*, 2014).

La desventaja de esta metodología son los altos costos del equipo y de los reactivos, por lo que esta técnica es utilizada actualmente para fines investigativos y no para el diagnóstico rutinario (Mosqueda *et al.*, 2012). En el presente trabajo se pretende utilizar la PCR punto final y qPCR.

La mayoría de estudios utilizados para el diagnóstico, estudios epidemiológicos y análisis filogenéticos usan como base amplificaciones de regiones parciales del gen de la subunidad pequeña del ARN ribosomal, debido a que este gen es altamente conservado, presenta variaciones mínimas en las secuencias de nucleótidos, posee una acumulación constante de mutaciones sobre la escala evolutiva y tiene una gran capacidad para distinguir entre diferentes especies. Diferentes regiones del gen de la subunidad pequeña del ARNr, han sido amplificadas por PCR por ejemplo el gen ARNr 18S, el primer y el segundo espaciador transcrito (ITS1 e ITS2) y el gen 5.8S ARNr (Hillis y Dixon, 1991; Zahler *et al.*, 1998; Carret *et al.*, 1999; Jefferies, 2006; Allsopp y Allsopp, 2006). Sin embargo, es el gen ARNr 18S el más ampliamente usado para la

identificación de organismos pertenecientes a un género en particular (Allsopp y Allsopp, 2006).

### **1.6 Justificación**

El género *Babesia* ha sido un patógeno de gran interés con un considerable impacto económico, por su gran habilidad para producir una importante morbilidad y mortalidad en especies de mamíferos domésticos (Schnittger *et al.*, 2012).

La babesiosis es una enfermedad cuyo agente etiológico es el segundo parásito más comúnmente encontrado en la sangre de mamíferos, después del tripanosoma (Rodríguez-Morales, 2007; Solano-Gallego, *et al.*, 2008; Schnittger *et al.*, 2012), y cuyo rango de infección puede ir desde crónico o subclínico a hiperagudo y fatal, dependiendo de la patogénesis de la especie y de la susceptibilidad del hospedador (Schoeman, 2009).

Recientemente la distribución de artrópodos vectores y los patógenos que ellos transmiten ha aumentado considerablemente alrededor del mundo, tal distribución se ha visto influenciada por varios factores como lo son cambios climáticos y ambientales, aumento del comercio internacional, transporte global más rápido y un aumento en la resistencia a medicamentos contra vectores y patógenos (Knols y Takken, 2007).

Además de los reportes de babesiosis canina en los países tradicionalmente considerados como endémicos y con casos autóctonos, se han reportado casos en muchas regiones que previamente habían sido consideradas libres de babesiosis canina. Por lo tanto, es importante estudiar la distribución de la babesiosis canina dentro de nuevas áreas geográficas, ya que esta enfermedad se considera actualmente un problema veterinario emergente (Kubelová *et al.*, 2013). La presente investigación aportará información relevante a médicos veterinarios de Costa Rica, que ayudará a la toma de decisiones para el abordaje y tratamiento de estas infecciones.

Los estudios de garrapatas en caninos de América Central son pocos, sin embargo se reportan las siguientes especies de garrapatas de importancia para la medicina veterinaria presentes en el país: *R. sanguineus* s.l.,

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma mixtum*, *Amblyomma maculatum*, *Amblyomma pecarium*, *Amblyomma oblongoguttatum*, *Dermacentor nitens* e *Ixodes boliviensis* (Álvarez 2003; Álvarez *et al.*, 2006; Bermúdez y Miranda 2011, Troyo *et al.*, 2012).

*R. sanguineus* s.l., además de ser la garrapata con mayor presencia en perros de Costa Rica, es la única garrapata conocida presente en el país capaz de transmitir la babesiosis canina (Álvarez *et al.*, 2006, Troyo *et al.*, 2012). La garrapata *R. sanguineus* s.l. es considerada vector de *B. canis vogeli*, *B. canis canis*, *B. gibsoni*, *B. conradae* y *B. microti like*, tiene un comportamiento que puede clasificarse como endófilo u hogareño, vive predominantemente cerca o dentro de las casas de los humanos y es predominantemente encontrada en áreas urbanas y suburbanas. En algunos hábitats húmedos puede ser exófila y puede asechar a sus huéspedes desde la vegetación (Gray, 2013).

En Costa Rica a la fecha sólo existen dos estudios que reportan la presencia de especies de *Babesia* en sangre de caninos; uno fue realizado por Rojas *et al.* (2014) en cuatro localidades de Costa Rica y determinó una prevalencia de un 8% de *B. canis vogeli*. La prevalencia reportada por regiones fuera del Valle Central fue de 21%, 8% y 2% en Chomes de Puntarenas (Pacífico Central), Liberia de Guanacaste (Pacífico Norte) y Kékoldi de Limón (Región Huetar Atlántica), respectivamente. Sin embargo, en San Ramón de Alajuela (dentro del Valle Central) no se pudo determinar la presencia de *B. canis vogeli*, probablemente por un tamaño de muestra insuficiente (30 individuos). El otro estudio fue realizado en un pueblo de Guanacaste y se encontró una prevalencia de 25% de *Babesia* spp.; en 2 perros se determinó *B. gibsoni* y en 8 perros *B. vogeli* (Wei *et al.* 2015).

Estos dos estudios investigaron pocos caninos provenientes de muy pocas localidades de Costa Rica, además, no brindan información sobre la distribución de este agente en todo el país. Tampoco generaron información sobre la seroprevalencia de *Babesia* en los caninos de nuestro país, ni determinaron la presencia de agentes babesiales en garrapatas de caninos de Costa Rica.

El presente trabajo es un estudio epidemiológico descriptivo transversal que pretende describir la prevalencia y seroprevalencia de *Babesia* spp. en perros dentro y fuera del Valle Central de Costa Rica, y establecer la presencia de *Babesia* spp. en garrapatas, además de identificar los factores asociados a la babesiosis canina.

### **1.7 Hipótesis**

Ho1 = No hay *Babesia* spp. en sangre de caninos dentro del Valle Central de Costa Rica.

Ho2 = No hay *Babesia* spp. en garrapatas de caninos dentro y fuera del Valle Central de Costa Rica.

Ho3 = No hay diferencia en la prevalencia y seroprevalencia de *Babesia* spp. entre caninos dentro y fuera del Valle Central de Costa Rica.

Ho4 = No existen diferencias en las variables hematológicas de los perros positivos para *Babesia* spp., respecto a los negativos.

Ho5 = No hay factores de riesgo asociados a *Babesia* spp en caninos.

### **1.8 Objetivos**

#### **1.8.1 Objetivo general**

Determinar la prevalencia, seroprevalencia y factores asociados a *Babesia* spp. en perros y sus garrapatas dentro y fuera del Valle Central de Costa Rica.

#### **1.8.2 Objetivos específicos**

1. Comprobar la presencia de anticuerpos contra *Babesia* spp. en caninos dentro y fuera del Valle Central de Costa Rica para determinar infecciones pasadas.
2. Comprobar la presencia o ausencia de *Babesia* spp. en sangre y garrapatas de caninos dentro y fuera del Valle Central de Costa Rica para determinar infecciones activas.
3. Estimar la prevalencia de *Babesia* spp. dentro y fuera del Valle Central de Costa Rica.
4. Comparar los valores hematológicos de los caninos positivos y negativos para determinar los que se asocian con la presencia de *Babesia* spp. en Costa Rica.

5. Establecer factores asociados a seropositividad y positividad a PCR de *Babesia* spp.
6. Identificar las especies de *Babesia* spp. circulantes en garrapatas y sangre de caninos en Costa Rica.

## 2. Metodología

### 2.1 Tipo de estudio

Se realizó un estudio epidemiológico de tipo observacional, transversal y descriptivo, en el cual se determinó la seroprevalencia de *Babesia* spp. en muestras de suero y la prevalencia de *Babesia* spp. en sangre y garrapatas de caninos dentro del Valle Central y fuera del Valle Central de Costa Rica.

### 2.2 Procedencia, tipo y tamaño de la muestra

La presencia, la prevalencia y la seroprevalencia de *Babesia* spp. se determinó a partir de un banco de ADN de sangre y garrapatas de caninos, además de sueros de esos caninos, que se encontraban en la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional. Se utilizaron muestras de ADN de sangre de caninos, grupos de ADN de garrapatas y muestras de sueros. Tales muestras se recolectaron en 15 parques recreativos de Costa Rica, en su mayoría (407) en el periodo de junio del 2011 a setiembre del 2012 (Barrantes-Gonzalez *et al.*, 2016) y algunas (68) en mayo del 2014. Se contó con información del origen de los perros a nivel de cantón.

Según List (2009), en Costa Rica, existe una tasa de 1,56 perros por hogar en estratos bajos y 1,65 por hogar en estratos altos. En Costa Rica, para el 2011, había un total de 1 211 964 viviendas ocupadas, 62% se concentraron en la región central y 38% fuera de la región central (INEC, 2012; Fuprovi, 2012; Fornaguera, 2013). Tomando un promedio de 1,6 perros por vivienda, se obtiene que en Costa Rica viven 1 939 142 perros. Se calculó la cantidad de perros a analizar dentro y fuera del Valle Central tratando de respetar la proporción de viviendas, y por consiguiente, la de perros reportados en cada provincia, sin embargo la realidad del muestreo en cada lugar marcó algunos cambios en la proporción final.

Para estudiar los caninos dentro del Valle Central se calcularon dos tamaños de muestras, uno para determinar presencia o ausencia de *Babesia* spp., y otro para determinar la prevalencia de *Babesia* spp. Para determinar la presencia o ausencia de *Babesia* spp. en caninos dentro del Valle Central se analizaron 299 individuos, esto calculado sobre una población de 1 millón de

perros, para encontrar un mínimo de un 1% de prevalencia (se utiliza un 1%, porque no se ha encontrado aún *Babesia* spp. en caninos dentro del Valle Central, por lo tanto, debe considerarse como si la prevalencia fuera de al menos un 1%) y un 95% de confianza. Para determinar la prevalencia de *Babesia* spp. dentro del Valle Central, se analizaron 169 individuos, sobre una población de 1 millón de perros, para encontrar un mínimo de un 1% de prevalencia con un error de 1.5% y un 95% de confianza. Para estudiar los caninos fuera del Valle Central, fue necesario calcular también dos muestras diferentes, una para determinar presencia o ausencia y una para determinar prevalencia. Para determinar la presencia o ausencia de *Babesia* spp. fuera del Valle Central se analizaron al menos 59 individuos, esto sobre una población estimada de 40000 perros fuera del Valle Central, y para encontrar un mínimo de un 5% de prevalencia (se utiliza 5% y no un 1%, porque Rojas *et al.* (2014) reportaron una prevalencia de un 8% fuera del Valle Central de Costa Rica) (95% de confianza). Para determinar la prevalencia se analizaron 176 individuos, sobre una población de 40000 perros, para encontrar un 8% de prevalencia (Rojas *et al.*, 2014) y un error aceptado de 4% (95% de confianza).

La información para el análisis de los factores asociados al agente en estudio, se tomó de una encuesta realizada al propietario de cada uno de los caninos participantes en el estudio. Se recolectaron datos de procedencia, sexo, edad en años, raza, talla, largo del pelo, estatus de pertenencia, si vive dentro o fuera del hogar, número de personas con que convive, convivencia con otros perros, pérdida de pelo, presencia y control de ectoparásitos y frecuencia de visitas a los parques recreativos. Además, se preguntó, al propietario, si alguna vez había observado signos clínicos sugestivos de Babesiosis en su perro (anorexia, fiebre, debilidad, depresión, hematuria, problemas para caminar, problemas respiratorios y diarrea). También se analizaron los datos incluidos en la ficha clínica que se obtuvo de cada animal, después de la evaluación clínica: condición corporal, actitud, color de las mucosas, hematuria, alopecia, llenado capilar y temperatura.

A cada una de las muestras de sangre de caninos se les realizó además un frotis sanguíneo y un hemograma completo (hematocrito, hemoglobina, CHCM

[Concentración de hemoglobina corpuscular media], plaquetas, leucocitos, neutrófilos bandas, neutrófilos segmentados, eosinófilos, basófilos, linfocitos y monocitos). Todas estas observaciones fueron incluidas en una base de datos, de la cual se tomó la información para realizar los análisis en el presente estudio

La extracción del ADN de la sangre de caninos se realizó mediante el Kit comercial "Wizard Genomic de PROMEGA®", una vez extraído, se guardó a -20°C. Las garrapatas se recolectaron en alcohol al 70% hasta su clasificación por especie, sexo y estadio. Seguidamente se les extrajo el ADN utilizando el Kit comercial "DNeasy Blood and Tissue kit" de QIAGEN® y se almacenaron a -20°C. Para la extracción del suero se utilizó sangre completa sin anticoagulante, se centrifugó a 10000 g por 10 minutos y se guardó a -20°C.

### **2.3 Diagnóstico serológico**

Para la detección de Inmunoglobulinas G (IgG) contra *Babesia* spp. en suero de perros se utilizó el kit de IFI de Megacor (MegaScreen® Fluo BABESIA canis). Para realizar el ensayo se siguieron las indicaciones del fabricante. Las láminas consistían de 12 pocillos que contenían eritrocitos de caninos fijados, los cuales estaban infectados con *Babesia* y contenían el merozoito citoplasmático característico. Los sueros caninos a evaluar se diluyeron 1:32 en buffer PBS, pH 7.4, y se añadieron 10 µl de cada suero a los pocillos. En cada lámina se incluyó un control positivo y un control negativo y se incubaron en cámara húmeda a 37°C, permitiendo la reacción de los anticuerpos del canino con el antígeno de *Babesia*. Seguidamente, se procedió a lavar cuidadosamente las láminas con Buffer Fosfato Salino (PBS) para remover las proteínas del suero sin reaccionar, se añadió una gota del conjugado anti-canino Ig-G fluoresceína a cada pocillo. Las láminas se incubaron de nuevo en la oscuridad en cámara húmeda a 37°C durante 30 minutos, posteriormente se lavaron. Las reacciones se visualizaron usando un microscopio de fluorescencia. Pocillos donde se observó merozoitos verdes fluorescentes fuertemente definidos dentro del citoplasma de eritrocitos infectados en cada campo se consideraron positivos. Sueros positivos en la dilución 1:32 se volvieron a someter a la IFI con diluciones seriadas sencillas de 1:64 hasta 1:4096, para determinar el título final. Se reportaron como positivos

para anticuerpos contra *B. canis vogeli* aquellos sueros que presentaron merozoitos verdes fluorescentes a diluciones iguales o mayores a 1:32. Se reportaron como títulos bajos títulos entre 1:32 y 1:164 y como títulos altos aquellos mayores o iguales a 1:128.

## **2.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

### **2.4.1 PCR punto final para Babesia spp. en sangre y garrapatas de caninos y secuenciación**

La cantidad y calidad del ADN de la totalidad de las muestras de sangre y garrapatas se verificó midiendo la absorbancia a 260nm. Todas las muestras mostraron cantidad de ADN total necesario (40 ng/μl) para ser analizadas mediante PCR. Para determinar la presencia de *Babesia* spp. se utilizó el procedimiento de PCR descrito por Földvári *et al.* (2005). Se amplificó una región del gen ARNr18S de aproximadamente 450 pb de *Babesia* spp., utilizando los iniciadores PIRO-A1 (sentido) y PIRO-B (antisentido). El iniciador PIRO-B fue descrito previamente por Olmeda *et al.* (1997) y el iniciador PIRO-A1 fue diseñado por Muhlnickel *et al.* (2002) para amplificar la mayoría de especies de *Babesia* (Cuadro 2).

Se preparó una reacción con Dream Taq PCR Master Mix 2X (Thermo Scientific™, Waltham, USA), 1 μl de cada iniciador (10 μM), 5 μl del ADN extraído (40 ng/μl) y 5.5 μl de agua grado biología molecular (Thermo Scientific™, Waltham, USA), para un volumen final de 25 μl. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min.; 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30s, de alineación a 60°C por 30s y de extensión de 72°C por 1 min. Se llevó a cabo un paso de extensión final a 72°C por 15 min y por último se mantuvieron las muestras a 4°C. Como control positivo se utilizó ADN de *B. canis vogeli*, donado por el Dr. Gad Baneth, de la Universidad Hebrea de Jerusalem. Las muestras amplificadas fueron separadas con un gel de agarosa al 1.5% en amortiguador TBE 1x (Tris Base, Ácido Bórico, EDTA pH 8, 0.5 M), teñidos con GelRed™ (Nucleic Acid Gel Stain, Biotium) y corridas en una cámara de electroforesis a 100 voltios durante 35 min. El marcador de peso molecular utilizado fue Thermo Scientific™ GeneRuler 100bp

Plus DNA Ladder (Sm243). Muestras que mostraron bandas de tamaño de 450pb se consideraron positivas.

Las muestras que resultaron positivas se sometieron a una segunda amplificación de acuerdo al procedimiento descrito por Zahler *et al.* (2000), amplificando un fragmento de 1600 pb del ARNr 18S empleando los iniciadores RIB-19 y RIB-20 (Cuadro 2), los cuales están localizados en el extremo 5' y 3' de la subunidad pequeña del gen, respectivamente. Se preparó una reacción con 12,5 µl de Dream Taq PCR Master Mix 2X (Thermo Scientific™, Waltham, USA), 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl de cada iniciador (50 uM), 2,5 µl del ADN extraído (40 ng/µl) y 7,5 µl de agua grado biología molecular (Thermo Scientific™, Waltham, USA), para un volumen final de 25 µl. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 95°C por 5 min. seguido por 30 ciclos de una desnaturalización a 95°C por 60s, una alineación a 54°C por 60s y una extensión a 72°C por 90s. Se realizó un paso de extensión final a 72°C por 10 min. Se utilizó el mismo control positivo descrito arriba y las mismas condiciones para la separación de los productos amplificados mediante electroforesis. Muestras que mostraron bandas de tamaño 1600pb se consideraron positivas.

Muestras positivas en alguno de los dos PCR convencionales y en las cuales se obtuvieron al menos 50ng/µL se enviaron para su purificación y secuenciación a MACROGEN, Inc. (Seoul, Korea). Las secuencias de las muestras se alinearon con el programa Bio Edit Sequence Alignment Editor® (Hall, 1999) y se compararon mediante el algoritmo BLASTn® 2.2.28 con la base de datos del NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information). Las secuencias de 1600pb del ARNr 18S se utilizaron para la construcción del árbol filogenético y para analizar las relaciones de filogenia con otras secuencias depositadas en GenBank® e identificar así las especies de *Babesia* spp. circulantes en garrapatas y sangre de caninos.

#### **2.4.2. qPCR para *B. canis vogeli* en sangre y garrapatas de caninos**

Se amplificó una región del gen ARNr18S de aproximadamente 102 pb, utilizando los iniciadores indicados en el Cuadro 2, y siguiendo el procedimiento descrito por Vilhena *et al.* (2013) con las siguientes modificaciones:

Se preparó una reacción con 12 µl de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific), 1 µl de cada iniciador (10 uM), 5 µl del ADN extraído (40 ng/µl) y 1 µl de agua grado biología molecular (Thermo Scientific), para un volumen final de 20 µl. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: un ciclo de 50°C por 2 min; un ciclo de 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15s y de 60°C por 1 min. Por último, se mantuvieron las muestras a 4°C.

Para determinar la eficiencia de este método se elaboró una curva estándar con 5 puntos por triplicado con las siguientes diluciones: 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000. Se utilizó una muestra positiva a *Babesia* spp. y a *B. canis vogeli* en PCR en punto final y en qPCR, respectivamente. Para evaluar la especificidad de la técnica se adicionó un análisis de curva de disociación al final de la corrida. Se consideraron muestras positivas aquellas en las que se obtuvieron valores del Ciclo umbral (Ct) entre 15 y 33.

**Cuadro 2.** Iniciadores utilizados en el estudio para determinar *Babesia* spp. y *B. canis vogeli*.

Gen	Agente	Iniciador	Secuencia del iniciador	Longitud del fragmento a amplificar	Referencias
ARNr18s	<i>Babesia</i> spp.	Sentido (PIRO-A1)	5' -AGGGAGCCTGAGAGACGGCTACC-3'	450 pb	Földvári <i>et al.</i> (2005).
		Antisentido (PIRO-B)	5' -TTAAATACGAATGCCCCCAAC-3'		
		Sentido (RIB19)	5'-CGGGATCCAACCTGGTTGATCCTGC-3'	1600 pb	Zahler <i>et al.</i> (2000)
		Antisentido (RIB20)	5'-CCGAATTCCTTGTTACGACTTCTC-3'		
<i>B. canis vogeli</i> .	Sentido	5'-CATTGCTTTGGCTTTTCGAG-3'	102	Vilhena <i>et al.</i> (2013)	
	Antisentido	5'-CCATGCTGAAGTATTC AAGACAAAAGT-3'			

## 2.5 Análisis estadístico

Los resultados de la IFI, de los PCR y de la secuenciación se digitaron en una base de datos en excel que contenía los datos de la encuesta, la ficha clínica y los valores hematológicos.

Para alcanzar el objetivo 4 se comparó por medio de la prueba de t-student los valores hematológicos para cada grupo, negativo y positivo, se consideraron diferencias estadísticamente significativas en aquellos valores con un  $p \leq 0,05$ . Para alcanzar el objetivo 5 se realizó el análisis de los factores asociados a seropositividad y a positividad a *B. canis vogeli*. Este análisis se realizó por medio de la prueba de regresión logística, se estimó el riesgo mediante la razón de posibilidades (odds ratio, OR), se consideraron factores asociados aquellos con un  $p \leq 0,05$ . Se realizó un análisis multivariado, sin embargo, no hubo convergencia en los análisis, por lo que no fue posible obtener resultados válidos.

### 3. Resultados

#### 3.1 Población analizada

Se analizaron muestras de un total de 490 perros, 278 (56,7%) dentro del Valle Central y 212 (43,2%) fuera del Valle Central (Cuadro 3). De estos perros se analizaron 453 sueros en IFI para *B. canis*, 475 extracciones de ADN de sangre en PCR punto final para *Babesia* spp., y 400 muestras en qPCR para *B. canis vogeli*. Además, se analizaron 166 y 142 extracciones de ADN de grupos de garrapatas recolectadas de los caninos, en PCR en punto final y en qPCR, respectivamente.

Las características de la población canina que se usó para este trabajo, dentro y fuera del Valle Central, tales como sexo, edad, talla, largo del pelo y raza, se muestran en el Cuadro 4. Los factores asociados analizados en la población canina dentro y fuera del Valle Central como lugares de residencia, cantidad de personas y perros con los que que habita el perro, presencia, grado de infestación y tratamiento contra garrapatas, presencia de la garrapata *R. sanguineus* s.l. como frecuencia de visitas a parques recreativos se detallan en el Cuadro 5. Un total de 446 perros contaban con propietario mientras que 44 perros (31 dentro y 13 fuera del Valle Central) se encontraron deambulando en los parques, por lo que de estos animales solamente se obtuvo información del examen objetivo general y de las muestras analizadas.

**Cuadro 3.** Cantidad de perros analizados dentro y fuera del Valle Central por provincia, cantón y región

Provincia	Cantón	Cantidad de perros por cantón (%)	Total de perros por provincia (%)	Cantidad de perros por región		Cantidad de muestras de suero (%)	Cantidad de muestras de ADN de sangre (%)
				Dentro del Valle Central (%)	Fuera del Valle Central (%)		
San José	Alajuelita	4 (0.8)	189 (38.5)	4 (0.8)		3 (0.6)	4 (0.8)
	Aserri	19 (3.8)		19 (3.8)		17 (3.7)	19 (4.0)
	Curridabat	2 (0.4)		2 (0.4)		1 (0.2)	2 (0.4)
	Desamparados	54 (11.0)		54 (11.0)		51 (11.2)	54 (11.3)
	Escazú	12 (2.4)		12 (2.4)		12 (2.6)	12 (2.5)
	Montes de Oca	2 (0.4)		2 (0.4)		2 (0.4)	0 (0)
	Mora	24 (4.8)		24 (4.8)		23 (5.0)	22 (4.6)
	Moravia	1 (0.2)		1 (0.2)		1 (0.2)	1 (0.2)
	San José	59 (12.0)		59 (12.0)		52 (11.4)	57 (12.0)
	Santa Ana	2 (0.4)		2 (0.4)		2 (0.4)	2 (0.4)
	Tibas	7 (1.4)		7 (1.4)		5 (1.1)	7 (1.4)
Vasquez de Coronado	3 (0.6)	3 (0.6)		3 (0.6)	3 (0.6)		
Alajuela	Alajuela	24 (4.8)	42 (8.5)	24 (4.8)		22 (4.8)	23 (4.8)
	San Carlos	18 (3.6)			18 (3.6)	16 (3.5)	17 (3.5)
Heredia	Heredia	8 (1.6)	31 (6.3)	8 (1.6)		8 (1.7)	8 (1.6)
	San Pablo	2 (0.4)		2 (0.4)		2 (0.4)	2 (0.4)
	San Rafael	18 (3.6)		18 (3.6)		17 (3.7)	18 (3.8)
	Santo Domingo	3 (0.6)		3 (0.6)		3 (0.6)	3 (0.6)
Cartago	Cartago	25 (5.1)	34 (6.9)	25 (5.1)		21 (4.6)	25 (5.2)
	El Guarco	4 (0.8)		4 (0.8)		4 (0.8)	3 (0.6)
	La Unión	2 (0.4)		2 (0.4)		2 (0.4)	2 (0.4)
	Oreamuno	3 (0.6)		3 (0.6)		2 (0.4)	3 (0.6)
Puntarenas	Golfito	33 (6.7)	63 (12.8)		33 (6.7)	32 (7.0)	33 (6.9)
	Garabito	30 (6.1)			30 (6.1)	29 (6.4)	27 (5.6)
Guanacaste	Libería	35 (7.1)	78 (15.9)		35 (7.1)	35 (7.7)	35 (7.3)
	Cañas	43 (8.7)			43 (8.7)	42 (9.2)	41 (8.6)
Limón	Limón	27 (5.5)	53 (10.8)		27 (5.5)	25 (5.5)	27 (5.6)
	Pococi	26 (5.3)			26 (5.3)	21 (4.6)	25 (5.2)
<b>Total</b>		490 (100)	490 (100)	278 (56.7)	212 (43.2)	453 (100)	475 (100)

**Cuadro 4.** Características de la población canina analizada dentro y fuera del Valle Central.

Característica	Estrato	Cantidad de perros dentro del Valle Central	%	Cantidad de perros fuera del Valle Central	%
Sexo	Hembra	130	46.8	119	56.1
	Macho	148	53.2	91	42.9
	No registrado	0	0.0	2	0.9
Total		278	100.0	212	100.0
Edad en años	0-1	140	50.4	77	36.3
	2-7	110	39.6	115	54.2
	8-15	28	10.1	16	7.5
	No registrado	0	0.0	4	1.9
Total		278	100.0	212	100.0
Talla	Pequeños	71	25.5	32	15.1
	Medianos	201	72.0	110	51.9
	Grandes	6	2.2	2	0.9
	No registrado	0	0.4	68	32.1
Total		278	100.0	212	100.0
Largo del pelo	Corto	184	66.2	121	57.1
	Largo	94	33.8	23	10.8
	No registrado	0	0.0	68	32.1
Total		278	100.0	212	100.0
Raza	Sin raza definida	106	38.1	146	68.9
	Raza pura	172	61.8	63	29.7
	No registrado	0	0.0	3	1.4
Total		278	100	212	100

**Cuadro 5.** Algunas variables analizadas en la población canina dentro y fuera del Valle Central.

Factores	Estrato	Cantidad de perros dentro del Valle Central	%	Cantidad de perros fuera del Valle Central	%
Cantidad humanos que habitan con el perro	0 humanos	28	10.1	13	6.1
	De 1 a 4	167	60.1	152	71.7
	Más de 4	83	29.9	41	19.3
	No registrado	0	0.0	6	2.8
<b>Total</b>		<b>278</b>	<b>100.0</b>	<b>212</b>	<b>100.0</b>
Lugar de residencia	Afuera de la casa	99	35.6	116	54.7
	Adentro de la casa	120	43.2	57	26.9
	Afuera y adentro	59	21.2	36	17.0
	No registrado	0	0.0	3	1.4
<b>Total</b>		<b>278</b>	<b>100.0</b>	<b>212</b>	<b>100.0</b>
Cantidad de perros que habitan con el perro	0 perros	119	42.8	46	21.7
	De 1 a 3	115	41.4	98	46.2
	Más de 3	16	5.7	55	25.9
	No registrado	28	10.1	13	6.1
<b>Total</b>		<b>278</b>	<b>100.0</b>	<b>212</b>	<b>100.0</b>
Presencia de garrapatas en el pasado	No	117	42.1	44	20.8
	Si	118	42.4	147	69.3
	No registrado	43	15.5	21	9.9
<b>Total</b>		<b>278</b>	<b>100.0</b>	<b>212</b>	<b>100.0</b>
Tratamiento contra garrapatas	No	99	35.6	58	27.4
	Si	136	48.9	121	57.1
	No registrado	43	15.5	33	15.6
<b>Total</b>		<b>278</b>	<b>100.0</b>	<b>212</b>	<b>100.0</b>
Presencia de garrapatas en el momento de la recolección de datos	no hay	231	83.1	101	47.6
	si hay	47	16.9	111	52.4
<b>Total</b>		<b>278</b>	<b>100.0</b>	<b>212</b>	<b>100.0</b>
Grado de infestación con garrapatas	0	231	83.0	99	46.7
	1-10	42	15.1	86	40.6
	11-25	4	1.4	18	8.5
	25-50	1	0.4	9	4.2
	Más de 50	0	0	0	0.0
<b>Total</b>		<b>278</b>	<b>100.1</b>	<b>212</b>	<b>100.0</b>
Presencia de <i>R. sanguineus</i> s.l.	No	235	84.5	106	50.0
	Si	41	14.7	106	50.0
<b>Total</b>		<b>278</b>	<b>100.0</b>	<b>212</b>	<b>100.0</b>
Frecuencia de visitas a parques recreativos	primera vez	67	24.1	69	32.5
	Menos de 4 semanas	74	26.6	37	17.5
	Más de un mes	18	6.5	5	2.4
	Años	76	27.3	47	22.2
	No registrado	43	15.5	54	25.5
<b>Total</b>		<b>278</b>	<b>100.0</b>	<b>212</b>	<b>100.0</b>

### 3.2. Resultados del diagnóstico serológico y caracterización de los perros seropositivos

En un total de 24 (5%) de 453 sueros se detectaron anticuerpos contra *B. canis vogeli*, cinco (20.8%) provenían de caninos del Valle Central y dieinueve (79.2%) fuera del Valle Central, determinándose una seroprevalencia de 2% (5/253) dentro del Valle Central y de 10% (19/200) fuera del Valle Central. La provincia con mayor prevalencia fue Guanacaste (17%, 13/77), seguido por Puntarenas (10%, 6/61), Alajuela (3%, 1/38), Heredia (3%, 1/30) y San José (2%, 3/172), en Cartago y Limón no se encontraron perros seropositivos (Cuadro 6).

En 18 (75%) de los sueros positivos se determinó títulos altos (1:128 a 1:4069), 4 (22%) perros vivían en el Valle Central (3 en San José, 1 en Alajuela) y 14 (78%) fuera del Valle Central (3 en Puntarenas, 11 en Guanacaste) (Cuadro 7).

**Cuadro 6.** Seroprevalencias y prevalencias en caninos y porcentajes de infección en garrapatas con *B. canis vogeli*, distribuidas por provincias.

Provincia	IFI +/Total (%)	qPCR en sangre +/Total (%)	qPCR en garrapatas +/Total (%)
San José	3/172 (2%)	24/153 (16%)	13/35 (37%)
Alajuela	1/38 (3%)	18/32 (56%)	5/17 (29%)
Heredia	1/30 (3%)	4/27 (15%)	1/3 (33%)
Cartago	0/46 (0%)	11/21 (52%)	0/0 (0%)
Puntarenas	6/61 (10%)	25/56 (45%)	6/35 (17%)
Guanacaste	13/77 (17%)	27/69 (39%)	10/29 (34%)
Limón	0/46 (0%)	16/42 (38%)	7/23 (30%)
<b>Total</b>	<b>24/453 (5%)</b>	<b>125/400 (31%)</b>	<b>42/142 (30%)</b>

+. Cantidad de caninos positivos.

**Cuadro 7.** Títulos de los sueros caninos seropositivos a *B. canis vogeli* según procedencia (dentro y fuera del Valle Central).

Título	Muestras seropositivas por título	Total de muestras positivas por categoría*	Perros seropositivos Dentro del Valle Central	Perros seropositivos Fuera del Valle Central
1:32	4	6 (25%)	1 (17%)	5 (83%)
1:64	2			
1:128	3	18 (75%)	4 (22%)	14(78%)
1:256	4			
1:512	5			
1:1024	2			
1:4096	4			
Total	24	24	5	19

\*Títulos bajos: 1:32 a 1:64 y títulos altos 1:128 a 1:4096

Los cinco perros seropositivos dentro del Valle Central se caracterizaron por no tener propietarios (3, 60%), ser machos (5, 100%), de 0 a 1 año de edad (4, 80%), de talla mediana (5, 100%), y de pelo corto (4, 80%). Dos fueron sin raza definida (40%) y tres (60%) de raza (American Staffordshire Terrier [2] y Cocker Spaniel Inglés [1]) y no vivían con otros perros (3, 60%). Los propietarios recordaron haber visto garrapatas en sus animales (3, 60%) y haber aplicado tratamiento (3, 60%). Solamente en 3 (60%) de los perros se encontraron de 1 a 10 garrapatas durante el examen objetivo general. Todas las garrapatas se identificaron como *R. sanguineus* s.l. En los perros seropositivos los propietarios reportaron anorexia (1, 20%) fiebre (1, 20%) y picazón (2, 40%). El examen objetivo particular realizado en el momento de recolección de la muestra de los caninos dentro del Valle Central, determinó que un 60% (3) de los perros mostraron condición corporal regular (2) o caquexia (1), un perro (20%) presentó membranas mucosas pálidas y llenado capilar de 4 s y un perro (20%) presentó fiebre.

Los 19 perros seropositivos detectados fuera del Valle Central se caracterizaron porque la mayoría tenían propietario (18, 95%), fueron hembras (12, 63%), de 2 a 7 año de edad (15, 79%), sin raza definida (19, 100%), viviendo fuera de la casa (12, 63%) y no vivían con otros perros (10, 53%). Los propietarios recordaron haber visto garrapatas en sus animales (12, 63%) y algunos aplicaron tratamiento (8, 42%). Solamente en 8 (42%) de los perros se

encontraron de 1 a 10 garrapatas durante el examen objetivo general. Todas las garrapatas se identificaron como *R. sanguineus* s.l. En algunos de los perros seropositivos los propietarios reportaron anorexia (7, 37%) fiebre (5, 26%), picazón (9, 47%) y depresión (2, 11%). El examen objetivo particular realizado en el momento de recolección de la muestra de los caninos, determinó que un 58% (11) de los perros mostraron condición corporal regular (8) o mala (3), un 32% (6) presentó membranas mucosas pálidas (5) o muy pálidas (1), un (5%) canino presentó llenado capilar de 4 s y cinco perros (26%) presentaron fiebre.

### **3.3. Valores hematológicos de los caninos seropositivos a *B. canis vogeli* y diferencias significativas con respecto a caninos seronegativos**

De todos los caninos seropositivos (24) el 50% (12) de los perros presentaron valores alterados del hematocrito, el 42% (10) el hematocrito bajo y el 8% (2) alto. Valores menores a los normales se presentaron en la hemoglobina (en el 38% [9] de los caninos) y en la CHCM (en el 50% [12] de los caninos). El 42% (10) de los caninos presentaron valores alterados en los leucocitos, el 21% (5) presentaron leucopenia y el 21% (5) leucocitosis. En los segmentados también se observaron valores alterados, el 42% (10) de los caninos con valores más bajos y el 8% (2) con valores más altos que los rangos normales. El 42% (10) presentaron eosinopenia y el 12% (3) eosinofilia. El 8% (2) de los caninos presentaron valores mayores a los normales en los basófilos. Los linfocitos (en el 46% [11] de los caninos), los monocitos (en el 58% [14] de los caninos) y las plaquetas (en el 62% [15] de los caninos) también se observaron menores a los rangos normales.

En cuanto a los valores hematológicos de los 5 caninos seropositivos dentro del Valle Central se encontró que el 40% presentaron valores alterados del hematocrito, el 20% (1) el hematocrito bajo y el 20% (1) el hematocrito alto. Valores menores a los normales se presentaron en la CHCM (en el 34% [1] de los caninos). Un canino presentó leucocitosis. El 40% (2) de los caninos presentaron valores mayores a los normales en los eosinófilos y en los basófilos. Los monocitos (en el 40% [2] de los caninos) y las plaquetas (en el 40% [2] de los caninos) también se observaron menores a los rangos normales.

Los caninos seropositivos fuera del Valle Central (19) presentaron niveles más bajos de lo normal en el hematocrito (en el 47% [9]), en la hemoglobina (en el 47% [9]) y en la CHCM (en el 58% [11]). El 47% de los caninos presentaron valores alterados de leucocitos, el 26% (5) con leucopenia y el 21% (4) con leucocitosis. También se presentaron valores más bajos de lo normal en los segmentados (en el 53% [10]), en los eosinófilos (en el 53% [10]), en los linfocitos (en el 57% [11]), en los monocitos (en el 63% [12]) y en las plaquetas (en el 68% [13]).

Los valores hematológicos de caninos seropositivos mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) con respecto a los seronegativos en el hematocrito, en la hemoglobina, en el CHCM, en los linfocitos, en los monocitos y en las plaquetas (Cuadro 8), siendo menores en los caninos positivos. Aunque el valor promedio de los linfocitos de los caninos seronegativos y seropositivos mostró diferencias significativas no se encontró fuera de los rangos normales, en estos últimos.

**Cuadro 8.** Diferencias significativas entre valores hematológicos de perros seropositivos y seronegativos a *B. canis vogeli*.

Variable	Valores referenciales perros Laboratorio de Análisis Clínico, UNA		Seronegativos			Seropositivos			P
	Unidad	Valor	N	Media	DE	n	Media	DE	
Hematocrito	%	36-47	354	43.64	8.24	18	31.44	13.13	0.01
Hemoglobina	g/dl	11-16	347	14.97	10.27	17	9.47	4.21	0.03
CHCM	g/dl	32-36	324	32.56	2.44	17	30.35	2.50	0.00
Leucocitos	/mm <sup>3</sup>	6000-12000	347	11782.13	11991.41	17	9367.65	11991.41	0.41
Bandas	/mm <sup>3</sup>	0-300	344	201.16	342.07	17	75.29	109.6	0.13
Segmentados	/mm <sup>3</sup>	3000-9000	322	6350.61	2518.81	16	2518.81	3113.13	0.08
Eosinófilos	/mm <sup>3</sup>	100-750	330	844.60	1395.06	16	230.25	348.31	0.08
Basófilos	/mm <sup>3</sup>	0-10	347	14.77	127.02	17	16.41	46.43	0.96
Linfocitos	/mm <sup>3</sup>	1000-4800	289	2967.19	3267.53	17	1105.53	1593.78	0.02
Monocitos	/mm <sup>3</sup>	60-840	345	194.41	267.80	17	40.24	101.53	0.00
Plaquetas	/mm <sup>3</sup>	200000-500000	325	201326.27	104395.29	17	100428.47	83854.27	0.00

n: Número de individuos analizados. DE: Desviación Estándar. P: Probabilidad calculada entre los grupos seropositivos y seronegativos.

### 3.4. Factores asociados a caninos seropositivos a *B. canis vogeli*

De todas las variables analizadas mediante regresión logística en la población total (dentro y fuera del Valle Central) se encontraron quince factores asociados a seropositividad a *B. canis vogeli* ( $p \leq 0,05$ ) trece fueron factores de riesgo (vivir fuera del Valle Central, ser de talla mediana, habitar con más de tres perros, tener garrapatas, tener garrapatas de la especie *R. sanguineus* s.l., mayor grado de infestación con garrapatas, haber tenido en el pasado anorexia, fiebre, debilidad, pérdida de pelo, problemas respiratorios y picazón, y presentar fiebre), y dos factores se determinaron como protectivos: ser de raza pura y frecuentar un parque recreativo (Cuadro 9).

**Cuadro 9.** Factores asociados a caninos seropositivos a *B. canis vogeli*, determinado mediante regresión logística

Factor asociado a <i>B. canis vogeli</i>	Estrato	n	+	%+	OR	IC		Chi cuadrado	P (p≤0.05)
						Li	Ls		
Localización	Dentro del Valle Central	253	5	1.98%	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref
	Fuera del Valle Central	200	19	9.50%	5.20	1.79	16.24	12.57	< 0.001
Talla	Pequeña	88	0	0.00%	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref
	Mediana	290	13	4.48%	inf	inf	inf	4.07	0.04
Raza	Sin raza definida	238	21	8.82%	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref
	Raza pura	212	3	1.42%	0.15	0.03	0.53	12.16	< 0.001
Cantidad de perros que habitan con el perro	0 perros	150	5	3.33%	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref
	Más de 3	69	7	10.14%	3.27	0.89	12.45	4.21	0.04
Grado de infestacion con garrapatas	0	299	9	3.01%	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref
	1-10	124	11	8.87%	3.14	1.17	8.49	6.67	0.01
	25-50	9	2	22.22%	9.21	1.14	60.67	9.33	0.00
Presencia de garrapatas	no hay	301	9	2.99%	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref
	si hay	152	15	9.87%	3.55	1.42	9.04	9.50	0.00
Presencia de <i>R. sanguineus</i> s.l.	no	311	9	2.89%	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref
	si	142	15	10.56%	3.96	1.58	10.10	11.40	< 0.001
Frecuencia de visitas a parques	Primera vez	126	12	9.52%	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref
	Años	112	3	2.68%	0.26	0.06	1.03	4.69	0.03
Anorexia en el pasado	no	324	13	4.01%	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref
	si	84	8	9.52%	2.52	0.92	6.79	4.14	0.04
Fiebre en el pasado	no	376	15	3.99%	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref
	si	31	6	19.35%	5.78	1.82	17.76	13.78	< 0.001
Debilidad en el pasado	no	370	15	4.05%	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref
	si	38	6	15.79%	4.44	1.42	13.34	9.70	0.00
Pérdida de pelo en el pasado	no	329	12	3.65%	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref
	si	79	9	11.39%	3.40	1.26	9.06	7.81	0.01
Problemas respiratorios en el pasado	no	382	17	4.45%	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref
	si	26	4	15.38%	3.90	1.01	13.84	5.95	0.01
Picazón en el pasado	no	277	10	3.61%	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref
	si	131	11	8.40%	2.45	0.94	6.42	4.16	0.04
Fiebre en el presente	no	244	5	2.05%	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref
	si	78	6	7.69%	3.98	1.04	15.58	5.69	0.02

n: Número de individuos en el estrato +: Número de seropositivos %: Porcentaje en ese estrato OR: Razón de Posibilidades IC: Intervalo de Confianza (95%) LI: Límite Inferior LS: Límite Superior P: Probabilidad. Ref: Variable usada como valor de referencia.

### **3.5 Resultados del PCR en punto final de los caninos positivos a *Babesia* spp.**

Del total de 474 caninos analizados mediante el PCR ARNr18S (450 pb) se lograron amplificar dieciséis muestras. En el PCR ARNr18S (1600 pb) solamente se logró amplificar una de estas dieciséis muestras.

De los 160 grupos de garrapatas analizados mediante el PCR ARNr18S (450 pb) se encontraron dieciséis con *Babesia* spp. En el PCR ARNr18S (1600 pb) no se logró amplificar ningún grupo de garrapatas.

### **3.6 Secuenciación y árbol filogenético**

De las treinta y dos muestras de caninos (16 de caninos y 16 de garrapatas) que amplificaron en el PCR ARNr18S (450 pb), se enviaron a secuenciar 12 sangres y 7 garrapatas: de diez muestras se logró obtener una secuencia, mientras que nueve no se lograron secuenciar. Al comparar las diez secuencias obtenidas con secuencias depositadas en la base de datos del NCBI, se determinaron cinco muestras como *B. canis vogeli* (4 sangres y 1 grupo de garrapatas) (Cuadro 10) y cinco como *Hepatozoon canis* (4 sangres y 1 grupo de garrapatas) (Cuadro 10).

La única muestra canina positiva que amplificó en el PCR ARNr18S (1600 pb) no se logró secuenciar de forma completa (382/1600 pb), sin embargo, se confirmó como *B. canis vogeli* (Cuadro 10). No fue posible realizar el árbol filogenético.

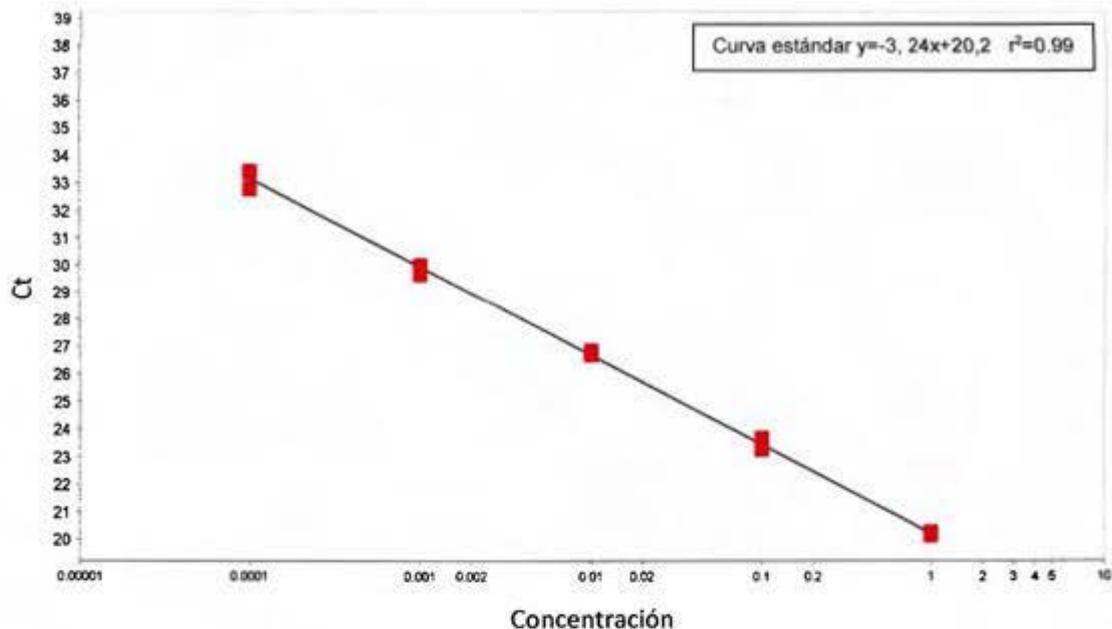
**Cuadro 10.** Resultados de las secuencias del gen ARNr 18S de sangre y garrapatas de perros y de la base de datos GenBank del NCBI utilizando el algoritmo Blastn y de la comparación entre la qPCR.

Especie ID de la muestra	Tipo de muestra	Resultados de secuenciación				Resultado de la qPCR (valor Ct <sup>a</sup> )
		Tamaño (pb)	Número de acceso GenBank	Identidad (%)	Cobertura (%)	
<i>B. canis vogeli</i>						
1	Sangre	284	KT323933	261/269 (94)	98	Positivo (22)
2	Sangre	354	KY073363	354/354 (100)	100	Positivo (15)
3	Sangre	382	HQ662635	382/382 (100)	100	Positivo (25)
4	Sangre	252	KJ513202	247/250 (99)	99	Negativo (35)
5	Garrapata	247	GU386270	220/238 (92)	96	Negativo (36)
6 <sup>b</sup>	Sangre	382	KJ939326	382/382 (100)	100	Positivo (24)
<i>Hepatozoon canis</i>						
7	Sangre	372	KX712123	371/371 (100)	99	Negativo (35)
8	Sangre	401	KX712123	401/401 (100)	100	Negativo (ND)
9	Sangre	350	KX712123	344/350 (98)	100	NR
10	Sangre	438	KJ634654	420/429 (97)	98	Positivo (32)
11	Garrapata	256	KX712129	248/253 (98)	98	Positivo (32)

ID: Identificación. <sup>a</sup>: Se consideraron positivas por qPCR las muestras en las que se obtuvo valores de CT entre 15 a  $\leq$  33. <sup>b</sup>: Muestra procesada con la PCR ARNr18S (1600pb), el resto de las muestras fueron procesadas con la PCR ARNr18S (450pb). ND: no determinado. NR: no se realizó la qPCR.

### 3.7 Resultados de la qPCR para *B. canis vogeli*

Debido a los resultados obtenidos con el PCR en punto final se implementó un PCR en tiempo real para *B. canis vogeli*. El qPCR implementado mostró una eficiencia de 103% (Figura 2). El análisis de la curva de disociación mostró un único producto amplificado en las muestras con el ADN de interés, además los primers utilizados fueron previamente evaluados y determinados como específicos (Vilhena *et al.*, 2013), estableciéndose una alta especificidad de la técnica. Muestras que mostraron Ct iguales o mayores a 15 e iguales o menores a 33 se consideraron positivas, muestras con Ct mayores a 33 se determinaron como negativas.



**Figura 2.** Curva estándar del qPCR implementado para identificar *B. canis vogeli*.

De las 400 muestras caninas analizadas mediante qPCR para *B. canis vogeli* 125 muestras resultaron positivas.

Al comparar los resultados obtenidos en la PCR ARNr18S (450 pb) con los resultados obtenidos en la qPCR se determinó 10 de las 16 muestras de sangre como positivas en qPCR (valores Ct de 15 a  $\leq 33$ ), cuatro como negativas (valores Ct  $> 33$ ) dos muestras no se analizaron por falta de ADN. Los cuatro caninos identificados como *B. canis vogeli* mediante PCR ARNr18S (450 pb) y secuenciación se determinaron como positivos (3) o negativos (1) en qPCR (Cuadro 10). Los cuatro caninos identificados como *Hepatozoon canis* mediante PCR ARNr18S (450 pb) y secuenciación se determinaron como positivos (1), negativos (2) y uno no se analizó por falta de ADN (Cuadro 10). La única muestra de sangre identificada como *B. canis vogeli* mediante PCR ARNr18S (1600 pb) y secuenciación se determinó como positiva en qPCR.

Un total de 47 perros resultaron positivos con qPCR dentro del Valle Central y 78 fuera del Valle Central, encontrándose con esta técnica prevalencias de 31% (125/400), 21% (47/220) y 43% (78/180) a nivel nacional, dentro del Valle Central y fuera del Valle Central, respectivamente. La provincia con mayor

prevalencia fue Alajuela (56%, 18/32), seguido por Cartago (52%, 11/21), Puntarenas (45%, 25/56), Guanacaste (39%, 27/69), Limón (38%, 16/42), San José (16%, 24/153) y la que presentó menos prevalencia fue Heredia (15%, 4/27) (Cuadro 6).

Los perros positivos dentro del Valle Central (47) tenían propietarios (46 [96%]), fueron machos (27 [57%]), de 0 a 7 años de edad (45 [96%]), vivían fuera del hogar (20 [43%]), de talla mediana y pelo corto (29 [61,7%]), de raza (28 [60%]), viviendo con 1 a 4 personas (29 [62%]) y con 1 a 3 perros (27 [57%]). Un 30% (14) de los propietarios recordaron haber visto garrapatas en sus animales, y haber aplicado tratamiento (10 [21%]). En 7 (15%) de los perros se encontraron de 1 a 10 garrapatas durante el examen objetivo general. Las garrapatas se identificaron como *R. sanguineus* s.l. (6) e *I. boliviensis* (1). Los propietarios recordaron haber observado anorexia (6 [13%]), debilidad (2 [4%]), depresión (4 [8%]), pérdida de pelo (9 [19%]), problemas respiratorios (4 [8%]) y picazón (19 [40%]) en sus mascotas. El examen objetivo general determinó que presentaron membranas mucosas pálidas (4 [9%]) y fiebre (6 [13%]).

Los perros positivos fuera del Valle Central (78) tenían propietarios (75 [98%]), fueron machos (38 [49%]), de 2 a 7 años de edad (26 [55%]), habitaban fuera del hogar (44 [56%]), de talla mediana (32 [42%]), de pelo corto (39 [50%]), sin raza definida (55 [71%]), viviendo con 1 a 4 personas (58 [74%]) y con 1 a 3 perros (37 [47%]). Los propietarios recordaron haber visto garrapatas en sus animales (58 [74%]) y haber aplicado tratamiento (47 [60%]). Durante el examen objetivo general a los perros se le encontraron de 1 a 50 (37 [47%]) garrapatas, todas *R. sanguineus* s.l. Los propietarios recordaron haber notado en el pasado anorexia (10 [13%]), fiebre (3 [4%]), debilidad (4 [5%]), depresión (6 [8%]), pérdida de pelo (11 [14%]), problemas para caminar (5 [6%]), problemas respiratorios (5 [6%]) y picazón (17 [22%]) en sus mascotas. El examen objetivo general determinó membranas mucosas pálidas (13 [17%]), llenado capilar de 3 segundos (7 [9%]) y fiebre (13 [17%]).

### **3.8 Valores hematológicos de los caninos positivos a *B. canis vogeli* y diferencias significativas con respecto a caninos negativos**

Los caninos positivos (125) presentaron valores alterados en el hematocrito (23 [18%] con hematocrito bajo y 38 [30%] alto), en la hemoglobina (16 [13%] hemoglobina baja y 33 [26%] hemoglobina alta), en la CHCM (39 [31%] baja y en 4 [3%] alta), en los leucocitos (9 [80%] bajos y 30 [24%] altos), en las bandas (16 [13%] bajas), en los segmentados (26 [21%] bajos y 10 [8%] altos), en los eosinófilos (29 [23%] bajos y 52 [42%] altos), en los basófilos (6 [5%] bajos), en los linfocitos (22 [18%] bajos y 17 [14%] altos), en los monocitos (53 [42%] bajos y 1 [0,8%] altos) y en las plaquetas (59 [47%] bajas y 1 [0,8%] alta).

Los caninos positivos dentro del Valle Central presentaron valores alterados en el hematocrito (3 [7%] bajo y 20 [53%] alto), la hemoglobina (1 [3%] baja y 16 [42%] alta), la CHCM (8 [21%] baja y 1 [3%] alta), los leucocitos (3 [8%] bajos y 12 [32%] altos), las bandas (5 [13%] mayores), los segmentados (2 [5%] menores y 8 [21%] mayores), los eosinófilos (4 [11%] bajos y 15 [39%] altos), los basófilos (2 [5%] altos), los linfocitos (8 [21%] altos), los monocitos (19 [50%] bajos) y las plaquetas (13 [35%] bajas y 1 [3%] altos).

Los caninos positivos fuera del Valle Central presentaron valores alterados en el hematocrito (20 [33%] bajo y 14 [23%] alto), la hemoglobina (15 [25%] baja y 7 [12%] alta), la CHCM (30 [50%] baja y 2 [3%] alta), los leucocitos (6 [10%] bajos y 17 [28%] altos), las bandas (11 [18%] mayores), los segmentados (23 [38%] menores y 2 [3%] mayores), los eosinófilos (24 [40%] bajos y 15 [25%] altos), los basófilos (4 [7%] altos), los linfocitos (22 [15%] bajos y 9 [28%] altos), los monocitos (32 [53%] bajos y 1 [2%] altos) y las plaquetas (45 [75%] bajas).

Al comparar las medias de los valores hematológicos entre caninos qPCR positivos y negativos se determinó diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) únicamente en los segmentados (Cuadro 11). Sin embargo, aunque el valor promedio de los segmentados fue significativamente menor en los positivos que en los negativos, el valor se encontró dentro del rango normal.

**Cuadro 11.** Diferencias significativas entre valores hematológicos de perros qPCR positivos y negativos a *B. canis vogeli*, determinado mediante prueba t.

Variable	Valores referenciales perros		Negativos			Positivos			P
	Unidad	Valor	n	Media	DE	n	Media	DE	
Hematocrito	%	36-47	228	43.77	8.50	99	42.13	9.50	0.10
Hemoglobina	g/dl	11-16	217	14.83	10.00	99	13.76	3.40	0.30
CHCM	g/dl	32-36	214	32.06	2.67	98	31.86	3.96	0.60
Leucocitos	/mm <sup>3</sup>	6000-12000	217	12070.28	14793.85	99	10871.72	4243.16	0.43
Bandas	/mm <sup>3</sup>	0-300	215	202.11	369.53	98	126.27	220.51	0.06
Segmentados	/mm <sup>3</sup>	3000-9000	199	6763.48	10831.4	96	4635.43	3542.16	<b>0.01</b>
Eosinófilos	/mm <sup>3</sup>	100-750	204	850.68	1518.95	98	601.73	781.5	0.12
Basófilos	/mm <sup>3</sup>	0-10	217	20.41	158.60	99	7.52	37.97	0.42
Linfocitos	/mm <sup>3</sup>	1000-4800	198	2980.06	3621.17	93	2574.31	2329.76	0.32
Monocitos	/mm <sup>3</sup>	60-840	215	203.10	248.83	99	164.40	325.29	0.24
Plaquetas	/mm <sup>3</sup>	200000-500000	196	195515.94	104730.19	98	195281.51	107473.06	0.98

n: Número de individuos analizados. DE: Desviación Estándar. P: Probabilidad calculada entre los grupos positivos y negativos.

### 3.9 Factores asociados a *B. canis vogeli* de los caninos positivos en qPCR

Se encontraron cinco factores asociados, cuatro de riesgo y uno protector: vivir fuera del Valle Central, tener propietario, habitar con 1 o más de 4 personas y tener de 11 a 25 garrapatas fueron factores de riesgo, mientras que recibir tratamiento oral contra garrapatas resultó un factor protector (Cuadro 12).

**Cuadro 12.** Factores asociados a caninos positivos a *B. canis vogeli*, determinado mediante regresión logística.

Factor asociado a <i>B. canis vogeli</i>	Estrato	n	+	%+	OR	IC		Chi cuadrado	P
						LI	Ls		
Localización	Dentro del Valle Central	220	47	21.36%	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref
	Fuera del Valle Central	180	78	43.33%	2.81	1.78	4.46	22.19	< 0.001
Cantidad humanos que habitan con el perro	0 humanos	34	4	11.76%	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref
	De 1 a 4	253	87	34.39%	3.93	1.26	13.62	7.06	0.01
	Más de 4	107	33	30.84%	3.34	1.01	12.22	4.82	0.03
Estatus	Deambulante	37	4	10.81%	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref
	Existe propietario	363	121	33.33%	4.13	1.35	14.06	7.91	0.000
Ha recibido tratamiento oral contra garrapatas	no	298	101	33.89%	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref
	si	23	1	4.35%	0.0887	0.0044	0.632	8.5706	0.0034
Grado de infestación con garrapatas	0	270	79	29.26%	Ref	Ref	Ref	Ref	Ref
	11-25	18	10	55.56%	3.02	1.05	8.78	5.45	0.02

n: Número de individuos en el estrato +: Número de qPCR positivos %: Porcentaje de positivos correspondientes a ese estrato OR: Razón de Posibilidades IC: Intervalo de Confianza (95%) LI: Limite Inferior LS: Limite Superior P: Probabilidad. Ref: Variable usada como valor de referencia.

### 3.10 Resultados de la qPCR de los caninos con garrapatas positivas a *B. canis vogeli*

Se encontró un 30% (42/142) de garrapatas infectadas con *B. canis vogeli*, pertenecientes a las especies *R. sanguineus* s.l. (41) y *A. ovale*. (1).

Al comparar los resultados obtenidos en la PCR ARNr18S (450 pb) con los resultados obtenidos en la qPCR se confirmaron siete de los 16 grupos de garrapatas positivos en qPCR (valores Ct 15 a 33), mientras que siete se encontraron negativos (valores Ct >33), dos muestras no se analizaron por falta de ADN. El grupo de garrapatas identificado como positivo a *B. canis vogeli* en PCR ARNr18S (450 pb) y secuenciación se determinó negativo en qPCR (Ct 36). El grupo de garrapatas identificado como *Hepatozoon canis* mediante PCR ARNr18S (450 pb) y secuenciación se determinaron como positivo en qPCR (Ct 33) (Cuadro 10).

El porcentaje de infección con *B. canis vogeli* en garrapatas de caninos dentro del Valle Central fue de 34% (16/46) y fuera del Valle Central de 27% (26/96). Cuatro caninos con garrapatas *R. sanguineus* s.l. positivas también fueron seropositivos y trece qPCR positivos. El perro del cual se tomaron las garrapatas positivas de la especie *A. ovale* fue seronegativo y negativo en qPCR.

Los caninos dentro del Valle Central con garrapatas qPCR positivas (16), vivían en la provincia de San José (13), Alajuela (2) y Heredia (1) y tenían propietario (13), vivían afuera de la casa (11), con uno o más de un perro (7), machos (13), de 0 a 1 año (11) o de 2 a 7 (5) años, de raza (9), de talla mediana (12) y de pelo corto (12). Los propietarios reportaron la presencia de garrapatas en su perro en el pasado (10) y ocho aplicaron tratamiento. Además, observaron en el pasado anorexia (2), fiebre (1), debilidad (1), depresión (1), pérdida de pelo (1), picazón (5) y diarrea (1). En el examen objetivo general se encontró animales con membranas mucosas pálidas (2), con fiebre (3) y con 1 a 50 garrapatas (15). Se encontraron valores alterados en el hematocrito con un rango de 34 a 55% (2 caninos con el hematocrito bajo y 5 caninos con el hematocrito alto), en la CHCM de 29 a 36 g/dL (5 caninos con la CHCM baja), en los leucocitos de 7900 a 23900 /mm<sup>3</sup> (6 caninos con valores altos), en las bandas de 0 a 640 /mm<sup>3</sup> (2 caninos con valores altos), en los segmentados de 4661 a 20076/mm<sup>3</sup> (2 caninos con valores altos), en los eosinófilos de 0 a 1946/mm<sup>3</sup> (1 canino con valores bajos y 4 con valores altos), en los linfocitos de 1848 a 5002/mm<sup>3</sup> (1 canino con valores altos), en los monocitos de 0 a 675/mm<sup>3</sup> (5 caninos con valores bajos) y en las plaquetas de 120376 a 300940/mm<sup>3</sup> (8 caninos con valores menores).

Los caninos fuera del Valle Central con garrapatas positivas (26) vivían en la provincia de Guanacaste (10), Limón (7), Puntarenas (6) y Alajuela (cantón de San Carlos, 3), y tenían propietario (23), viviendo afuera de la casa (18), habitando con 1 a 4 (18) personas en el hogar y con 1 o más perros (17). La mayoría fueron hembras (15) entre 0 a 7 años (22), sin raza definida (18), de talla mediana (13) y pelo corto (14). Los propietarios reportaron la presencia de garrapatas en su perro en el pasado (18) y les aplicaron tratamiento (13). Recordaron que sus mascotas sufrieron de anorexia (5), fiebre (2), debilidad (3), depresión (1), pérdida de pelo (3), problemas respiratorios (2), problemas para

caminar (1) picazón (6) y diarrea (1). En el examen objetivo general se encontró perros con membranas mucosas pálidas (5), fiebre (3), con llenado capilar entre 3 ó 4 segundos (3) y con 1 a 50 garrapatas (24). Se encontraron valores alterados en el hematocrito con un rango de 14 a 50% (4 caninos con el hematocrito bajo y 4 con el hematocrito alto), en la hemoglobina de 4 a 17 g/dL (4 caninos con la hemoglobina baja y 2 con la hemoglobina alta), en la CHCM de 26 a 40 g/dL (10 caninos con la CHCM baja y 2 caninos con la CHCM alta), en los leucocitos de 5250 a 16150/mm<sup>3</sup> (3 caninos con valores bajos y 7 con valores altos), en las bandas de 0 a 658/mm<sup>3</sup> (6 caninos con valores altos), en los segmentados de 44 a 10804/mm<sup>3</sup> (9 caninos con valores bajos y 3 caninos con valores altos), en los eosinófilos de 0 a 2329/mm<sup>3</sup> (7 caninos con valores bajos y 6 caninos con valores altos), en los linfocitos de 24 a 10820/mm<sup>3</sup> (7 caninos con valores bajos y 4 caninos con valores altos), monocitos de 0 a 444/mm<sup>3</sup> (12 caninos con valores bajos) y en las plaquetas de 20552 a 395626/mm<sup>3</sup> (16 caninos con valores bajos).

### ***3.11 Resultados de los caninos seropositivos y qPCR negativos, seropositivos y qPCR positivos, y qPCR positivos y seronegativos***

Un total de 130 caninos se identificaron positivos, ya sea en IFI o qPCR. 12 caninos resultaron seropositivos y negativos en qPCR, de éstos sólo un perro tenía garrapatas positivas. La mayoría de caninos seropositivos pero PCR negativos se detectaron fuera del Valle Central de Costa Rica (9/12). Los caninos tenían propietarios (9, 75%), machos (7, 58%) de 0 a 7 años (11, 92%), vivían fuera del hogar (8, 67%), de talla mediana (6, 50%) y pelo corto (5, 42%), sin raza definida (11, 92%), viviendo con más de 4 personas (6, 50%) y con 1 a 3 perros (5, 42%). Un 50% (6) de los propietarios recordaron haber visto garrapatas en sus animales, y haber aplicado tratamiento (4, 33%). En 4 (33%) de los perros se encontraron de 1 a 10 garrapatas durante el examen objetivo general. Los propietarios recordaron haber observado anorexia (5, 42%), debilidad (4, 33%), depresión (2, 17%), pérdida de pelo (4, 33%), problemas respiratorios (2, 17%) problemas para caminar (2, 17%) y picazón (4, 33%) en

sus mascotas. El examen objetivo general determinó que presentaron membranas mucosas pálidas (3, 25%), llenado capilar mayor a 2 segundos (1, 17%) y fiebre (2, 17%).

Siete caninos se determinaron seropositivos y qPCR positivos a *B canis vogeli*, en dos se encontraron garrapatas qPCR positivas. El 86% (6/7) de los caninos se detectaron fuera del Valle Central. Los 7 caninos tenían propietarios (7, 100%), hembras (4, 57%) de 2 a 7 años (5, 42%), vivían dentro del hogar (4, 57%) y pelo corto (2, 29%), sin raza definida (6, 86%), viviendo con 1 a 4 personas (5, 71%) y con 1 a 3 perros (3, 43%). Un 86% (6) de los propietarios recordaron haber visto garrapatas en sus animales, y haber aplicado tratamiento (4, 57%). En 3 (43%) de los perros se encontraron de 1 a 10 garrapatas durante el examen objetivo general. Los propietarios recordaron haber observado anorexia (2, 29%), debilidad (1, 14%), pérdida de pelo (5, 71%), problemas respiratorios (1, 14%) y picazón (3, 43%) en sus mascotas. El examen objetivo general determinó que presentaron membranas mucosas pálidas (2, 29%) y fiebre (1, 14%).

Se encontraron 111 caninos qPCR positivos a *B canis vogeli* pero seronegativos, el 62% (69) se detectaron fuera del Valle Central. De los 111 perros qPCR positivos 11 tenían garrapatas *R. sanguineus* s.l. qPCR positivas. Estos 111 caninos tenían propietarios (108, 97%), hembras (62, 56%) de 0 a 7 años (100, 90%), vivían fuera del hogar (50, 45%), de talla mediana (55, 50%) y pelo corto (60, 54%), sin raza definida (63, 57%), viviendo con 1 a 4 personas (80, 72%) y con 1 a 3 perros (49, 44%). Un 59% (65) de los propietarios recordaron haber visto garrapatas en sus animales, y haber aplicado tratamiento (58, 52%). En 29 (26%) de los perros se encontraron de 1 a 10 garrapatas durante el examen objetivo general. Los propietarios recordaron haber observado anorexia (13, 12%), debilidad (5, 5%), depresión (8, 7%), pérdida de pelo (13, 12%), problemas respiratorios (6, 5%) problemas para caminar (5, 5%) y picazón (29, 26%) en sus mascotas. El examen objetivo general determinó que presentaron membranas mucosas pálidas o muy pálidas (15, 14%), llenado capilar mayor a 2 segundos (10, 9%) y fiebre (14, 13%).

Se realizó una prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) para comparar los valores hematológicos entre los caninos seropositivos-qPCR negativos con caninos negativos, entre los caninos seropositivos-qPCR positivos con caninos negativos y entre los caninos qPCR positivos-seronegativos y los caninos negativos. Se determinó diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) en los valores de la CHCM entre los caninos seropositivos-qPCR positivos y los caninos negativos (Cuadro 13).

**Cuadro 13.** Diferencias estadísticamente significativas entre valores hematológicos de los perros según los resultados obtenidos en la IFI y en la qPCR mediante prueba de ANOVA.

IFI	qPCR	ID	Variable	n	Media	DE	DES	IFI	qPCR	ID	Variable	n	Media	DE	DES
-	-	a	Hematocrito	202	44.10	8.00		-	-	a	Eosinófilos	183	874.10	1588.00	
-	+	b		87	42.30	9.20		-	+	b		86	564.30	648.60	
+	-	c		9	31.10	12.90		+	-	c		8	247.40	367.80	
+	+	d		5	35.00	15.20		+	+	d		5	126.60	279.20	
-	-	a	Hemoglobina	195	14.80	6.70		-	-	a	Basófilos	195	21.30	166.80	
-	+	b		87	15.80	17.70		-	+	b		87	8.50	40.40	
+	-	c		9	9.80	4.50		+	-	c		9	31.00	61.70	
+	+	d		5	10.0	4.30		+	+	d		5	0.00	0.00	
-	-	a	CHCM	193	32.50	2.50	d	-	-	a	Linfocitos	157	3123.90	3969.20	
-	+	b		86	32.70	2.50	d	-	+	b		78	2588.70	2331.20	
+	-	c		9	31.00	2.80		+	-	c		9	1467.30	1904.00	
+	+	d		5	29.40	0.90	a, b	+	+	d		5	241.20	486.80	
-	-	a	Leucocitos	195	12304.10	15547.00		-	-	a	Monocitos	193	204.40	250.90	
-	+	b		87	10750.60	4127.20		-	+	b		87	181.20	342.60	
+	-	c		9	8411.10	3914.00		+	-	c		9	54.60	132.90	
+	+	d		5	12510.00	6600.40		+	+	d		5	0.00	0.00	
-	-	a	Bandas	193	213.60	385.80		-	-	a	Plaquetas	175	201233.90	104277.80	
-	+	b		86	140.50	231.00		-	+	b		86	195444.60	108098.40	
+	-	c		9	74.40	112.10		+	-	c		9	124943.10	100976.20	
+	+	d		5	0.40	0.90		+	+	d		5	91089.40	58137.00	
-	-	a	Segmentados	182	6997.70	11265.70									
-	+	b		84	4723.60	3581.60									
+	-	c		8	2501.90	2709.50									
+	+	d		5	1099.60	2299.40									

IFI: Inmunofluorescencia indirecta, ID: Identificación del grupo n: Número de individuos, DE: Desviación Estándar, DES: Diferencia Estadísticamente Significativa contra otra media ( $p < 0,05$ ). Se resalta en negrita aquellos valores hematológicos donde se hallaron diferencias significativas. Se encontraron diferencias entre el grupo a y d y entre el grupo b y d en el valor de la CHCM.

## 4. Discusión

### 4.1 Diagnóstico serológico

En Costa Rica no se registran hasta la fecha estudios serológicos que hayan determinado la prevalencia de *B. canis vogeli* en perros, ya sea en la población total, dentro del Valle Central o fuera del Valle Central. Tampoco se han reportado estudios similares en Centroamérica. En Brasil hay reportes de estudios sobre la seroprevalencia de este agente en diferentes regiones, reportándose en el estado Maranhão y Minas Gerais seroprevalencias de 16.1% (52/322) (Pereira da Costa *et al.*, 2015) y 28.7% (70/244) (Costa-Júnior *et al.*, 2009), respectivamente, mientras que en un hospital veterinario del noreste de Brasil se determinó una seroprevalencia de 22.5% (20/89) (Barcellos *et al.*, 2015). Un estudio en Colombia reportó una seroprevalencia de 51.6% (47/91) (Vargas *et al.*, 2012). Al comparar estas seroprevalencias con la determinada en Costa Rica (5%), se observa que en nuestro país es menor a las encontradas en Brasil (16.1%, 28.7% y 22.5%) y Colombia (51.6%). El estudio realizado en el estado Maranhão, Brasil, se llevó a cabo en una región abandonada de Brasil, en caninos con un alto porcentaje de infestación con garrapatas (63%) (Costa *et al.*, 2013), donde muy probablemente el cuidado de los caninos no haya sido el adecuado, mientras que el estudio de Minas Gerais se llevó a cabo en tres regiones diferentes, dos de las cuales (Nanuque y Belo Horizonte) se caracterizaron por temperaturas altas, que según los autores podrían haber favorecido los altos niveles de infestación con garrapatas y por consiguiente altas seroprevalencias de infecciones por *Babesia*, mientras que en el estudio realizado en un hospital veterinario en el noreste de Brasil, se analizaron caninos sospechosos de sufrir babesiosis, lo que podría explicar las diferencias encontradas con nuestro estudio, en los que se analizaron caninos aparentemente sanos y que en un 91% de los casos contaban con propietarios. En contraste, el estudio realizado en Colombia, analizó en su mayoría caninos de perreras y de una clínica veterinaria, por lo que la convivencia con otros perros o la condición de enfermedad podrían haber sido la causa de la alta seroprevalencia determinada. Estas condiciones de los caninos estudiados en Brasil y Colombia podrían explicar las altas seroprevalencias encontradas en

comparación con las del presente estudio. Otra razón por la cual se encontraron bajas seroprevalencias, podría ser por una baja sensibilidad de la IFI, ya que la utilizada en el presente estudio no fue diseñada específicamente para la especie *B. canis vogeli*, sino que fue creada con antígeno de *B. canis canis*, sin embargo, es comercializada para detectar anticuerpos contra las tres especies de *B. canis* (Otranto *et al.*, 2010).

En concordancia con el estudio de Minas Gerais, Brasil se determinó una mayor seroprevalencia en los perros viviendo fuera del Valle Central (10%, 19/200) en comparación con los caninos viviendo dentro del Valle Central (2%, 5/253) ( $p \leq 0,05$ ), debido probablemente a las más altas temperaturas que se registran fuera del Valle Central. Se ha documentado que mayores temperaturas favorecen una infestación de los perros con garrapatas (Costa-Junior *et al.*, 2009). Así, se determinaron la mayoría de seropositivos en las provincias de Guanacaste (17%, 13/77) y Puntarenas (10%, 6/61).

Las diferencias estadísticamente significativas determinadas entre los valores hematológicos de los caninos seropositivos y seronegativos, (hematocrito, hemoglobina, CHCM, monocitos y plaquetas), concuerda con lo descrito por Boozer y Macintire (2003), que señalan la anemia hemolítica y la trombocitopenia como las principales alteraciones hematológicas en los caninos seropositivos. Se han reportado varios mecanismos que pueden producir anemia hemolítica en caninos con babesiosis: el daño causado directamente por el parásito en el eritrocito, la fragilidad osmótica de las células infectadas, la producción de auto anticuerpos dirigidos hacia la membrana de los eritrocitos, la actividad eritrofagocítica aumentada de macrófagos inducida por factores hemolíticos séricos y el daño inducido por el sistema de inmunidad secundaria después de la producción de anticuerpos de membrana antieritrocitos (Day, 1999; Irwin, 2009; Irwin, 2010; Salem y Farag, 2014).

Mientras, la trombocitopenia podría ser causada por la destrucción de plaquetas, por un incremento en el secuestro de plaquetas en el hígado o por una disminución en la producción de plaquetas (Stappendel, 1978, Feldman *et al.*, 1988 y Salem y Farag, 2014).

La monocitopenia no se ha observado con frecuencia en caninos con babesiosis por lo que su ocurrencia y causa deben de ser analizadas en estudios futuros (Vercammen *et al.*, 1997, Furlanello *et al.*, 2005).

Es importante mencionar que pueden existir otros hemoparásitos transmitidos también por garrapatas como *Hepatozoon canis*, *Ehrlichia canis* o *Anaplasma* spp. (Barrantes-Gonzalez *et al.*, 2016; Montenegro *et al.*, 2017) en los caninos seropositivos a *B. canis vogeli* y que puedan también producir alteraciones en los valores hematológicos.

Los caninos seropositivos presentaron mayor posibilidad de haber sido de talla mediana que los caninos seronegativos los, esto concuerda con lo reportado por Araujo *et al.* (2015), quienes encontraron que la raza mediana en caninos representaba un factor de riesgo para ser seropositivos, sin embargo no se conocen las razones por lo que deberá ser analizado en estudios futuros.

Los caninos seropositivos tuvieron 3 veces más posibilidad de vivir con más de tres perros que los seronegativos Mayor número de perros viviendo juntos podría representar una mayor probabilidad de exposición de éstos al vector, y por lo tanto una mayor probabilidad de contraer la babesiosis. El contacto con otros perros y su asociación con *B. canis vogeli* no ha sido reportado a la fecha.

Los caninos seropositivos tuvieron 4, 3 y 9 veces más posibilidad de presentar garrapatas, de tener de 1 a 10 y de 25 a 50 garrapatas que los caninos seronegativos, respectivamente. Esto se debe a que los caninos que presentan garrapatas tienen una mayor probabilidad de infectarse con *B. canis vogeli* que aquellos que no presentan garrapatas, un hallazgo que concuerda con lo encontrado por Costa-Junior *et al.* (2009) en el estado de Minas Gerais en Brasil, donde los caninos infectados con garrapatas presentaron también 3.1 veces más probabilidad de ser seropositivos que los caninos no infestados.

Los caninos seropositivos presentaron 4 veces más posibilidad de presentar garrapatas de la especie *R. sanguineus* s.l. que los seronegativos Este hallazgo era de esperarse, ya que los parásitos de *B. canis vogeli* son transmitidos a perros susceptibles a través de la saliva de garrapatas de la especie *R. sanguineus* s.l. infectadas, mientras éstas se están alimentando, descubrimiento

que fue demostrado en 1936 por Regendanz y Muniz. (Dantas-Torres y Aguiar, 2006)

Los caninos seropositivos tuvieron más posibilidad de presentar en el pasado en el pasado anorexia (3 veces), fiebre (6 veces), debilidad (4 veces), problemas respiratorios (4), pérdida de pelo (3 veces) y picazón (2 veces) que los caninos seronegativos. Los caninos seropositivos tuvieron 4 veces más probabilidad de presentar fiebre durante el examen objetivo general que los seronegativos. Anorexia, fiebre y debilidad son signos clínicos reportados para todas las especies de *Babesia* que infectan perros (Irwin, 2009, Solano-Gallego y Baneth, 2011, Solano-Gallego *et al.*, 2016), mientras que problemas respiratorios se han asociado más a caninos infectados con *B. canis rossii* (Jacobson, 2006; Solano-Gallego *et al.*, 2016). No se ha reportado a la fecha la pérdida de pelo ni picazón como factores asociados, ni como signos clínicos en caninos seropositivos. Se necesitan estudios futuros para conocer la razón por la cual la picazón y la pérdida de pelo se establecieron como factores asociados en la presente investigación.

Ser de raza pura resultó ser un factor protector. El 9% de los caninos sin raza definida fueron seropositivos, mientras que sólo un 1% de los caninos de raza. Según lo indicado por Araujo *et al.* (2015) los caninos de razas puras, por lo general, viven en lugares más restringidos y tienen poco contacto con ambientes externos, lo que los protege de estar expuestos al vector de la babesiosis, la garrapata. Esta podría ser la causa de que raza pura resultara ser un factor protector en nuestro estudio. Otros estudios han reportado que los caninos sin raza definida presentan mayor seroprevalencia con *B. canis vogeli* que aquellos perros de razas puras (Maia *et al.*, 2007, Araujo *et al.*, 2015).

Frecuentar por años parques recreativos resultó ser un factor protector, el 10% de los caninos que visitaron parques recreativos sólo una vez, fueron seropositivos, mientras que sólo el 3% de los que los visitaron por años, resultaron seropositivos. A la fecha no se ha reportado en la literatura este factor protector. Los caninos que visitaron el parque recreativo por primera vez no presentaron signos clínicos sugestivos de babesiosis significativamente diferentes a los caninos que visitaron por años el parque, a excepción de

anorexia, y tampoco presentaron mayor cantidad de garrapatas. Es posible, que los dueños de estos animales vieran a los investigadores en el parque realizando la investigación, y debido a la anorexia de sus perros, visitaran por primera vez el parque para incorporar a sus perros en la investigación. Se necesitan, sin embargo, más investigaciones para explicar y confirmar este hallazgo.

Se identificó que los caninos seropositivos tuvieron 5 veces más posibilidad de vivir fuera del Valle Central que los caninos seronegativos. Esto puede deberse a las condiciones en las que vivían los caninos fuera del Valle Central. Las regiones fuera del Valle Central se consideran más rurales y con condiciones económicas más desfavorables que dentro del Valle Central. Una encuesta llevada a cabo en una ciudad mexicana y en tres comunidades rurales mostró que el nivel de supervisión de los perros varía con la condición socioeconómica, e indicó que las personas de zonas urbanas proveen de mejor alimento, refugio y medicina preventiva a sus perros que las personas de zonas rurales (Ortega-Pacheco *et al.*, 2007)

Esto concuerda con nuestra investigación, ya que del total de factores asociados encontrados en este estudio, cuatro (convivencia con más de tres perros, presencia de garrapatas, presencia de garrapatas de la especie *R. sanguineus* s.l., y grado de infestación con garrapatas) fueron significativamente más frecuentes en los caninos viviendo fuera del Valle Central ( $p \leq 0,05$ ), los cuales pueden haber incidido en la más alta seroprevalencia de babesiosis determinada en esos perros. Así un 26% de los caninos fuera del Valle Central convivieron con más de tres perros en comparación con el 6% de los caninos dentro del Valle Central, un 52% de los caninos fuera del Valle Central presentaron garrapatas mientras que solamente un 17% de los caninos dentro del Valle Central las presentaron, un 50% de los caninos viviendo fuera del Valle Central presentaron garrapatas de la especie *R. sanguineus* s.l, mientras que solamente en un 15% de los caninos viviendo dentro del Valle Central se encontró esta especie de garrapata. El 41% de los caninos viviendo fuera del Valle Central presentaron de 1 a 10 garrapatas, el 8% de 10 a 25 y el 4% de 25 a 50 garrapatas, mientras que los caninos viviendo dentro del Valle Central solamente el 15%, el 1% y el 0,4% presentaron de 1 a 10, de 10 a 25 y de 25 a

50 garrapatas, respectivamente. Además, las condiciones climáticas que se presentan fuera del Valle Central pueden favorecer un alto nivel de infestación de los animales con garrapatas (Costa-Junior *et al.*, 2009). Se conoce que condiciones de humedad menor a 50% y temperaturas más bajas que 18°C impiden el desarrollo del ciclo biológico de la garrapata *R. sanguineus* s.l. (Maroli *et al.*, 1996). El fenómeno de diapausa que se define como la reducción del metabolismo en ciertos insectos, provocada por exposición a condiciones desfavorables (Obenchan y Galun, 1982), como la baja humedad y la baja temperatura o ausencia de hospederos, interfieren con el comportamiento de la garrapata incrementando el periodo de incubación de los huevos o inhibiendo la búsqueda de hospederos (Sonenshine, 1993). Por el contrario, la alta humedad y temperatura fuera del Valle Central podrían beneficiar el crecimiento y desarrollo de las garrapatas y así potenciar la inoculación del parásito de *Babesia* en los caninos.

La IFI o en general las técnicas serológicas son útiles porque permiten determinar animales que han estado en contacto con el parásito, permiten detectar la presencia indirecta del agente, cuando el número de parásitos de *Babesia* en sangre es muy bajo (frotis) y es una técnica más barata que el PCR. Sin embargo, presenta algunos inconvenientes como lo son la reacción cruzada entre diferentes agentes babesiales. Otro inconveniente que presenta la IFI, es la dificultad de identificar infecciones activas (Papadopoulos *et al.*, 1996; Galuppi *et al.*, 2012, Ristic y Sibinovic, 1964; Todorovic, 1975, Dantas-Torres y Aguiar 2006, Kubelová *et al.*, 2013).

#### **4.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa**

La prevalencia encontrada mediante la qPCR a nivel nacional de *B. canis vogeli* (31%, 125/400) fue mayor a la reportada en un estudio anterior mediante qPCR (8%, 12/144) realizado por Rojas *et al.* (2014). La diferencia en la prevalencia encontrada en este estudio con respecto al estudio de Rojas pudo deberse a que el tamaño de la muestra (144) y la representatividad de ésta por regiones fueran insuficientes. En el estudio de Rojas *et al.* (2014) solamente se analizaron 144 muestras de cuatro regiones: Chomes en Puntarenas, Liberia en

Guanacaste, San Ramón en Alajuela y Kékoldí en Limón, en comparación con las 400 muestras recolectadas a nivel nacional y analizadas en el presente trabajo.

Otro estudio con qPCR que reporta la presencia de *B. canis vogeli* en un único pueblo de Guanacaste (Nueva Esperanza) fue el realizado por Wei *et al.* (2015), que reportó una prevalencia de 20% (8/40), menor a la encontrada en nuestro estudio en la zona de Guanacaste (39%, 27/69), pero mayor a la encontrada por Rojas *et al.* (2014) en Liberia Guanacaste (8%, 3/36). La diferencia en los resultados también pudo deberse al tamaño de la muestra y a la representatividad de ésta.

Otra razón por la cual se podrían presentar diferencias entre nuestro estudio y los estudios de Rojas *et al.* (2014) y Wei *et al.* (2015), podría deberse a la técnica de qPCR utilizada. Rojas *et al.* (2014) amplificaron mediante qPCR un fragmento del gen de la proteína de choque térmico 70 (hsp70) de *B. canis vogeli*, utilizando sondas de hidrólisis; mientras que Wei *et al.* (2015) amplificaron un fragmento del ARNr18S de *Babesia* spp. utilizando sondas FRET, y mediante análisis de curvas de fusión determinaron la especie de *Babesia*. En nuestro estudio se amplificó un segmento del ARNr18S de *B. canis vogeli* y se utilizó el fluoróforo SYBR Green I. Se conoce que el SYBR Green I es un fluoróforo que interactúa con el surco menor del ADN de doble cadena, emitiendo 1000 veces más fluorescencia que cuando está libre en solución (Valasek y Repa, 2005). El inconveniente de los agentes intercalantes como el SYBR Green I, cuando se compara con sondas de hidrólisis o con sondas FRET, es su capacidad de unión a ADN inespecífico de doble cadena generando señales inespecíficas. Sin embargo, la escogencia adecuada de los iniciadores determinó en gran manera la especificidad de nuestra técnica. La especificidad de los iniciadores utilizados fue evaluada previamente por Vilhena *et al.* 2013 de la siguiente manera: 1) mediante pruebas *in silico* para evitar amplificación cruzada con otros agentes (utilizando información de las secuencias depositadas en las bases de datos del GenBank y RDP II), 2) comprobando la amplificación de un control positivo a *B. canis vogeli* y por ausencia de amplificación en muestras positivas a otros agentes y 3) por secuenciación del ADN de muestras positivas para *B. canis*

*vogeli*. Además, la técnica de qPCR implementada mostró una alta eficiencia (103%) y especificidad, lo que se determinó mediante la curva estándar y el análisis de curvas de disociación, respectivamente, por lo que se descartan reacciones inespecíficas (resultados falsos positivos).

La eficiencia de la qPCR se define, como la fracción de moléculas de interés que son copiadas en un ciclo de PCR. Generalmente una eficiencia entre un 90 y un 110% se considera muy buena (Applied Biosystem, 2017). Si se tiene una eficiencia de un 100% se obtiene una pendiente de -3,33, esto significa que en cada ciclo de PCR se duplica el número de moléculas de ADN de interés (Sveca *et al.*, 2015). También se comprobó que la qPCR implementada en el presente estudio resultó ser bastante específica, ya que el análisis de curvas de disociación solamente mostró un producto amplificado. Por estas razones se descarta que la qPCR implementada en el presente estudio haya arrojado resultados falsos positivos.

Otra de las razones por las cuales se determinó una alta prevalencia en nuestro estudio podría ser quizás, porque en el momento en que se realizó la toma de muestras se estaba empezando a diseminar la infección, por eso tantos perros positivos en qPCR y negativos aún en IFI. Sin embargo, se necesitará realizar otras investigaciones para comprobarlo.

Mediante qPCR también se observó una mayor prevalencia de *B. canis vogeli* fuera del Valle Central (43%, 78/180), en comparación con la encontrada dentro del Valle Central (21% 47/220) ( $p \leq 0,05$ ). En contraste con los resultados de seroprevalencia obtenidos en el presente estudio, se determinó un alto porcentaje de perros qPCR positivos (38-56%) en todas las provincias fuera del Valle Central y en Alajuela y Cartago. Como ya se mencionó anteriormente, las condiciones en las que viven los caninos y el clima fuera del Valle Central, favorecen el crecimiento y desarrollo de las garrapatas, y por consiguiente la introducción de *Babesia* en los caninos. Los caninos qPCR positivos viviendo en la provincia de Alajuela, representan tanto a un cantón del Valle Central, Alajuela, como a un cantón fuera del Valle Central, San Carlos, casualmente los caninos de San Carlos presentaron una alta prevalencia (77%), quizás esta es la razón por la cual la provincia de Alajuela fue la más prevalente de todas. A pesar de

que la provincia de Cartago se caracteriza por un clima más templado como el que presentan las provincias de San José y Heredia, en las que se encontraron bajas prevalencias (15-16%), en esta provincia se determinó una alta prevalencia (52%) del agente en los perros seronegativos, lo que puede indicar una infección reciente como también se estableció en las provincias de Alajuela y Limón, donde las prevalencias establecidas con el qPCR fueron mucho mayores a las seroprevalencias determinadas. Esto podría indicar una infección reciente de la población con el agente en el momento en que se tomaron las muestras (Kubelová *et al.*, 2013). Esto concuerda con los resultados del trabajo de Rojas *et al.* (2014) en el cual no encontraron *B. canis vogeli* dentro del Valle Central. Otra razón de altas prevalencias en caninos seronegativos podría ser debido a que el sistema inmune de los perros infectados con *B. canis vogeli* no detecte el agente y por lo tanto no seroconvierten, tal situación ha sido reportada en caninos infectados crónicamente por *B. gibsoni* que resultaron ser seronegativos (Birkenheuer *et al.*, 1999).

Se reporta por primera vez la presencia de *B. canis vogeli* en perros del Valle Central, ya que no se había reportado anteriormente (Rojas *et al.*, 2014).

Tener propietario y vivir con una a cuatro o más personas resultaron ser factores asociados. Los animales qPCR positivos tuvieron 4 veces más probabilidad de tener propietario que los qPCR negativos. Los perros qPCR positivos tuvieron 4 ó 3 veces más probabilidad de vivir con una o cuatro personas o más de cuatro personas que los qPCR negativos, respectivamente. Se esperaba que los caninos sin propietario presentaran mayor probabilidad de ser qPCR positivos (sólo 4 caninos de 37 caninos deambulantes) o seropositivos (3 caninos de 43 deambulantes), ya que su comportamiento deambulante los expone a mayor riesgo de contraer babesiosis al estar más expuestos al vector (Araujo *et al.*, 2015) o por no recibir tratamiento contra ectoparásitos. Sin embargo, esto no fue lo observado en este estudio. Un estudio realizado en el noreste de Italia encontró que no se encontraron diferencias significativas entre las prevalencias a *B. canis* entre caninos con y sin propietarios (Vascellari *et al.*, 2016). Quizas, la razón por la cual tener propietario o vivir con una a cuatro o más personas resultara ser un factor asociado fuera porque los propietarios o

muchas personas viviendo en el hogar, cuidan de sus mascotas y encuentran garrapatas mas eficientemente, respectivamente, por lo que controlan infecciones con *Babesia* a edades tempranas. Animales sin dueños o con menos dueños, posiblemente se enfrentan a edades más tempranas al agente, seroconvierten, y están protegidos por el resto de sus vidas de reinfecciones. Esta es una posible explicación de estos dos factores de riesgo, sin embargo hacen falta más investigaciones al respecto.

Los caninos qPCR positivos tuvieron 3 veces más probabilidad de presentar de 11 a 25 garrapatas que los qPCR negativos, lo cual ha sido ampliamente reportado en la literatura (Dantas-Torres y Aguiar, 2006).

Haber recibido tratamiento oral contra garrapatas también resultó ser un factor protector. El 34% de los caninos que no recibieron tratamiento oral resultaron ser qPCR positivos a *B. canis vogeli*, mientras que sólo el 4% de los que recibieron tratamiento oral resultaron positivos. Aunque en este estudio también se evaluó la asociación entre el tratamiento tópico y parental y la seroprevalencia o prevalencia a *B. canis vogeli* no se obtuvo asociación significativa entre estos tratamientos. En la literatura se reporta un estudio donde se evaluó la asociación entre el uso de acaricidas sobre los caninos y la seroprevalencia de *B. canis vogeli*, pero no se determinó asociación (Araujo *et al.*, 2015). En la actualidad se recomienda el uso de acaricidas tópicos con acción residual y resistencia al agua como una de las principales acciones para prevenir la babesiosis canina (Solano Gallego *et al.*, 2016).

Se identificó que los caninos qPCR positivos tenían 3 veces más probabilidad de vivir fuera del Valle Central que los caninos qPCR negativos, debido probablemente a que los perros fuera del Valle Central viven en zonas más rurales y con condiciones económicas más desfavorables que los caninos dentro del Valle Central, y en condiciones climáticas que favorecen un alto nivel de infestación de los animales con garrapatas (Maroli *et al.*, 1996; Ortega-Pacheco *et al.*, 2007).

Hasta la fecha no se había reportado la presencia de *B. canis vogeli* en garrapatas de caninos en Costa Rica. En otros países se han reportado porcentajes de infección de garrapatas con *B. canis vogeli* recolectadas sobre

perros de 2.6% (6/235, Maranhão, Brasil) y de 4.4% (7/160, Pernambuco, Brasil) (Barbosa-Silva *et al.*, 2012; Araujo *et al.*, 2015). En Tunisia, un estudio reportó un porcentaje de infección de 0.6% (1/160) (M'ghirbi y Bouattour, 2008) y en Japón de 0.5% (6/1136) (Inokuma *et al.*, 2003). En nuestro estudio el ADN de *B. canis vogeli* fue encontrado en el 30% (42/142) de las garrapatas, prevalencia mucho más alta que las determinadas en Brasil, Tunisia y Japón. Los estudios realizados en estos tres países utilizaron la técnica de PCR en punto final para identificar el agente infeccioso. En nuestro trabajo, la PCR punto final también determinó bajas prevalencias en perros y garrapatas a diferencia de la qPCR, esta pueda ser quizás una razón de haber detectado mayores prevalencias de infección en nuestro estudio con qPCR, ya que se conoce que la qPCR es por lo menos cuatro veces más sensible que la PCR en punto final (Chiang *et al.*, 1996; Mosqueda *et al.*, 2012). El bajo porcentaje de infección reportado por Inokuma *et al.* (2003) en garrapatas de Japón, menor al reportado en este estudio, era esperado, ya que se conoce que la garrapata *R. sanguineus* s.l. el vector natural de *B. canis vogeli* se encuentra distribuido principalmente en climas cálidos y de alta humedad (Inokuma *et al.*, 1996), como los que se presentan en Costa Rica.

Este alto porcentaje de infección con *B. canis vogeli* encontrado en las garrapatas también podría confirmar la alta prevalencia en caninos en qPCR y no en la IFI, es decir una gran cantidad de caninos con posible infección reciente.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de garrapatas infectadas con *B. canis vogeli* dentro del Valle Central (34%) y fuera del Valle Central (27%). Se encontraron dos especies de garrapatas infectadas con *B. canis vogeli*, *R. sanguineus* s.l. (n=41) y *A. ovale* (n=1). Nuestros resultados coinciden con lo que se reporta en la literatura, que el vector natural de *B. canis vogeli* es la garrapata *R. sanguineus* s.l. (Dantas-Torres, 2008). En este estudio se encontró, además una garrapata de la especie *A. ovale* infectada con *B. canis vogeli*, sin embargo, se deben realizar más estudios para comprobar si es o no un vector competente. A la fecha no se encontraron reportes de garrapatas de la especie *A. ovale* infectadas con *B. canis vogeli*.

Se identificaron 17 caninos seronegativos y qPCR negativos con garrapatas positivas. Estas garrapatas probablemente fueron recolectadas de los perros antes de que fueran infectados con *B. canis vogeli* ya que la inoculación requiere en promedio tres días de alimentación para la transmisión del agente (Araujo *et al.*, 2015).

El presente estudio demostró que la qPCR es un técnica útil para la detección de *B. canis vogeli* en sangre y garrapatas de caninos. Algunos autores reportan una eficiencia y especificidad de un 100% (Dantas- Torres y Aguiar, 2006; Martin *et al.*, 2006). En casos de baja parasitemia es de gran utilidad utilizar la PCR, aunque pueden presentarse falsos negativos en casos de babesiosis crónica, por la eliminación del parásito en la sangre circulante del hospedador y su persistencia en medula ósea (Abutarbush *et al.*, 2012; Kubelova, *et al.*, 2013).

Aunque una parte de las muestras positivas en la PCR en punto final se confirmaron mediante qPCR (10/14 muestras caninas y 7/14 grupos de garrapatas) alrededor de un 40% de las muestras resultaron negativas en qPCR, con valores de Ct entre 33 y 36. Esto puede haberse debido a una menor cantidad de ADN en el momento en que se procesaron las muestras mediante qPCR que a la hora de procesarlas por PCR en punto final, producto de la repetida manipulación por lo que no se encontraron dentro del rango de Ct considerado como positivo. Se conoce que los procesos de congelación y descongelación promueven la degradación del ADN (Gómez y Uribe, 2007). Otra razón podría ser, que las muestras de caninos y garrapatas que no amplificaron en el qPCR pertenecieran a otra especie de *Babesia*, como por ejemplo *B. gibsoni* reportada por Wei *et al.* en el 2015 en Guanacaste. Dos de las cinco muestras que se determinaron como *Hepatozoon canis* resultaron también positivas en qPCR (1 sangre y 1 garrapata), determinándose así la presencia de los dos agentes en estas muestras, lo cual ya ha sido reportado en la literatura (Pereira da Costa *et al.*, 2015). Caninos infectados con *Babesia* también se han reportado infectados con otros patógenos tales como *Leishmania* spp., *Ehrlichia/Anaplasma* spp., *Hepatozoon* spp. o *Rickettsia conorii*. La coinfección con otros patógenos tiene gran importancia clínica ya que el diagnóstico se

complica, el pronóstico empeora, los signos clínicos se exacerban y la efectividad del tratamiento se reduce (Miro *et al.*, 2013; Solano-Gallego *et al.*, 2015).

La PCR de punto final presentó desventajas en comparación con la qPCR, consumió mucho más tiempo al utilizar geles de agarosa, además, los resultados se basaron en la discriminación de segmentos amplificados por tamaños, lo cual no fue preciso. En contraste, el hecho de que la señal fluorescente en la qPCR fue detectada por un termociclador hizo esta técnica más sensible y objetiva (Chiang *et al.*, 1996; Mosqueda *et al.*, 2012).

Con respecto a los primers PIRO-A1 y PIRO-B utilizados en la PCR en punto final, éstos no resultaron ser específicos para la detección del género *Babesia*, lo que no concuerda con estudios anteriores (Földvári *et al.*, 2005; Olmeda *et al.*, 1997 y Muhlnickel *et al.*, 2002; Jefferies *et al.*, 2003). Luego de secuenciar las muestras en las que se observaron bandas en el gel de agarosa cercanas a los 450 pb se obtuvieron secuencias de *Hepatozoon canis*, este hallazgo ya había sido reportado (O'Dwyre *et al.*, 2009).

#### **4.3 Situación epidemiológica de la babesiosis canina en Costa Rica**

Al comparar los resultados de la IFA con la qPCR se estableció una prevalencia mucho mayor (31%) que la seroprevalencia (5%). Estos hallazgos podrían indicar que un gran número de caninos (111) se detectaron en una fase de infección temprana, en la que aún no presentaban anticuerpos (qPCR positivos y serológicamente negativos), indicando una reciente diseminación del agente en la población en el momento de la recolecta de las muestras de sangre. Esto concuerda con los hallazgos de garrapatas qPCR positivas sobre caninos seronegativos y qPCR negativos. En la literatura se reporta que las garrapatas necesitan alimentarse al menos tres días en sus hospedadores caninos, para transmitir la *Babesia*, mientras que los anticuerpos contra *B. canis vogeli* se desarrollan en los caninos dos a tres semanas después de la infección (Vercammen *et al.*, 1997). Los 111 caninos no presentaron signos clínicos significativos de babesiosis, ni presentaron valores hematológicos diferentes a los caninos negativos, lo que concuerda con una infección temprana (Krause *et al.*, 1996).

Un total de siete caninos resultaron tanto seropositivos como qPCR positivos, lo que indica una infección activa de los caninos en el momento de la toma de muestra. Se cree, que los animales probablemente se hayan infectado un tiempo atrás (al menos hace 21 días, que es lo que duran en aparecer los anticuerpos antibabesiales en el perro), mientras que en doce perros se establecieron infecciones pasadas (seropositivos y qPCR negativos). En la literatura se indica, que los anticuerpos pueden ser diagnosticados hasta 420 días post-infección en el perro (Fukumoto *et al.*, 2004).

La combinación de técnicas serológicas con técnicas moleculares permitió determinar perros con infección reciente (111), activa (7) o pasada (12), permitiendo entender la situación epidemiológica de la babesiosis canina en Costa Rica. Se concluye, que la babesiosis canina pareciera ser una infección con reciente diseminación en la población canina, tanto dentro como fuera del Valle Central, encontrándose más prevalente en perros y sus garrapatas fuera del Valle Central.

## 5. Conclusiones

- La seroprevalencia de *Babesia* spp. a nivel nacional fue de 5%, en caninos dentro del Valle Central de 2% y fuera del Valle Central de 10%.
- Las variables hematológicas mostraron diferencias estadísticamente significativas entre de los perros seropositivos y seronegativos. Los caninos seropositivos presentaron con mayor frecuencia trombocitopenia (62%), monocitopenia (58%), y anemia, con valores bajos en la CHCM (50%), en el hematocrito (42%) y en la hemoglobina (38%).
- Los factores asociados a seropositividad fueron: vivir fuera del Valle Central, ser perro de talla mediana, habitar con más de tres perros, grado de infestación con garrapatas, presencia de garrapatas, presencia de la especie de garrapata *R. sanguineus* s.l., haber presentado en el pasado anorexia, fiebre, debilidad, pérdida de pelo, problemas respiratorios y picazón y haber presentado en el examen objetivo general fiebre. Mientras que, raza pura y frecuentar por años el parque recreativo, fueron factores protectivos asociados a seropositividad.
- La prevalencia de *B. canis vogeli* en sangre de caninos a nivel nacional de 31%, dentro del Valle Central de 21% y fuera del Valle Central de 43%.
- No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores hematológicos de los caninos qPCR positivos y negativos.
- Los factores asociados a positividad (qPCR) fueron: vivir fuera del Valle Central, vivir con una a más de cuatro personas, tener propietario, y el grado de infestación con garrapatas. Mientras que, el tratamiento oral contra garrapatas resultó ser un factor protector asociado a positividad.
- En un 30% de las garrapatas de perros analizadas se presentó *B. canis vogeli*, 41 *R. sanguineus* s.l. y 1 *A. ovale*.

- *B. canis vogeli* fue la única especie de *Babesia* presente en sangre y en garrapatas de perros.
- De los 130 caninos positivos, ya sea en IFI o qPCR, el 85% (111/130) presentaron infección reciente, el 5% (7/130) infección activa y el 9% (12/130) infección pasada, tanto dentro (n=42, 1 y 3, respectivamente) como fuera del Valle Central (n= 69, 6 y 9, respectivamente).

## 6. Recomendaciones

- Utilizar la técnica qPCR desarrollada en el presente trabajo para determinar prevalencias en caninos y garrapatas a *B. canis vogeli* y no la PCR en punto final evaluada.
- Informar a la comunidad médica veterinaria nacional sobre las alteraciones hematológicas asociados a seropositividad a *B. canis vogeli* para que se incorporen al diagnóstico de babesiosis y realizar futuros estudios para determinar la ocurrencia y causa de la monocitopenia en la babesiosis canina
- Informar a la comunidad médica veterinaria nacional sobre los factores de riesgo asociados a seropositividad a *B. canis vogeli* para que se incorporen al diagnóstico de babesiosis y realizar futuros estudios para conocer la razón por la cual perros de talla mediana, habitar con más de tres perros, picazón y pérdida de pelo son factores de riesgo y frecuentar por años el parque un factor protectorio.
- Informar a la comunidad médica veterinaria nacional sobre los factores de riesgo asociados a positividad a *B. canis vogeli* para que se incorporen al diagnóstico de babesiosis y realizar futuros estudios para conocer la razón por la cual vivir con una a más de cuatro personas o tener propietario resultaron ser factores de riesgo.
- Realizar futuros estudios para buscar otros hemoparásitos asociados a *B. canis vogeli* y transmitidos también por garrapatas para evaluar como las infecciones múltiples pueden alterar los valores hematológicos y asociarse a factores de riesgo.

- Realizar futuros estudios que permitan identificar otras especies de Babesia en caninos y garrapatas de Costa Rica. *B. gibsoni* ha sido reportada únicamente en un pueblo de Guanacaste, sería importante conocer su distribución y prevalencia a nivel nacional.
- Determinar la seroprevalencia actual, para confirmar la posible reciente diseminación del agente en perros de Costa Rica.
- Utilizar técnicas serológicas y técnicas moleculares ya que facilitan determinar infecciones recientes, activas y pasadas en la población.

## 7. Bibliografía

- Abutarbush SM., Alqawasmeh DM, Mukbel RM., Al-Majali AM. Equine babesiosis: seroprevalence, risk factors and comparison of different diagnostic methods in Jordan. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2012; 59: 72–78.
- Afosa. Animal Welfare & Food Safety GmbH. BABESIA-ELISA DOG. Recuperado de: [www.afosa.de/en/bebesia-ELISA-dog](http://www.afosa.de/en/bebesia-ELISA-dog). 2017. [Consulta: 13 de marzo, 2017].
- Álvarez V., Pérez E. y Herrero MV. Epizootiologic instability of bovine populations against *Babesia bovis* (Piroplasmida: Babesiidae) in the region of Poas, Costa Rica. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1996; 791: 110-106.
- Álvarez V. Taxonomía de garrapatas. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Dirección de Salud Animal. C. R. 2003.
- Álvarez V, Bonilla R y Cascante J. Casuística de *Rhipicephalus sanguineus* y *Amblyomma* spp. (Acari: Ixodidae) en perros atendidos en clínicas veterinarias ubicadas en los cantones de Escazú, Santa Ana y Mora. *Ciencias Veterinarias*. 2006; 24: 9-18.
- Allsopp M y Allsopp BA. Molecular sequence evidence for the reclassification of Some *Babesia* species. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006; 1081: 509–517.
- Allsopp, M. T. E. P. The phylogeny of *Babesia*, *Theileria* and related parasites and the development of species-specific probes for diagnostic purposes. Ph.D. Thesis, University of the Witwatersrand, Johannesburg, South Africa. 1994 101 pp.
- Applied Biosystem. Real-Time PCR: Understanding Ct Application Note. Recuperado de <https://goo.gl/FWEQlu>. 2017. [Consulta: 6 de abril, 2017].
- Applied Biosystem. Real-Time PCR: Real-time PCR handbook. Recuperado de <https://goo.gl/rJPudr> [Consulta: 9 de junio, 2017].
- Araujo AC, Silveira JAG, Azevedo SA, Nieri-Bastos FA, Ribeiro FB, Labruna MB y Horta MC. *Babesia canis vogeli* infection in dogs and ticks in the semiarid region of Pernambuco, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2015 ; 35: 456-461.
- Babes, V. Sur l'hémoglobinurie bacterienne du boeuf. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III*. 1888, 107: 692–694.
- Baneth G., Florin-Christensen y Schnittger L. Reclassification of *Theileria annae* as *Babesia vulpes* sp. nov. *Parasites & Vectors*. 2015; 8:1-7.
- Barbosa Silva A., Periera Costa A., Cortez De Sá J., Borges Costa F., Gomes dos Santos AC., y Seabra Nogueira De Candanedo Guerra RDM. DETECÇÃO MOLECULAR DE *Babesia canis vogeli* EM CÃES E EM *Rhipicephalus*

sanguineus NA MESORREGIÃO DO OESTE MARANHENSE, NORDESTE BRASILEIRO. Ci. Anim. Bras., Goiânia, 2012; 13: 388-395.

- Barcellos Krause LE., Lencioni Sampaio LC, Garcez Ribeiro CL., Mano Meinerz AR., Aquino Franco F, da Rosa Farias NA, Lopes Ruas J. Parasitologic, Serological and Molecular Diagnostic of *Ehrlichia canis* and *Babesia canis* in a Veterinary Hospital in Southern Brazil. Scholars Journal of Agriculture and Veterinary Sciences. 2015; 2: 337: 341.
- Barrantes-González AV., Jiménez-Rocha AE., Romero-Zúñiga JJ. Serology, molecular detection and risk factors of *Ehrlichia canis* infection in dogs in Costa Rica. Ticks and Tick-borne Diseases. 2016; 7: 1245-1251.
- Bermúdez S., Miranda R., Zaldivar Y., González P., Berguido G., Trejos D., Pascale JM. y Labruna M. Detección de *Rickettsia* spp. en ectoparásitos de animales domésticos y silvestres de la Reserva Natural Privada Cerro Chucanti y comunidades aledañas, Panamá. Biomédica. 2007-2010. 2012; 23: 189-195.
- Birkenheuer AJ, Levy MG, Savary KC, Gager RB. y Breitschwerdt EB. *Babesia gibsoni* infections in dogs from North Carolina. Journal of the American Animal Hospital Association. 1999; 35:125-128.
- Birkenheuer, A.J., Levy, M.G. y Breitschwerdt, E.B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. Journal of Clinical Microbiology. 2003; 41: 4172-4177.
- Bohórquez D. y Duque N. 2009. Valores hematológicos en yeguas Paso Fino Colombiano y sus variaciones con el ejercicio, en los municipios de Tabio y Cajicá, Cundinamarca. Tesis Medicina Veterinaria. Bogotá, Colombia. Universidad de La Salle. 30 p
- Boozer AL y Macintire DK. Canine babesiosis. Veterinary Clinical Small Animal. 2003; 33:885-904.
- Bose R. y Peymann B. Diagnosis of *Babesia caballi* infections in horses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and western blot. International Journal for Parasitology. 1994; 24: 347-346.
- Brandão LP. Hagiwara MK. y Myiashiro SI. Humoral immunity and reinfection resistance in dogs experimentally inoculated with *Babesia canis* and either treated or untreated with imidocarb dipropionate. Veterinary Parasitology. 2003; 114: 253-265.
- Cavalcanti P., Regis-da-Silva CG. y Gomes YM. Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection: a

- mini-review. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 2010; 16: 537-532.
- Camacho-Garcia AT. Piroplasma infection in dogs in northern Spain. *Veterinary Parasitology*. 2006; 138: 97–102.
- Cannon RM. y Roe RT. *Livestock disease surveys: A field manual for veterinarians*. Bureau of Rural Science, Department of Primary Industry; Australian Government Publishing Service, Canberra, Australia. 1982. 33 pp.
- Carret C., Walas F., Carcy B., Grande N., Precigout E., Moubri K., Schetters TP y Gorenflot A. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 1999; 46:298-303.
- Chauvin A., Moreau E., Bonnet S., Plantard O. y Malandrin L. *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Veterinary Research*. 2009; 40: 2-18.
- Chiang, PW., Song WJ., Wu KY., Korenberg JR., Fogel EJ., Van Keuren ML., Lashkari D., Kurnit DM. Use of a fluorescent-PCR reaction to detect genomic sequence copy number and transcriptional abundance. *Genome research*.1996; 6: 1013-1026.
- Cowell RL, Tyler RD, Meinkoth JH y De-Nicola DB. *Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat*. 2008. 3rd. ed. Elsevier, Missouri.
- Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real Enfermedades Infecciosas. *Microbiología Clínica*. 2004; 22:299-305
- Costa AP., Silva AB., Costa FB., Xavier GS., Martins TF., Labruna MB. y Guerra RMSNC A Survey of Ectoparasites Infesting Urban and Rural Dogs of Maranhão State, Brazil. *Journal Medical Entomology*. 20013; 50: 674-678.
- Costa-Júnior LM., Ribeiro MFB., Rembeck K., Rabelo EML., Zahler-Rinder M., Hirzmann J, Pfister K. y Passos LMF. Canine babesiosis caused by *Babesia canis vogeli* in rural areas of the State of Minas Gerais, Brazil and factors associated with its seroprevalence. *Research in Veterinary Science*. 2009; 86: 257–260,
- Criado-Fornelio A., Rey-Valeiron C., Buling A., Barba-Carretero JC., Jefferies R. y Irwin P. New advances in molecular epizootiology of canine hematic protozoa from Venezuela, Thailand and Spain *Veterinary Parasitology*. 2007; 144: 261–269.
- Dantas-Torres F. y Aguiar FL. Canine babesiosis: A Brazilian perspective. *Veterinary Parasitology*. 2006; 141: 197–203.
- Dell' Porto A., Oliveira MR. y Miguel O. *Babesia canis* in stray dogs from the city of São Paulo Comparative studies between the clinical and hematological aspects and

- the indirect fluorescence antibody test. *Revista. Brasileira. Parasitologia. Veterinária*. 1993; 2: 37–40.
- Day MJ. Antigen specificity in canine autoimmune hemolytic anemia. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1999; 69: 215–224.
- Duarte SC., Linhares GFC., Romanowsky TN., Neto OJS., Borges LMF. Assessment of primers designed for the subspecies-specific discrimination among *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli* and *Babesia canis rossi* by PCR assay. *Veterinary Parasitology*. 2008; 152:16–20.
- Eiras DF., Basabe J., Mesplet M. y Schnittger L. First molecular characterization of *Babesia vogeli* in two naturally infected dogs of Buenos Aires, Argentina. *Veterinary Parasitology*. 2008; 157: 294–298.
- Fahrimal Y., Goff WL. y Jasmer DP. Detection of *Babesia bovis* carrier cattle by using polymerase chain reaction amplification of parasite DNA. *Journal of Clinical Microbiology*. 1992; 30: 1374-1379.
- Friche-Passos LM., Geiger SM., Barbosa-Ribeiro MF., Pfister K, Zahler-Rinder M. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil *Veterinary Parasitology*. 2005; 127: 81-85.
- Feldman BF, Thomason KJ y Jain NC. Quantitative platelet disorders. *Veterinary Clinics of North America*. 1988; 18: 35–49.
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 1985; 39: 783-791.
- Figueroa JV., Chieves LP., Johnson GS. y Buening GM. Detection of *Babesia bigemina*-infected carriers by polymerase chain reaction amplification. *Journal of Clinical Microbiology*. 1992; 30: 2576-2582.
- Földvári G., Hell E. y Farkas R. *Babesia canis canis* in dogs from Hungary: detection by PCR and sequencing. *Veterinary Parasitology*. 2005; 127:221–226.
- Fornaguera I. Mayoría de casas se concentra en 15% del territorio nacional. 2013 Oct 9 *La Nación*; Secc 4A.
- Fukumoto, S., Sekine, Y., Xuan, X., Igarashi, I., Sugimoto, C., Nagasawa, H., Fujisaki, K., Mikami, T. y Suzuki, H. Serodiagnosis of canine *Babesia gibsoni* infection by enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant P50 expressed in *Escherichia coli*. *J. Parasitol.* 2004; 90: 387–391.
- Fukumoto S., Xuan X., Nishikawa Y., Inoue N., Igarashi I., Nagasawa H., Fujisaki K. y Mikami T. Identification and expression of a 50-kilodalton surface antigen of

- Babesia gibsoni* and evaluation of its diagnostic potential in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001; 39: 2603-2609.
- FUPROVI (Fundación Promotora de Vivienda). 2012. Situación de vivienda y desarrollo urbano en Costa Rica 2011. Costa Rica.
- Furlanello T, Fiorio F, Caldin M, Lubas G, Solano-Gallego L. Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form *Babesia* from dogs of northeastern Italy. *Veterinary Parasitology*. 2005; 134: 77–85
- Furuta PI, Opliveira TM., Theixeira MC., Rocha AG., Machado RZ. y Tinucci-Costa MG. Comparison between a soluble antigen-based ELISA and IFAT in detecting antibodies against *Babesia canis* in dogs. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2009; 18:41-45.
- Galuppi, R., Bonoli, C., Aureli, S., Cassini, R., Marcer, F., Foley, JE. Tampieri, MP. Comparison of diagnostic methods to detect piroplasms in asymptomatic cattle. *Veterinary Parasitology*. 2012; 183: 364–368.
- Gray J., Dantas-Torres F., Estrada-Peña A. y Levin M. Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2013; 4: 171–180.
- Gómez M. y Uribe S. Preservación y almacenamiento de ADN de mariposas utilizando papel filtro. *Revista Colombiana de Entomología*. 2007; 33: 191-196.
- Goodger BV. Preparation and preliminary assessment of purified antigens in the passive haemagglutination test for bovine babesiosis. *Australian Veterinary Journal*. 1971; 47: 251-256.
- Hall TA. BioEdit: to user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 1999; 41: 95-98.
- Häselbarth K., Tenter AM., Brade V., Krieger G. y Hunfeld KP. First case of human babesiosis in Germany – Clinical presentation and molecular characterization of the pathogen. *International Journal of Medical Microbiology* 2007; 297: 197–204.
- Hermans P. Dwinger RH. Buening GM. y Herrero MV. Seasonal incidence and hemoparasite infection rates of Ixodid ticks (Acari: Ixodidae) detached from cattle in Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*. 1994; 42:623-32.
- Herwaldt BL., Linden JV., Bosserman E., Young C., Olkowska D. y Wilson M. Transfusion-associated babesiosis in the United States: a description of cases. *Annals of Internal Medicine*. 2011; 155:509-19.
- Higuchi R., Dollinger G., Walsh PS. y Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)*. 1992; 10:413-417.

- Hillis DM y Dixon MT. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology*. 1991; 66:411-53.
- Hunfeld KP, Hildebrandt A, y Gray JS. Babesiosis: Recent insights into an ancient disease. *International Journal for Parasitology*. 2008; 38:1219–1237.
- Ikadai H., Osorio CR., Xuan X., Igarashi I., Kanemaru T., Nagasawa H., Fujisaki K., Suzuki N. y Mikami T. Detection of *Babesia caballi* infection by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant 48-kDa merozoite rhoptry protein. *International Journal for Parasitology*. 2000; 30: 633-635.
- [INEC] Instituto Nacional de Estadística y Censos. X Censo Nacional de Población y IV de Vivienda Costa Rica: Resultados Generales. San José, Costa Rica: GEDI/ICE. 2012.
- Inokuma H., Tamura K., Onishi T. Seasonal occurrence of *Rhipicephalus sanguineus* in Okayama Prefecture, Japan and effect of temperature on development of the tick. *J Veterinary Medicine and Science*. 1996; 58:225-228.
- Inokuma H., Yoshizaki Y., Shimada Y., Sakata Y., Okuda M. y Onishi T. Epidemiological Survey of *Babesia* Species in Japan Performed with Specimens from Ticks Collected from Dogs and Detection of New *Babesia* DNA Closely Related to *Babesia odocoilei* and *Babesia divergens* DNA. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003; 41:3494–3498.
- Ionita M., Mitrea IL., Pfister K., Hamel D., Buzatu CM. y Silaghi C. Canine babesiosis in Romania due to *Babesia canis* and *Babesia vogeli*: a molecular approach. *Parasitology Research*. 2012; 110:1659– 1664.
- Irwin PJ. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasites & Vectors* 2009; 2: 1-9.
- Irwin PJ. Canine Babesiosis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 2010; 40: 1141– 1156.
- Jacoby GA., Hunt JV., Kosinski KS., Demirjian ZN., Huggins C., Etkind P, Marcus LC. y Spielman A. Treatment of transfusion-transmitted babesiosis by exchange transfusion. *New England Journal of Medicine*. 1980; 303:1098-100.
- Jacobson RH., Gale KR., Waltisbuhl DJ. Y Wright IG. An improved ELISA for the detection of antibodies against *Babesia bovis* using either a native or a recombinant *B. bovis* antigen. *Parasitology Research*. 1990, 76: 648-652.
- Jacobson LS. The South African form of severe and complicated canine babesiosis: clinical advances 1994–2004. *Veterinary Parasitology*. 2006; 13:126–139.

- Jefferies R, Ryan UM, Muhinickel CJ y IrwinPJ. Two Species of Canine Babesia in Australia: Detection and Characterization by PCR. 2000. The Journal of Parasitology. 2003; 89: 409-412.
- Jefferies R. Emerging Canine Tick-borne Diseases in Australia and Phylogenetic Studies of the Canine Piroplasmida. Tesis para optar al grado de Doctor de Filosofía de la Universidad de Murdoch. 2006.
- Jukes TH. y Cantor CR. Evolution of protein molecules. In Mammalian Protein Metabolism, Ed., Munro, H.N., Academic Press, New York. 1969; pp. 21-132.
- Keller N., Jacobson LS., Nel M., de Clerq M., Thompson PN. y Schoeman, JP. Prevalence and risk factors of hypoglycemia in virulent canine babesiosis. Journal of Veterinary Internal Medicine. 2004; 18: 265–270.
- Kjemtrup AM. y Conrad PA. A review of the small canine piroplasms from California: *Babesia conradae* in the literature. Veterinary Parasitology. 2006; 138: 112–117.
- Kjemtrup AM., Wainwright K., Miller M., Penzhorn BL. Y Carreno, RA. *Babesia conradae*, sp. nov., a small canine *Babesia* identified in California. Veterinary Parasitology. 2006; 138: 103–111.
- Knols BGJ. y Takken W. Alarm bells ringing: more of the same, and new and novel diseases and pests. In Emerging Pests and Vector Borne Diseases in Europe. Wagen ingen Academic Publishers. 2007:13 –19.
- Krause PJ., Telford S., Spielman A., Ryan R., Magera J., Rajan TV., Christianson D., Alberghini TV., Bow L., y Persing D. Comparison of PCR with Blood Smear and Inoculation of Small Animals for Diagnosis of *Babesia microti* Parasitemia. Journal of Clinical Microbiology. 1996: 27912794.
- Kubelová M., Sedlák K., Panev. A y Sirok. P. Conflicting results of serological; PCR and microscopic methods clarify the various risk levels of canine babesiosis in Slovakia: A complex approach to *Babesia canis* diagnostics. Veterinary Parasitology. 2013; 191: 353–357.
- Kubista M., Andrade JM., Bengtsson M., Forootan M., Jona'k J., Lind K., Sindelka R., Sjobackv R., Sjogreen B., Strombom L., Stahlberg A. y Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. Molecular Aspects of Medicine. 2006; 27:95–125
- Leisewitz AL., Jacobson LS., de Morais HS y Reyers F. The mixed acid–base disturbances of severe canine babesiosis Journal of Veterinary Internal Medicine. 2001; 15: 445–452.
- Lempereur L., De Cat A., Caron Y., Madder M., Claerebout E., Saegerman C. y Losson B. First molecular evidence of potentially zoonotic *Babesia microti* and *Babesia* sp. EU1 in Ixodes ricinus ticks in Belgium. Vector Borne Zoonotic Disease. 2011; 11:125–130.

- List M. Situación de las poblaciones caninas en Costa Rica: Presentación del programa nacional de fauna urbana. Servicio Nacional de Salud Animal. Presentación audiovisual. Diciembre del 2009.
- Maia MG, Costa RT, Haddad JPA, Passos LMF., Ribeiro MFB. Epidemiological aspects of canine babesiosis in the semiarid area of the state of Minas Gerais, Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*. 2007; 79: 155–162.
- Maroli M., Khoury C., Frusteri L. y Manilla G. Diffusione della zecca del cane (*Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806) in Italia: un problema di salute pubblica. *Annali Dell' Istituto Superiore di Sanità*. 1996; 32: 387–397.
- Miro G, Montoya A, Roura X, Galvez R y Sainz A. Seropositivity rates for agents of canine vector-borne diseases in Spain: a multicentre study. *Parasites & Vectors*. 2013; 6: 2-9.
- M'ghirbi Y y Bouattour A. Detection and molecular characterization of *Babesia canis vogeli* from naturally infected dogs and *Rhipicephalus sanguineus* ticks in Tunisia. *Veterinary Parasitology*. 2008; 152: 1–7.
- Mosqueda J., Olvera-Ramírez A., Aguilar-Tipacamú G. y Cantó GJ. Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis. *Current Medicinal Chemistry*. 2012; 1: 1504-1518.
- Montenegro VM., Bonilla MC., Kaminsky D., Romero-Zúñiga JJ., Siebert S., Krämer F. Serological detection of antibodies to *Anaplasma* spp., *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia canis* and of *Dirofilaria immitis* antigen in dogs from Costa Rica. *Veterinary Parasitology*. 2017; 236: 97-107.
- Montes-Farah J., De la Vega-del Risco F., Bello-Espinosa A. y Fortich-Salvador AS. Coinfección de Babesiosis y Ehrlichiosis: Un caso en Cartagena de Indias, Colombia. *Revista de Ciencias Biomedicas*. 2012; 3: 339-345.
- Morzaria S., Katende J., Kairo A., Nene V. y Musoke A. New methods for the diagnosis of *Babesia bigemina* infection. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1992; 87: 201-205
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G. y Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium in Quantitative Biology*. 1986 51: 263-73.
- Muhlnickel CJ., Jefferies R., Morgan-Ryan UM. y Irwin PJ. *Babesia gibsoni* infection in three dogs in Victoria. *Clinical*. 2002; 80: 606-610.
- Obenchan FD., Galun R. (Eds.), 1982. *Physiology of Ticks*. Pergamon Press. 470p.

- O'Donoghue PJ., Friedhoff KT., Vizcaino OG. y Weyreter H. The detection of IgM and IgG antibodies against *Babesia bigemina* in bovine sera using semi-defined antigens in enzyme immunoassays. *Veterinary Parasitology*. 1985; 18: 1-12.
- O'Dwyer LH, Von Ah Lopes V., Rubini AS., Dos Santos Paduan K; Martins Ribolla PE. *Babesia* spp. infection in dogs from rural areas of São Paulo State, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*. Jaboticabal. 2009; 18: 23-26.
- Ormerod EJ., Edney ATB., Foster SJ. y Whyham MC. Therapeutic applications of the human-comp anion animal bond. *Veterinary Record*. 2005; 157: 689-691.
- Ortega-Pacheco A., Rodriguez-Buenfil JC, Bolio-Gonzalez ME., Sauri-Arceo CH, Jiménez-Coello M y Forsberg CL. A Survey of Dog Populations in Urban and Rural Areas of Yucatan, Mexico. *Anthrozoös*. 2007. 20: 261-274.
- Otranto D., Dantas-Torres F. y Breitschwerdt EB. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. *Trends in Parasitology*. 2009; 25: 157-163.
- Otranto D., Testini G., Dantas-Torres F., Latrofa MS., Vissotto de Paiva Diniz PP., de Caprariis De, Lia RP., Mencke N., Stanneck D., Capelli G. y Breitschwerdt EB. Diagnosis of Canine Vector-Borne Diseases in Young Dogs: a Longitudinal Study. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010; 48: 3316-3324
- Olmeda AS., Armstrong PM., Rosenthal BM., Valladares B., del Castillo A., de Armas F., Miguelez M., Gonzalez A., Rodriguez JA., Spielman A. y Telford SR. A subtropical case of human babesiosis. *Acta Tropica*. 1997; 67:229-234.
- Oyamada M., Davoust B., Boni M., Dereure J., Bucheton B., Hammad A., Itamoto K., Okuda M. y Inokuma H. Detection of *Babesia canis rossi*, *B. canis vogeli*, and *Hepatozoon canis* in dogs in a village of eastern sudan by using a screening PCR and sequencing methodologies. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2005, 12: 1343-1346.
- Papadopoulos, B., Perie, NM., Uilenberg, G. Piroplasms of domestic in the Macedonia region of Greece. 1. Serological crossreactions. *Veterinary Parasitology*. 1996; 63: 41-56.
- Passosa LM., Geingerb SM., Barbosa Ribeiro MF. Pfisterb K. y Zahler Rinder M. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. *Veterinary Parasitology* 2005; 127: 81-85.
- Peleg O., Baneth G., Eyal O., Inbar J. y Harrus S. Use of chimeric DNA-RNA primers in quantitative PCR for detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia canis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009; 75: 6393-6398.
- Pereira da Costa A, Borges Costa F, Bahia Labruna M, Silveira I, Moraes-Filho J, Fábio Soares J, Granziera Spolidorio M y Nogueira de Candanedo Guerra RMS. A serological and molecular survey of *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* and

- Rickettsia* spp. among dogs in the state of Maranhão, northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2015; 24: 28-35.
- Pérez E., Herrero MV., Jiménez C., Carpenter TE. y Buening GB. Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Costa Rica. *Preventive Veterinary Medicine*. 1994; 20: 23-31.
- Pérez E., Jaén M. y Herrero MV. Effect of management and inherent factors on birth seropositivity and seroconversion to *Babesia bovis* in calves in Costa Rica. 1996; 791: 100-9.
- Persing DH., Mathiesen D., Marshall WF., Telford SR., Spielman A., Thomford JW. y Conrad PA. Detection of *Babesia microti* by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 1992; 30: 2097-2103.
- Piana GP y Galli-Valerio B. Su di un infezione del cane con parassiti endoglobulari. *Il Moderno Zooiatro*. 1895; 6: 163-169.
- Pineda RA. Influencia de la anemia infecciosa equina (AIE) y babesiosis en caballos de resistencia en Costa Rica. Universidad Nacional. Escuela de Medicina Veterinaria. 1998.
- Posada MF. *Babesia caballi* y *Theileria equi* en equinos de comunidades indígenas de Costa Rica. Tesis para optar al grado de Magister Scientiae en Enfermedades Tropicales. 2012.
- Purnell RE., Hendry DJ., Bidwell DE. y Turp P. Microplate enzyme linked immunosorbent assay for antibody to *Babesia divergens* in cattle. *The Veterinary Record*. 1976; 99: 102.
- Quirós-Romero H. *Parasitología y Enfermedades Parasitarias de Animales Domésticos*. 2005. Editorial LIMUSA. México. 827 pp.
- Ristic M. y Sibinovic S. Serologic diagnosis of *Babesia bigemina* infection in cattle by the indirect fluorescent antibody test. *Research in Veterinary Science*. 1964; 9: 557.
- Regendanz, P. y Muniz, J. O *Rhipicephalus sanguineus* como transmissor da piroplasmose canina no Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1936; 31: 81-84.
- Reyers F., Leisewitz AL., Lobetti RG., Milner RJ., Jacobson LS. y Van Zyl M. Canine babesiosis in South Africa: more than one disease. Does this serve as a model for falciparum malaria? *Ann. Tropical Medical Parasitology*. 1998; 92: 503-511.
- Rojas A., Rojas D., Montenegro V., Gutierrez R., Yasur D. y Baneth G. Vector-borne pathogens in dogs from Costa Rica: First molecular description of *Babesia vogeli* and *Hepatozoon canis* infections with a high prevalence of monocytic ehrlichiosis

- and the manifestations of co-infection. *Parasitology Veterinary*. 2014; 199: 121-228.
- Rodriguez-Morales AJ. Epidemiología de la Babesiosis: Zoonosis emergente. *Acta Científica Estudiantil*. 2007; 5:132-138.
- Rollend L., Bent SJ., Krause PJ., Usmani-Brown S., Steeves TK., States SL., Lepore T, Ryan R., Dias F, Mamoun CB., Fish D. y Diuk-Wasser MA. Quantitative PCR for Detection of *Babesia microti* in *Ixodes scapularis* Ticks and in Human Blood. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2013; 13: 784-790.
- Salem NY y Farag HS. Clinical, Hematologic, and Molecular Findings in Naturally Occurring *Babesia canis vogeli* in Egyptian Dogs. *Veterinary Medicine International*. 2014: 1-6.
- Schnittger L., Rodriguez AE., Florin-Christensen M. y Morrison DA. *Babesia*: A world emerging. *Infection, Genetics and Evolution*. 2012; 12: 1788–1809.
- Schoeman JP. Canine babesiosis. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 2009; 76: 59–66.
- Shebish E., Vemulapalli R. y Oseto C. Prevalence and molecular detection of *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle from Puntarenas Province, Costa Rica. *Veterinary Parasitology*. 2012; 188:164-7.
- Skotarczak B. Babesiosis of human and domestic dog; ethiology, pathogenesis, diagnostics. *Wiadomosci parazytologiczne*. 2007; 53:271-80.
- Smith T. y Kilbourne EL. Investigation into the nature, causation, and prevention of southern cattle fever. U.S. Department of Agriculture, Bureau of Animal Industry. 1893; Bulletin No 1.
- Sneath PHA y Sokal RR. *Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco. 1973; 573 p
- Solano-Gallego L. y Baneth G. Babesiosis in dogs and cats—Expanding parasitological and clinical spectra. *Veterinary Parasitology*. 2011; 181:48–60.
- Solano-Gallego L., Capri A., Pennisi MG., Caldin M., Furlanello T., Trotta M. Acute febrile illness is associated with *Rickettsia* spp infection in dogs. *Parasites & Vectors*. 2015; 8: 2-10.
- Solano-Gallego L. Sainz A., Roura X., Estrada Peña A., Miró G. A review of canine babesiosis: European perspective. *Parasit Vector*. 2016; 9:2-18.
- Solano-Gallego L., Trotta M., Carli E., Carcy B., Caldin M. y Furlanello T. *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* clinicopathological findings and DNA detection by

- means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease. *Veterinary Parasitology*. 2008; 157: 211–22.
- Sonenshine DE., 1993. *Biology of Ticks*. Oxford University Press, New York. EUA, 463 p.
- Suárez CE., Palmer GH., Florin-Christensen M., Hines SA., Hotzel I., McElwain TF. Organization, transcription, and expression of rhoptry associated protein genes in the *Babesia bigemina* rap-1 locus. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2003; 127: 101-112.
- Suárez Rey ML., González Martínez A. y Santamaría Pernas G. Babesiosis canina. *Canis et Felis*. 2011; 113: 48-65.
- Stappendel RJ. Hemolytic anemia in the dog [Ph.D. thesis], Utrecht University, Utrecht, The Netherland, 1978
- Sveca D., Tichopad A., Novosadova V., Pfafflid MW., Kubista M. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular Detection and Quantification*. 2015. 3: 9-16.
- Taboada J, Harvey JW, Levy MG, Breitschwerdt EB. Seroprevalence of babesiosis in Greyhounds in Florida. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1992; 200:47–50.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 2011; 28: 2731-2739.
- Todorovic RA. Serological diagnosis of babesiosis: A review. *Tropical Animal Health and Priduction*.1975; 7: 1-14.
- Troyo A., Calderón-Arguedas O., Alvarado G., Vargas-Castro L. y Avendaño. Ectoparasites of dogs in home environments on the Caribbean slope of Costa Rica. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*. Jaboticabal. 2012; 21:179-183.
- Valasek MA y Repa JJ. The power of real time PCR. *Advances in physiology Education*. 2005; 29: 151-159.
- Vannier E. y Krause PJ. Human Babesiosis. *The New England Journal of Medicine*. 2012; 366:2397-407.
- Vargas-Hernández G., André MR., Faria JLM. y Munhoz TD., Hernandez Rodriguez M., Machado R.Z. y Tinucci-Costa M. Molecular and serological detection of *Ehrlichia*

- canis* and *Babesia vogeli* in dogs in Colombia. *Veterinary Parasitology*. 2012; 186: 254–260.
- Vascellari M., Ravagnan S., Carminato A, Cazzin S, Carli E, Da Rold G, Lucchese L, Natale A, Otranto D y Capelli G. Exposure to vector-borne pathogens in candidate blood donor and free-roaming dogs of northeast Italy. *Parasites & Vectors*. 2016; 9: 2-10.
- Vercammen F., De Deken R y Maes L. Duration of protective immunity in experimental canine babesiosis after homologous and heterologous challenge. *Veterinary Parasitology*. 1999; 68: 51-55.
- Vercammen, F., De Deken, R., Maes, L. Haematological and biochemical profile in experimental canine babesiosis (*Babesia canis*). *Vlaams Diergenceskundig Tijdschrift*. 1997. 66, 174–178.
- Vial HJ. y Gorenflot A. Chemotherapy against babesiosis, *Veterinary Parasitology*. 2006; 138: 147–160.
- Vilhena H., Martinez-Díaz VL., Cardoso L, Vieira L., Altet L, Francino O., Pastor J. y Silvestre- Ferreira AC. (2013). Feline vector-borne pathogens in the north and centre of Portugal. *Parasites & Vectors*, 6 (99); 1-6.
- Vinueza C. PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular. *Revista electrónica de Veterinaria*. 2009; 10: 1-13.
- Waltisbuhl DJ., Goodger BV., Wright IG., Commins MA. y Mahoney DF. An enzyme linked immunosorbent assay to diagnose *Babesia bovis* infection in cattle. *Parasitology Research*. 1987; 73:126-131.
- Weiland G. Species-specific serodiagnosis of equine piroplasma infections by means of complement fixation test (CFT), immunofluorescence (IIF), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Veterinary Parasitology*. 1986; 20: 43-48.
- Wei L., Kelly P., Ackerson K., Zhang J., El-Mahallawy HS., Kaltenboeck B. y Wang C. First report of *Babesia gibsoni* in Central America and survey for vector-borne infections in dogs from Nicaragua. *Parasites & Vectors*. 2014; 7:121-126.
- Wei L., Kelly P., Ackerson K., Zhang J., El-Mahallawy HS., Kaltenboeck B. y Wang C. Molecular detection of *Dirofilaria immitis*, *Hepatozoon canis*, *Babesia* spp., *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs on Costa Rica. *Acta Parasitologica*. 2015; 60: 21-25.
- Weiss DJ. y Wardrop KJ. Schalm's veterinary hematology. 2010. 6th. Ed. Wiley-Blackwell, Iowa.
- Yabsley MJ., McKibben J., Macpherson CM., Cattan PF, Cherry NA., BC., Hegarty BC., Breitschwerdt EB., O'Connor T., Chandrashekar R, Paterson T, Perea ML., Ball

- G., Friesen S., Goedde J., Henderson B. y Sylvester W. Prevalence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Bartonella vinsonii berkhoffii*, and *Rickettsia* spp. in dogs from Grenada. *Veterinary Parasitology*. 2008; 151: 279–285.
- Zahler M., Rinder H., Schein E. y Gothe R. Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. *Veterinary Parasitology*. 2000; 89: 241–248.
- Zahler M., Schein E., Rinder H. y Gothe R. Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. *Parasitology Research*. 1998; 84:544-548.

## 8. Anexos

**Anexo 1.** Sinopsis de las diferencias estadísticamente significativas de los valores hematológicos encontrados en todo el estudio en caninos con respecto a *B. canis vogeli*.

Prueba	Grupos a comparar <sup>1</sup>		Valor Hematológico con $P \leq 0,05$ <sup>2</sup>
	IFI	Seropositivos	Seronegativos
Hemoglobina			
CHCM			
Monocitos			
Plaquetas			
IFI y qPCR	Positivos (IFI y qPCR)	Negativos (IFI y qPCR)	CHCM

<sup>1</sup> Los valores hematológicos fueron menores en los grupos positivos para ambas técnicas.

<sup>2</sup> No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores hematológicos de los caninos qPCR positivos y qPCR negativos, entre los caninos seropositivos-qPCR negativos y los caninos negativos ni entre los caninos qPCR positivos-seronegativos y los caninos negativos.

**Anexo 2.** Sinopsis de los factores asociados a los caninos seropositivos o positivos a *B. canis vogeli* en todo el estudio.

Prueba	Riesgo/Protección	Factores asociados a babesiosis, valor de $P \leq 0,05$
IFI	Riesgo	Fiebre
	Riesgo	Talla mediana
	Riesgo	Picazón en el pasado
	Riesgo	Fiebre en el pasado
	Riesgo	Fuera Valle Central
	Riesgo	Anorexia en el pasado
	Riesgo	Debilidad en el pasado
	Riesgo	Presencia de garrapatas
	Riesgo	Presencia de <i>R. sanguineus</i> s.l.
	Riesgo	Pérdida de pelo en el pasado
	Riesgo	Más de 3 perros que habiten con el perro
	Riesgo	Problemas respiratorios en el pasado
	Riesgo	Grado de infestación con garrapatas (1-10, 25-50)
	Protección	Raza pura
	Protección	Frecuencia de visitas a parques (años)
qPCR	Riesgo	Fuera del Valle Central
	Riesgo	Los perros con propietario
	Riesgo	Caninos con 11-25 garrapatas
	Riesgo	Cantidad humanos que habitan con el perro (1-4, >4)
	Protección	Tratamiento oral contra garrapatas