



CIENCIAS AGRARIAS Y DE LA PESCA

Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba, 2020

DetECCIÓN e IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR GARRAPATAS EN *EQUUS CABALLUS* Y GARRAPATAS DEL OCCIDENTE DE CUBA

Adrian A. Díaz Sánchez ¹ <https://orcid.org/0000-0001-7743-7794>
Belkis Corona González ^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-2302-5361>
Neil B. Chilton ² <https://orcid.org/0000-0002-3982-1351>
Evelyn Lobo Rivero ¹ <https://orcid.org/0000-0002-8103-4821>
Ernesto Vega Cañizares ¹ <https://orcid.org/0000-0001-6137-3837>
Carlos Yrurzun Estrada ³ <https://orcid.org/0000-0002-8465-3038>
Alejandro Cabezas Cruz ⁴ <https://orcid.org/0000-0002-8660-730X>
Osvaldo Fonseca Rodríguez ⁵ <https://orcid.org/0000-0002-0253-5928>
Lisset Roblejo Arias ¹ <https://orcid.org/0000-0002-3246-1026>
Roxana Marrero Perera ¹ <https://orcid.org/0000-0002-0864-8034>
Aivaldo Henrique da Fonseca ⁶ <https://orcid.org/0000-0002-5834-141X>
Carlos Luiz Massard ⁶ <https://orcid.org/0000-0002-8465-3038>
Marcus Sandes Pires ⁶ <https://orcid.org/0000-0002-1284-2462>
Sergio Luis del Castillo Domínguez ¹ <https://orcid.org/0000-0002-1629-917X>

¹ Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. Mayabeque, Cuba

² Universidad de Saskatchewan. Saskatchewan, Canadá

³ Universidad Agraria de La Habana Fructuoso Rodríguez Pérez. Mayabeque, Cuba

⁴ Instituto Nacional de Investigación para la Agricultura, la Alimentación y el Medio Ambiente de Francia. París, Francia

⁵ Universidad de Umea. Umea, Suecia

⁶ Universidad Federal Rural de Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Brasil.

*Autor para la correspondencia: bcorona@censa.edu.cu

RESUMEN

Palabras clave

Babesia caballi; *Theileria equi*, *Rickettsia* sp; *Dermacentor nitens*; *Amblyomma mixtum*

Introducción. *Babesia caballi*, *Theileria equi* y varias especies de rickettsias son agentes de enfermedades transmitidas por vectores que afectan a los equinos. El objetivo del presente estudio fue detectar infecciones por *B. caballi* y *T. equi* en caballos e identificar rickettsias en caballos y garrapatas en la región occidental de Cuba. **Métodos.** Se estandarizaron 2 ensayos de nPCR para la detección de *B. caballi* y *T. equi*. Se colectaron muestras de sangre de caballos, y garrapatas. Se realizó identificación por frotis sanguíneo y detección e identificación molecular de *B. caballi*, *T. equi* y *Rickettsia* sp. **Resultados.** Se observaron formaciones intraeritrocíticas compatibles con *B. caballi* y *T. equi*. El nPCR mostró que el 25 % de las



muestras fueron positivas para *B. caballi*, 73 % para *T. equi* y 20 % mostraron coinfección. Los resultados se confirmaron con la secuenciación parcial de los genes bc 48 (*B. caballi*) y ema-1 (*T. equi*). La secuenciación del gen ARNr 18S de *T. equi* demostró la presencia de al menos 2 genotipos de aislados de *T. equi* en Cuba. El ensayo de PCR en tiempo real y la secuenciación revelaron la presencia de *Rickettsia amblyommatis* en *A. mixtum* y *Rickettsia felis* en *D. nitens*. Como conclusiones estos resultados constituyen la primera evidencia molecular de *B. caballi* y *T. equi* en equinos y el primer reporte de *Rickettsia felis* en *D. nitens* en Cuba, lo que amplía el conocimiento sobre la distribución de patógenos y el espectro de vectores potenciales contribuyendo al fortalecimiento de los programas de manejo y control.

Molecular detection and identification of tick-borne pathogens in *Equus caballus* and ticks from western Cuba

ABSTRACT

Introduction. *Babesia caballi*, *Theileria equi* and several species of rickettsias are agents of vector-borne diseases that affect equines. The objective of this study was to detect infections by *B. caballi* and *T. equi* in horses and to identify rickettsias in horses and ticks in the western region of Cuba. **Methods.** Two nPCR assays were developed and standardized for the detection of *B. caballi* and *T. equi*. Blood samples from horses and ticks were collected. Identification by blood smear and molecular detection and identification of *B. caballi*, *T. equi* and *Rickettsia* spp. were carried out. **Results.** Intraerythrocytic formations compatible with *B. caballi* and *T. equi* were observed. The nPCR showed that 25 % of the samples were positive for *B. caballi*, 73 % for *T. equi* and 20 % showed coinfection. The results were confirmed with the partial sequencing of the genes bc48 (*B. caballi*) and ema-1 (*T. equi*). The sequencing of the 18S rRNA gene of *T. equi* demonstrated the presence of at least two genotypes of *T. equi* isolates in Cuba. The real time qPCR assay and sequencing revealed the presence of *Rickettsia amblyommatis* in *A. mixtum* and *Rickettsia felis* in *D. nitens*. **Conclusions:** These results constitute the first piece of molecular evidence of *B. caballi* and *T. equi* in horses and the first report of *Rickettsia felis* in *D. nitens* in Cuba, which broadens the knowledge about the distribution of pathogens and the spectrum of potential vectors contributing to the strengthening of management and control programs.

Keywords

Babesia caballi; *Theileria equi*; *Rickettsia* spp; *Dermacentor nitens*; *Amblyomma mixtum*

INTRODUCCIÓN

La piroplasmosis equina se considera la enfermedad transmitida por vectores más importante que afecta a los equinos en regiones con clima tropical, subtropical y templado. es una infección intraeritrocítica, aguda, subaguda o crónica, causada por los hematozoos *Babesia caballi* y *Theileria equi*. que se transmiten por garrapatas de los géneros *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus* e *Hyalomma*.⁽¹⁾ En Cuba estudios previos basados en el análisis de frotis sanguíneos y ensayos serológicos, describen la presencia de estos piroplasmas en rebaños equinos.⁽²⁾

Hasta la fecha se han desarrollado diversos ensayos, basados en la técnica del nPCR, para la detección de *B. caballi* y *T. equi* caracterizados por presentar elevada sensibilidad y especificidad analítica, permitiendo la detección de estos hemoparásitos en equinos con bajos niveles de parasitemia y vectores portadores.^(3,4,5,6)

Los miembros del género *Rickettsia* son bacterias gram negativas intracelulares obligadas que requieren células eucariotas para replicarse. Se transmiten por artrópodos hematófagos a humanos y animales. En muchas partes del mundo, las rickettsiosis transmitidas por garrapatas representan enfermedades emergentes o reemergentes. En Cuba se reportaron 2 especies, *Rickettsia amblyommatis* y *Rickettsia felis*, en garrapatas (*Amblyomma mixtum*) y en muestras de sangre de perros, respectivamente.^(7,8)

Aunque los caballos en Cuba están expuestos con frecuencia a las garrapatas (*A. mixtum* y *Dermacentor nitens*),⁽⁷⁾ no se han realizado estudios de vigilancia para determinar la prevalencia de *Rickettsia* en los mismos o examinar sus posibles funciones como reservorios para patógenos zoonóticos y como centinelas para la salud pública. El objetivo del presente estudio fue detectar infecciones por *B. caballi* y *T. equi*

en caballos e identificar rickettsias en caballos y garrapatas en la región occidental de Cuba.

MÉTODOS

Alteraciones hematológicas en caballos infectados con *B. caballi* y *T. equi*.⁽⁹⁾

Se analizaron 58 muestras de sangre de caballos clínicamente sanos (17 de La Habana y 41 de Mayabeque), a las que se les realizó el diagnóstico de *B. caballi* y *T. equi* a partir de frotis sanguíneo, y el examen hematológico de la serie roja y de la serie blanca. La identificación de cada hemoparásito se realizó basada en parámetros morfológicos y biométricos descritos en la literatura, tales como la forma, la localización y el tamaño.⁽¹⁰⁾

Los animales se inspeccionaron de forma individual; se les realizó examen físico y se determinó la presencia de garrapatas. Las garrapatas colectadas se conservaron en etanol al 70 % y para la identificación taxonómica se empleó la clave publicada por Barros-Battesti *et al.*⁽¹¹⁾

Se determinó el valor medio, máximo y mínimo de los valores obtenidos del hematocrito, la hemoglobina, los eritrocitos totales, el volumen corpuscular medio, la concentración de hemoglobina corpuscular media y los leucocitos totales de los animales en estudio. Se utilizaron tablas de contingencia 2 x 2 para detectar la asociación entre las variables sexo, edad, presencia de garrapatas, contacto con bovinos y hematocrito < 0,32 L/L, con la presencia de *B. caballi* y *T. equi*. Para identificar diferencias con respecto a los valores de hematocrito en animales positivos y negativos a *B. caballi* y *T. equi*, se realizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. El análisis de los datos se realizó con el empleo de los programas Epidat 3,1⁽¹²⁾ e InfoStat,⁽¹³⁾ con 95 % de intervalo de confianza (IC). Las diferencias se consideraron significativas para $p < 0,05$.

Desarrollo, estandarización y evaluación de ensayos de nPCR para la detección de *B. caballi* y *T. equi*

Para el diagnóstico de *B. caballi* y *T. equi* se emplearon los cebadores descritos por Battsetseg *et al.*,⁽³⁾ que amplifican 2 fragmentos de ADN dentro de los genes *bc48* y *ema-1*, respectivamente.

En todos los ensayos de nPCR, para ambas etapas (PCR₁ y PCR₂), las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 25 µl, conteniendo 1X GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, EE. UU.) y 0,8 µM de cada cebador; en el PCR₁ se utilizaron 2 µl de ADN y en el PCR₂ 1 µl de producto del PCR₁. Las reacciones se desarrollaron en un termociclador Eppendorf Mastercycler *gradient 96* (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania).

Los resultados del nPCR se aplicaron en geles de agarosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, EE. UU.) al 2 % en tampón TBE 0,5 X y se tiñeron con bromuro de etidio (0,5 µg/mL). Los resultados se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta macro vue (Pharmacia Biotech Inc., EE. UU.). En todos los casos se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Promega, Madison, EE. UU.).

Se optimizaron los principales parámetros críticos en ambas etapas de los ensayos (PCR₁ y PCR₂), realizando el PCR₂ a partir del producto del PCR₁. Cada experimento se realizó por duplicado. Se determinaron la temperatura óptima de alineamiento de los cebadores, la concentración óptima de cebadores, la especificidad analítica y la sensibilidad analítica.

Detección molecular de *B. caballi* y *T. equi* mediante nPCR⁽¹⁴⁾

El método de muestreo aplicado fue aleatorio simple. La población objeto de estudio está ubicada en 6 municipios del occidente de Cuba, correspondientes a las provincias: Mayabeque (San José de las Lajas, Jaruco y Madruga), Artemisa (Artemisa), La Habana (Boyeros) y Matanzas (Unión de Reyes).

Se tomaron muestras de sangre a 100 caballos, mediante punción de la vena yugular utilizando agujas hipodérmicas calibre 25 mm x 0,8 mm (21G) y tubos para extracción de sangre por sistema de vacío de 4 mL (BD Vacutainer®), con 7,2 mg de K₂ EDTA como anticoagulante. En el momento de la toma de muestra ningún animal presentaba manifestaciones clínicas de síndrome hemolítico.

La extracción de ADN de las muestras se realizó con el estuche comercial DNeasy Blood and Tissue DNA Purification Kit (QIAGEN®, EE. UU.), según la metodología descrita por el fabricante. La calidad y concentración del ADN se determinó en el equipo Colibri Microvolume Nanodrop Spectrophotometer (Titertek-Berthold, Alemania).

Para el diagnóstico de *B. caballi* y *T. equi* se emplearon las etapas de cada ensayo de nPCR estandarizado en el presente estudio. La visualización de los productos de PCR se realizó según la metodología descrita con anterioridad.

Para confirmar los resultados obtenidos en los ensayos de nPCR, se secuenciaron 3 amplímeros del gen *bc48* (*B. caballi*) y 3 del gen *ema-1* (*T. equi*). Además, se seleccionaron 3 muestras positivas a *T. equi* para amplificar el gen ARNr 18S (~ 1800 pb), con los cebadores publicados por Liu *et al.*⁽¹⁵⁾ Los productos de PCR se purificaron utilizando el estuche comercial QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN®, USA), y se secuenciaron por el método Sanger empleando el estuche comercial ABI Prism BigDye™ Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems®, EE. UU.), en un secuenciador automático ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems®, EE. UU.).

Las secuencias obtenidas se ensamblaron, editaron y analizaron utilizando el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis 7 (MEGA7).⁽¹⁶⁾ El algoritmo BLASTn⁽¹⁷⁾ se empleó para evaluar los porcentajes de identidad de las secuencias consenso generadas con secuencias nucleotídicas representativas de los genes *bc48*, *ema-1* y ARNr 18S, disponibles en la base de datos GenBank. Las secuencias obtenidas en este estudio se depositaron en la base de datos GenBank: *B. caballi bc48* (KY111763, KY111764 y KY111765), *T. equi ema-1* (KY111766) y *T. equi* ARNr 18S (KY111760, KY111761 y KY111762).

Las secuencias analizadas se alinearon con secuencias de aislados tipo, empleando el algoritmo ClustalW.⁽¹⁸⁾ El método de máxima verosimilitud (ML) se seleccionó para construir el árbol filogenético con la mejor topología posible, y las matrices de distancia para las secuencias alineadas se calcularon por el modelo paramétrico "Kimura-2-parámetros".⁽¹⁹⁾ La representación gráfica y edición del árbol filogenético se realizó con el programa MEGA7.

Detección e identificación molecular de rickettsias en caballos y garrapatas recolectadas de caballos en el occidente de Cuba⁽²⁰⁾

Se recolectaron muestras de sangre de la vena yugular de 164 caballos clínicamente sanos de 6 áreas rurales: Aguacate, El Perú, Tapaste, San Antonio de las Vegas, Santa Bárbara, Zaragoza y 34 muestras de un área urbana: San José de las Lajas, para un total de 200 caballos (126 hembras y 74 machos), con edades comprendidas entre los 5 meses y los 18 años por su dentición y la información proporcionada por los propietarios. Se colectaron 209 garrapatas parcialmente ingurgitadas de 11 caballos de San José de las Lajas y 68 de caballos de las áreas rurales. Las garrapatas se identificaron morfológicamente utilizando la clave taxonómica de Nava *et al.*⁽²¹⁾ La identidad de especie de *A. mixtum* se confirmó mediante secuenciación de los genes mitocondriales ARNr 12S y ARNr 16S.

Se extrajo ADN de cada muestra de sangre de caballo y de las garrapatas utilizando el estuche comercial Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Madison, WI, EE. UU.). Para detectar la presencia de *Rickettsia* se utilizó un ensayo de PCR en tiempo real TaqMan® dirigido al gen del antígeno rickettsial de 17 kDa (*htrA*).⁽²²⁾ Las muestras con un Ct inferior a 40 se consideraron positivas para *Rickettsia*.

La identificación de especie de *Rickettsia* se realizó mediante la secuenciación de amplicones producidos a partir de un PCR anidado (nPCR) dirigido a 394 pb del gen del antígeno rickettsial de 17 kDa.⁽²³⁾ Se realizó nPCR a todas las muestras de garrapatas positivas por RT-qPCR. Se purificaron 8 ampli-

cones, 5 de *A. mixtum* (3 hembras y 2 machos) y 3 de *D. nitens* (3 hembras), y se sometieron a secuenciación automatizada de ADN, con los cebadores utilizados para la amplificación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El valor medio de todos los parámetros hematológicos evaluados estuvo en el rango de referencia descrito para la especie equina. Se observaron formaciones intraeritrocíticas compatibles con *B. caballi* y *T. equi* en 3/58 (5,2 %) y 8/58 (13,8 %) animales, respectivamente; de estos, 6/11 (10,3 %) tenían valores de hematocrito <0,32 L/L. El análisis estadístico mostró diferencias significativas al evaluar la relación entre los valores de hematocrito y las muestras positivas a *T. equi*. Por otra parte, la presencia de estas infecciones está distribuida similarmente entre animales de uno y otro sexo, en los 2 grupos etarios estudiados y no estuvo favorecida por la presencia de garrapatas, ni por el contacto con bovinos. Sin embargo, los animales infectados con *T. equi* mostraron asociación con la presencia de anemia, a diferencia de los animales infectados con *B. caballi*.

A partir de estos resultados se puede concluir que, en la región en estudio, las infecciones con *B. caballi* y *T. equi* están presentes en caballos sin signos clínicos de piroplasmosis equina, los cuales pueden actuar como una fuente potencial de infección de estos hemoparásitos a los rebaños equinos susceptibles.

Con la verificación del desempeño de los ensayos de nPCR se comprobó que estas técnicas son factibles de realizar en nuestras condiciones de laboratorio, visualizándose bandas correspondientes a las tallas esperadas en las etapas de PCR₁ y PCR₂, similares a lo descrito por Battsetseg *et al.*⁽³⁾. Otros autores, como Kang *et al.*⁽²⁴⁾ y Braga *et al.*⁽²⁵⁾ obtuvieron resultados similares cuando desarrollaron estos ensayos.

Se seleccionó 56 °C como la temperatura de alineamiento óptima para todas las etapas, considerando la intensidad de las bandas amplificadas y la ausencia de amplificaciones inespecíficas. A partir de los resultados obtenidos se seleccionaron, para la primera etapa de los ensayos de nPCR correspondientes a *B. caballi* y *T. equi*, las concentraciones de 0,4 μM y 0,2 μM, respectivamente; para la segunda etapa se seleccionó la concentración de 0,2 μM de cada cebador para ambos ensayos de nPCR.

Las condiciones finales para los tiempos y temperaturas de amplificación se organizaron de la forma siguiente: *B. caballi* y *T. equi*: un ciclo a 96 °C/4 min, seguido por 40 ciclos de 94°C/1 min, 56 °C/2 min, 72 °C/2 min y una extensión final de 72 °C/5 min, las condiciones de amplificación para la PCR₂ son similares a las ya descritas, pero durante 30 ciclos. Al evaluar la especificidad analítica, cada ensayo demostró ser

específico para el hemoparásito analizado, coincidiendo con los resultados de Battsetseg *et al.*.⁽³⁾

Los ensayos de nPCR estandarizados demostraron la detección sensible y específica de estos hemoparásitos, por lo que constituyen una poderosa herramienta diagnóstica que puede utilizarse en los programas de manejo y control de estas hemoparasitosis.

Como resultado del diagnóstico molecular de *B. caballi* y *T. equi* con el empleo de 2 ensayos de nPCR, en muestras de sangre de 100 animales, 78 (78 %; 95 % CI; 68,5 %-85,7 %) resultaron positivos a la presencia de al menos 1 de los hematozoos en estudio; de estos 5 (5 %; 95 % CI; 2,2 %-11,2 %) estaban infectados solo con *B. caballi*, 53 (53 %; 95 % CI; 43,3 %-62,5 %) con *T. equi* y 20 (20 %; 95 % CI; 13,4 %-28,9 %) presentaron coinfección. Es de destacar que en el momento de la toma de muestra ningún animal presentaba manifestaciones clínicas de síndrome hemolítico; esto hace suponer que estos animales son portadores asintomáticos de *B. caballi* y *T. equi*, que pueden actuar como reservorio para la infección de garrapatas vectores que participan en la transmisión natural de estos hemoparásitos.

La distribución de muestras positivas, aun cuando no se trata de un estudio epidemiológico, permite suponer que las infecciones por *T. equi* pudieran estar distribuidas en diferentes rebaños de la región en estudio, si se tiene en cuenta el número de animales que resultaron positivos por nPCR. Resultados similares son descritos en estudios realizados en Brasil, España, Portugal, Italia, Irán, Mongolia y la India, donde la mayoría de los rebaños equinos en estos países son portadores de *B. caballi* y *T. equi*.^(26, 27, 28)

La identificación de *B. caballi* y *T. equi* se confirmó con la secuenciación de fragmentos de los genes *bc48* y *ema-1*, respectivamente, de 3 muestras positivas de cada hemoparásito, seleccionadas al azar, lo que evidenció que todas las secuencias obtenidas para *B. caballi* se corresponden con el gen *bc48*, las cuales mostraron de 96 % a 100 % de identidad con secuencias publicadas de Brasil, Estados Unidos, Egipto, Filipinas y Mongolia. En el caso de *T. equi* también se confirmó que todas las secuencias obtenidas corresponden con el gen *ema-1*, y mostraron de 99 % a 100 % de identidad con secuencias de África del Sur, Brasil, Estados Unidos, Israel, India, Japón y Tailandia.

Las secuencias del gen ARNr 18S de *T. equi* mostraron de 96 % a 100 % de identidad con secuencias de *T. equi* previamente depositadas en el GenBank. El análisis filogenético las agrupó dentro de los clados correspondientes a los genotipos A y C, descritos para este agente.⁽²⁹⁾ La secuencia ubicada en el clado A muestra 99 % de identidad con secuencias de África del Sur, Brasil, Estados Unidos y la India; mientras que

las 2 secuencias ubicadas en el clado C muestran 99 % de identidad con secuencias de África del Sur, Brasil y México.

En el presente estudio se identificaron al menos 2 genotipos de *T. equi* (A y C), en los rebaños equinos de la región occidental de Cuba, lo que demuestra la diversidad genética en los aislados existentes, aspecto conocido incluso dentro de rebaños de una misma región geográfica. Estos resultados se informaron previamente en África del Sur, Estados Unidos, Jordania, Sudán, Mongolia y Turquía.^(26, 30)

Estos resultados constituyen la primera evidencia molecular de *B. caballi* y *T. equi* infectando caballos en Cuba y su confirmación mediante el análisis de los genes secuenciados. Los animales positivos constituyen un reservorio para la infección a otros equinos susceptibles y a las garrapatas vectores, lo que se debe tener en cuenta para la estrategia de los programas de manejo y control de estos hemoparásitos en el país.

En los estudios de identificación de rickettsias, las garrapatas recolectadas comprendieron 14 *A. mixtum* (4 hembras y 10 machos) y 195 *Dermacentor nitens* (58 hembras, 53 machos y 84 ninfas). Las ninfas de *D. nitens* se agruparon en 19 grupos de 2-5 garrapatas recolectadas del mismo hospedador.

Se detectó ADN rickettsial en 29 (20 %) de las 144 muestras de garrapatas; 3 hembras y 6 machos de *A. mixtum*, 12 hembras y 6 machos de *D. nitens*, y 2 muestras agrupadas de ninfas de *D. nitens*. La prevalencia de *Rickettsia* en adultos de *A. mixtum* (64 %) fue significativamente mayor ($P < 0,001$) que en adultos de *D. nitens* (16 %). Los 9 adultos de *A. mixtum* que fueron PCR positivos para *Rickettsia* se recolectaron de 9 caballos diferentes, y los 18 adultos y 2 grupos de ninfas de *D. nitens* que fueron PCR positivos se recolectaron de 16 caballos. Cinco caballos estaban parasitados por ambas especies de garrapatas. De estos, 3 tenían adultos de *A. mixtum*, los otros 2 tenían *A. mixtum* y *D. nitens* que eran todas PCR positivos para *Rickettsia*. Todos los caballos parasitados por garrapatas que dieron positivo en la PCR para *Rickettsia* procedían de áreas rurales de la provincia de Mayabeque, mientras que las garrapatas recolectadas en el área urbana fueron todas PCR negativas.

Las secuencias de nucleótidos obtenidas para el gen de 17 kDa de las rickettsias de las 5 *A. mixtum* (números de acceso al GenBank MN885528-MN885532) eran idénticas entre sí. Los resultados del análisis BLASTn revelaron que estas 5 secuencias eran 100 % idénticas a las secuencias del gen de 17 kDa de *R. amblyommatis* de *Amblyomma* spp. en México, Argentina y Brasil, y de caballos en Brasil. También fueron 99 % similares a las secuencias de ADN de una cepa de referencia (GAT-30V) de *R. amblyommatis*, y otros aislados de esta bacteria de *Amblyomma* spp. en Argentina y Estados Unidos.

La detección de *R. amblyommatis* en adultos de *A. mixtum* de la provincia de Mayabeque en el presente estudio es consistente con los hallazgos de Noda *et al.* ⁽⁷⁾ quienes reportaron una alta prevalencia de esta bacteria en *A. mixtum* parasitando caballos y perros en la provincia de Artemisa. Recientemente, se detectó *R. amblyommatis* en una ninfa de *A. mixtum* extraída de un turista alemán que regresó a su país de una visita a la provincia de Mayabeque. ⁽³¹⁾ Aunque no está claro si *R. amblyommatis* es un patógeno humano, los sueros de 3 a 6 pacientes sospechosos de contraer fiebre maculosa de las Montañas Rocosas (RMSF) en Carolina del Norte (EE. UU.), durante 2005 tuvieron seroconversión con un aumento de 4 veces o más en los títulos de IgG a *R. amblyommatis*, y no a *R. rickettsia*, ⁽³²⁾ el agente causante de RMSF. En 2006, una mujer de Carolina del Norte desarrolló una erupción localizada en el lugar donde había sido picada por una garrapata *Amblyomma americanum* infectada con "Ca. *R. Amblyommii*", ⁽³³⁾ por lo que *R. amblyommatis* puede representar un riesgo potencial para la salud humana.

Las secuencias de nucleótidos (394 pb) obtenidas para el gen de 17 kDa de las rickettsias de los 3 adultos de *D. nitens* (números de acceso MN885533-MN885535) fueron 100 % idénticas a las secuencias del gen de 17 kDa de una cepa de referencia (URRWXCal2/California 2) de *Rickettsia felis* y otros aislados de *R. felis* de Brasil, EE. UU., México y China.

La presencia de *R. felis* en ninfas y adultos de *D. nitens* sugiere que los caballos pueden ser potenciales reservorios vertebrados de esta bacteria en Cuba. Sin embargo, a diferencia de las muestras de garrapatas, todas las muestras de sangre tomadas de los 200 caballos fueron PCR-negativas para *Rickettsia*. Esto no excluye la posibilidad de infección por rickettsias en estos caballos porque la detección molecular en la sangre tiene una sensibilidad relativamente baja, una vez que las bacterias comienzan a infectar las células endoteliales ⁽³⁴⁾ que ocurre después de los primeros días o semanas de una infección. ⁽³⁵⁾

Los caballos pueden ser un reservorio potencial para *R. felis* si otras especies de garrapatas, como *Rhipicephalus sanguineus*, que son garrapatas de 3 hospedadores que parasitan a perros y humanos, ⁽³⁶⁾ y ocasionalmente caballos, ⁽³⁷⁾ puede transmitir la bacteria a los caballos que parasitan. Aunque no se han reportado casos humanos de rickettsiosis en Cuba, se necesitan estudios adicionales para investigar la amenaza potencial de infección por *R. felis* en humanos y otros vertebrados en Cuba.

Estos resultados representan el primer reporte de *R. felis* en *D. nitens* en Cuba y amplían el conocimiento sobre el espectro de vectores potenciales y la distribución de patógenos que pueden transmitir en el occidente de Cuba.

Conclusiones

Se dispone de ensayos de nPCR para la detección sensible y específica de *Babesia caballi* y *Theileria equi*, que pueden contribuir al fortalecimiento de los programas de manejo y control de estas hemoparasitosis. Por primera vez en Cuba se realiza la detección e identificación molecular de *B. caballi* y *T. equi* en caballos. El análisis filogenético de las secuencias completas del gen ARNr 18S de *T. equi* demostró la presencia de al menos 2 genotipos diferentes de este hemoparásito en caballos de la región occidental, lo que confirma su diversidad genética, dentro de rebaños equinos de una misma región geográfica. Por primera vez se reporta *Rickettsia felis* en garrapatas *Dermacentor. nitens* en Cuba. Con los resultados obtenidos se amplía el conocimiento sobre el espectro de vectores potenciales y la distribución de patógenos que pueden transmitir, en el occidente cubano.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer a Chulantha Prasanga Dives, Matthew E. M. Yunik, Yanet López Dorta, Marcelina Santos Ordaz, Enrique Pérez Pérez, Cristian Díaz Corona, Fulgencio Pupo Batista, Oscar Fernández Martínez, Armando Perfecto Pérez, Marcio Díaz Ravelo, Kelvin Estrada Porras, Evelio Castellón Madruga, Nelson Albelo Chávez y Eleuterio Hernández Hernández por la colaboración brindada para la realización de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Scoles GA, Ueti MW. Vector ecology of equine piroplasmiasis. *Annu Rev Entomol.* 2015;60:561-80.
2. Salabarría FF, Godshaev A, Ferrer J, Jimenez T, Villalba G, Jorge J. *Babesia equi* and *Babesia caballi* in zebras. Morphological and serological diagnosis. *Revista Cubana de Ciencias Veterinarias.* 1982;12:171-6.
3. Battsetseg B, Xuan X, Ikadai H, Bautista JLR, Byambaa B, Boldbaatar D, *et al.* Detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in *Dermacentor nuttalli* adult ticks. *Int J Parasitol.* 2001;31:384-6.
4. Rampersad J, Cesar E, Campbell MD, Samlal M, Ammons D. A field evaluation of PCR for the routine detection of *Babesia equi* in horses. *Vet Parasitol.* 2003;114:81-7.
5. Baptista C, Lopes MS, Tavares AC, Rojer H, Kappmeyer L, Mendonca D, da Camara Machado A. Diagnosis of *Theileria equi* infections in horses in the Azores using cELISA and nested PCR. *Ticks Tick Borne Dis.* 2013;4:242-5.
6. Ayala Valdovinos MA, Lemus Flores C, Galindo García J, Banuelos Pineda J, Rodríguez Carpena JG, Sanchez Chipres D, Duifhuis Rivera T. Diagnosis and prevalence of *Theileria equi* horses in western Mexico by nested PCR. *Parasitol Int.* 2016;66:821-4.
7. Noda AA, Rodríguez I, Miranda J, Mattar S, Cabezas Cruz A. First report of spotted fever group *Rickettsia* in Cuba. *Ticks Tick Borne Dis.* 2016;7:1057-8.

8. Corona BG, Díaz Sánchez AA, Meli ML, Cañizares EV, Arias LR, Dorta YL, Rivero EL, Hofmann-Lehmann R. Occurrence of tick-borne pathogens in stray dogs from Havana, Cuba. *Acta Biomedica Scientifica*. 2018;3:158-9.
9. Díaz Sánchez AA, Fonseca Rodríguez O, Castillo Domínguez S, López Dorta Y, Lobo Rivero E, Corona González B, Vega Cañizares E. Hematological alterations found in horses (*Equus caballus*) infected with *Babesia caballi* and *Theileria equi*. *Rev Salud Anim*. 2018;40:1. ISSN: 2224-4667.
10. OIE TM. Equine piroplasmosis. NB: Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE. 2014.8p.
11. Barros Battesti DM, Hernández MR, Famadas KM, Onofrio VC, Beati L, Guglielmo AA. The ixodid ticks (Acari: Ixodidae) of Cuba. *Syst Appl Acarol*. 2009;14(2):101-28.
12. Hervada VX, Santiago PM, Vázquez FE, Castillo SC, Loyola EE, Silva ALC. Epidat 3.0 programa para análisis epidemiológico de datos tabulados. *Rev Esp Salud Públ*. 2004;78(2):277-80.
13. Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat [programa de cómputo]. Córdoba, Argentina: Universidad Nacional de Córdoba; 2011. versión 24-03-2011: Disponible en: <http://www.infostat.com.ar/>
14. Díaz Sánchez AA, Sandes M, Yurzun C, Vega Cañizares E, Castillo Domínguez S, Cabezas Cruz A, Lobo Rivero E, Henrique da Fonseca A, Massard CL, Corona-González B. First molecular evidence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses in Cuba. *Parasitol Res*. 2018;117:3109-18.
15. Liu Q, Zhao JL, Zhou YQ, Liu EY, Yao BA, Fu Y. Study on some molecular characterization of *Babesia orientalis*. *Vet Parasitol*. 2005;130:191-8.
16. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*. 2016;33:1870-4.
17. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990;215:403-10.
18. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, *et al*. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007;23:2947-8.
19. Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol*. 1993;10:512-26.
20. Díaz Sánchez AA, Chilton NB, Roblejo Arias L, Fonseca Rodríguez O, Marrero Perera R, Diyes ChP, Yunik MEM., Lobo Rivero E, Corona González B. Molecular detection and identification of spotted fever group rickettsiae in ticks collected from horses in Cuba. *Med Vet Entomol*. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/mve.12480>
21. Nava S, Venzal JM, González Acuña D, Martins TF, Guglielmo AA. Chapter 2 - Genera and Species of Ixodidae. In *Ticks of the Southern Cone of America* (ed. by S. Nava, J. M. Venzal, D. González-Acuña, T. F. Martins & A. A. Guglielmo). Academic Press, London, United Kingdom. 2017. 25-267p.
22. Jiang J, Stromdah, EY, Richards AL. Detection of *Rickettsia parkeri* and *Candidatus Rickettsia andeanae* in *Amblyomma maculatum* Gulf Coast ticks collected from humans in the United States. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2012;12:175-82.
23. Labruna MB, Whitworth T, Horta MC, Bouyer DH, McBride JW, Pinter A, Popov V, Gennari SM, Walker DH. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. *J Clin Microbiol*. 2004;42:90-8.
24. Kang SW, Doan HT, Choe SE, Noh JH, Yoo MS, Reddy KE, Kim YH, *et al*. Molecular investigation of tick-borne pathogens in ticks from grazing cattle in Korea. *Parasitol Int*. 2013;62:276-82.
25. Braga M, Costa FN, Gomes DRM, Xavier DR, Andre MR, Goncalves LR, *et al*. Genetic diversity of piroplasmids species in equids from island of Sao Luis, northeastern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2017;26:331-9.
26. Munkhjargal T, Sivakumar T, Battsetseg B, Nyamjargal T, Abou-laila M, Purevtseren B, *et al*. Prevalence and genetic diversity of equine piroplasms in Tov province, Mongolia. *Infect Genet Evol*. 2013;16:178-85.
27. Peckle M, Pires MS, Dos Santos TM, Roier EC, da Silva CB, Vi-lela JA, Santos HA, Massard CL. Molecular epidemiology of *Theileria equi* in horses and their association with possible tick vectors in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitol Res*. 2013;112:2017-25.
28. Sumbria D, Moudgil AD, Singla LD. Equine Piroplasmosis: Current status. *Veterinaria*. 2014;1:9-14.
29. Bhoora R, Franssen L, Closthuizen MC, Guthrie AJ, Zweygarth E, Penzhorn BL, *et al*. Sequence heterogeneity in the 18S rRNA gene within *Theileria equi* and *Babesia caballi* from horses in South Africa. *Vet Parasitol*. 2009;159:112-20.
30. Qablan MA, Obornik M, Petrzalkova KJ, Sloboda M, Shudiefat MF, Horin P, *et al*. Infections by *Babesia caballi* and *Theileria equi* in Jordanian equids: epidemiology and genetic diversity. *Parasitol*. 2013;140:1096-103.
31. Chitimia-Dobler L, Schaper S, Mansfeld P, Gonschorrek J, Bröker M, Nava S. Detection of *Amblyomma mixtum* (Acari: Ixodidae) in Germany on a human traveler returning from Cuba. *J Med Entomol*, 2020;57:962-4.
32. Apperson CS, Engber B, Nicholson WL, Mead DG, Engel J, Yabsley MJ, *et al*. Tick-borne diseases in North Carolina: Is "*Rickettsia amblyommii*" a possible cause of rickettsiosis reported as Rocky Mountain spotted fever? *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2008;8:597-606.
33. Billeter SA, Blanton HL, Little SE, Levy MG, Breitschwerdt EB. Detection of "*Rickettsia amblyommii*" in association with a tick bite rash. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2007;7:607-10.
34. Walker DH, Valbuena GA, Olano JP. Pathogenic mechanisms of diseases caused by *Rickettsia*. *Ann New York Acad Sci*. 2003;990:1-11.
35. Znazen A, Sellami H, Elleuch E, Hattab Z, Ben Sassi L, Khrouf F, *et al*. Comparison of two quantitative real time PCR assays for *Rickettsia* detection in patients from Tunisia. *PLOS Negl Trop Dis*. 2015;9, e0003487.
36. Dantas-Torres F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasit Vectors*. 2010;3:26.
37. Medrano Bugarini RA, Figueroa Millán, JV, Rivera Chavira BE, Lira Amaya JJ, Rodríguez Alarcón CA, Beristain Ruiz DM, Adame Gallegos JR. Detection of *Theileria equi*, *Babesia caballi*, and *Anaplasma phagocytophilum* DNA in soft ticks and horses at Ciudad Juárez, Mexico. *Southwest Entomol*. 2019;44:647-58.

Conflicto de interés

Los autores declaran que no existen conflictos de interés relacionados con el presente artículo.

Contribuciones de autores

- Conceptualización: Adrian A. Díaz Sánchez, Belkis Corona-González, Neil B. Chilton.
- Curación de datos: Adrian A. Díaz Sánchez, Osvaldo Fonseca-Rodríguez, Lisset Roblejo Arias.
- Análisis formal: Carlos Yrurzun Estrada, Adivaldo Henrique da Fonseca, Carlos Luiz Massard.
- Adquisición de fondos: Adrian A. Díaz-Sánchez, Belkis Corona-González, Neil B. Chilton.
- Investigación: Adrian A. Díaz Sánchez, Ernesto Vega Cañizares, Roxana Marrero Perera, Carlos Yrurzun Estrada, Marcus Sandes Pires, Sergio Luis del Castillo Domínguez.
- Metodología: Adrian A. Díaz-Sánchez, Belkis Corona González, Neil B. Chilton, Evelyn Lobo-Rivero.
- Administración del proyecto: Belkis Corona-González, Neil B. Chilton.
- Recursos: Neil B. Chilton.

- Supervisión: Belkis Corona-González, Neil B. Chilton, Alejandro Cabezas Cruz.
- Redacción-borrador original: Adrian A. Díaz Sánchez
- Redacción-revisión y edición: Adrian A. Díaz-Sánchez, Belkis Corona González, Neil B. Chilton, Alejandro Cabezas Cruz.

Financiación

Adrian A. Díaz Sánchez recibió una beca del Programa de Líderes Emergentes en las Américas (ELAP) a través del Programa de Becas Internacionales de Asuntos Globales de Canadá. Este proyecto fue parcialmente financiado a través de una Beca del Consejo de Investigación en Ingeniería y Ciencias Naturales de Canadá, al Profesor Neil B. Chilton.

Cómo citar este artículo

Díaz-Sánchez AA, Corona González B, Chilton NB, Lobo Rivero E *et al.*. Detección e identificación molecular de patógenos transmitidos por garrapatas en *Equus caballus* y garrapatas del occidente de Cuba. *Anales de la Academia de Ciencias de Cuba* [internet] 2022[citado en día, mes y año];12(1): e1125. Disponible en: <http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/1125>

