



Detección e identificación molecular de *Babesia* (Piroplasma: Babesiidae) en garrapatas asociadas a animales domésticos del departamento de Sucre, Colombia

MARCO FIDEL GUEVARA VEGA

Trabajo de grado para optar al título de Magíster en Biología

Director:

BSc, MSc, DrSci LUIS PATERNINA TUIRÁN

Co-Director:

BSc, MSc Cand. PhD ANAÍS CASTELLAR MARTÍNEZ

UNIVERSIDAD DE SUCRE  
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS  
Sincelejo  
Año, 2018

Notas de aceptación:

---

---

---

---

---

---

---

---

Firma de presidente del jurado

---

Firma del jurado 2

---

Firma del jurado 3

Dedicatoria

*A Dios, por brindarme su infinita bondad y amor.  
A mi madre Carmen Vega, por apoyarme en todo momento y su  
motivación constante.  
A mis abuelos, tíos, primos y amigos por el apoyo que me brindaron en  
el día a día, fomentando en mí el deseo de superación y de triunfo en la  
vida.*

*Marco Guevara Vega*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Luis Paternina Tuirán por colocar su confianza en mí para desarrollar este trabajo.

A Anaís Castellar Martínez por su continua ayuda y asesoría.

Al Dr. Pedro Blanco Tuirán por abrirme las puertas del laboratorio del cual dirige.

A mis amigos y compañeros del grupo de Investigaciones Biomédicas.

Al Instituto Investigaciones Biomédicas del Caribe. Departamento de Sucre. Código BPIN 2012000100008, por la financiación de este trabajo de Investigación.

## CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ESTADO DEL ARTE .....	3
2.1 Consideraciones generales del genero <i>Babesia</i> (morfología/genoma).....	3
2.2 Clasificación filogenética. ....	6
2.3 Ciclo biológico de <i>Babesia</i> spp.....	9
2.3.1 Desarrollo en hospederos vertebrados. ....	11
2.3.2 Desarrollo en garrapatas. ....	11
2.3 Babesiosis animal y humana.....	13
2.4 Diagnóstico de Babesiosis. ....	16
3. OBJETIVOS.....	18
3.1 Objetivo general. ....	18
3.2 Objetivos específicos. ....	18
4. METODOLOGÍA.....	19
4.1 Área y tipo estudio.....	19
4.2 Recolección e identificación taxonómica de garrapatas del municipio de La Unión. ....	20
4.3 Extracción de ADN de garrapatas. ....	20
4.4 Detección de piroplasma.....	22
4.5 Análisis de infección por piroplasma. ....	23
4.6 Análisis filogenético.....	23
4.7 Modelos de distribución potencial de especies de garrapatas infectadas con <i>Babesia</i> .....	24
5. RESULTADOS .....	27
5.1 Garrapatas. ....	27
5.2 Detección molecular de piroplasmas.....	28
5.3 Modelos de distribución potencial de especies de garrapatas halladas con <i>Babesia</i> en la región Caribe.....	36
6. DISCUSIÓN.....	40
CONCLUSIONES .....	47
RECOMENDACIONES.....	48
BIBLIOGRAFÍA.....	49

## LISTAS DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Representación de centromeros de <i>B. bovis</i> y genes <i>smorf</i> y <i>ves1</i> .....	5
Figura 2. Árbol consenso de 170 mil árboles muestreados por análisis bayesiano de 603 secuencias de 18S ARNr de piroplasmidos con grupo externo de <i>Cardiosporidium</i> .....	9
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Babesia</i> spp.....	13
Figura 4. Ubicación geográfica de los municipios del departamento de Sucre donde fueron realizados los muestreos.....	19
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de PCR-ITS1n de muestras seleccionadas.....	29
Figura 6. Asociación de porcentaje de infección a <i>Babesia</i> y variable sitio de muestreo de los ectoparásitos.....	30
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de PCR 18S de piroplasma usando los cebadores PiroA1 - PiroB.....	31
Figura 8. Análisis Neighbor-Joining de las secuencias de ITS1 de piroplasma (Sum of Branch Length=4.41908569).....	33
Figura 9. Análisis Neighbor-Joining de las secuencias 18S de piroplasma (Sum of Branch Length = 4.17682535).....	34
Figura 10. Análisis Neighbor-Joining de las secuencias 18S de Hepatozoon (Sum of Branch Length = 0.30126801).....	35
Figura 11. Análisis de componentes principales de variables bioclimáticas WorldClim.....	37
Figura 12. Modelos de distribución potencial de especies de garrapatas en el territorio colombiano.....	38
Figura 13. Modelos de distribución potencial de especies de garrapatas en la región Caribe de Colombia.....	39

**LISTA DE TABLAS**

	Pág.
Tabla 1. Comparación de características de genoma de <i>P. falciparum</i> , <i>T. parva</i> y <i>B. bovis</i> .....	5
Tabla 2. Especies de Babesia con potencial zoonótico (Modificado).....	15
Tabla 3. Distribución de especies de garrapatas en las diferentes áreas de recolección.....	28
Tabla 4. Cantidad de especies de garrapatas encontradas en los diferentes animales referenciados en el estudio. ....	28
Tabla 5. Análisis de infección por piroplasma por municipios.....	29
Tabla 6. Análisis de infección por piroplasma por especies.....	30
Tabla 7. Especies de piroplasmas encontrados de acuerdo al sexo, hospedero, diana de PCR y municipio relacionado con la especie de garrapata. ....	32
Tabla 8. Promedio de variables bioclimáticas de acuerdo al hábitat de las especies de garrapatas relacionadas con el estudio.....	37

## RESUMEN

La babesiosis es causada por parásitos protozoarios intraeritrocíticos que son transmitidos por especies de garrapatas, capaces de infectar animales domésticos y salvajes. Estos protozoos del género *Babesia* han causado gran pérdida económica dentro de la industria ganadera debido a la mortalidad, morbilidad y los altos costos que implica la atención veterinaria. En Colombia, diversos estudios han permitido determinar que la babesiosis especialmente la bovina tiene una gran repercusión económica y sanitaria, sin embargo, trabajos dirigidos sobre la ixodofauna relacionada como el vector de la enfermedad poco se ha realizado. Por esta razón, en el presente trabajo de investigación, se identificó protozoarios del género *Babesia* asociados a garrapatas en ambientes rurales del departamento de Sucre. 1.084 garrapatas (487 *R. sanguineus*, 336 *D. nitens*, 251 *R. microplus*, 7 *A. mixtum* y 3 *A. auricularium*) fueron colectadas de diferentes animales domésticos organizados en 350 grupos de ectoparásitos, donde 165 grupos eran de *R. sanguineus*, 97 *D. nitens*, 83 *R. microplus*, 4 *A. mixtum* y 1 *A. auricularium*. A estos grupos de garrapatas se les realizó extracción de ADN, luego una PCR anidada de la región ITS1 y PCR del gen 18S ARNr de especies de *Babesia*. Posteriormente la secuenciación y análisis genético que permitió la identificación de los parásitos detectados. De 10 extractos de ADN de las diferentes especies de garrapatas positivos a piroplasmas; 5 extractos de ADN fueron de *D. nitens*, 3 de *R. microplus* y 2 de *R. sanguineus*, donde se identificaron

mediante ITS1 *B. canis vogeli*, *B. bigemina*, *B. equi* (= *T. equi*) y *B. caballi*; mientras que por el gen 18S ARNr se identificó a *B. equi*, *B. canis vogeli* y *B. caballi*, inesperadamente a partir de un extracto de ADN de *R. microplus* se identificó *Hepatozoon canis*. La presente investigación constituye la evidencia de la gran diversidad de piroplasmas del género *Babesia* que se puede encontrar en especies de garrapatas de animales domésticos del departamento de Sucre. La alta diversidad de piroplasmas y las relaciones que se observaron con las especies de garrapatas en las que fueron detectadas, confirman la existencia de complejos patrones de interrelaciones garrapata-hospedero en zonas rurales del norte de Colombia que ameritan más estudios ecológicos y moleculares.

Palabras clave: *Babesia*, ITS1, 18S ARNr, Garrapatas, PCR.

## ABSTRACT

Babesiosis is caused by intraerythrocytic protozoan parasites, tick species-transmitted, capable of infecting domestic and wild animals. These protozoa of the genus *Babesia* have caused great economic loss within the livestock industry due to the mortality, morbidity and high costs involved in veterinary care. In Colombia, several studies have made it possible to determine that babesiosis, especially bovine babesiosis, has a great economic and health repercussion, however, works directed on the related ixodofauna as the vector of the disease have not been carried out. For this reason, in this research work, protozoa of the genus *Babesia* associated with ticks were identified in rural environments of the department of Sucre. 1.084 ticks (487 *R. sanguineus*, 336 *D. nitens*, 251 *R. microplus*, 7 *A. mixtum* and 3 *A. auricularium*) were collected from different domestic animals organized into 350 pools of ectoparasites, where 165 pools were *R. sanguineus*, 97 *D. nitens*, 83 *R. microplus*, 4 *A. mixtum* and 1 *A. auricularium*. These pools of ticks were subjected to DNA extraction, then a nested PCR of ITS1 and PCR of the 18S rRNA gene of *Babesia* species. Later, the sequencing and genetic analysis allowed the identification of parasite. From 10 DNA extracts of the different species of ticks; 5 extracts were from *D. nitens*, 3 from *R. microplus* and 2 *R. sanguineus*, where were identified by ITS1: *B. canis vogeli*, *B. bigemina*, *B. equi* (= *T. equi*) and *B. caballi*; while for the 18S rRNA gene: *B. equi*, *B. canis vogeli* and *B. caballi*, unexpectedly from a DNA extract from *R. microplus* was

identified *H. canis*. The present investigation constitutes the evidence of the great diversity of piroplasmas of the genus *Babesia* that can be found in species of ticks of domestic animals of the department of Sucre. The high diversity of piroplasmas and the relations observed with the tick species in which they were detected, confirm the existence of complex patterns of tick-host interrelations in rural areas of northern Colombia that warrant further ecological and molecular studies.

Keywords: Babesia, ITS1, 18S rRNA, Ticks, PCR

## 1. INTRODUCCIÓN

La babesiosis es una enfermedad causada por protozoos del género *Babesia* (Piroplasmida: Babesiidae) y transmitidos por garrapatas, esta enfermedad es de gran importancia económica por su impacto en la ganadería, siendo la primera enfermedad transmitida por vectores descrita y desde entonces se han descubierto más de 100 especies de estos hemoparásitos que afectan principalmente a vertebrados de la clase Mammalia. En Colombia, se reconoce la presencia de *Babesia bigemina* y *Babesia bovis* en ganado bovino, *Babesia canis* en perros y se puede considerar la presencia de *Babesia equi* en caballos, a partir de esta información se han realizado estudios para demostrar el potencial zoonótico de estos agentes en salud pública dada la similitud clínica y parasitológica que presentan la malaria y la babesiosis humana.

En el departamento de Sucre se ha iniciado una serie de trabajos encaminados a conocer parte de la ixodofauna local y su potencial epidémico como vectores de enfermedades humanas. Sin embargo, no se han realizado trabajos enfocados en la diversidad de protozoos del género *Babesia* en ambientes rurales, los cuales dependen en gran parte de las garrapatas para su transmisión en escenarios ecológicamente complejos, es posible que bajo ciertas condiciones se puedan presentar casos en humanos debido a los potenciales

encuentros entre humanos y garrapatas infectadas con especies de *Babesia* aún no registradas en Colombia. Debido a la ausencia de información sobre la diversidad de *Babesia* y de su relación con las garrapatas, el objetivo del presente trabajo fue identificar protozoos del género *Babesia* asociados a garrapatas en ambientes rurales del departamento de Sucre y estimar un riesgo ixodológico parcial a través de modelos de distribución de garrapatas para la región Caribe de Colombia.

## 2. ESTADO DEL ARTE

### 2.1 Consideraciones generales del género *Babesia* (morfología/genoma).

*Babesia* es uno de los hemoparásitos más comunes en el mundo, con un gran rango de hospederos; desde su descubrimiento a finales del siglo XIX se han encontrado animales silvestres y domésticos asociados a las diferentes especies de este género, y también a garrapatas como su principal vector (Chauvin, Moreau, Bonnet, Plantard, Malandrin, 2009).

En 1888, Victor Babes, reportó microorganismos en los eritrocitos de ganado en Rumania, que fueron asociados con hemoglobinuria bovina; posteriormente se encontró también en eritrocitos de ovejas (Babes, 1888). Investigaciones realizadas cinco años más tarde por Smith y Kilborne, permitieron señalar la presencia de un parásito intraeritrocítico en bovinos causante de la fiebre del ganado en Texas (Estados Unidos), transmitido por una garrapata, otorgándole el nombre de *Pyrosoma bigeminum* (Smith y Kilborne, 1893); fue el primer reporte de la transmisión de un parásito protozoario por un artrópodo. Sin embargo, ese mismo año, los diferentes parásitos descritos por Babes, Smith y Kilborne fueron nombrados por Starcovici como *Babesia bovis*, *Babesia ovis* y *Babesia bigemina*, respectivamente (Starcovici, 1893). Luego, Piana y Galli-Valerio (1895) y Koch (1904), observaron a estos microorganismos parasitando eritrocitos de otros

animales domésticos como perros y caballos, y se les describió con el nombre de *B. canis* y *Babesia caballi*, respectivamente.

Según su morfología, son llamados piroplasmidos debido a que los parásitos adquieren una forma de pera dentro de las células de los hospederos vertebrados que parasitan (Kakoma & Mehlhorn, 1993; Telford, Gorenflot, Brasseur y Spielman, 1993), y de esta forma se pueden clasificar en dos grupos: babesias pequeñas (1,0-2,5  $\mu\text{m}$  de longitud) que incluye *B. bovis*, *Babesia gibsoni*, *Babesia microti*, *Babesia rodhaini*, entre otros y babesias grandes (2,5-5,0  $\mu\text{m}$  de longitud) como *B. bigemina*, *B. caballi*, *B. canis* y otros, dependiendo de esto, así será la orientación del parásito en las células infectadas; si el tamaño es grande, los parásitos se encontraran en sus extremos formando un ángulo agudo y si son pequeños formaran un ángulo obtuso (Ruprah, 1985).

En relación a su genoma, para el caso de *B. bovis*, secuenciado por Brayton et al., (2007), se determinó un tamaño del genoma es de 8,2 Mpb que consiste en cuatro cromosomas de 2,62 2,59 1,73 y 1,25 Mbps (Figura 1). El genoma de *B. bovis* es similar en tamaño al de *Theileria parva* (8.3Mbps) (Gardner et al., 2005) y *Theileria annulata* (8.35 Mbps) (Pain et al., 2005), siendo el genoma más pequeño de aplicomplexa secuenciado (Tabla 1).

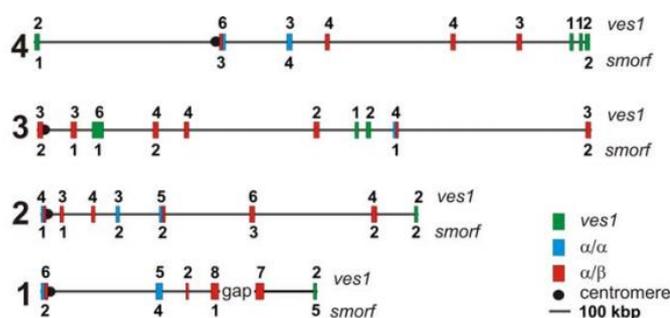


Figura 1. Representación de centromeros de *B. bovis* y genes *smorf* y *ves1*. Se describen cinco grupos de proteínas antigénicas, presentes en *B. bovis*, dos de ellas son codificadas por grandes familias de genes: las proteínas variables expresadas en la superficie de los eritrocitos (VESA1) y las proteínas SmORF. Las otras son codificadas por familias de genes más pequeñas, es el caso de las proteínas de los cuerpos esféricos (SBP), las proteínas de los rhotries (RAP-1) y las proteínas variables de la superficie de los merozoitos (VMSA). Fuente: Brayton et., 2007.

El genoma de *B. bovis* contiene tres operones ARNr, dos en el cromosoma 3 y uno en el cromosoma 4, y 44 genes ARNt distribuidos en todos los cuatro cromosomas y se estima un total 3.671 proteínas nucleares codificadas por genes. Además del genoma nuclear, el parásito contiene dos genomas extracromosómicos ricos en A+T: un genoma de apicoplasto circular de 33 kbp y un genoma mitocondrial lineal de ~6 kbp (Tabla 1) (Brayton et al., 2007).

Características	Especies		
	<i>P. falciparum</i>	<i>T. parva</i>	<i>B. bovis</i>
Tamaño (Mbp)	22,8	8,3	8,2
Número de cromosomas	14	4	4
Tamaño del genoma apicoplasto (kbp)	35	39.5	33
Tamaño del genoma mitocondrial	~6 lineal	~6 lineal	~6 lineal
Número de proteínas codificadas por genes	5.268	4.035	3.671

Tabla 1. Comparación de características de genoma de *P. falciparum*, *T. parva* y *B. bovis*. Fuente: Brayton et al., 2007 (Modificado).

## 2.2 Clasificación filogenética.

El género *Babesia* pertenece al filo *Apicomplexa* (también llamado *Sporozoa*), caracterizada por la presencia de un complejo apical y un citoesqueleto único que lo diferencia de los otros eucariotas (Gordon & Silbley, 2005).

Pertenece a la Clase Aconoidasida (Piroplasmae), orden Piroplasmida (Levine, 1971; Levine et al., 1980; Mehlhorn et al., 1980). Tradicionalmente se habla con especial interés de dos familias dentro de este orden: Babesiidae y Theileriidae, cuya diferencia entre ellos radica en la ausencia de un ciclo preeritrocítico en Babesiidae y la ausencia de transmisión transovarial en Theileridae (Kakoma & Mehlhorn, 1993; Telford et al., 1993).

Antes de la aplicación de metodologías moleculares, se habían validado cerca de 111 especies del género *Babesia*, basados específicamente en características morfológicas y biológicas (Mehlhorn, Schein y Ahmed, 1994; Levine, 1988; Reichard, Van Den Bussche, Meinkoth, Hoover, y Kocan, 2005). En contraste, con estos caracteres fenotípicos, las secuencias de ADN tienen la ventaja de diferenciar especies morfológicamente similares y cuantificar estas diferencias. Recientemente, las herramientas moleculares han hecho importantes contribuciones que han permitido revelar linajes y relaciones evolutivas, aportando grandes cambios en la clasificación de

los piroplásmidos. Es importante destacar que estas contribuciones han confirmado y refinado en gran medida las clasificaciones taxonómicas anteriores, que fueron realizadas por la observación de un número limitado de caracteres fenotípicos (Schnittger, Rodriguez, Florin-Christensen y Morrison, 2012).

En estudios de análisis filogenéticos basados en la subunidad pequeña del ARN ribosomal 18S (18S rRNA) con inferencias bayesianas de más de 600 secuencias del orden Piroplasmida se han descrito 6 clados (Schnittger et al., 2012; Criado et al., 2003a), a partir de este análisis es evidente que el género *Theileria* no es más que un linaje polifilético de piroplasmas dentro del género *Babesia*.

A) El primer clado contiene a *B. microti* y *B. rodhaini*, parásitos que se encuentran asociados a roedores, así también como *B. leo* y *B. felis* que infectan felinos. Los roedores y los felinos han sido considerados hospederos primordiales (Criado et al., 2003b; Penzhorn, Kjemtrup, López-Rebollar y Conrad, 2001).

B) El segundo clado consiste de piroplasmas que han sido aislados en el oeste de los Estados Unidos, como California y Washington, por tal razón es llamado el "Clado Occidental". Algunas de las especies de este clado son *B. conradae* y *B. duncani*, que son indistinguibles en su morfología y ultraestructura.

C) El tercer clado contiene piroplasmas de los géneros *Theileria*, *Cytauxzoon* y *Babesia* (3A y 3B), de forma general es conocido como el clado *Theileria*.

D) El cuarto clado contiene a *B. bicornis* y *Theileria equi*/*B. equi*, se comporta como un clado monofilético que no es en el sentido estricto de la taxonomía *Theileria* ni *Babesia* (Criado et al., 2003a; Holman, Spencer y Droleskey, 2005; Hunfeld, Hildebrandt y Gray, 2008; Gray, Zintl y Hildebrandt, 2010; Herwaldt, Caccio y Gherlinzoni, 2003).

E) El quinto clado incluye especies del género *Theileria*, el primer grupo incluye a *T. annulata*, *T. parva*, *T. lestoquardi* que presentan proliferación en los leucocitos, las cuales afectan la salud de ovejas y el ganado en la región mediterránea, Asia y África, y el segundo grupo de especies no presentan una proliferación en leucocitos, e incluye el complejo *T. buffeli* y *T. ovis*. Los parásitos de *Theileria* de este grupo infectan exclusivamente a ungulados.

F) El sexto clado contiene al género *Babesia* sensu stricto, e incluye a especies como *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. ovis*, *B. caballi*, *B. vogeli*, *B. canis* y *B. divergens* que infectan desde especies como ovejas y caballos hasta caninos y el hombre.

Este panorama filogenético ha tenido un profundo impacto en la taxonomía de piroplasmas, mostrando que entre las familias Babesiidae y Theileriidae no parecen existir límites taxonómicos claros (figura 2) y poniendo en tela de juicio la existencia misma de la familia Theileridae.

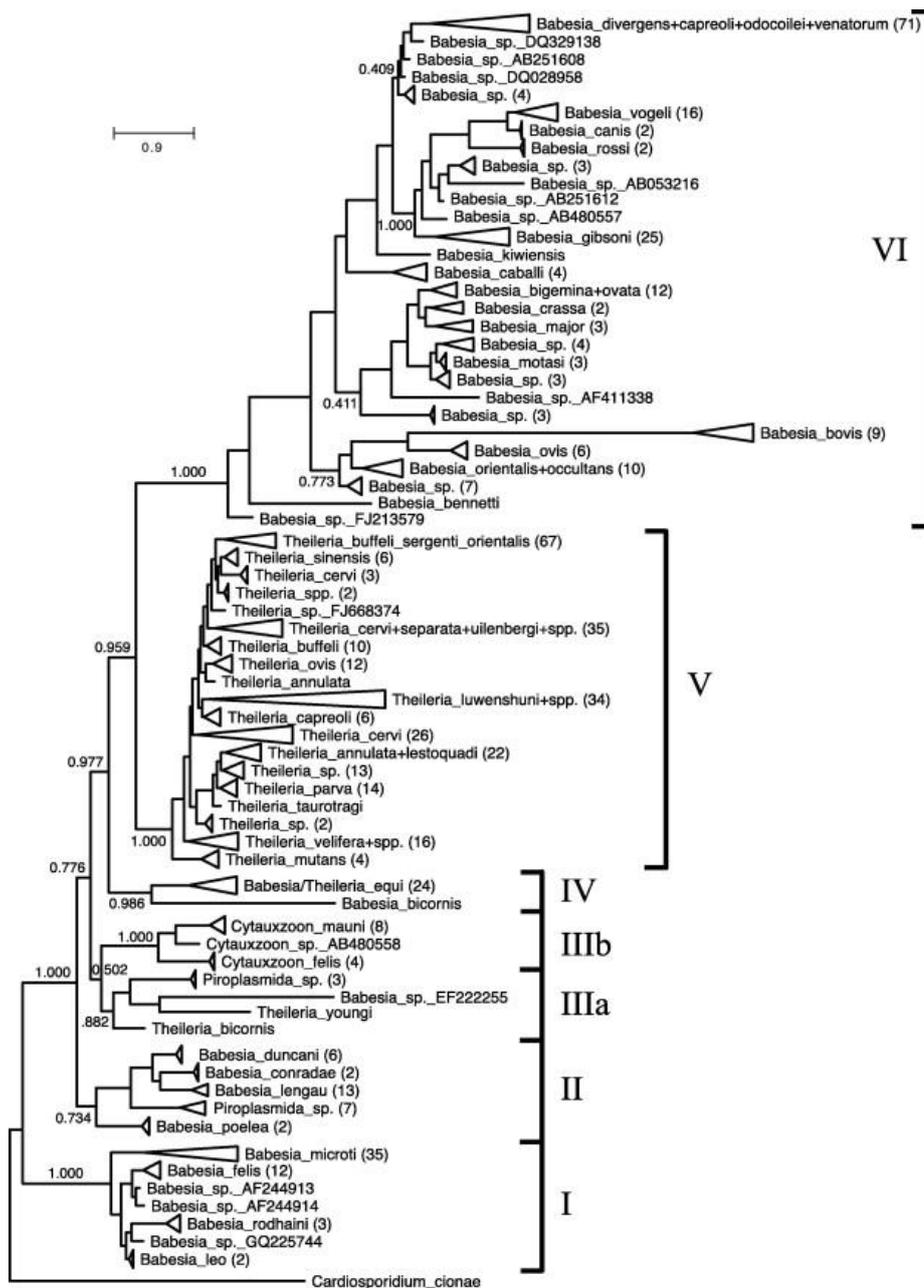


Figura 2. Árbol consenso de 170 mil árboles muestreados por análisis bayesiano de 603 secuencias de 18S ARNr de piroplasmidos con grupo externo de *Cardiosporidium*. Fuente: Schnittger et al., 2012.

### 2.3 Ciclo biológico de *Babesia* spp.

Se ha considerado que las especies del género *Babesia* pueden ser encontradas en lugares donde haya ciertas especies de garrapatas. Hasta la fecha, en los Estados Unidos se han identificado garrapatas del género *Ixodes* como vectores para *Babesia* a excepción de un

estudio en el que se identificó al argásido, *Ornithodoros erraticus*, como potencial vector de *B. meri* (Gunders, 1977).

Seis de los siete principales géneros de garrapatas de la familia Ixodidae se consideran vectores experimentales o naturales de diversas especies de *Babesia* (Telford et al., 1993; Schein, Rehbein, Voigt y Zwegarth, 1981; Spielman, 1976). Algunas especies como *B. bigemina* y *B. equi* pueden infectar a más de un género de garrapatas (Telford et al., 1993), y varias especies de garrapatas pueden ser infectadas por más de una especie de *Babesia*, por ejemplo, *Ixodes dammini* puede albergar generalmente a *B. microti* en su etapa de ninfa (Piesman, Karakashian, Lewengrub, Rudzinska y Spielman, 1986; Piesman y Spielman, 1982; Spielman et al., 1981) y también a *B. odocoilei* (Mehlhorn et al., 1994). Aún se desconoce si las garrapatas pueden albergar más de una especie de *Babesia* al mismo tiempo en condiciones naturales o si puede transmitir más de una de ellas a la vez (Homer, Aguilar-Delfin, Telford, Krause y Persing, 2000).

Se han identificado más de cien especies de *Babesia* (Schnittger et al., 2012; Telford et al., 1993; Levine, 1971) que infectan muchos tipos de mamíferos, especialmente el orden Rodentia, y también a varias especies de aves (Telford et al., 1993; Levine, 1971; Kakoma & Mehlhorn, 1993). Los rangos de los hospedadores de *B. microti* y *B. divergens* pueden variar, desde pequeños mamíferos terrestres (Spielman, 1976; Brandt, Healy y Welch, 1977; Etkind, Piesman, Ruebush, Spielman y Juranek, 1980) a primates no humanos (Moore y Kuntz, 1981) y humanos (Clarke, Rogers, Egan, 1989). El género *Babesia* al igual que al género *Theileria*, comprenden el filo aplicomplexa; generalmente se encuentran tres etapas de reproducción durante su ciclo de vida: 1) gamogonia, formación y fusión de gametos dentro del intestino de la garrapata; 2) esporogonia, reproducción asexual en las glándulas salivares; y 3) merogonia, reproducción

asexual en los hospederos vertebrados (Olmeda et al., 1997).

### **2.3.1 Desarrollo en hospederos vertebrados.**

Todas las especies de *Babesia* son transmitidas naturalmente por la picadura de una garrapata y la principal diferencia durante el ciclo de vida es la transmisión transovarial en algunas especies (*Babesia* sensu stricto). Durante la picadura de la garrapata, los esporozoitos son inyectados en el hospedero infectando de manera directa a los eritrocitos. Este fenómeno soporta la separación clásica de *Babesia* y *Theileria*, donde los esporozoitos no infectan de manera inicial a las células rojas sino a los linfocitos o macrófagos (Uilenberg, 2006). En el hospedero, los esporozoitos de *Babesia* se desarrollan dentro de los eritrocitos resultando dos o en algunos casos cuatro células hijas (merozoitos) que dejan la célula hospedadora para infectar a otros eritrocitos (merogonia), esto ocurre hasta que las células mueran o la respuesta inmune elimine a los parásitos (De Vos, Dalgliesh, Callow, 1987; Gray et al., 2008) (Figura 3).

### **2.3.2 Desarrollo en garrapatas.**

Los eritrocitos infectados con parásitos de *Babesia* son ingeridos por garrapatas, donde la mayoría de ellos son destruidos. Sin embargo, algunas etapas específicas del parásito (pre-gametocitos) sobreviven y pueden desarrollarse en gametocitos (Chauvin et al., 2009). Unas horas después de la ingestión, forman cuerpos alargados, con cabeza

en forma de punta de flecha. Estos cuerpos son llamados cuerpos radiados. Los gametos se fusionan en el lumen del tracto digestivo de la garrapata para crear un cigoto con forma similar a los gametos que facilitará la penetración celular (Mehlhorn, Peters y Haberkorn, 1980). Una vez los cigotos de *Babesia* han sido internalizados, la punta de flecha se desintegra y el cigoto se transforma en una fase móvil, denominada ooquineto. El ooquineto escapa del epitelio del intestino medio e invade los tejidos del cuerpo de la garrapata, incluyendo también a los ovarios donde los huevos son infectados con parásitos del género *Babesia* (transmisión transovarica). El desarrollo del parásito incluye multiplicación asexual, continuando con la esporogonia y el desarrollo de numerosos quinetos (esporoquinetos). La esporogonia toma lugar en cada etapa de la garrapata y la infección adquirida durante una etapa de la vida es pasada a la próxima (transmisión transestadial). Algunos quinetos también invaden las glándulas salivares de las garrapatas, donde al final del ciclo del desarrollo se producen los esporozoitos. Los esporozoitos representan la etapa de infección del parásito en el hospedero mamífero (Chauvin et al., 2009) (Figura 3).

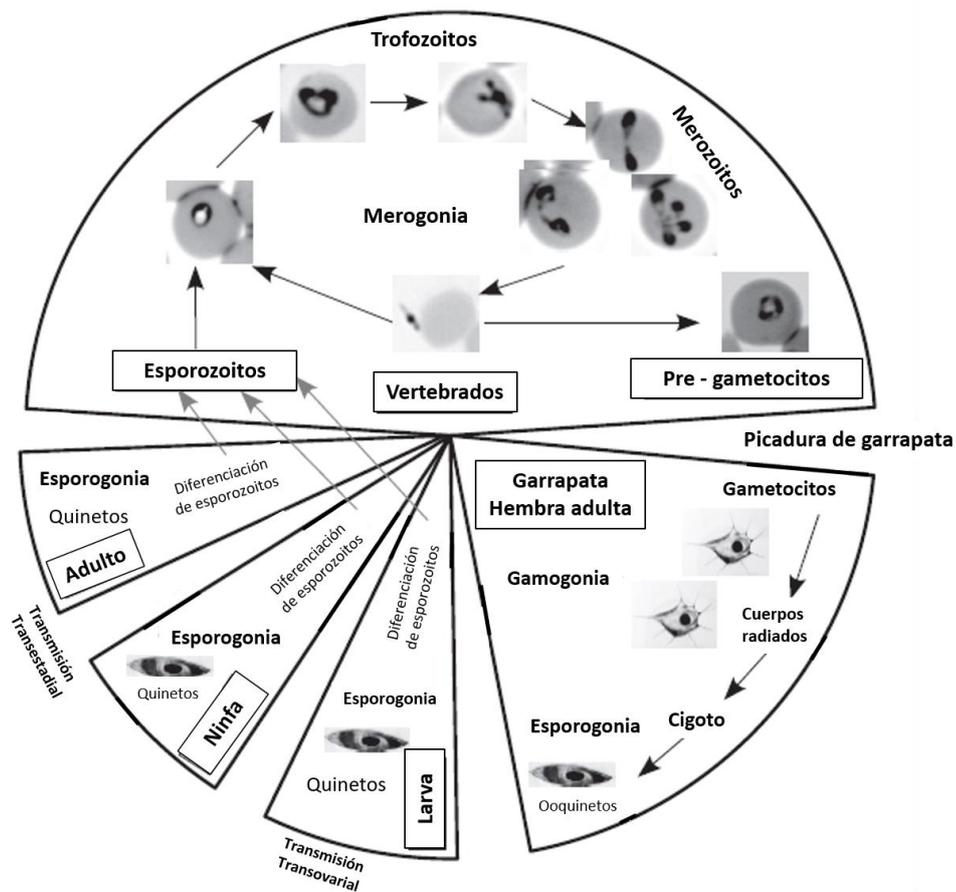


Figura 3. Ciclo de vida de *Babesia* spp. Fuente: Chauvin et al., 2009.

### 2.3 Babesiosis animal y humana.

La incidencia de babesiosis en humanos se ha incrementado en las últimas cinco décadas en los Estados Unidos (Vannier & Krause, 2012; Hunfeld et al., 2008; Krause et al., 2003; Joseph et al., 2011; Krause et al., 1991; White et al., 1998). La mayoría de los casos ocurren en el verano, en áreas donde la garrapata vector y el reservorio vertebrado están en completa relación o proximidad a los humanos. En algunos sitios y en ciertos años de alta transmisión, la babesiosis puede imponer una significancia en salud pública.

Siete parásitos de babesia se han encontrado relacionados con babesiosis en humanos: *B. microti*, *B. divergens*, *B. bovis*, *B. canis*, *B. duncani*, *B. venatorum* y un nuevo tipo de *Babesia* sp. similar a *B. ovis* nombrada KO1 (Calvo De Mora, Garcia-Castellano, Herrera, Jimenez-Alonso, 1985; Marsaudon et al., 1995; Gorenflot, Moubri, Precigout, Carcy y Schetters, 1998; Homer et al., 2000; Gray y Weiss, 2008; Hildebrandt in press) (Tabla 2). Los casos de babesiosis se han reportado a lo largo del mundo, donde *B. divergens* es la causa más común de la enfermedad en Europa, aunque también se han descritos pocos casos de infección con relación a *B. microti* y *B. venatorum*. La infección en humanos con *B. venatorum* es endémica en China, donde se ha reportado *B. divergens* y *B. microti* (Jian et al., 2014; Vannier y Krause, 2014). Se ha demostrado que *B. bovis*, *B. divergens* y *B. bigemina* afectan más a los pacientes esplenectomizados, los ancianos y los inmunosuprimidos, mientras *B. microti* puede presentarse más en los inmunocompetentes (Suarez & Castellano, 1997).

<b>Especies</b>	<b>Vector</b>	<b>Hospedero vertebrado</b>	<b>Ocurrencia geográfica</b>
<i>B. divergens</i>	<i>Ixodes ricinus</i> , <i>Ixodes ventralloi</i>	Ganado, rumiantes salvajes	Europa
<i>B. venatorum</i>	<i>Ixodes ricinus</i>	Ciervos	China, Europa
<i>B. ovis – KO1</i>	<i>Hemaphysalis longicornis</i>	Ovejas	Korea, Asia
<i>B. bovis</i>	<i>Boophilus</i> spp., <i>Ixodes</i> spp. <i>Rhipicephalus bursa</i>	Ganado, búfalo, rumiantes salvajes	Sur de Europa, África, América, Asia, Australia
<i>B. canis</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> , <i>Hemaphysalis leachi</i> , <i>Dermacentor</i>	Perros, caninos salvajes	Europa, Asia, África. América, Australia

<i>reticularis</i>			
<i>B. microti</i>	<i>Ixodes trianguliceps</i> , <i>Ixodes ricinus</i> , <i>Ixodes ovatus</i> , <i>Ixodes scapularis</i> , <i>Ixodes spinipalpis</i> , <i>Ixodes angustus</i> , <i>Ixodes muris</i>	Roedores	Europa, Asia, América
<i>B. duncani</i>			Estados Unidos

Tabla 2. Especies de Babesia con potencial zoonótico (Modificado). Fuente: Hunfeld, Hildebrandt, Gray; 2008.

El humano adquiere el parásito a través de la picadura de una garrapata o por transfusión de sangre (Homer et al., 2000). La infección por el parásito es de manera accidental, y se ha encontrado que los humanos no son los hospederos definitivos (Gubernot et al., 2009), algunos de los modos de transmisión poco comunes son transplacental y perinatal (Dobroszycki et al., 1999; Della-Giustina et al., 2005). Las características clínicas en pacientes con babesiosis varían sustancialmente de asintomáticas a potencialmente mortales, dependiendo de las condiciones del paciente y el parásito involucrado. En general, pacientes de todas las edades, incluidos los niños se ven afectados, pero la mayoría se presenta clínicamente entre los 40 y 60 años (Mylonakis, 2001; Hunfeld y Brade, 2004).

En el año 2003 se reportó el primer caso humano de babesiosis para Colombia en el departamento de Antioquia, en este estudio se encontraron 7 personas con anticuerpos específicos de tipo IgM e IgG para *Babesia*. Sin embargo, solo una de ellas fue positiva por diagnóstico parasitológico y por serología para *B. bovis* (Ríos, Alvarez y Blair, 2003). Posteriormente un estudio realizado en el municipio de

Puerto Berrío de este mismo departamento, se encontró un nivel de seroreactividad para *B. bovis* superior a 75% en una población de bovinos (Ríos, Zapata, Reyes, Mejía y Baena, 2010); y luego en la subregión del Magdalena Medio se detectó la infección mediante técnicas moleculares y microscopia directa en ganado y garrapatas, la positividad de *B. bigemina* fue de 59,9% y 79,2%, respectivamente (Rios-Tobón, Gutiérrez y Ríos, 2014). En el 2008, para el departamento de Córdoba se detectaron anticuerpos contra *B. microti* en 31% de los 80 individuos analizados (Buevas, Alvis, Buevas, Miranda, Mattar, 2008). Aún se desconocen que otras especies de *Babesia* existen en garrapatas.

#### **2.4 Diagnóstico de Babesiosis.**

Para el diagnóstico de *Babesia*, existen técnicas de laboratorios microscópicas, serológicas y moleculares (Liu et al., 2016; Hamšíková et al., 2016; Qurollo et al., 2017). El examen microscópico de frotis de sangre delgada y gruesa que son teñidos con Giemsa permite la detección de parásitos. Sin embargo, en técnicas serológicas la detección de anticuerpos son útiles para detectar individuos infectados con muy bajos niveles de parasitemia (como donantes de sangre asintomáticos en los casos asociados a transfusión). La prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes (IFA) utilizando parásitos *B. microti* como antígeno detecta anticuerpos en 88-96% de los pacientes con infección por *B. microti*. La especificidad es del 100% en los

pacientes con otras enfermedades transmitidas por garrapatas o personas no expuestas al parásito (Krause et al., 1994). También se han descrito ensayos para la detección de parásitos basada en PCR tanto para *B. microti* (Persing et al., 1992) y *B. divergens* (Olmeda et al., 1997). Los estudios han demostrado que estos ensayos son más sensibles y más específicos para la detección de casos agudos facilitando la diferenciación entre *Babesia* y *Plasmodium*, que no es fácilmente distinguible por microscopía. Generalmente se basan en la amplificación de secuencias de interés (genes o regiones no codificantes) y su análisis consiste en la comparación de estas secuencias con una base de datos de secuencias conocidas que permiten la identificación definitiva del agente infectante. Además, los enfoques moleculares son muy valiosos en la investigación de nuevas especies de *Babesia* que se han relacionado en las últimas infecciones humanas en los Estados Unidos y en Europa, algunos de los estudios realizados han hecho uso del gen parcial de citocromo B, ITS, 18S (Tian et al., 2013; Luo et al., 2005; Criado-Fornelio, Martinez, Buling, 2003).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general.

Identificar protozoos del género *Babesia* asociados a garrapatas de ambientes rurales del departamento de Sucre y estimar un riesgo ixodológico parcial a través de modelos de distribución de garrapatas para la región Caribe de Colombia.

#### 3.2 Objetivos específicos.

Detectar agentes del género *Babesia* en garrapatas obtenidas de animales domésticos de los municipios de La Unión, San Marcos, San Onofre, Tolúviejo y Sincelejo.

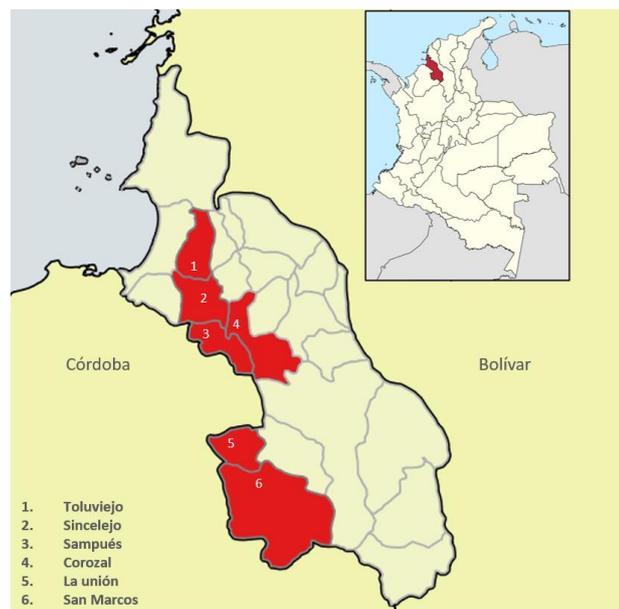
Identificar mediante análisis filogenético las especies de *Babesia* que infectan a las garrapatas analizadas.

Generar modelos de distribución potencial de las especies de garrapatas infectadas con *Babesia* para estimar áreas de riesgo ixodológico en la región Caribe de Colombia.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Área y tipo estudio.

Este estudio se desarrolló en los municipios de San Marcos, La Unión (subregión San Jorge), Toluviejo (subregión Golfo del Morrosquillo), Sampués, Corozal (subregión Sabanas) y Sincelejo (subregión Montes de María) del departamento de Sucre. Este departamento se encuentra ubicado entre los departamentos de Córdoba y Bolívar, y está enmarcado básicamente en la zona de vida Bosque Seco Tropical (BS-T) según la escala de Holdridge (Figura 4). El presente estudio es de tipo retrospectivo.



*Figura 4.* Ubicación geográfica de los municipios del departamento de Sucre donde fueron realizados los muestreos.

#### **4.2 Recolección e identificación taxonómica de garrapatas del municipio de La Unión.**

Las garrapatas fueron recolectadas mediante búsqueda activa manual sobre el cuerpo de animales domésticos como caninos, equinos y bovinos. Los ectoparásitos recolectados fueron depositados en viales con isopropanol debidamente rotulados con un código único que representa la localidad, área de muestreo, especie de hospedero y fecha de captura, luego fueron transportados hasta el laboratorio del Grupo Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Sucre, donde se determinó su estadio de desarrollo, estado alimenticio y fueron identificados taxonómicamente hasta el nivel de especie usando las claves de Barros-Battesti et al., (2006), con la ayuda de un estereomicroscopio de luz fría acoplado a un sistema de fotodocumentación utilizando el objetivo de 100X.

#### **4.3 Extracción de ADN de garrapatas.**

Los extractos de ADN de las garrapatas de los municipios de San Marcos, Toluviejo, Sampedo, Corozal y Sincelejo fueron obtenidos con el sistema QIAmp DNA MiniKit (Qiagen, Alemania) y se encontraban depositados en el laboratorio del grupo Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Sucre. Mientras que las muestras del municipio de La Unión fueron recolectadas exclusivamente para la realización del presente trabajo.

Debido a limitaciones para la obtención de los extractos con el sistema QIAmp DNA MiniKit (Qiagen, Alemania) para los ectoparásitos colectados en el municipio de La Unión, se decidió comparar varios métodos de extracción con los sistemas de Columns (Guevara, Vertel y Morinson, 2019). Finalmente se decidió emplear un método basado en sales para la extracción de ADN de garrapatas de La Unión, ya que el extracto de ADN es completamente funcional para aplicaciones como PCR sin comprometer los resultados de la investigación en curso.

La extracción de ADN de las garrapatas se realizó a grupos de artrópodos o de forma individual dependiendo del tamaño de los ectoparásitos, estado de desarrollo, estado alimenticio y especie. Cada garrapata o grupo de garrapatas fue macerado mecánicamente con micropistilos estériles siguiendo el protocolo de altas concentraciones de sales descrito por Aljanabi & Martínez (1997), cada muestra se resuspendió en 50 $\mu$ L de agua ultra pura.

La calidad de los extractos de ADN fueron evaluados mediante la cuantificación del material genético total por microlitro de solución, y además fue sometido a control de calidad mediante la amplificación del gen constitutivo 16S (gen mitocondrial) para garrapatas. Los extractos de ADN de las garrapatas de los municipios de San Marcos, Toluviéjo, Sincelejo, Sampués y Corozal también fueron sometidos al mismo procedimiento.

#### 4.4 Detección de piroplasma.

El ADN extraído fue utilizado como moldes para la amplificación de un fragmento que pertenece a la Secuencia Interna Transcrita 1 de piroplasma, mediante una PCR anidada (PCR-ITS1n), utilizando los cebadores externos ITS-15C (5'-CGA TCG AGT GAT CCG GTG AAT TA-3') e ITS-13B (5'-GCT GCG TCC TTC ATC GTT GTG-3') (Shock et al., 2011), la mezcla de reacción de PCR contenía 2,5µl bufer de reacción NH<sub>4</sub> 10x, 0,75µl solución MgCl<sub>2</sub> 50mM, 0,5µl mezcla de dNTP 10mM, 1µl de cada cebador, 1,5U de Taq polimerasa (Bioline™), 15,95µl agua ultrapura y 3µl de ADN (5–15 ng totales por reacción). Para la PCR anidada, 1µl del producto primario fue usado como plantilla en la segunda reacción con un volumen final de 25µl que contenía los componentes descritos en la primera ronda y los cebadores internos ITS-15D (5'-AAG GAA GGA GAA GTC GTA ACA AGG-3') e ITS-13C (5'-TTG TGT GAG CCA AGA CAT CCA-3'). Los parámetros del perfil térmico para desarrollar la primera y segunda reacción se tuvieron en cuenta los parámetros del perfil térmico descritos por en Shock et al., (2011).

Las muestras analizadas que presentaron bandas compatibles con ITS1 (entre 300 y 500pb) fueron consideradas positivas. Los extractos de ADN positivos a ITS1 de piroplasma fueron sometidas a una nueva PCR para amplificar una región de ~450pb de 18S ARNr (PCR-18S) de piroplasmidos con los cebadores Piro-A1 (5'-AGG GAG CCT GAG AGA CGG CTA CC-3') y Piro-B (5'-TTA AAT ACG AAT GCC CCC

AAC-3'). El perfil térmico empleado consistió de desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturalización por 30 segundos a 94°C, alineamiento por 30 segundos a 60°C y una extensión de 30 segundos a 72°C, finalmente una etapa de extensión durante 5 minutos a 72°C, (modificado de Silva et al., 2010).

#### **4.5 Análisis de infección por piroplasma.**

Se realizó un análisis estadístico descriptivo de los datos, se calculó la frecuencia mínima de infección (FMI) por grupos analizados y se evaluó las asociaciones de porcentaje de infección a *Babesia* con las variables especie de garrapata y sitio de muestreo de los ectoparásitos computando el estadístico Fisher para prueba de proporciones múltiples con el paquete FMSB en el programa estadístico R 3.5.1 (R Core Development Team). Además, se calculó la frecuencia máximo-verosímil de infección (FMVI) por *Babesia* por cada especie de garrapatas con el programa PoolScreen 2.0 (Katholi et al., 2006).

#### **4.6 Análisis filogenético.**

Para realizar los análisis filogenéticos se escogió la secuenciación de los productos de PCR del gen 18S de *Babesia* ya que este marcador genético es el mejor representado en bases de datos genéticas para Piroplasmas. Cuando no fue posible analizar 18S se procedió a realizar secuenciación de la región ITS1. Los productos de PCR fueron evaluados en un NanoDrop 2000 para determinar su

concentración, calidad y pureza del ácido nucleico amplificado y el servicio de secuenciación fue realizado por la empresa Macrogen (Seoul, South Korea).

Los electroferogramas obtenidos a partir de las secuencias fueron ensamblados en GeneStudio Pro 2.2.0 (GeneStudio Inc., Georgia, USA), luego las secuencias consenso fueron sometidas a análisis preliminar de similitud en BLASTn de NCBI (Wheeler y Bhagwat 2007). Posteriormente, las secuencias consenso fueron incluidas en matrices de secuencias de referencia de piroplasmas y se realizó alineamiento con el programa MAFFT 7 (Kato y Standley, 2013). Finalmente se reconstruyeron árboles de secuencias Neighbor-Joining utilizando distancias patrísticas (P-distance) y 1.000 pseudoréplicas de Bootstrap en MEGA 5.2 (Tamura et al., 2011) para identificar las especies de piroplasmas detectadas de acuerdo al agrupamiento con especies de referencia. Debido a que los alineamientos de 18S e ITS1 suelen presentar gaps, estos fueron removidos solo mediante comparaciones entre pares de secuencias, esto permitió maximizar el área analizable de los alineamientos.

#### **4.7 Modelos de distribución potencial de especies de garrapatas infectadas con *Babesia*.**

A las especies de garrapatas a las que se les detectó *Babesia*, se le aplicó un modelamiento de distribución potencial utilizando el algoritmo

de Máxima Entropía, desarrollado por Phillips et al., (2006) e implementado en el programa MaxEnt 3.3.k se construyó utilizando los puntos geográficos donde se ha reportado la presencia de estas especies de garrapatas en Colombia, junto con las variables ambientales de estas zonas. Con la información se creó un perfil de “preferencias ambientales” el cual se proyectó sobre un espacio geográfico de interés con el fin de obtener una distribución potencial de donde se pueden hallar las especies de interés (Phillips, Anderson y Schapire, 2006; Elith et al., 2011).

Las variables bioclimáticas utilizadas se tomaron de la base de datos WorldClim a una resolución de 30arcsec, y se sometieron a un proceso de selección de variables poco correlacionadas en el espacio multivariado, mediante análisis de componentes principales y análisis factorial de nicho ecológico, de acuerdo a los lineamientos antes descritos (Elith et al., 2011; Calenge, 2006; Estrada, Horak y Petney, 2008). El modelo de distribución potencial de máxima entropía se obtuvo a través de la ejecución de 30 réplicas con 500 iteraciones cada una, utilizando el 75% de los registros de presencia de las especies de garrapatas de interés para generar modelos de distribución y el 25% restante de los registros para evaluar el desempeño del modelo. Todas las proyecciones geográficas de los modelos de distribución potencial generados en ASCII fueron posteriormente procesados en el programa QGIS 2.8 (QGIS Development Team). Los modelos de distribución potencial obtenidos permitieron estimar cuales áreas geográficas del

Caribe Colombiano son aptas para el establecimiento de las garrapatas de interés dadas unas condiciones climáticas observadas para la especie. De tal forma que se puede constituir en un primer paso para determinar en qué áreas es posible encontrar a potenciales vectores de parásitos del género *Babesia*.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Garrapatas.

De un total de 1.084 garrapatas, 225 garrapatas proceden de Corozal, 211 de Toluviéjo, 207 de San Marcos, 195 de La Unión, 147 de Sincelejo y 99 de Sampués. Con estas garrapatas recolectadas se formaron grupos de individuos dependiendo del tamaño de los ectoparásitos (1-5 garrapatas), estado de desarrollo, estado alimenticio y especie para la realización de la extracción de ADN, obteniendo un total de 350 grupos, que correspondieron a 72, 63, 61, 70, 55 y 29 grupos para los municipios de Corozal, Toluviéjo, San Marcos, La Unión, Sincelejo y Sampués; respectivamente (Tabla 3).

El género de garrapata de mayor abundancia fue *Rhipicephalus* (738/1.084, 68%) (Tabla 3). 487 garrapatas de *Rhipicephalus sanguineus*, 336 *Dermacentor nitens* y 251 *Rhipicephalus microplus* fueron recolectadas de los seis municipios. Solo 7 *Amblyomma mixtum* y 3 *Amblyomma auricularium* fueron recolectadas en un municipio (Tabla 3).

Especie	Área						Total
	Corozal	Sampués	San Marcos	Sincelejo	Toluviéjo	La Unión	
<i>D. nitens</i>	62 (19)	64 (17)	68 (19)	25 (7)	60 (17)	57 (18)	336 (97)
<i>R. sanguineus</i>	157 (51)	28 (9)	92 (28)	88 (38)	106 (31)	16 (8)	487 (165)
<i>R. microplus</i>	6 (2)	7 (3)	44 (13)	34 (10)	38 (11)	122 (44)	251 (83)
<i>A. auricularium</i>	0	0	3 (1)	0	0	0	3 (1)
<i>A. mixtum</i>	0	0	0	0	7 (4)	0	7 (4)
Total	225 (72)	99 (29)	207 (61)	147 (55)	211 (63)	195 (70)	1084 (350)

Tabla 3. Distribución de especies de garrapatas en las diferentes áreas de recolección. La cantidad relacionada en paréntesis indica el número de grupos formados.

De acuerdo al animal hospedero 501 garrapatas fueron colectadas sobre perros y 319 en caballos. Así mismo, de los 350 grupos de garrapatas resultantes en total pertenecieron a 172 perros, 94 caballos, 47 bovinos, 33 burros y 4 por el método de arrastre (Tabla 4).

Especie	Animal					Total
	Arrastre	Burro	Caballo	Perro	Vaca	
<i>D. nitens</i>	0	92 (29)	232 (64)	5 (2)	7 (2)	336 (97)
<i>R. sanguineus</i>	0	3 (1)	0	484 (164)	0	487 (165)
<i>R. microplus</i>	0	3 (3)	87 (30)	9 (5)	152 (45)	251 (83)
<i>A. auricularium</i>	0	0	0	3 (1)	0	3 (1)
<i>A. mixtum</i>	7 (4)	0	0	0	0	7 (4)
<b>Total</b>	<b>7 (4)</b>	<b>98 (33)</b>	<b>319 (94)</b>	<b>501 (172)</b>	<b>159 (47)</b>	<b>1084 (350)</b>

Tabla 4. Cantidad de especies de garrapatas encontradas en los diferentes animales referenciados en el estudio. La cantidad relacionada en paréntesis indica el número de grupo de garrapatas formadas.

## 5.2 Detección molecular de piroplasmas

Del total de los 350 grupos de garrapatas evaluados por PCR anidado para el marcador ITS1, en 54 de ellos fue posible detectar la presencia de bandas entre 200-500pb de Piroplasma (Figura 5). La secuenciación de algunas de estas bandas mostró que estas representan las regiones ITS1 de piroplasmas a excepción de la banda de 200pb (ITS1 de Hongo). Por ello, se pudo establecer que se encontró infección por estos protistas del 10.2%, es decir en 36 grupos de los 350 evaluados.

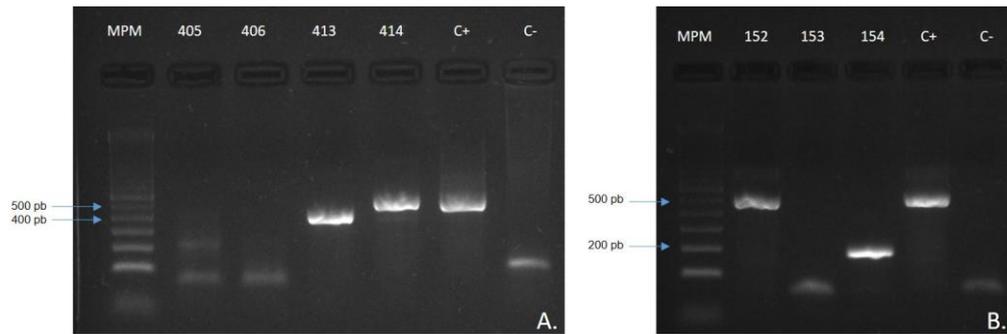


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de PCR-ITS1n de muestras seleccionadas. A. MPM: marcador de peso molecular 100pb; muestras: 405, 406, 413 y 414; C+= control positivo; C-= control negativo. B. PCR-ITS1n. MPM= marcador de peso molecular 100 pb; Muestras: 152, 153 y 154; C+= control positivo; C-= control negativo.

Posteriormente, se calculó la frecuencia mínima de infección (FMI) por grupos analizados donde se encontró que el municipio de Sampués presentó la mayor FMI de 7,07% (Tabla 5). El resultado de la comparación múltiple de proporciones entre la FMI y la variable de municipios mostró diferencias significativas entre el municipio de la Unión y Sampués ( $p$ - value 0,0024), La unión y Sincelejo ( $p$ - value 0,0231), y La unión y Tolviejo ( $p$ - value 0,0209) (Figura 6).

Municipios	Cantidad de grupos de garrapatas (Positivos)	Cantidad de garrapatas	FMI (%)	FMVI (%)
Corozal	72 (7)	225	3.10	3.20
Sampués	29 (7)	99	7.07	7.90
San Marcos	61 (5)	207	2.40	2.46
Sincelejo	55 (7)	147	4.76	4.80
Tolviejo	63 (9)	211	4.20	4.40
La Unión	70 (1)	195	0.51	0.51

Tabla 5. Análisis de infección por piroplasma por municipios. FMI: Frecuencia mínima de infección. FMVI: frecuencia máximo-verosímil de infección.

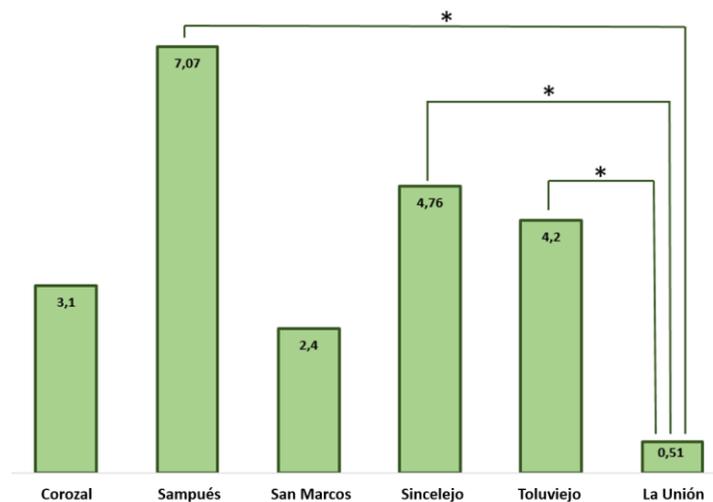


Figura 6. Asociación de porcentaje de infección a *Babesia* y variable sitio de muestreo de los ectoparásitos. Los valores relacionados en cada barra se encuentran en unidad de porcentaje (%). \*Indica p value < 0.05.

Por otro lado, el análisis de infección por piroplasma teniendo en cuenta la especie, mostró que *D. nitens* presentó un FMI de 5,65%, seguido por *R. microplus* de 2,39% y *R. sanguineus* 1,84%. La FMVI para *D. nitens* fue la mayor (6,08%) (Tabla 6). La comparación múltiple de proporción entre FMI y la variable especie mostró diferencias significativas para la pareja *R. sanguineus* y *D. nitens* (p- value 0,0052).

Especies	Cantidad de grupos de garrapatas (Positivos)	Cantidad de garrapatas	FMI (%)	FMVI (%)
<i>R. sanguineus</i>	165 (9)	487	1.84	1.87
<i>R. microplus</i>	83 (6)	251	2.39	2.41
<i>D. nitens</i>	97 (19)	336	5.65	6.08

Tabla 6. Análisis de infección por piroplasma por especies. FMI: Frecuencia mínima de infección. FMVI: frecuencia máximo-verosímil de infección

Al analizar los 36 grupos usando los cebadores PiroA1- PiroB, 15 de ellos amplificaron un producto aproximado de 450pb (Figura 7), de los

cuales, 6 fueron recolectados en perros, 5 en caballos, 3 en burros y un grupo colectado por el método de bandera, que correspondió a 3,4%, 5,3%, 9,1% y 25% del número total de grupos de garrapatas procesadas a partir de perros, caballos, burros y método de bandera, respectivamente. Los piroplasmas no fueron detectados a partir de garrapatas colectadas en vaca. Los extractos de ADN de grupos de garrapatas que resultaron positivos a piroplasmas pertenecieron a los municipios de Sampués (6 grupos), Toluviejo (4 grupos), Sincelejo (3 grupos), Corozal (1 grupo) y San Marcos (1 grupo).

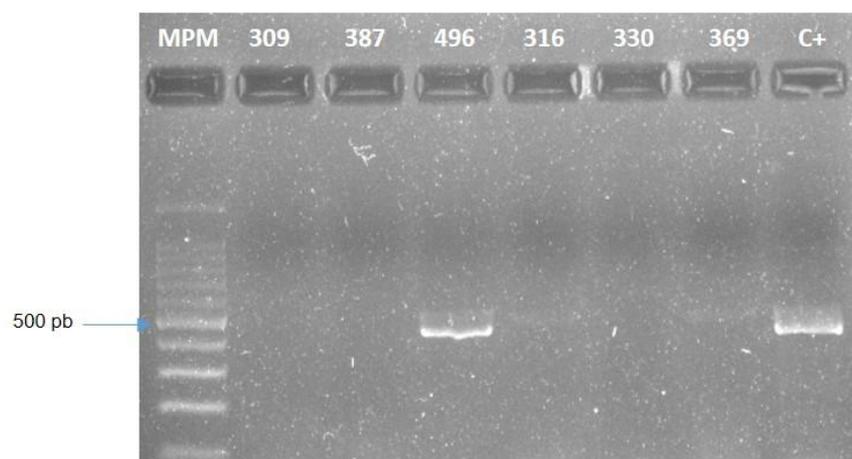


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de PCR 18S de piroplasma usando los cebadores PiroA1 - PiroB. Líneas: 1, marcador de peso molecular 100 pb; 2-7, muestras analizadas (309, 387, 496, 316, 330, 369); 8, control positivo.

De las quince muestras amplificadas, solo fue posible secuenciar 6 de ellas; las especies de patógenos identificados fueron *B. equi* (= *T. equi*), *B. canis vogeli* y *B. caballi*, también se logró la identificación de *Hepatazoon canis* (Tabla 7). Por otro lado, 4 muestras amplificadas por PCR anidado para ITS1, fueron seleccionadas de acuerdo al tamaño de la banda en el gel de agarosa (300-500 pb) y la especie de

garrapata en la que fue detectada, las especies identificadas fueron *B. canis vogeli*, *B. bigemina*, *B. equi* (= *T. equi*) y *B. caballi* (Tabla 7).

Muestra	Garrapata	Sexo	Hospedero	Piroplasma	Secuencia	Municipio
P264	<i>R. microplus</i>	H	Caballo	<i>B. equi</i>	18S	Sampués
P278	<i>R. microplus</i>	H	Perro	<i>H. canis</i>	18S	Sincelejo
P280	<i>R. sanguineus</i>	H	Perro	<i>B. canis vogeli</i>	18S	Sincelejo
P301	<i>R. microplus</i>	H	Burro	<i>B. equi</i>	18S	Toluviejo
P304	<i>D. nitens</i>	M	Caballo	<i>B. equi</i>	18S	San Marcos
P496	<i>D. nitens</i>	H	Caballo	<i>B. caballi</i>	18S	Sampués
P142	<i>D. nitens</i>	M	Burro	<i>B. canis vogeli</i>	ITS1*	Sincelejo
P254	<i>R. sanguineus</i>	M	Perro	<i>B. bigemina</i>	ITS1*	Sampués
P387	<i>D. nitens</i>	H	Burro	<i>B. equi</i>	ITS1**	Sincelejo
P414	<i>D. nitens</i>	H	Burro	<i>B. caballi</i>	ITS1**	Toluviejo

Tabla 7. Especies de piroplasmas encontrados de acuerdo al sexo, hospedero, diana de PCR y municipio relacionado con la especie de garrapata. \*Fragmento amplificado de 300-400pb, \*\* Fragmento amplificado de 400-500pb. Sexo H: hembra, M: macho.

Para el análisis filogenético de las muestras positivas se construyeron tres árboles Neighbor-Joining teniendo en cuenta los diferentes marcadores empleados, ITS1 de Piroplasma (Figura 8), 18S de Piroplasma (Figura 9) y 18S de Hepatozoon (Figura 10).

El árbol filogenético de acuerdo al marcador ITS1 de piroplasma mostró que, de las cuatro muestras secuenciadas, la secuencia consenso P142 se agrupó y fue identificada como *B. canis vogeli*, mientras que la secuencia consenso P254 fue identificada como *B. bigemina*, la secuencia consenso P414 fue identificada como *B. caballi* y la secuencia consenso P387 fue identificada como *B. equi* de acuerdo a las agrupaciones observadas (Figura 8).



El análisis filogenético para 18S de piroplasma muestra que tres secuencias consenso de los grupos P264, P301 y P304 se agrupan con *B. equi* (= *T. equi*). La secuencia de la muestra P496 se encontró agrupada con *B. caballi* con un soporte de rama de 98% y la secuencia consenso P280 fue identificada como *B. canis vogeli* dado su agrupamiento con un soporte de rama 100%. Por último, demostramos que la secuencia obtenida a partir del control positivo (C+) utilizado en todos los experimentos perteneció a *B. bigemina* con un soporte de 100% y que los resultados obtenidos no provienen de contaminaciones con los controles usados (Figura 9).

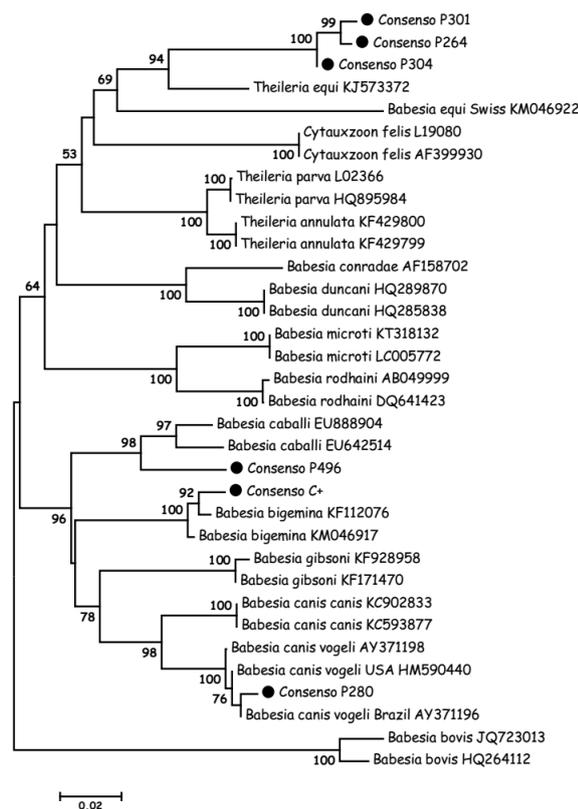


Figura 9. Análisis Neighbor-Joining de las secuencias 18S de piroplasma (Sum of Branch Length = 4.17682535). La base de datos analizada contenía 34 secuencias y el alineamiento 493 sitios.

Por último, el árbol filogenético realizado a partir de 18S de *Hepatozoon* ilustra claramente que la secuencia consenso P278 pertenece a *Hepatozoon canis* dado su agrupamiento con secuencias de esta especie y alto soporte de rama 100% (Figura 10).

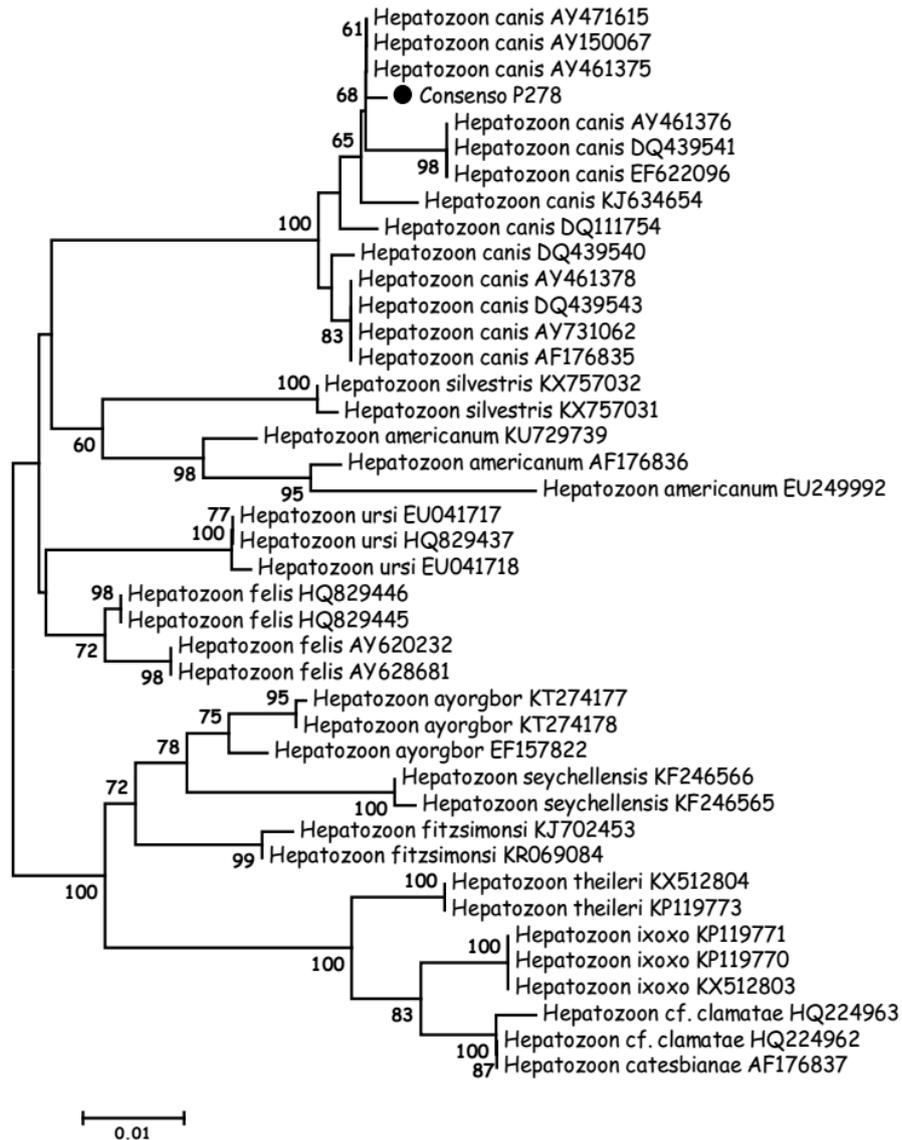


Figura 10. Análisis Neighbor-Joining de las secuencias 18S de *Hepatozoon* (Sum of Branch Length = 0.30126801). La base de datos analizada contenía 41 secuencias y el alineamiento tenía 523 sitios.

### 5.3 Modelos de distribución potencial de especies de garrapatas infectadas con *Babesia* en la región Caribe.

Fueron 19 variables bioclimáticas utilizadas para generar los modelos de distribución para la tres especies de garrapatas, donde la variable Altitud presentó un promedio de 1.559,25; 1.215,50 y 1.085,33 para *R. sanguineus*, *R. microplus* y *D. nitens*, respectivamente (Tabla 8).

Variables bioclimáticas	<i>R. sanguineus</i>	<i>R. microplus</i>	<i>D. nitens</i>
	Promedio	Promedio	Promedio
Bio1: Temperatura media anual (Tempmean)	19,262	21,830	22,65
Bio2: Rango de temperatura diurno medio (Temp. Máxima – Temp. Mínima) (Ratedime)	10,062	10,011	9,4
Bio3: Isotermalidad (Bio2/Bio7)(*100) (Isoterma)	79,87	84,58	89
Bio4: Estacionalidad de temperatura (desviación estándar * 100) (estatemp)	367,25	406,37	323,5
Bio5: Temperatura máxima del mes más caliente (Temameca)	25,512	27,908	28,066
Bio6: Temperatura mínima del mes más frío (Temimefr)	12,937	16,092	17,55
Bio7: Rango de temperatura anual (Bio5 – Bio6); (Ranteman)	12,575	11,815	10,516
Bio8: Temperatura media del trimestre más húmedo (Temetrhu)	19,025	21,624	22,516
Bio9: Temperatura media del trimestre más seco (Temetrse)	19,225	21,853	22,65
Bio10: Temperatura media del trimestre más caliente (Temetrca)	19,750	22,317	22,983
Bio11: Temperatura media del trimestre más frío (Temetrfr)	18,837	21,293	22,183
Bio12: Precipitación total anual (Pretoanu)	1.119,87	2.051,57	2.035,16
Bio13: Precipitación del mes más húmedo (Prmemahu)	162,75	280,02	278
Bio14: Precipitación del mes más seco (Prmemase)	30,87	59,64	75,83
Bio15: Estacionalidad de la	45,87	44,48	38,33

precipitación (coeficiente de variación) (Estaprec) (*100)			
Bio16: Precipitación del trimestre más húmedo (Prtrmahu)	408,50	728,09	692,5
Bio17: Precipitación del trimestre más seco (Prtrmase)	126,12	232,79	296,83
Bio18: Precipitación del trimestre más caliente (Prtrmaca)	267,75	44,97	573,16
Bio19: Precipitación del trimestre más frío (Prtrmafr)	295,50	579,1	669,33
Alt: altitud	1.559,25	1.215,50	1.085,33

Tabla 8. Promedio de variables bioclimáticas de acuerdo al hábitat de las especies de garrapatas relacionadas con el estudio.

Para la selección de las variables bioclimáticas, de las 19 analizadas, cuatro fueron seleccionadas de acuerdo a la baja correlación e importancia ambiental, las cuales fueron Altitud, Bio4, Bio16 y Bio18 (Figura 11). La correlación hallada entre Altitud y Bio4 fue -0,21; entre Altitud y Bio16 fue -0,11; Altitud y Bio18 fue 0,4; la variable Altitud fue seleccionada debido a la baja correlación con todas las variables.

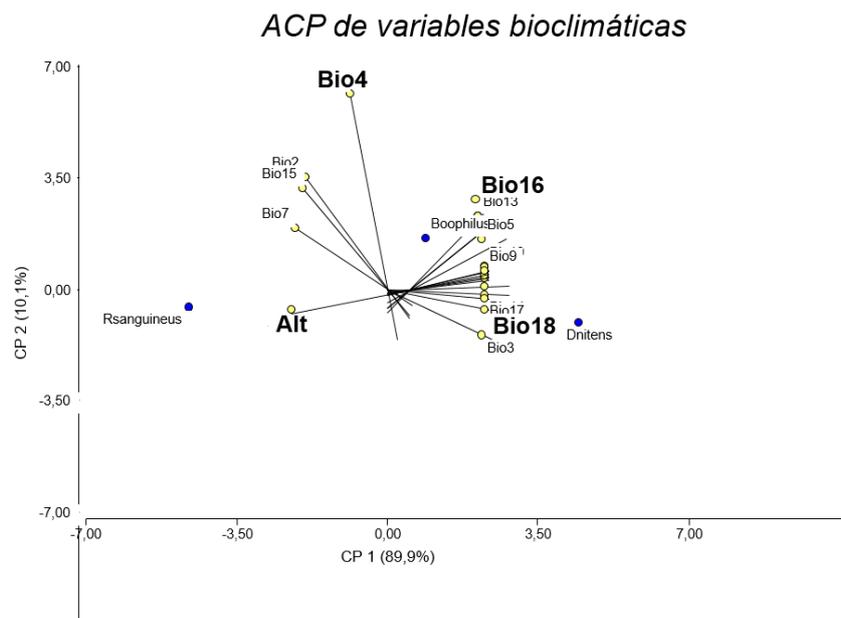


Figura 11. Análisis de componentes principales de variables bioclimáticas WorldClim.

De un total de 251 puntos encontrados en la literatura y georreferenciados para Colombia, 208 pertenecieron a la especie *R. microplus*, 29 a *R. sanguineus* y 14 a *D. nitens*. A partir de estos puntos y la relación de las cuatro variables bioclimáticas se logró obtener un modelo de distribución potencial para Colombia de acuerdo a las especies de garrapatas (Figura 12).

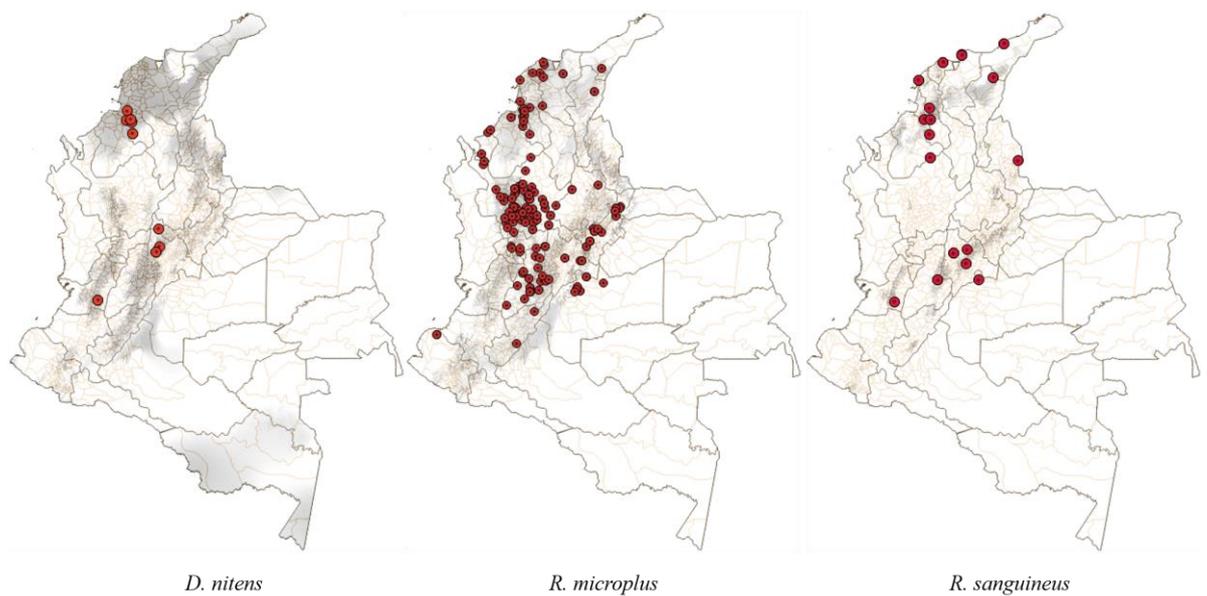
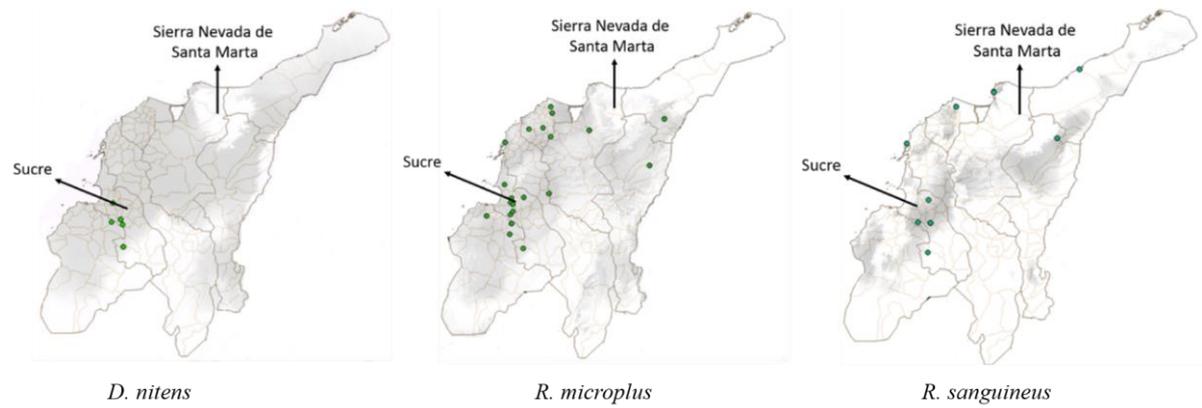


Figura 12. Modelos de distribución potencial de especies de garrapatas en el territorio colombiano. Los puntos de color rojo representan los registros encontrados en la literatura de cada una de las especies de garrapatas.

De acuerdo a la predicción delimitada a la región Caribe, los modelos ilustran en común una buena habitabilidad potencial en departamentos como Córdoba y Sucre y ausencia potencial de estas 3 especies de garrapatas en zonas altas como la Sierra Nevada de Santa Marta que presenta una altitud máxima de 5.775 m.s.n.m, y en el caso particular de *R. microplus* y *R. sanguineus* es notable la ausencia

potencial para las zonas áridas de la Alta Guajira y zonas inundables de la Depresión Momposina (Figura 13). La evaluación del modelo promedio fue de 98% de sensibilidad general para *D. nitens*, 91,63% para *R. microplus* y de 96,4 para *R. sanguineus*.



*Figura 13.* Modelos de distribución potencial de especies de garrapatas en la región Caribe de Colombia. Los puntos de color verde representan los registros encontrados en la literatura de cada una de las especies de garrapatas.

## 6. DISCUSIÓN

Actualmente el estudio de enfermedades transmitidas por garrapatas es de gran interés a nivel médico y veterinario debido a la percepción global de emergencia y re-emergencia de diversas enfermedades transmitidas por ellas (Paddock y Telford, 2010). Especialmente aquellas de tipo bacterianas como *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma* y *Borrelia* y de parásitos como *Babesia* (Quintero et al., 2018; Criado-Fornelio, Perez, Verdú-Exposito, 2018; Low et al., 2018; Smith et al., 2018).

La detección de los parásitos del género *Babesia* se puede hacer mediante el uso de métodos directos o métodos indirectos (detección de ADN del parásito) (Homer et al., 2000). El método utilizado con mayor frecuencia para la detección directa es la observación por microscopía de extendidos de sangre proveniente de animales en la etapa aguda de la enfermedad y su escasa utilidad para el análisis de infección de garrapatas (Bösse, Jorgensen, Dalgliesh, Friedhoff, de Vos, 1995). La detección molecular de piroplasmas en garrapatas es un tema poco explorado en Colombia, no obstante, el empleo del marcador genético ITS1 en nuestros ensayos, indica que el más del 10% (36/350 grupos) de los grupos analizados contenía ADN de *Babesia*. En contraste, con el marcador genético 18S solo fue del 4,2% (15/350). La detección hallada en este trabajo fue superior a la reportada en un estudio realizado en Estados Unidos, donde la detección de estos piroplásmidos fue de 2.1% en garrapatas (Shock et al., 2014). Así mismo la detección fue superior a la reportada por García-San Martín et al (3%) en un estudio realizado en el norte de España (García-San Martín, Barandika, Juste, García-Pérez y Hurtado, 2008) y difiere de los resultados encontrados en un estudio de detección molecular de *Theileria* spp. y *Babesia* spp. realizado en las

regiones noreste y sureste de Irán, donde se reportó una infección del 17.2% (Jafarbakloo et al., 2018).

En relación a la infección por *Babesia* en garrapatas, la especie que presentó mayor FMI fue *D. nitens*, encontrándose diferencias estadísticas entre esta y la de *R. sanguineus*. La especie *D. nitens* representó el 30% de todas las garrapatas analizadas, donde más del 90% de estos ectoparásitos fue colectada a partir de equinos de todos los municipios muestreados; las condiciones climáticas de estas zonas presentan una alta humedad relativa (>50%), hecho que no afectaría grandemente la eclosión de los huevos y la tasa de supervivencia larvaria de esta especie de garrapata (Guimaraes, Tucci y Barros-Battesti, 2001; Suzuki, Daemon y Faccini, 1999; Faustino et al., 2005). Por otro lado, la especie *R. sanguineus* representó la mayor cantidad de individuos utilizados en este trabajo, debido a que es el ectoparásito asociado al animal doméstico más común de las zonas, los perros. Esta abundancia de la garrapata se debe a que está adaptada diferencialmente para vivir en ambientes húmedos y secos (Yoder et al., 2006); no obstante, la detección de *Babesia* en estos organismos fue baja, lo que indica que probablemente una mayor distribución del vector no garantiza una mayor frecuencia de infección.

Este mismo contraste de datos sobre la frecuencia con la que los piroplasmas fueron detectados en garrapatas, pero entre las localidades analizadas, mostró diferencias estadísticas entre el municipio de La Unión (FMI: 0,51%) y los municipios de Sampedro, Sincelejo y Toluviejo, respectivamente. La diferencia encontrada entre el FMI de La Unión (hallada en *D. nitens*) y otros municipios del departamento de Sucre puede deberse presumiblemente a la escasa movilidad de los animales infectados de esta localidad en comparación con animales de otros municipios, generando un tipo de resistencia a la colonización de las garrapatas por *Babesia*. Teniendo en cuenta que el

ciclo de transmisión de *B. caballi* se ve afectado por la disponibilidad de animales susceptibles a una primoinfección, es decir, animales que han tenido contacto previo con esta *Babesia* no son buenas fuentes de parásitos para las garrapatas de *D. nitens* (Schwint, Knowles, Ueti, Kappmeyer y Scoles, 2008).

Diversos estudios han permitido conocer el estado y frecuencia de *Babesia*, donde se han descrito la existencia de casos en humanos (Ríos et al., 2003) y en bovinos (Blanco, Cardona y Vargas, 2016; Ríos et al., 2010), los cuales son los más comunes, sin embargo, también existen reportes en equinos y caninos (Calderón, Cardona, Vergara, 2013). Según los resultados obtenidos, se logró la identificación de *B. bigemina* mediante amplificación de ITS1 de piroplasmas a partir de un macho de *R. sanguineus* que fue colectado sobre un perro de la localidad de Sampués. Esta especie de *Babesia* que ha sido reportada tradicionalmente en bovinos y que se considera como piroplasma transmitido por *R. microplus*, sólo ha sido detectada en estas garrapatas en un estudio desarrollado en el Magdalena medio de Antioquia, donde se obtuvo una positividad del 79,2% para este piroplasma en garrapatas de ganado, mediante una PCR anidada especie-específica (Ríos et al., 2014).

Por otro lado, las especies *B. equi* y *B. caballi* fueron detectadas en dos grupos de *R. microplus* y un grupo de *D. nitens* que fueron recolectadas sobre caballos de Sampués y Toluviejo. Estos resultados no son inesperados si asumimos que estas garrapatas se estaban alimentando o se habían alimentado de equinos infectados. En Colombia el único paralelo molecular disponible, es un trabajo donde se reportó la primera evidencia molecular de al menos tres genotipos de *B. equi* en equinos del noroeste del país (Agudelo et al., 2017). Hasta la fecha no existen trabajos realizados con garrapatas que involucren a este piroplasma.

Otra especie de piroplasma detectada fue *B. canis vogeli*, encontrada en un grupo de hembras de *R. sanguineus* colectadas de un perro en la zona de rural del municipio de Sincelejo y detectada también en un grupo de machos de *D. nitens* recolectados a partir de un burro en la misma ciudad. *B. canis vogeli* se considera un hemoparásito de los perros latinoamericanos y es transmitida por *R. sanguineus*, por ello el hallazgo de este piroplasma en garrapatas de equinos eleva numerosos cuestionamientos sobre dos temas: I) la epidemiología del piroplasma y II) sobre el comportamiento “monoxénico” de *D. nitens* (que a menudo es catalogada como un ectoparásito exclusivo de equinos). En nuestro caso la detección de *B. canis vogeli* en *D. nitens* sugiere que estas garrapatas se podrían haber alimentado a partir de un perro infectado previo a su recolección a partir de equinos. A pesar de lo curioso de este hallazgo, este mismo fenómeno ha sido observado en investigaciones realizadas en garrapatas de Brasil y Palestina (Costa-Junior et al., 2009; Azmi et al., 2016). Para Colombia, existen pocos reportes en lo que concierne a la presencia de *Babesia* en perros (Galván, Miranda, Mattar, y Ballut, 2018; Vargas-Hernández et al., 2011), aunque es un tema frecuentemente reportado en Brasil (Passos, Geiger, Ribeiro, Pfister, y Zahler-Rinder, 2005; Ramos, Ramos, Araújo, Oliveira, y Souza, 2010; Spolidorio et al., 2010), Argentina (Eiras, Basabe, Mesplet, Schnittger, 2008) y Venezuela (Criado-Fornelio et al., 2007). En cuanto al trabajo con garrapatas, no existe mención alguna en la literatura científica sobre el hallazgo de este piroplasma en garrapatas de Colombia.

Por otra parte, el hallazgo de *H. canis* por reacción cruzada de los cebadores PiroA1 y PiroB, este resultado es poco frecuente, sin embargo, también fue obtenido por Silva et al., (2010) a partir de una muestra que por frotis sanguíneo había sido positiva tanto a *Babesia* como a gametocitos de *Hepatozoon*. De la misma manera, O'Dwyer et al., (2009) encontró reacción cruzada de estos cebadores después de

analizar 150 muestras sanguíneas de perros de zonas rurales de São Paulo. En Colombia, existe un reporte de caso sobre la presencia del parásito *Hepatozoon* en un paciente canino detectado mediante frotis sanguíneo, pero el comportamiento clínico del canino no correspondía a la enfermedad causada por este apicomplejo (Arcila, Castellanos, Sánchez y Díaz, 2005). Esta especie de apicompleja causa Hepatozoonosis, una enfermedad crónica debilitante, que está asociada a la coinfección por otros agentes patógenos, por ello algunos autores consideran que las infecciones por *H. canis* son realmente asintomáticas (McCully, Bassoon, Bigalke, De Vos y Young, 1976) y que los eventuales síntomas clínicos observados en perros se debe a otros agentes (Harmelin, Dubey, Yakobson, Nyska y Orgad, 1992; Murata et al., 1991; Gossett, Gaunt, y Aja, 1985). *H. canis* ha sido diagnosticado en asociación con *Toxoplasma gondii*, *Ehrlichia canis*, *B. canis* y *Haemobartonella canis* causando enfermedades severas (Baneth, Aroch y Presentey, 1997, Harmelim et al., 1992; Mundim et al., 1994; Mundim, Mundim, Jensen y Araújo, 1994, O'Dwyer, Guimarães y Massard, 1997; Gondim et al., 1998). En Colombia, no había sido reportada su presencia en garrapatas (hospedero intermediario, no vector) hasta la realización del presente trabajo.

Debido a que las especies *D. nitens*, *R. microplus* y *R. sanguineus* fueron las más abundantes y las encontradas con infección a piroplasmas, se crearon mapas de distribución potencial para estos tres ectoparásitos. A partir de los modelos de habitabilidad podemos observar que gran parte de la Región Caribe puede ser colonizable por estas garrapatas, a excepción de la Sierra Nevada de Santa Marta y algunas poblaciones de La Guajira que se consideran zonas agrestes ya que sus condiciones climáticas en el caso de la Sierra Nevada es variado con dos periodos lluviosos que van desde mayo a junio y desde septiembre a noviembre, sin embargo, suelen haber lluvias todos los días gracias a la altura y debido a la existencia de zonas inundables

que se consideran limitantes para el establecimiento de poblaciones permanentes de garrapatas.

Considerando la amplitud de habitabilidad de las especies modeladas en la Región Caribe, el ectoparásito que obtuvo una mayor distribución potencial fue *D. nitens*, seguido de *R. microplus* y por último *R. sanguineus*, siendo el mismo orden observado en la frecuencia (de mayor a menor) de infección de estas especies; es importante mencionar que en el trabajo realizado por Quintero et al., (2017) se encontró que *D. nitens* fue la garrapata más antropofílica (de las tres en mención), seguido de *R. microplus* y *R. sanguineus*, lo que indica que estas especies pueden representar un riesgo ixodológico para la población humana de la región. Por esta razón se consideraría estudiar el escenario epidemiológico de estos hemoparásitos y su relación con estos ectoparásitos en Colombia con diseños de muestreos específicos y con representatividad de otras regiones del país, involucrando también el análisis de potenciales vectores.

Los estudios encaminados en la búsqueda del agente patógeno en ectoparásitos, mediante el uso del material genético, es una de las herramientas más valiosas para impacto de ciertas infecciones en las economías locales y globales. En este sentido, la detección de un parásito en el hospedero intermediario o en el definitivo, es crucial para comprender la enfermedad y para poder diseñar estrategias apropiadas para su control (Awad et al., 2011). De esta manera, la detección de infección con *B. equi*, *B. canis vogeli*, *B. caballi*, *B. bigemina* y *H. canis* en las garrapatas analizadas, constituye un aporte valioso al conocimiento sobre la diversidad de hemoparásitos encontrados en garrapatas, sumado al potencial que tienen algunas de estas garrapatas para transmitirlos, pone de manifiesto la importancia de seguir realizando investigaciones que ayuden a comprender la

epidemiología de estos organismos de relevancia veterinaria e importante en salud pública.

## CONCLUSIONES

Las técnicas de diagnóstico molecular implementadas permitieron identificar una alta diversidad de piroplasmas, que a pesar de ser considerados hemoparásitos comunes de animales domésticos, la gran mayoría de ellas son detectadas por primera vez en garrapatas de nuestro país.

En 4 de los 6 municipios estudiados (en todas las subregiones analizadas) se presentó al menos una especie de Piroplasma, identificándose 4 especies en el departamento de Sucre: *B. bigemina*, *B. canis vogeli*, *B. equi* y *B. caballi*.

Se registra por primera vez *H. canis* en garrapatas de la zona rural de Sincelejo, mediante los cebadores PiroA1 y PiroB que flanquean una zona variable del gen 18S de Piroplasma, agregando otro microorganismo a la lista de hemoprotozoos que infectan perros.

Las relaciones piroplasma-garrapata-hospedero observadas muestran que algunas de las especies de garrapatas de la zona podrían tener un hábito hematofágico más amplio de lo anteriormente pensado. Esta información podría permitir mejorar nuestra comprensión de la epidemiología de estos hemoparasitos transmitidos por garrapatas en la región Caribe de Colombia.

## RECOMENDACIONES

Evaluar la utilidad de los métodos artesanales usados por los campesinos para el control de ectoparásitos.

Realizar investigaciones encaminadas al conocimiento de estabilidad enzoótica de la babesiosis; así como también la distribución, prevalencia en animales y humanos, determinación de resistencias a los garrapaticidas, efectividad de vacunas para garrapatas y otras enfermedades transmitidas por garrapatas en nuestro medio.

Estimar las pérdidas económicas causadas por garrapatas y enfermedades que transmiten, entre otras, que ayuden a elaborar planes de control y prevención acordes con la realidad nacional.

Realizar investigaciones dirigidas a determinar la seroprevalencia de especies de *Babesia* en la población humana y los factores asociados en la Región Caribe.

Realizar trabajos para identificar la riqueza de las especies de *Babesia* en animales de la fauna silvestre.

## BIBLIOGRAFÍA

- Agudelo-Ruíz, Y., Acevedo-Gutiérrez, L., Montoya-Sánchez, A., Paternina T, L., & Rodas G, J. (2017). Identificación molecular de hemoparásitos transmitidos por garrapatas en equinos del Noroeste de Colombia. *Revista MVZ Córdoba*, 22 (supl), 6004-6013
- Aljanabi, S.; Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.* 25:4692-4693.
- Arcila, V., Castellanos, V., Sánchez, M., Díaz S. (2005). Reporte de un caso de *Hepatozoon canis* en Colombia. *Revista Spei Domus*, 1(2), 40-45.
- Awad, H., Antunes, S., Galindo, R. C., do Rosário, V. E., De la Fuente, J., Domingos, A., & El Hussein, A. M. (2011). Prevalence and genetic diversity of *Babesia* and *Anaplasma* species in cattle in Sudan. *Veterinary Parasitology*, 181(2), 146-152.
- Azmi, K., Ereqat, S., Nasereddin, A., Al-Jawabreh, A., Baneth, G., Abdeen, Z. (2016). Molecular detection of *Theileria*, *Babesia*, and *Hepatozoon* spp. in ixodid ticks from Palestine. *Ticks Tick Borne Disease*, 7(5), 734–741
- Babes V. (1888). Sur l'he´moglobinurie bacte´rienne du boeuf. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences*, 107, 692–694.
- Baneth, G., Aroch, I., Presentey, B. (1997). *Hepatozoon canis* infection in a litter of Dalmatian dogs. *Veterinary Parasitology*, 70(1-3), 201-206.
- Barros-battesti, D.M.; Arzua, M.; Bechara, G.H. (2006). Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: Vox/ International Consortium on Ticks and Tick-borne Diseases (ICTTD-3)/Butantan. 223 p
- Betancourt, J. (2011). Parasitología veterinaria y cambio climático. *Biomédica (Colombia)*, 31(3), 279-282.

- Blanco, R., Cardona, J., & Vargas, M. (2016). Prevalencia de parásitos hematópicos endoglobulares en bovinos gyr puros en Córdoba, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*, (31).
- Brandt, F., Healy, G., Welch, M. (1977). Human babesiosis: the isolation of *Babesia microti* in golden hamsters. *Journal of Parasitology*, 63, 934–937.
- Brayton, K. A., Lau, A. O. T., Herndon, D. R., Hannick, L., Kappmeyer, L. S., Berens, S. J., ... Nene, V. M. (2007). Genome Sequence of *Babesia bovis* and Comparative Analysis of Apicomplexan Hemoprotozoa. *PLoS Pathogens*, 3(10), e148. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030148>.
- Bösse, R., Jorgensen, W., Dalglish, R. Friedhoff, K., de Vos, A. (1995) Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Veterinary Parasitology*, 57: 61-74
- Buevas, F., & Alvis, N., & Buevas, I., & Miranda, J., & Mattar, S. (2008). Alta Prevalencia de Anticuerpos contra Bartonella y Babesia microti en Poblaciones Rurales y Urbanas en dos Provincias de Córdoba, Colombia. *Revista de Salud Pública*, 10 (1), 168-177.
- Calderón, A., Cardona, J., & Vergara, Ó. (2013). Frecuencia de *Babesia* spp. En caballos de Montería, Córdoba (Colombia). *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 16(2), 451-458.
- Calenge, C. (2006). The package adehabitat for the R software: a tool for the analysis of space and habitat use by animals. *Ecological modelling*, 197: 516-519 (IF: 1.888).
- Calvo De Mora, A., Garcia Castellano, J. M., Herrera, C., Jimenez-Alonso, J. (1985). Babesiosis humana: aportacion de un caso de evolucion fatal. *Medicina Clinica*, 85, 515–516.
- Chauvin, A., Moreau, E., Bonnet, S., Plantard, O., & Malandrin, L. (2009). *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Veterinary Research*, 40(2), 37.

- Clarke, C., Rogers, E., Egan, E. (1989). Babesiosis: underreporting or case-clustering. *Postgraduate Medical Journal*, 65, 591–593.
- Costa-Júnior, L., Ribeiro, M., Rembeck, K., Rabelo, E., Zahler-Rinder, M., Hirzmann, J., Pfister, K. (2009). Canine babesiosis caused by *Babesia canis vogeli* in rural areas of the State of Minas Gerais, Brazil and factors associated with its seroprevalence. *Passos Research in Veterinary Science*, 86(2), 257–260.
- Criado-Fornelio, A., Martinez, A., Buling, A., Barb, J. C. (2003). Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe Part I. Phylogenetic analysis and evolutionary history. *Veterinary Parasitology*, 114, 173-194.
- Criado-Fornelio, A., Martinez, A., Buling, A., Barb, J. C. (2003b). Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history. *Veterinary Parasitology*, 114, 173–194.
- Criado-Fornelio, A., Rey-Valeiron, C., Buling, A., Barba-Carretero, J.C., Jefferies, R., Irwin, P. (2007). New advances in molecular epizootiology of canine hematic protozoa from Venezuela, Thailand and Spain. *Veterinary Parasitology*, 144, 261–269.
- Criado-Fornelio, A., Perez, M., Verdú-Exposito, Reinoso, S., Pérez-Serrano, J. (2018). Molecular epidemiology of parasitic protozoa and *Ehrlichia canis* in wildlife in Madrid (central Spain). *Parasitol Res.* Jul; 117 (7):2291-2298.
- Crowder, C., Rounds, M., Phillipson, C., Picuri, J., Matthews, H., Halverson, J., et al. (2010). Extraction of total nucleic acids from ticks for the detection of bacterial and viral pathogens. *Journal of Medical Entomology*, 47, 89–94.
- Della Giustina, M. E. S., Alvarenga, C. J. S., de Dardenne, M. A., Santos, R. V., Dantas, E. L., Pimentel, M. M., Sial, A. N. (2005). Estratigrafia Isotópica de dois intervalos carbonáticos na borda da Bacia dos Parecis. In.: X Congresso Brasileiro de Geoquímica e II

- Simposio de Geoquímica dos Países do Mercosul, Porto de Galinhos, Pernambuco, CD, 3pp.
- De Vos, A. J., Dalglish, R. J., Callow, L. L. (1987). Babesia. *Immune Responses in Parasitic Infections. Protozoa*, 3, 183–222.
- Dobroszycki, J., Herwaldt, B. L., Boctor, F., Miller, J. R., Linden, J., Eberhard, M. L., Yoon, J. J., Ali, N. M., Tanowitz, H. B., Graham, F., Weiss, L. M., Wittner, M. A. (1999). Cluster of Transfusion-Associated Babesiosis Cases Traced to a Single Asymptomatic Donor. *JAMA*, 281(10), 927–930.
- Eiras, F., Basabe, J., Mesplet, M., Schnittger, L. (2008). First molecular characterization of Babesia vogeli in two naturally infected dogs of BuenosAires, Argentina. *Veterinary Parasitology*, 157, 294–298
- Elith J, Phillips SJ, Hastie T, Dudík M, Chee YE, Yates CJ. (2011). A statistical explanation of MaxEnt for ecologists. *Diversity and Distributions*. 17: 43–57
- Estrada-Peña, A., Horak, I. G., Petney T. (2008). Climate changes and suitability for the ticks *Amblyomma hebraeum* and *Amblyomma variegatum* (Ixodidae) in Zimbabwe (1974-1999) *Vet. Parasitol*, 151. pp. 256-267
- Etkind, P., Piesman, J., Ruebush, T., Spielman, A., Juranek, D. (1980). Methods for detecting Babesia microti infection in wild rodents. *Journal of Parasitology*, 66, 107–110.
- Faustino, M., et al. (2005). Estudo comparativo de dados bioecológicos da fase não parasitária de Anocentor nitens (Acari: Ixodidae) (Neumann, 1897) em dois ambientes experimentais no Recife - PE. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, v. 8, n. 1, p. 43-52.
- Galván, C., Miranda, J., Mattar, S., Ballut, J. (2018). Babesia spp. in dogs from Córdoba, Colombia. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 24 (6): 829-834. DOI: 10.9775/kvfd.2018.19982
- García-Sanmartín, J., Barandika, J., Juste, R., García-Pérez, A., Hurtado, A. (2008). Distribution and molecular detection of Theileria

- and Babesia in questing ticks from northern Spain. *Med Vet Entomol.* 22(4):318-25.
- Gardner, M., Bishop R, Shah T, de Villiers EP, Carlton JM, et al. (2005). Genome sequence of *Theileria parva*, a bovine pathogen that transforms lymphocytes. *Science*, 309, 134–137.
- Gondin, L., Konayagawa, A., Alencar, N., Biondo, A., Takahira, R., Franco, S. (1998). Canine hepatozoonosis in Brazil: description of eight naturally occurring cases. *Veterinary Parasitology*, 74, 319-323.
- Gordon J. L., Sibley L. D. (2005). Comparative genome analysis reveals a conserved family of actin-like proteins in apicomplexan parasites. *BMC Genomics*, 6, 179.
- Gorenflot, A., Moubri, K., Precigout, E., Carcy, B., Schetters, T. P. (1998). Human babesiosis. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 92, 489–501.
- Gray, J., Weiss, L. M. (2008). Babesia microti. *Emerging Protozoan Pathogens*, 303–349.
- Gray, J., Zintl, A., Hildebrandt, A. (2010). Zoonotic babesiosis: overview of the disease and novel aspects of pathogen identity. *Ticks Tick Borne Dis*, 1, 3-10.
- Gossett, K., Gaunt, S., Aja, D. (1985). Hepatozoonosis and ehrlichiosis in dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 21, 265-267.
- Gubernot, D. M., Nakhasi, H. L., Mied, P.A, et al. (2009). Transfusion transmitted babesiosis in the United States: summary of a workshop. *Transfusion*, 49, 2759-71.
- Gray, J. S., Weiss, L. M. (2008). Babesia microti. *Emerging Protozoan Pathogens*, 303–349.
- Guimaraes, H., Tucci, E., Barros-Bettesti, D. (2001). Ectoparasitos de importancia veterinaria. *FAPESP*, 215 pp.
- Guimarães Da Silva, C. L. et al. (1997). Efeito de diferentes teores de umidade sobre a biologia da fase de vida livre de *Anocentor nitens* (Neumann) Schulze, 1937 (Acari: Ixodidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 6, n. 1, p. 29-32

- Gunders, A. (1977). Piroplasmal sporozoites in the argasid *Ornithodoros erraticus* (Lucas). *Experientia*, 33, 892–893.
- Harmelin, A., Dubey, J., Yakobson, B., Nyska, A., Orgad, U. (1992). Concurrent *Hepatozoon canis* and *Toxoplasma gondii* infections in a dog. *Veterinary Parasitology*, 43(1-2), 131-136.
- Herwaldt, B., Caccio, S., Gherlinzoni, F. (2003). Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 9, 942-948.
- Hildebrandt, A., Tenter, A.M., Straube, E., Hunfeld, K.P., in press. (2008). Human babesiosis in Germany: just overlooked or truly new? *Int. J. Med. Microbiol*
- Holman, P., Spencer, A., Droleskey, R. (2005). In vitro cultivation of a zoonotic *Babesia* sp. isolated from eastern cottontail rabbits (*Sylvilagus floridanus*) on Nantucket Island, Massachusetts. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 3995-4001.
- Homer, M. J., Aguilar-Delfin, I., Telford, S. R., Krause, P. J., Persing, D. H. (2000). Babesiosis. *Journal of Clinical Microbiology. Rev*, 13, 451–469.
- Hunfeld, K. P., Brade, V. (2004). Zoonotic *Babesia*: possibly emerging pathogens to be considered for tick-infested humans in Central Europe. *International Journal of Medical Microbiology*, 293 (37), 93–103.
- Hunfeld, K. P., Hildebrandt, A., Gray, J. S. (2008). Babesiosis: recent insights into an ancient disease. *International Journal for Parasitology*, 38, 1219-37.
- Hamšíková, Z., Kazimírová, M., Haruštiaková, D., Mahríková, L., Slovák, M., Berthová, L., Schnittger, L. (2016). *Babesia* spp. in ticks and wildlife in different habitat types of Slovakia. *Parasites & Vectors*, 9, 292.
- Jafarbekloo, A., Ramzgouyan, M., Shirian, S., Tajedin, L., Bakhshi, H., Faghihi, F., Sedaghat, M., Telmadarraiy, Z. (2018). Molecular

- Characterization and Phylogenetic Analysis of Theileria spp. and Babesia spp. Isolated from Various Ticks in Southeastern and Northwestern Regions of Iran. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 18(11):595-600.
- Jaramillo, J., Montenegro, V., de la Fournière, S., Sarmiento, N., Farber, M., & Wilkowsky, S. (2018). Development of an Indirect ELISA Based on a Recombinant Chimeric Protein for the Detection of Antibodies against Bovine Babesiosis. *Veterinary Sciences*, 5(1), 13.
- Jiang, J. F., Zheng, Y. C., Jian, R. R., et al. (2014). Epidemiological, clinical, and laboratory characteristics of 48 cases of Babesia venatorum infection in China: a descriptive study. *Lancet Infect Disease*, S1473-3099(14), 71046-1.
- Joseph, J. T., Roy, S. S., Shams, N., et al. (2011). Babesiosis in lower Hudson Valley, New York, USA. *Emerging Infectious Diseases journal*, 17, 843–7.
- Kakoma, I., Mehlhorn, H. (1993). Babesia of domestic animals. *Parasitic protozoa*, 7, 141–216.
- Katoh K, Standley DM. MAFFT: iterative refinement and additional methods. *Methods Mol Biol.* Forthcoming (2013).
- Katholi, C. R., Unnasch, T. R. (2006). Important experimental parameters for determining infection rates in arthropod vectors using pool screening approaches. *Am J Trop Med Hyg.* 74(5):779–785.
- Koch, R. (1904). Rhodesian investigations. *Cape Agricultural Journal* 24, 33-45.
- Krause, P. J., Telford, S. R., Ryan, R., et al. (1991). Geographical and temporal distribution of babesial infection in Connecticut. *Journal of Clinical Microbiology*, 29, 1–4.
- Krause, P., Telford III, R. Ryan, P. A. Conrad, M. Wilson, J. W. Thomford, and A. Spielman. (1994). Diagnosis of babesiosis: evaluation of a serologic test for the detection of Babesia microti antibody. *The Journal of Infectious Diseases*, 169, 923–926.

- Krause, P. J., McKay, K., Gadabaw, J., et al. (2003). Increasing health burden of human babesiosis in endemic sites. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68, 431–6.
- Levine, N. (1971). Taxonomy of the piroplasms. *Transactions of the American Microscopical Society*, 90, 2–33.
- Levine, N., Corliss, J. O., Cox, F. E., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B. M., Leedale, G. F., Loeblich, A. R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E. G., Page, F. C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J. & Wallace, F. G. (1980). A newly revised classification of the protozoa. *The Journal of Protozoology*, 27, 37–58.
- Levine, N. (1988). Blood parasites: the piroplasms. *The Protozoan Phylum Apicomplexa*, 2: 35–45.
- Liu, M., Cao, S., Vudriko, P., Suzuki, H., Soma, T., & Xuan, X. (2016). Babesia gibsoni internal transcribed spacer 1 region is highly conserved amongst isolates from dogs across Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 78(5), 863-865.
- Low, V., Prakash, B., Lim, Y., Vinnie-Siow, W., Sofian, M., AbuBakar, S. (2018). Detection of Anaplasmatataceae agents and co-infection with other tick-borne protozoa in dogs and Rhipicephalus sanguineus sensu lato ticks. *Exp Appl Acarol*. 2018 Aug; 75(4):429-435
- Luo, J., Yin, H., Liu, Z., Yang, D., Guan, G., Liu, A., Ma, M., Dang, S., Lu, B., Sun, C., et al. (2005). Molecular phylogenetic studies on an unnamed bovine Babesia sp. based on small subunit ribosomal RNA gene sequences. *Veterinary Parasitology*, 133(1), 1–6.
- McCully, R., Bassoon, P., Bigalke, R., De Vos, V., Young, E. (1976). Observations on naturally acquired hepatozoonosis of wild carnivores and dogs in the Republic of South Africa. Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 42(4), 117-133.
- Marsaudon, E., Camenen, J., Testou, D., Bourree, P., Samson, P., Luneau, F. (1995). Babesia canis human babesiosis causing a 40-day anuria. *Annales de Médecine Interne (Paris)*, 146, 451–452.

- Mehlhorn, H., W. Peters, and A. Haberkorn. (1980). The formation of kinetes and oocysts in *Plasmodium gallinaceum* and considerations on phylogenetic relationships between Haemosporidia, Piroplasmida, and other Coccidia. *Protistologica*, 16, 135–154.
- Mehlhorn, H. (1988). *Parasitology in Focus: Facts and Trends*, Springer, Berlin.
- Mehlhorn, H., Schein, E., Ahmed, J. (1994). Theileria. *Parasitic protozoa*, 7, 217–304.
- Moore, J. Kuntz, R. (1981). Babesia microti infections in nonhuman primates. *Journal of Parasitology*, 67, 454–456.
- Mundim, A., Mundim, M., Jensen, N., Araújo, S. (1994). Hepatozoon canis: estudo retrospectivo de 22 casos de infecção natural em cães de Uberlândia, MG. *Revista do Centro de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia*, 10,89-95.
- Murata, T., Shiramizu, K., Hara, Y., Inoue, M., Shimoda, K., Nakama, S. (1991). First case of Hepatozoon canis infection of a dog in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 53(6), 1097-1099.
- Mylonakis, E. (2001). When to suspect and how to monitor babesiosis. *American Family Physician Journal*, 63, 1969–1974.
- O'Dwyer, L., Guimarães, L., Massard, C. (1997). Ocorrência de infecção múltipla por Babesia canis, Hepatozoon canis e Haemobartonella canis em um cão esplenectomizado. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, 4, 83-84.
- O'Dwyer, L., Lopes, V., Rubini, A., Paduan, K., Ribolla, P. (2009). Babesia spp. infection in dogs from rural areas of São Paulo State, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 18(2), 23-26.
- Olmeda A, Armstrong P, Rosenthal M, Valladares B, del Castillo A, de Armas F, Miguez M, Gonzalez A, Rodriguez J, Spielman A, elford S. (1997). A subtropical case of human babesiosis. *Acta Tropica*, 67, 229–234.
- Paddock, C., Telford, S. (2010). Through a glass, darkly: the global incidence of tick-borne diseases. En: *Critical Needs and Gaps*

- Understanding Prevention, Amelioration and Resolution of Lyme and Other Tick-Borne Diseases: The Short-Term and Long-Term Outcomes. Workshop Report, pp 221–266
- Pain, A., Renauld, H., Berriman, M., Murphy, L., Yeats, C.A, et al. (2005). Genome of the host-cell transforming parasite *Theileria annulata* compared with *T. parva*. *Science*, 309, 131–133.
- Passos, L., Geiger, S., Ribeiro, F., Pfister, K., Zahler-Rinder, M. (2005). First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil. *Veterinary Parasitology*, 127, 81–85.
- Penzhorn, B.L., Kjemtrup, A.M., López-Rebollar, L.M., Conrad, P.A. (2001). *Babesia leo* N. sp. from lions in the Kruger National Park, South Africa, and its relation to other small piroplasms. *Journal of Parasitology*, 87(3), 681–685.
- Persing, D. H., D. Mathiesen, W. F. Marshall, S. R. Telford III, A. Spielman, J. W. Thomford, and P. A. Conrad. (1992). Detection of *Babesia microti* by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 2097–2103.
- Phillips, S.J., Anderson, R.P. & Schapire, R.E. (2006). Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*, 190, 231–259.
- Piana, G.P., Galli-Valerio, B. (1895). Su di un'infezione del cane con parassiti endoglobulari nel sangue. Nota preventiva, *Il Moderno Zoiatro* 6, 163–169.
- Piesman, J., Spielman, A. (1982). *Babesia microti*: infectivity of parasites from ticks for hamsters and white-footed mice. *Experimental Parasitology*, 53, 242–248.
- Piesman, J., Karakashian, S., Lewengrub, S., Rudzinska, M., Spielman, A. (1986). Development of *Babesia microti* sporozoites in adult *Ixodes dammini*. *International Journal for Parasitology*, 16, 381–385.
- Quintero, J., Aguirre-Acevedo, D., Rodas, J., Arboleda, A., Vega, F., Osorio, L., Rojas, C. (2018). Epidemiological characterization of

- incident cases of *Rickettsia* infection in rural areas of Urabá region, Colombia. *PLoS Negl Trop Dis*. Oct 31; 12(10).
- Quintero, J., Paternina, L., Uribe, A., Muskus, C., Hidalgo, M., Gil, J., Cienfuegos, A., Osorio, L., Rojas, C. (2017). Eco-epidemiological analysis of rickettsial seropositivity in rural areas of Colombia: A multilevel approach. *PLoS Negl Trop Dis* 11(9): e0005892.
- Qurollo, B. A., Archer, N. R., Schreeg, M. E., Marr, H. S., Birkenheuer, A. J., Haney, K. N., Breitschwerdt, E. B. (2017). Improved molecular detection of *Babesia* infections in animals using a novel quantitative real-time PCR diagnostic assay targeting mitochondrial DNA. *Parasites & Vectors*, 10, 128.
- Ramos, R., Ramos, C., Araújo, F., Oliveira, R., Souza, I. (2010). Molecular survey and genetic characterization of tick-borne pathogens in dogs in metropolitan Recife (north-eastern Brazil). *Parasitology Research*, 107, 1115–1120.
- Rech, A., Bittar, C., de Castro, C., Azevedo, K., dos Santos, R., Machado, A., Schwartzmann, G., Goldani, L., Brunetto, A. (2004). Asymptomatic babesiosis in a child with hepatoblastoma. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 26, 213.
- Reichard, M., Van Den Bussche, R., Meinkoth, J., Hoover, J., Kocan, A. (2005). A new species of *Cytauxzoon* from Pallas' cat caught in Mongolia and comments on the systematic and taxonomy of piroplasmids. *Journal of Parasitology*, 91, 420–426.
- Ríos, L., Alvarez, G., & Blair, S. (2003). Serological and parasitological study and report of the first case of human babesiosis in Colombia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(4), 493-498.
- Ríos, L. A., Zapata, R., Reyes, J., Mejía, J., Baena, A. (2010). Estabilidad enzoótica de babesiosis bovina en la región de Puerto Berrío, Colombia. *Revista Científica*, 20(5), 485-492.
- Rios S, Gutiérrez L, Ríos L. (2014). Assessing bovine babesiosis in *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* ticks and 3 to 9-month-old cattle

- in the middle Magdalena region. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 34(4), 313-319.
- Ruprah, N. S. (1985). Textbook of Clinical Protozoology. Oxonian Press Pvt. Ltd. New Delhi.
- Schein, E., Rehbein, G., Voigt, W., Zweygarth, E. (1981). Babesia equi (Laveran 1901) Development in horses and in lymphocyte culture. *Tropical Medicine and Parasitology*, 32, 223–227.
- Schnittger, L., Rodriguez, A.E., Florin-Christensen, M., Morrison, D. A. (2012). Babesia: A world emerging. *Infection. Genetics and Evolution*, 12, 1788–1809.
- Schwint, N., Knowles, D., Ueti, M., Kappmeyer, L., Scoles, G. (2008). Transmission of Babesia caballi by Dermacentor nitens (Acari: Ixodidae) Is Restricted to One Generation in the Absence of Alimentary Reinfection on a Susceptible Equine Host. *Journal of Medical Entomology*, Volume 45, Issue 6, 1 November 2008, Pages 1152–1155.
- Shock, B. C., Murphy, S. M., Patton, L. L., Shock, P. M., Olfenbittel, C., Beringer, J., Prange, S., Grove, D. M., Peek, M. and Butfiloski, J. W. (2011). Distribution and prevalence of Cytauxzoon felis in bobcats (Lynx rufus), the natural reservoir, and other wild felids in thirteen states. *Veterinary Parasitology* 175, 325–330
- Smith T, Kilborne F. (1893). Investigations into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever. *Repts. Bur. Anim. Industr*, 177–304.
- Silva, R. (2010). Diagnóstico dos Gêneros Ehrlichia e Babesia em Cães Domésticos e Caracterização de Anaplasma platys na Região Metropolitana do Rio de Janeiro (tesis de maestria). UFRRJ Instituto De Veterinária, Brasil.
- Smith, K., Oesterle, P., Jardine, C., Dibernardo, A., Huynh, C., Lindsay, R., Pearl, D., Nemeth, N. (2018). Tick infestations of wildlife and companion animals in Ontario, Canada, with detection of human

- pathogens in *Ixodes scapularis* ticks. *Ticks Tick Borne Dis.* 2018 Sep 3. pii: S1877-959X(18)30242-5.
- Spielman, A. (1976). Human babesiosis on Nantucket Island: transmission by nymphal *Ixodes* ticks. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 25, 784–787.
- Spielman, A., Etkind, P., Piesman, J., Ruebush, T., Juranek, D., Jacobs, M. (1981). Reservoir hosts of human babesiosis on Nantucket Island. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 30, 560–565.
- Spolidorio, M., Labruna, M., Machado, R., Moraes-Filho, J., Zago, A., Donatele, D., Pinheiro, S., Silveira, L., Caliari, K., Yoshinari, N., (2010). Survey for tick-borne zoonoses in the state of Espírito Santo, Southeastern Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83, 201–206.
- Starcovici, C. (1893). Bemerkungen u"ber den durch Babes entdeckten Blutparasiten und die durch denselben hervorgebrachten Krakheiten, die seuchenhafte Ha"moglobinurie des Rindes (Babes), dans Texasfieber (Th. Smith) und der Carceag der Schafe (Babes). *Zbl. Bakt., I. Abt*, 14, 1–8.
- Suarez, M., Castellano, M. (1997). Pesquisaje de Babesia en trabajadores agropecuarios y donantes en la provincia de Ciego de Ávila. *Revista Cubana Medicina Tropical*, 49(2).
- Suzuki, E. M.; Daemon, E.; Faccini, J. L. H. (1999). Efeitos das umidades relativas de 30 e 50% sobre o desenvolvimento de ovos de *Anocentor nitens* (Neumman, 1987) (Acari: Ixodidae) expostos por diferentes intervalos de tempo. *Revista Brasileira de Zoociências*, v. 1, n. 1, p. 69-76
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 28:2731–2739.

- Telford, S. R., Gorenflot, A., Brasseur, P., Spielman, A. (1993). Babesial infections in humans and wildlife. *Parasitic protozoa*, 5, 1-12.
- Tian, Z., Luo, J., Zheng, J., Xie, J., Shen, H., Yin, H., Luo, J., Tian, M., Yuan, X., Wang, F., *et al.* (2013). Phylogenetic analysis of Babesia species in China based on Cytochrome b (COB) gene. *Infection, Genetics and Evolution*, 13, 36–40.
- Uilenberg, G., (2006). Babesia – A historical overview. *Veterinarian Parasitological*, 138, 3–10.
- Vannier, E., Krause, P. J. (2012). Human babesiosis. *The New England Journal of Medicine*, 366, 2397-407.
- Vannier, E., Krause, P. J. (2014). Babesiosis in China, an emerging threat. *Lancet Infect Disease*, S1473-3099(14)7, 1062-X.
- Vargas-Hernández, G., André, M., Faria, J., Munhoz, T., Hernandez-Rodriguez, M., Machado, R., Tinucci-Costa, M. (2012). Molecular and serological detection of Ehrlichia canis and Babesia vogeli in dogs in Colombia. *Veterinary Parasitology*, 25, 186(3-4): 254–260
- Wheeler DL, Bhagwat M. (2007). BLAST quick start: example-driven web-based BLAST. In: Bergman NH, ed. *Methods in Molecular Biology: Coin prratiz'e Genonncs-I*. Totowan, NJ: Humana Press, pp. 149-176.
- White, D. J., Talarico, J., Chang, H. G., *et al.* (1998). Human babesiosis in New York State: Review of 139 hospitalized cases and analysis of prognostic factors. *Archives of internal medicine American Medical*, 158, 2149–54.
- Yoder, J. A. *et al.* (2006). Developmental profiles in tick water balance with a focus on the new Rocky Mountain spotted fever vector, Rhipicephalus sanguineus. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 20, n. 4, p. 365-372.