

## USO DE PRUEBAS MOLECULARES PARA IDENTIFICAR Y DIFERENCIAR *Babesia canis vogeli* EN GARRAPATAS *Rhipicephalus sanguineus* ALIMENTADAS DE PERROS INFECTADOS NATURALMENTE

<sup>1</sup>José Juan Lira-Amaya, <sup>2</sup>Julio Vicente Figueroa-Millán, <sup>3</sup>Jesús Antonio Álvarez-Martínez, <sup>4</sup>Carmen Rojas-Martínez, <sup>5</sup>Alfredo Peláez-Flores, <sup>6</sup>Francisco Martínez Ibáñez, <sup>1,2,3,4</sup>CENID-PAVET, INIFAP. Km 11.5 Carretera Fed. Cuernavaca-Cuautla Col. Progreso, C.P. 62550 Jiutepec, Morelos, México. [lira.juan@inifap.gob.mx](mailto:lira.juan@inifap.gob.mx); [figueroa.julio@inifap.gob.mx](mailto:figueroa.julio@inifap.gob.mx); [alvarez.jesus@inifap.gob.mx](mailto:alvarez.jesus@inifap.gob.mx); [rojas.carmen@inifap.gob.mx](mailto:rojas.carmen@inifap.gob.mx); <sup>5,6</sup>C ENAPA, SENASICA. Km 11.5 Carretera Fed. Cuernavaca-Cuautla, Col. Progreso, Jiutepec, Morelos. C.P. 62550 [alfredo.pelaez@senasica.gob.mx](mailto:alfredo.pelaez@senasica.gob.mx); [francisco.martinez@senasica.gob.mx](mailto:francisco.martinez@senasica.gob.mx).

**RESUMEN:** Con el objeto de identificar la subespecie del agente etiológico de la babesiosis canina en México, se colectaron muestras sanguíneas de perros con antecedentes de exposición a garrapatas *Rhipicephalus sanguineus*, incluyendo el análisis de garrapatas colectadas de 10 perros, 9 de ellos clínicamente sanos y 1 infectado por *Babesia sp.*, diagnosticado por microscopía. Las muestras de ADN se amplificaron por PCR con iniciadores genéricos para *Babesia sp.*, y los amplicones sirvieron como molde para su digestión con enzimas de restricción (*TaqI* y *HinfI*) (RFLP). Además, se utilizaron iniciadores específicos para la subespecie *Babesia canis vogeli* (PCR semi-anidada). El PCR genérico permitió detectar dos muestras de sangre positivas y tres especímenes de garrapatas de las muestras analizadas. Con el uso de iniciadores específicos en la prueba de PCR se pudo corroborar la presencia de *B. canis vogeli* en 3 muestras en sangre y en 3 de las garrapatas analizadas.

Palabras clave: *Babesia canis vogeli*, ADN, PCR-RFLP.

### Using molecular tests to detect and differentiate *Babesia canis vogeli* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks fed on naturally infected dogs

**ABSTRACT:** In order to identify the subspecies of the etiologic agent of canine babesiosis in Mexico, blood samples from dogs with a history of exposure to *Rhipicephalus sanguineus* ticks were collected, including analysis of ticks collected from 10 dogs, 9 of them clinically healthy and one infected with *Babesia sp.*, as diagnosed by optical microscopy. The DNA samples were amplified by PCR using generic primers for *Babesia sp.* Amplicons obtained served as template for digestion with restriction enzymes (*Taq I* and *Hinf I*) (RFLP). In addition, specific primers for *Babesia canis* subspecies *vogeli* (semi-nested PCR) were used. The generic PCR allowed for the detection of two positive blood samples and three tick specimens in the analyzed samples. By using species-specific primers, the PCR test could confirm the presence of *B. canis vogeli* in 3 blood samples and 3 analyzed ticks.

Key words: *Babesia canis vogeli*, ADN, PCR-RFLP.

### Introducción

La babesiosis canina es una enfermedad cosmopolita transmitida por garrapatas que afecta a los perros domésticos, y la distribución se relaciona con la presencia del vector siendo más prevalente en regiones con climas tropicales y subtropicales. La enfermedad es causada por los parásitos intra-eritrocíticos *B. canis* y *B. gibsoni* (Birkenheuer *et al.*, 2003). La especie *B. canis* ha sido re-clasificada en tres subespecies con base en el vector que la transmite y su distribución: *B. canis canis* cuyo vector para la transmisión es la garrapata *Dermacentor reticulatus*; *B. canis rossi* transmitida por *Haemaphysalis leachii*; y *B. canis vogeli* transmitida por *Rhipicephalus sanguineus* en zonas tropicales y subtropicales. Estas se encuentran distribuidas en Europa, Sudáfrica y América, respectivamente (Uilenberg *et al.*, 1989), aunque recientemente se ha reportado la presencia de *B. canis rossi* en los EEUU y de *B. canis vogeli* en Sudáfrica y Europa (Allison *et al.*, 2011; Caccio *et al.*, 2002; Cardoso *et al.*, 2008). El diagnóstico directo del parásito se realiza mediante la observación microscópica de frotis

sanguíneo teñidos con colorante Giemsa, y el de tipo indirecto mediante serología utilizando paquetes comerciales.

Recientemente, se han realizado esfuerzos para implementar el diagnóstico molecular para la babesiosis canina en México, por lo que no existen reportes que demuestren e identifiquen que subespecie del parásito está presente en la sangre de perros domésticos infectados. La prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha sido utilizada para la amplificación del gen 18S rRNA, lo que ha facilitado la identificación de *B. canis canis* y *B. canis vogeli* en muestras de perros naturalmente infectados en regiones de Italia y Croacia (Caccio *et al.*, 2002), en el norte de Portugal también han sido descritas las subespecies antes mencionadas lo que hace suponer la presencia y distribución del vector (Cardoso *et al.*, 2008), mientras que en Brazil solo se ha identificado la subespecie *B. canis vogeli* (García *et al.*, 2006). El análisis de polimorfismos en longitud de fragmentos amplificados y digeridos con enzimas de restricción (PCR-RFLP) es una alternativa para la discriminación entre las subespecies de *B. canis*. En Francia e Italia, la amplificación por PCR del fragmento del gen 18S rRNA (400 pb) ha permitido diferenciar las subespecies *B. canis canis*, *B. canis vogeli* y *B. canis rossi* utilizando las enzimas *TaqI* y *HinfI*, obteniéndose fragmentos de 203, 171 y 26 pb para *B. canis vogeli* y de 227 y 174 pb para *B. canis rossi*. En el caso de *B. canis canis*, y dado que la secuencia amplificada no cuenta con sitios de restricción para ambas enzimas (Carret *et al.*, 1999; Solano *et al.*, 2008) el fragmento no se digiere con ninguna de estas enzimas, permitiendo así discriminar la subespecie *B. canis canis*.

No existe actualmente información disponible en México acerca de la detección de infección por *Babesia canis* en garrapatas *Rhipicephalus sanguineus*. Sin embargo en otros países como Australia, Túnez y Francia, por citar algunos ejemplos, se ha logrado implementar la caracterización molecular del parásito mediante el uso de la técnica de PCR (Jefferies *et al.*, 2003, M'ghirbi y Bouattour, 2008; René *et al.*, 2012). El propósito de este trabajo fue implementar un esquema de genotipificación de *B. canis* mediante las pruebas de PCR-RFLP y PCR-anidada que permita discernir la(s) sub-especie(s) de *B. canis* presentes en México, analizando muestras de sangre de perro y garrapatas *Rhipicephalus sanguineus*.

## Materiales y Método

**Preparación de muestras.** Se colectaron muestras sanguíneas de 22 perros mediante la punción de la vena cefálica en tubos con anticoagulante (EDTA) que fueron referidos a una clínica particular en la ciudad de Cuautla, Morelos con signología de fiebre, anemia, letargia ó epistaxis, consistente y sospechosa de babesiosis y/o ehrlichiosis canina e historia de previa exposición o presencia de garrapatas. Se tomó una alícuota y se extendió en un portaobjetos para ser fijado con metanol y teñido con colorante Giemsa, cada laminilla fue observada por microscopia durante al menos 20 minutos. El paquete celular conteniendo glóbulos rojos y blancos fue separado del plasma mediante centrifugación a 4,000 rpm en centrífuga clínica y almacenado a -20°C hasta su utilización. Se analizaron, hasta ahora, 10 garrapatas (*Rhipicephalus sanguineus*) colectadas de perros de manera aleatoria, las cuales fueron identificadas mediante claves taxonómicas, identificándose solamente una de ellas como proveniente de un perro fehacientemente infectado con *Babesia canis*, al comprobarse por microscopía óptica que el perro infectado mantenía una parasitemia estimada en  $\leq 80\%$ .

**Extracción de ADN y PCR.** La extracción del material genético a partir del paquete celular se realizó con un kit comercial (ZR Genomic DNA II Kit; ZYMO RESEARCH). Para la extracción de ADN de las garrapatas analizadas en este estudio se utilizó el método de trituración con mortero previa a la utilización de un kit comercialmente disponible (ZR Tissue and Insect DNA Miniprep ZYMO RESEARCH) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La prueba de PCR se realizó con la

enzima Polimerasa Go Taq Green Master Mix, 2X (PROMEGA), con un volumen final de 25 µl en un termociclador (BIO-RAD Icyclor). La detección de *Babesia sp.* se realizó mediante la amplificación de la porción variable del gen 18S rRNA utilizando el par de iniciadores genéricos denominados PIRO-A sentido (5'-AATACCCAATCCTGACACAGGG-3') y PIRO-B anti-sentido (5'-TTAAATACGAATGCCCCACC-3'), bajo el siguiente protocolo: 94°C por 5 min en la desnaturalización inicial, (94°C, 1 min; 55°C 1 min; 72°C 1min) por 35 ciclos y 72°C por 15 min para la extensión final. La prueba de PCR semi-anidada incluyó un primer paso con los iniciadores externos 455-479 sentido (5'-GTCTTGTAATTGGAATGATGGTGAC-3') y 793-772 anti-sentido (5'-ATGCCCCCAACCGTTCCTATTA-3) bajo el protocolo de amplificación (95°C 5 min; 95°C 45 seg; 58°C 45 seg; 72 °C 45 seg; 72°C 5 min con 50 ciclos de repetición, posteriormente la segunda PCR (semi-anidada) incluyo los iniciadores internos para cada una de las subespecies de *B. canis* [*B. canis canis* (BCC) sentido (5'-TGCGTTGACGGTTTGACC-3'); *B. canis rossi* (BCR) sentido (5'-GCTTGGCGGTTTGTTGC-3'); y *B. canis vogeli* (BCV) sentido (5'-GTTCGAGTTTGCCATTCGTT-3')], y anti-sentido 793-772 (5'- ATGCCCCCAACCGTTCCTATTA-3') con el mismo protocolo de amplificación anterior con 30 ciclos de repetición. Los productos de PCR amplificados con los iniciadores genéricos se probaron con las enzimas de restricción *TaqI* y *HinfI* para la discriminación de especies de *Babesia sp.* Para el análisis de los productos de PCR y PCR-RFLP se utilizaron geles de agarosa al 3% y sometidos a electroforesis por 45 min a 100V.

## Resultados

Se identificaron 2 muestras positivas mediante análisis microscópico, con predominancia de estadios trofozoitos en una muestra y trofozoitos y merozoitos consistentes con *Babesia sp* en la segunda muestra. Sin embargo, las parasitemias fueron muy bajas como para ser cuantificadas (> 0.01%). La amplificación de ADN por medio de la prueba de PCR con los iniciadores genéricos para la especie de *B. canis sp*, permitió identificar dos muestras de sangre positivas del total de muestras analizadas, mientras tanto de las muestras de garrapatas que se analizaron en este estudio demostró de manera consistente la presencia de un fragmento de 400 pb en tres muestras. Los resultados de los amplicones que se sometieron a digestión con las enzimas antes mencionadas, se pudo observar digestión parcial con la enzima *Taq I* en dos muestras sanguíneas y solamente una en las muestras de las garrapatas sometidas a la digestión enzimática, mismas que corresponden con el tamaño de los fragmentos obtenidos 203 pb, 171pb y 26 pb (no visible en el gel éste último) (Fig. 1) coincidente con el patrón RFLP correspondiente a *B. canis vogeli* (Carret *et al*, 1999).

El análisis de resultados con la prueba de PCR semianidada permitió identificar tres muestras positivas a partir de sangre (Fig. 2) y tres a partir de garrapatas (Fig. 3) consistentes con la amplificación de un fragmento de 192 pb cuando se utiliza el iniciador específico de subespecie BCV en la prueba de PCR semi-anidada. Se comprueba así que la técnica de semianidamiento tiene mayor sensibilidad analítica y una mejor especificidad para la discriminación de subespecies de *B. canis*, identificándose por primera vez en México la subespecie *B. canis vogeli* en la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*.

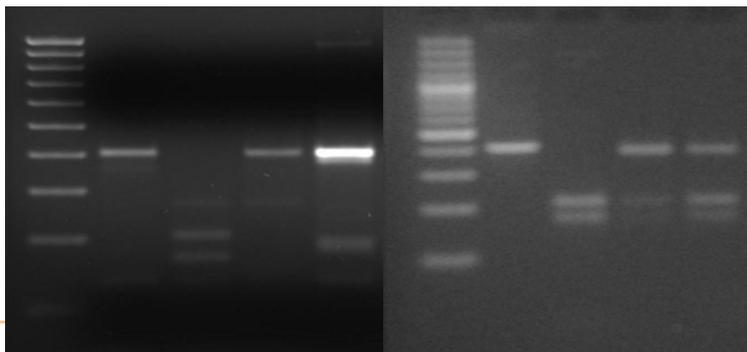


Figura 1. Imagen representativa de los productos de PCR digeridos con la enzima de restricción *Taq I* (RFLP) a partir de sangre (izquierda) y garrapatas (derecha), para la sub-especie *Babesia canis vogeli*.

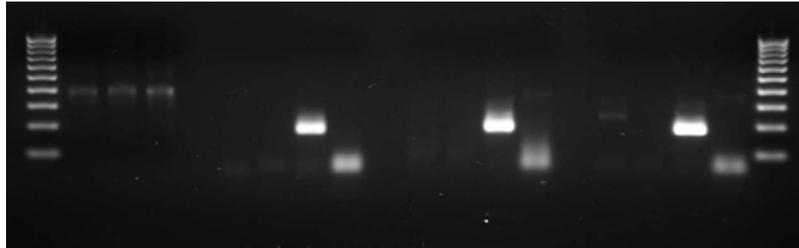


Figura 2. Productos de PCR amplificados con los iniciadores específicos para la sub-especie *Babesia canis vogeli* (192 pb) en muestras ADN a partir de sangre

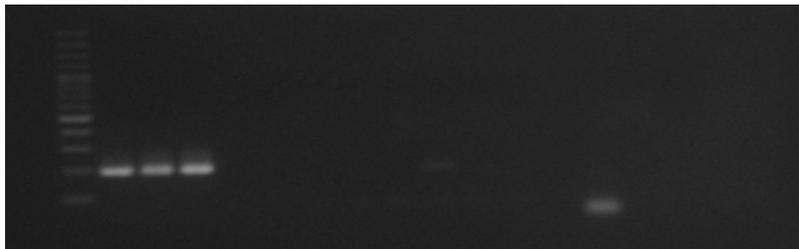


Figura 3. Productos de PCR amplificados con los iniciadores específicos para la sub-especie *Babesia canis vogeli* (192 pb) en muestras ADN a partir de garrapatas *Rhipicephalus sanguineus*.

## Discusión y conclusiones

La forma clásica para la detección de *Babesia canis* es mediante la observación de las formas intra-eritrocíticas en laminillas teñidas con colorante Giemsa, la cual es considerada como la prueba de oro al ser una técnica relativamente sencilla de realizar. Las pruebas moleculares son herramientas altamente confiables para la genotipificación de los microorganismos causantes de la babesiosis canina, son un recurso válido y necesario, ya que permite clasificar a las diferentes subespecies de *B. canis* a nivel regional y mundial, para determinar el origen o la posible ruta de transmisión de *B. canis* de la garrapata al hospedero canino, como se ha realizado en otras latitudes (Carret *et al.*, 1999; Caccio *et al.*, 2002; Garcia *et al.*, 2006; Cardoso *et al.*, 2008; Solano *et al.*, 2008). Sin embargo la PCR anidada resulto ser la prueba con mayor sensibilidad y especificidad para la diferenciación de especies *B. canis* tanto en muestra de ADN a partir de sangre como de garrapatas (Jefferies *et al.*, 2003; M'ghirbi y Bouattour, 2008; René *et al.*, 2012.). La importancia de la garrapata vector radica en que por sus hábitos hematófagos, son capaces de transmitir mecánica y biológicamente distintas enfermedades, algunas tan graves que alcanzan niveles epidemiológicos alarmantes, porque afectan al hombre (Morales y Nava, 2006). De acuerdo a trabajos previamente realizados sobre la distribución de la garrapata café del perro (*Rhipicephalus sanguineus*) en Morelos, la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* se ha identificado en perros del valle de Cuernavaca (Morales y Cruz, 1998) y en la ciudad de Cuautla (Morales y Nava, 2006). La identificación de algunas garrapatas positivas en la prueba molecular de PCR-RFLP de este estudio sugiere que *B. canis vogeli* muy probablemente es transmitida por esta garrapata, coincidente con lo reportado previamente en la literatura (Uilenberg *et al.*, 1989; Carret *et al.*, 1999; Birkenheuer *et al.*, 2003). Estudios previamente realizados han demostrado la presencia de

*Babesia canis* en México (Rodríguez *et al.*, 2000). Sin embargo, este es el primer reporte de la identificación molecular de la subespecie *B. canis vogeli* en garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* en México. Estudios adicionales incluyendo el procesamiento de un mayor número de garrapatas se encuentran en proceso, lo que permitirá establecer la estimación de las tasas de infección por *B. canis vogeli* en garrapatas colectadas en algunas regiones del estado de Morelos.

### Literatura Citada

- Allison, R. W., Yeagley, T. J., Levis, K., Reichard, M.V. 2011. *Babesia canis rossi* infection in a Texas dog. *Vet. Clin. Pathol.* 40: 345-350.
- Birkenheuer, A. J., Levy, M. G., Breitschwerdt, E. B. 2003. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. *J. Clin. Microbiol.* 41: 4172-4177.
- Caccio, S. M., Antunovic, B., Moretti, A., Mangili, V., Marinculic, A., Baric, R. R., Slemenda, S. B., Pieniazek, N. J. 2002. Molecular characterization of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* from naturally infected European dogs. *Vet. Parasitol.* 106: 285-292.
- Cardoso, L., A. Costa, J. Tuna, L. Vieira, O. Eyal, Y. Y. Mekuzas and G. Baneth. 2008. *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* infections in dogs from northern Portugal. *Vet. Parasitol.* 156:199-204.
- Carret, C., F. Walas, B. Carcy, N. Grande, E. Precigout, K. Moubri, T.H. Schetters and A. Gorenflot. 1999. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: Differentiation of the three subspecies by a Restriction Fragment Length Polymorphism analysis on amplified Small Subunit Ribosomal RNA Genes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46:298-303.
- Garcia de Sá, A., A. Figueiredo, L. H. O'Dwyer, D. Barros, F. Silva, R. Fernandes, A. Muller, P. Bittencourt and N. R. Pereira. 2006. Detection and molecular characterization of *Babesia canis vogeli* from naturally infected Brazilian dogs. *Int. J. Appl. Res. Vet. Med.* 4:163-168.
- Jefferies, R., U. M. Ryan, C. J. Muhlnickel and P. J. Irwin. 2003. Two Species of Canine *Babesia* in Australia: Detection and Characterization by PCR. *J. Parasitol.* 89: 409-412.
- M'ghirbi, Y., A. Bouattour. 2008. Detection and molecular characterization of *Babesia canis vogeli* from naturally infected dogs and *Rhipicephalus sanguineus* ticks in Tunisia. *Vet. Parasitol.* 152: 1-7.
- Morales, S. M. y C. Cruz. 1998. Fluctuaciones poblacionales de *Rhipicephalus sanguineus*, garrapata parásita de perros en el valle de Cuernavaca, Morelos México. Estudio preliminar. *Vet. Méx.* 29: 299-301
- Morales, S. M., y R. A. Nava. 2006. Construcción de un control integral de *Rhipicephalus (Rhipicephalus) sanguineus* (Latreille) (Acarida: Ixodidae) en Morelos, México. *Investigación Agropecuaria.* 3:112-122.
- René, M., J. Chêne, J.P. Beaufils, C. Valiente Moro, G. Bourdoiseau, P. Mavingui, L. Chabanne. 2012. First evidence and molecular characterization of *Babesia vogeli* in naturally infected dogs and *Rhipicephalus sanguineus* ticks in southern France. *Vet. Parasitol.* 187: 399-407.
- Rodríguez, V.R.I., L. A. Cob y J. L. Domínguez. 2000. Hemoparásitos en bovinos, caninos y equinos diagnosticados en el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán (1984-1999). *Rev. Biomed.* 11:277-282.
- Solano, G. L., M. Trotta, E. Carli, B. Carcy, M. Caldinand T. Furlanello. 2008. *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease. *Vet. Parasitol.* 157:211-221.

Uilenberg, G., F. F. Franssen, N. M. Perie and A. A. Spanjer. 1989. Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. *Vet. Q.* 11:33-40.