



## CIENCIAS AGRARIAS Y DE LA PESCA

Artículo original de investigación

### Detección e identificación molecular de patógenos transmitidos por garrapatas en perros de La Habana, Cuba

Belkis Corona González <sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0002-2302-5361>  
Adrián Alberto Díaz Sánchez <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-7743-7794>  
Regina Hofmann Lehmann <sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0001-9750-4296>  
Marina L. Meli <sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-3609-2416>  
Lisset Roblejo Arias <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-3246-1026>  
Evelyn Lobo Rivero <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-8103-4821>  
Neil B. Chilton <sup>3</sup> <https://orcid.org/0000-0002-3982-1351>  
Osvaldo Fonseca Rodríguez <sup>4</sup> <https://orcid.org/0000-0002-0253-5928>  
Ernesto Vega Cañizares <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-6137-3837>  
Anisleidy Pérez Castillo <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-0368-3436>  
Roxana Marrero Perera <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-0864-8034>  
Cristian Díaz Corona <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-2035-1663>  
Elianne Piloto Sardiñas <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-6926-2194>

<sup>1</sup> Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. Mayabeque, Cuba

<sup>2</sup> Laboratorio clínico, Departamento para estudios y servicios clínicos, Centro para estudios clínicos, Facultad Vetsuisse, Universidad de Zurich. Zurich, Suiza

<sup>3</sup> Universidad de Saskatchewan. Saskatchewan, Canadá

<sup>4</sup> Universidad de Umea. Umea, Suecia

\*Autor para la correspondencia: [bcorona@censa.edu.cu](mailto:bcorona@censa.edu.cu)

#### RESUMEN

##### Revisores

Iliana María Sosa Testé  
Centro Nacional para la Producción  
de Animales de Laboratorio.  
La Habana, Cuba

Marco Antonio Suárez Tronco  
Universidad Agraria de La Habana y  
Centro de Investigaciones para el  
Mejoramiento  
Animal de la Ganadería Tropical.  
Mayabeque, Cuba

**Introducción:** Las enfermedades caninas transmitidas por vectores constituyen un peligro para la salud animal y humana. El presente estudio tuvo como objetivo determinar la prevalencia de patógenos zoonóticos (*Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Ehrlichia canis* y *Rickettsia* spp. y no zoonóticos (*Hepatozoon canis* y *Babesia* spp.) en perros sin dueño de La Habana. **Métodos:** Se recolectaron muestras de sangre de 100 perros; se estudiaron los perfiles hematológicos y se detectaron los patógenos por visualización de frotis sanguíneos y PCR en tiempo real. Para determinar la prevalencia de infección por *H. canis* se estudiaron 80 perros mediante visualización de frotis sanguíneo y PCR en tiempo real. Para la detección de *Babesia* spp. se estudiaron 60 perros, a los que se les realizó examen hematológico, frotis sanguíneo y PCR. **Resultados:** Resultaron positivos para al menos un patógeno 85 perros, siendo *E. canis* el más prevalente, seguido de *A. platys* y *Rickettsia felis*, y el 36 % mostró coinfecciones. Todas las muestras fueron negativas para *A. phagocytophilum* y *B. burgdorferi* s.l. Estos resultados constituyen el primer reporte de *R. felis* en perros de La Habana, demuestran la alta prevalencia de patógenos transmitidos por garrapatas, con potencial zoonótico y constituyen el primer estudio donde se analizan las

**Editor**

Lisset González Navarro  
Academia de Ciencias de Cuba.  
La Habana, Cuba

**Traductor**

Yoan Karell Acosta González  
Academia de Ciencias de Cuba.  
La Habana, Cuba

coinfecciones. El 38 % de los perros sin dueño resultaron positivos por PCR a *H. canis*, y por primera vez se realiza su caracterización molecular. Para *Babesia* spp., el 20 % de los perros fueron positivos por PCR, lo que constituye la primera evidencia molecular de *Babesia* spp. en perros sin dueño de La Habana. En conclusiones, estos resultados son de gran importancia para la vigilancia de las enfermedades transmitidas por vectores en perros, y demuestran la necesidad de estudios sobre la prevención de la transmisión y expansión de las enfermedades que provocan.

**Palabras clave:** enfermedades transmitidas por vectores; perros sin dueño; PCR en tiempo real

## Detection and molecular identification of tick-borne pathogens in Havana, Cubandogs

### ABSTRACT

**Introduction:** Vector-borne canine diseases are a serious danger to animal and human health. The objective of the present study was to determine the prevalence of zoonotic pathogens (*Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Ehrlichia canis* and *Rickettsia* spp. and non-zoonotic (*Hepatozoon canis* and *Babesia* spp.) in ownerless dogs from Havana, Cuba. **Methods:** Blood samples were collected from 100 dogs and the hematological profiles were studied and pathogens were detected by visualization of blood smears and real-time PCR. To determine the prevalence of infection by *Hepatozoon canis*, 80 dogs were studied by visualization of blood smears and real time PCR. For the detection of *Babesia* spp., 60 dogs were studied, using hematological examination, blood smear visualization and PCR. **Results:** Eighty-five dogs were positive for at least one pathogen, being *E. canis* the most prevalent, followed by *A. platys* and *Rickettsia felis*, and 36 % showed coinfections. All samples were negative for *A. phagocytophilum* and *B. burgdorferi* s.l. These results constitute the first report of *R. felis* in dogs from Cuba, demonstrate the high prevalence of pathogens transmitted by ticks, with zoonotic potential, and constitute the first study where coinfections are analyzed. 38 % of the dogs were positive for *H. canis* by PCR and for the first-time molecular characterization of *H. canis* was carried out in Cuban ownerless dogs and 20 % were positive by PCR for *Babesia* spp., which constitutes the first molecular evidence of *Babesia* spp. in ownerless dogs from Cuba. Conclusions, these results are of great importance for the surveillance of vector-borne diseases in dogs, and demonstrate the need for studies on the prevention of transmission and spread of the diseases they cause.

**Keywords:** canine vector-borne diseases; shelter dogs; real-time qPCR

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades caninas transmitidas por vectores constituyen un peligro para la salud animal. Algunos patógenos causantes de estas enfermedades son de gran preocupación zoonótica y constituyen un grave peligro para la salud humana en todo el mundo. <sup>(1)</sup>

*Ehrlichia canis* es el agente de la ehrlichiosis monocítica canina en perros, lobos y chacales y se ha reportado infectando a humanos. <sup>(2)</sup> La infección por *Anaplasma platys* causa trombocitopenia cíclica infecciosa en perros. El patógeno

también se ha identificado en un amplio abanico de hospedadores, que incluye a los humanos, además de los perros. <sup>(3)</sup> Las infecciones por *A. platys* pueden llegar a ser graves o mortales, sobre todo cuando hay coinfecciones con otros patógenos transmitidos por garrapatas, como *E. canis*. La presencia de *A. platys* y *E. canis* ha sido descrita previamente en Cuba, <sup>(4,5)</sup> pero la información relativa a su prevalencia y diversidad genética sigue siendo escasa.

La borreliosis de Lyme es la enfermedad zoonótica transmitida por garrapatas más prevalente en el hemisferio norte, causada por *Borrelia burgdorferi sensu lato*. <sup>(6)</sup> La anaplasmo-

sis granulocítica humana es otra enfermedad transmitida por garrapatas con importancia para la salud pública, causada por *Anaplasma phagocytophilum*.

La rickettsiosis es una enfermedad ampliamente distribuida por todo el mundo; varias especies son patógenos zoonóticos emergentes o reemergentes transmitidos por artrópodos hematófagos. <sup>(7)</sup>

La hepatozoonosis canina es una enfermedad protozoaria transmitida por garrapatas y causada por *Hepatozoon canis* y *Hepatozoon americanum*. Hasta la fecha, en Cuba solo hay un breve informe sobre la detección por PCR de *Hepatozoon* spp. en muestras de sangre de perros, y no se ha informado de la confirmación de la especie, ni de su caracterización molecular. <sup>(8)</sup>

En Cuba, el género *Babesia* se ha informado en perros, pero su diagnóstico se ha basado en la observación de signos clínicos, hallazgos hematológicos, observación directa mediante frotis de sangre y la detección de anticuerpos a través de métodos serológicos. González *et al.* <sup>(9)</sup> realizaron la primera detección molecular de *B. vogeli* infectando garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* s.l. colectadas de perros con dueño y plantearon la necesidad de la detección de las especies de *Babesia* infectando perros. El presente estudio tuvo como objetivo determinar la prevalencia de patógenos zoonóticos (*Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Ehrlichia canis* y *Rickettsia* spp.) y no zoonóticos (*Hepatozoon canis* y *Babesia* spp.) transmitidos por garrapatas en perros sin dueño de La Habana.

## MÉTODOS

### Diagnóstico molecular, prevalencia e importancia de los patógenos zoonóticos transmitidos por garrapatas

#### Recogida de muestras y extracción de ADN

Se tomaron muestras de sangre de un total de 100 perros seleccionados al azar de 10 municipios de la provincia La Habana. La extracción del ADN se realizó utilizando el juego de reactivos Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, EE. UU.). Se extrajo una muestra de hasta 10 garrapatas por perro infestado. La clasificación taxonómica se realizó según la clave taxonómica descrita por Estrada-Peña *et al.* <sup>(10)</sup>

#### Amplificación y secuenciación por PCR

Para verificar la presencia de ADN amplificable en las muestras, se realizó un ensayo de qPCR en tiempo real para el gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gapdh*)

<sup>(11)</sup> Todas las muestras de ADN se analizaron mediante qPCR en tiempo real utilizando los cebadores y sondas descritos para *A. phagocytophilum*, <sup>(12)</sup> *A. platys*, <sup>(13)</sup> *B. burgdorferi* s.l., <sup>(14)</sup> *E. canis* <sup>(15)</sup> y *Rickettsia* spp. <sup>(16)</sup> Se realizó la secuenciación del ADN en muestras seleccionadas al azar y se utilizaron en ensayos de PCR con cebadores específicos de género y especie para *Ehrlichia/Anaplasma* spp. (gen ARNr 16S), <sup>(17)</sup> *A. platys* (gen *groEL*), <sup>(18)</sup> *E. canis* (gen *gltA*), <sup>(19)</sup> y *Rickettsia* spp. (genes *ompA*, *ompB* y *htrA*) <sup>(20)</sup>

#### Análisis de secuencias

Los productos de la PCR se purificaron y se clonaron utilizando los reactivos pCR 2.1 de clonación TOPO TA (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Alemania) seguido de la transformación en células competentes *Escherichia coli* Top 10F'. El ADN del plásmido recombinante se envió para secuenciación con cebadores universales del gen M13 (Microsynth, Balgach, Suiza).

Las secuencias obtenidas se analizaron mediante BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La traducción teórica de las secuencias de nucleótidos a secuencias de aminoácidos se realizó con la herramienta ExPASy translate (<http://www.expasy.org>) y las secuencias de proteínas se alinearon con ClustalW, incluido en el paquete BioEdit v.7.0.0 (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, EE. UU.).

#### Análisis filogenético

El análisis filogenético se realizó con el paquete de software Molecular Evolutionary Genetics Analysis versión 7.0 (MEGA7), <sup>(21)</sup> utilizando el método neighbor-joining. Las secuencias se alinearon utilizando MAFFT configurado para la mayor precisión y se identificaron las regiones conservadas. <sup>(22)</sup> Tras la alineación, las regiones ambiguas se eliminaron con la versión 0.91 b de Gblocks <sup>(23)</sup> Para la construcción de los árboles filogenéticos, se seleccionó el modelo que mejor se ajustaba a la evolución de la secuencia basándose en el criterio de información de Akaike Corregido (cAIC) y el criterio de información bayesiano (BIC) implementados en MEGA7.

#### Análisis de datos

Los datos obtenidos se compilaron y analizaron con el software Excel 2016 (Microsoft Corporation, WA, EE. UU.), y el análisis estadístico se realizó con el software R. <sup>(24)</sup> Las tasas de prevalencia de *A. platys*, *E. canis*, *Rickettsia* spp. y coinfecciones con intervalos de confianza (IC) del 95 % se calcularon mediante un enfoque bayesiano basado en la distribución beta ( $s + 1$ ;  $n - s + 1$ ), donde  $s$  = positivos;  $n$  = animales analizados.

## Detección y caracterización molecular de *Hepatozoon canis*

### Toma de muestras de sangre y examen microscópico

Se tomaron muestras de sangre total de 80 perros sin dueños que vivían en diferentes lugares de La Habana. Se prepararon 2 frotis sanguíneos finos, se tiñeron con Giemsa<sup>(25)</sup> y se examinaron para detectar la presencia de gametos de *Hepatozoon* utilizando un microscopio de luz (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Alemania), con lente de inmersión en aceite a un aumento final 1000 X.

### Extracción de ADN y ensayos de PCR en tiempo real

El ADN se extrajo de sangre total utilizando el juego de reactivos Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, EE.UU.). Se realizó un ensayo de PCR en tiempo real para el gen *gapdh*.<sup>(26)</sup> La presencia de ADN de *H. canis* se evaluó mediante un ensayo de PCR en tiempo real con SBYR Green.<sup>(27)</sup> Se utilizó como control positivo una porción sintética de ADN de doble cadena (600 pb) del gen del ARNr 18 S de *H. canis* (GeneArt String DNA, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EE. UU.).

### Secuenciación y análisis filogenético

Las muestras positivas a la PCR de *H. canis* con valores de ciclo umbral (Ct) bajos se utilizaron para amplificar el gen ARNr 18S (~1750 pb).<sup>(28)</sup> Se enviaron para la secuenciación automatizada (Eurofins, Toronto, Canadá).

Las secuencias se enviaron a GenBank con los números de acceso MN393910-MN393913 y se compararon con secuencias del gen ARNr 18 S depositadas en el Gen Bank utilizando la herramienta nBLAST. Para el análisis filogenético, las secuencias se alinearon con las secuencias conocidas de *Hepatozoon* sp. utilizando MAFFT v.7 configurado para la máxima actividad (MAFFT con ajustes por defecto).<sup>(29)</sup> El modelo de evolución de la secuencia que mejor se ajustaba se seleccionó basándose en el criterio de información de Akaike corregido (cAIC) y el criterio de información bayesiano (BIC), tal y como se implementó en el análisis de genética evolutiva molecular (MEGA) v.7.0.14.<sup>(30)</sup> Se eligió para la reconstrucción del árbol el modelo de 3 parámetros de Tamura.<sup>(31)</sup> El árbol filogenético se reconstruyó utilizando el método *neighbor-joining* (NJ) implementado en MEGA.

### Análisis estadístico

Todos los datos obtenidos se compilaron en el *software* Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, WA). La concordancia entre los resultados de frotis de sangre y la PCR en tiempo real del gen ARNr 18 S se comprobó mediante la estadística kappa ( $\kappa$ ) basada en el esquema propuesto por Altman *et al.*<sup>(32)</sup> La prevalencia observada, los estadísticos

kappa, los intervalos de confianza (IC) de 95 % y el análisis estadístico se realizaron utilizando el *software* R.<sup>(24)</sup> La prueba U de Mann-Whitney se realizó utilizando la función *mwu* del paquete *sjstats* v0.17.5 y el análisis de concordancia se realizó utilizando el paquete *fmsb* v0.6.3 del *software* R.

## Ocurrencia de *Babesia* spp. en perros sin dueño

### Toma de muestras y extracción de la sangre

Se colectaron muestras de sangre completa de 60 perros sin dueño procedentes de 11 municipios de la provincia La Habana. La sangre se obtuvo mediante punción de la vena yugular, por sistema de vacío (BD Vacutainer®), con 7,2 mg de EDTA K2 como anticoagulante.

### Colecta de garrapatas

De cada animal se extrajo, al menos, 10 de las garrapatas presentes y se agruparon por especie, estadio y sexo. Para la identificación se empleó la clave taxonómica publicada por Nava *et al.*<sup>(33)</sup>

### Diagnóstico por frotis sanguíneo

Las formaciones compatibles con *Babesia* spp. se identificaron como inclusiones intracitoplasmáticas, ubicadas en los eritrocitos, en forma de peras, simples, pareadas o múltiples; según lo descrito por Lempereur *et al.*<sup>(34)</sup> extracelulares, según Coralie *et al.*<sup>(35)</sup>

### Extracción y calidad del ADN

Para la extracción del ADN se utilizó el juego de reactivos *Genomic DNA Purification Kit* (Promega, Madison, EE. UU.). Para detectar la presencia de posibles inhibidores en el ADN extraído, se amplificó un fragmento del gen *gapdh* (gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa).<sup>(36)</sup>

### Diagnóstico de *Babesia* spp.

Se seleccionaron los cebadores descritos por Birkenheuer *et al.*<sup>(36)</sup> con los que se amplifica en un primer ensayo de PCR el ARNr 18 S de *Babesia* y en un segundo ensayo de PCR se amplifica una región de aproximadamente 340 pb dentro de este gen. Los resultados del PCR se aplicaron en geles de agarosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, EE. UU.) al 2 % en tampón TBE 0,5X, se tiñeron con Bromuro de Etidio (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta Macro Vue (Farmacia Biotech Inc., EE. UU.). En todos los casos se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Promega, Madison, EE. UU.).

### Análisis estadístico

Los datos se agruparon conformando una base de datos en Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, WA). Se utilizó la prueba exacta de Fisher para determinar si existía asociación entre las variables infestación por garrapa-

tas y el sexo del animal, con la infección por *Babesia* spp. El análisis de los datos obtenidos se realizó con el empleo del software R, Package stats version 3.6.0. <sup>(24)</sup> con un 95 % de intervalo de confianza (IC).

### Consideraciones éticas

En todos los casos se emplearon los métodos de manejo y sujeción correctos para el procedimiento. Las muestras se colectaron por veterinarios clínicos, y se respetaron estrictamente las normas éticas y de bienestar animal de la Organización Mundial para la Sanidad Animal.

## RESULTADOS

### Diagnóstico molecular, prevalencia e importancia de los patógenos zoonóticos transmitidos por garrapatas

De las 100 muestras de sangre, 85 (85 %; IC del 95 %: 77, 88-92, 12) resultaron positivas para al menos un patógeno. *E. canis* fue el patógeno más prevalente 62 % (IC 95 %: 52,32-71,68), seguido de *A. platys* 40 % (IC 95 %: 30,23-49,77) y *Rickettsia* spp. 27 % (IC 95 %: 18,15-35,85). Los perros estaban coinfectados más frecuentemente por *E. canis* y *A. platys* en 28 (28 %; IC 95 %: 19,05-36,95), seguidos por *E. canis* y *Rickettsia* spp. en 13 (13 %; IC 95 %: 6,29-19,71), *A. platys* y *Rickettsia* spp. en 11 (11 %; IC 95 %: 4,76-17,24), y se detectaron infecciones mixtas triples en 8 perros (8 %; IC 95 %: 2,59-13,41). Se observó infestación por garrapatas en 57 de los 100 perros muestreados. Todas se identificaron morfológicamente como *R. sanguineus* (111 hembras, 131 machos y 6 ninfas). La presencia de garrapatas no se asoció estadísticamente con la aparición de infecciones positivas a la PCR ( $p = 0,115$ ): *E. canis* ( $p = 0,269$ ), *A. platys* ( $p = 0,268$ ), *Rickettsia* spp. ( $p = 0,814$ ) y coinfecciones ( $p = 0,411$ ).

El análisis de las secuencias del gen del ARNr 16 S obtenidas de los aislados cubanos de *E. canis* (1434 pb) y *A. platys* (1431 pb) reveló identidades > 99 % con varias secuencias de *E. canis* (LC269822, EF139459) y *A. platys* (EU106856, CP000107) disponibles en el Gen Bank. Las secuencias de nucleótidos obtenidas en el presente estudio no eran 100 % idénticas entre sí y pueden representar variantes locales que existen dentro de la región estudiada.

Las secuencias obtenidas de *E. canis-gltA* fueron 100 % idénticas entre sí y a las secuencias notificadas de China (CP025749), Filipinas (LC428206) y Zambia (LC373038), mientras que, para *A. platys-groEL*, las secuencias fueron 100 % idénticas entre sí y a las notificadas de la República Democrática del Congo (AF478129), Japón (AY077621) y Venezuela (AF399916) Las secuencias de *Rickettsia* spp.-*htrA* (434 pb) fueron 100 % idénticas entre sí y mostraron > 99 %

de identidad con las secuencias del gen del antígeno de superficie de 17 kDa de los aislados de referencia de *R. felis* notificados en México (GU447234) y Estados Unidos (CP000053). Para las secuencias de los genes *E. canis-gltA*, *A. platys-groEL* y *R. felis-htrA* no se observó ninguna variación nucleotídica entre los amplicones de PCR secuenciados.

El análisis filogenético basado en las secuencias del gen ARNr 16S se agrupó en 2 clados principales de *Anaplasma* spp. y *Ehrlichia* spp. El árbol filogenético resultante reveló que los aislados cubanos de *A. platys* y *E. canis* se agrupaban estrechamente con otras cepas de *A. platys* y *E. canis* notificadas en todo el mundo. El genotipo cubano de *A. platys-groEL* se clasificó estrechamente en el clúster de *A. platys* agrupado con otras cepas aisladas de diferentes especies hospedadoras de todo el mundo, con un valor *bootstrap* del 100 %. La cepa cubana de *E. canis-gltA* se agrupó dentro del clado de *E. canis* formado por cepas aisladas de diferentes especies hospedadoras de todo el mundo, con un apoyo del 100 % del valor *bootstrap*.

### Detección y caracterización molecular de *Hepatozoon canis*

El examen microscópico de los frotis de sangre reveló la presencia de gametos de *Hepatozoon* spp. en 8/80 (10,0 %; IC del 95 %: de 4,80 % a 18,0 %) perros. Los análisis por PCR detectaron la presencia de ADN de *H. canis* en 38/80 (47,5 %; IC 95 %: de 36,8 % a 58,4 %) muestras. Todas las muestras positivas por microscopía se confirmaron como infectadas por *H. canis* mediante PCR y secuenciación de ADN. Se observó una concordancia "pobre" entre los resultados obtenidos por el examen microscópico y el PCR, con un valor  $\kappa$  de 0,20 (IC 95 %: de 0,07 a 0,33). Las secuencias obtenidas para los tres aislados de *H. canis* fueron muy similares entre sí (de 99,3 % a 100 %) y > 99 % idénticas a las de los aislados de *H. canis* de República Checa (KX712124), Brasil (AY461375) y España (AY150067). El análisis filogenético produjo un árbol en el que los aislados cubanos de *H. canis* se situaron dentro de un clado con un fuerte apoyo de *bootstrap* (93 %) que contenía todos los demás aislados de *H. canis* con exclusión de todas las demás especies del género.

### Ocurrencia de *Babesia* spp. en perros sin dueño

A la exploración clínica el 51,6 % animales (31/60) estaban infestados con garrapatas. Se colectaron 69 garrapatas adultas y 3 ninfas de *Rhipicephalus sanguineus* s.l. En 10 de los perros donde se encontró *R. sanguineus* s.l., también se colectaron 15 garrapatas adultas y 2 ninfas de *Rhipicephalus microplus*.

Se observó que 11,6 % animales (7/60) presentaron formaciones intraeritrocíticas compatibles con *Babesia* spp. Se

visualizaron microorganismos intraeritrocíticos en forma de pera en pares o simples. En un animal (1,6 %) se observaron merozoitos extracelulares.

Como resultado del diagnóstico molecular mediante PCR, 20 % (12/60) de los animales resultaron positivos a la presencia de *Babesia* spp, con una banda de 340 pb, lo que se corresponde con lo descrito para este ensayo por Birkenheuer et al. (24) El estudio de asociación entre el sexo de los animales y la presencia de garrapatas con la infección por *Babesia* spp, mostró que no existe asociación entre las variables evaluadas para un valor de  $p = 1$ .

## DISCUSIÓN

Hasta donde los autores conocen, este es el primer estudio dirigido a investigar los patógenos transmitidos por garrapatas en perros sin dueño de La Habana. El 85 % de los perros resultaron positivos con los ensayos de PCR para al menos 1 de los patógenos en estudio. Las infecciones detectadas tienen un potencial zoonótico relevante, ya que se han notificado infecciones humanas por *E. canis*, *A. platys* y *Rickettsia* spp. en Venezuela, (37) Granada (38) y España, (39) respectivamente.

En este estudio se observó una alta prevalencia de infecciones mixtas; sin embargo, los perros no mostraron signos clínicos consistentes con las infecciones por *E. canis*, *A. platys* y *Rickettsia* spp. La mayoría de los perros eran asintomáticos, lo que puede reflejar la existencia de infecciones crónicas, subclínicas o leves que dificultan el diagnóstico clínico de los perros infectados.

El análisis filogenético, basado en las secuencias de ADNr 16 S, reveló que las cepas de *A. platys* y *E. canis* estaban estrechamente agrupadas con otras cepas de estos patógenos aisladas de perros de todo el mundo. Se observó un perfil genético altamente conservado para las cepas de *A. platys* y *E. canis* basado en el análisis de las secuencias parciales de los genes *groEL* y *gltA*, respectivamente. El análisis de las secuencias de los genes *E. canis-gltA* y *A. platys-groEL* realizado en 3 cepas cubanas reveló una identidad del 100 %, a pesar de que las muestras analizadas se obtuvieron de zonas diferentes. Los alineamientos de las secuencias y los árboles filogenéticos sugirieron una escasa diversidad genética y una evolución homogénea dentro de las cepas de *A. platys* y *E. canis*, basándose en la estrecha identidad entre sus secuencias de ADNr 16 S, *groEL* y *gltA*. Los resultados obtenidos concuerdan con resultados anteriores sobre una ligera variación genética entre los genes secuenciados de diferentes cepas de *A. platys* y *E. canis*. (40)

No se identificó la presencia de ADN de *A. phagocytophilum* y *B. burgdorferi* s.l. en ninguna de las muestras de sangre analizadas. Estos resultados están en consonancia con

la ausencia del principal vector de estos patógenos, que son garrapatas duras distintas de *R. sanguineus*, que nunca han sido reportadas en Cuba. (41)

De las 100 muestras, 27 resultaron positivas, en la qPCR de detección de especies de *Rickettsia*, y el posterior análisis de la secuencia identificó la presencia de *R. felis*, un miembro del grupo de las Rickettsias de la fiebre manchada (SFGR), por primera vez en perros de La Habana. Un estudio anterior realizado por Noda et al. (42) describió la detección de "*Candidatus Rickettsia amblyommii*" en la garrapata *Amblyomma mixtum* mediante PCR, lo que constituye el primer informe de un miembro de la SFGR en Cuba. La alta prevalencia de *R. felis* encontrada en los perros analizados pone de relieve la importancia sustancial de este patógeno para la salud humana, ya que la Rickettsiosis se ha convertido en un problema reemergente en todo el mundo. Estos hallazgos indican la necesidad de realizar más estudios sobre la presencia de *Rickettsia* spp. en *R. sanguineus* de Cuba.

En el presente estudio se informa por primera vez la detección de *H. canis* en perros sin dueños de La Habana. El examen microscópico de los frotis sanguíneos reveló una baja incidencia de infecciones por *Hepatozoon* spp. (10 %) en la población de perros examinados. El ensayo de PCR en tiempo real del gen ARNr 18 S, reveló que el 47,5 % de los perros estaban infectados por *H. canis*, demostrándose una escasa concordancia entre ambas pruebas. Este resultado demuestra que el examen microscópico de frotis sanguíneos es un método ineficaz, comparado con la PCR para la detección de *Hepatozoon* spp. en animales infectados, conclusión inferida por estudios anteriores realizados en otras regiones geográficas. (43)

La prevalencia de la infección por *H. canis* en perros sin dueños en La Habana basada en la PCR fue similar a la de informes anteriores basados en el análisis molecular en perros domésticos de Brasil (53,3 %), (44) República Checa (50 %), (45) e Italia (57,8 %). (46) Sin embargo, la prevalencia de la infección reportada para La Habana (47,5 %) fue mayor comparada con la descrita en estudios realizados en Haití (9,3 %) (47) y San Cristóbal y Nieves (6 %). (48) Las diferencias en la prevalencia de *H. canis* pueden deberse a varios factores, como la distribución geográfica y la densidad de población del vector, las condiciones climáticas, la metodología de muestreo utilizada, el estado inmunitario del hospedador y la población canina a la que se dirige. (49)

Los resultados de los análisis filogenéticos revelaron que *H. canis* de los perros de La Habana pertenecía al mismo clado que todos los demás aislados de *H. canis*, y con un apoyo estadístico muy fuerte para la separación de este clado de todas las demás especies de *Hepatozoon*. El presente estudio

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

proporciona la primera caracterización molecular de *H. canis* en perros sin dueños de La Habana. Los resultados confirman mediante PCR en tiempo real una alta prevalencia de *H. canis* en perros de zonas urbanas de La Habana, Cuba. Son necesarios más estudios para determinar la prevalencia de *H. canis* en diferentes poblaciones caninas y en vectores potenciales de diferentes zonas geográficas de Cuba.

En la detección de *Babesia* spp. el frotis sanguíneo mostró un bajo desempeño con respecto al PCR. Resultados similares fueron obtenidos por O'Dwyer *et al.*,<sup>(50)</sup> que reportaron el 8 % de las muestras positivas por PCR y solo en el 2 % se observaron los merozoitos de *Babesia* spp.

Singh *et al.*<sup>(51)</sup> no encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre el sexo y la infección por *Babesia* spp. en perros de la India. Estos autores plantean que existen otros factores de riesgo como la edad (animales jóvenes) y la época del año (verano) que si influyen de forma directa en la presencia de este patógeno en perros.

En el caso de la infestación por garrapatas, Galay *et al.*<sup>(52)</sup> reportaron que no existía asociación entre esta variable y la infección por *Babesia* spp.; sin embargo, los perros sin dueño pueden ser vehículos para las garrapatas, contribuyendo así a la propagación de las hemoparasitosis, por lo que la prevención de las enfermedades transmitida por garrapatas se logra eliminando la posibilidad de exposición al vector mediante un control activo del ambiente. Hasta donde los autores conocen este es el primer estudio de detección *Babesia* spp. en perros sin dueño de La Habana y demuestra la necesidad de investigaciones futuras dirigidas a determinar la especie, con estudios adicionales sobre los vectores que la pueden transmitir.

### Conclusiones

En el presente estudio se determinó la prevalencia de patógenos zoonóticos y no zoonóticos transmitidos por garrapatas en perros sin dueño de La Habana. Estos resultados constituyen el primer reporte de *Rickettsia felis* en perros sin dueño y demuestran la alta prevalencia de patógenos transmitidos por garrapatas, con potencial zoonótico, teniendo en cuenta, además las coinfecciones. Por primera vez se tiene evidencia molecular de *Hepatozoon canis* y *Babesia* spp. en perros sin dueño de La Habana.

Estos resultados son de gran importancia para la vigilancia de las enfermedades transmitidas por vectores en los animales de compañía, y demuestran la necesidad de estudios posteriores sobre la prevención de la transmisión y expansión de las enfermedades que provocan, siendo de gran valor para orientar medidas de prevención y control dirigidas a evitar su diseminación.

- Otranto D, Dantas Torres F, Mihalca AD, Traub RJ, Lappin M, Barneth G. Zoonotic Parasites of Sheltered and Stray Dogs in the Era of the Global Economic and Political Crisis. *Trends Parasitol.* 2017;33:813-25.
- Bouza Mora L, Dolz G, Solórzano Morales A, Romero Zuñiga JJ, Salazar Sánchez L, Labruna MB, Aguiar DM. Nuevo genotipo de *Ehrlichia canis* detectado en muestras de donantes de bancos de sangre humana en Costa Rica. *Ticks Tick Borne Dis.* 2017;8:36-40.
- Arraga-Alvarado CM, Parra OC, Hegarty BC, Breitschwerdt EB, Qurollo BA, Berrueta MA. Evidencia molecular de infección por *Anaplasma platys* en dos mujeres de Venezuela. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;91:1161-65.
- Navarrete MG, Cordeiro MD, Silva CB, Massard CL, López ER, Rodríguez JCA, *et al.* Diagnóstico serológico y molecular de *Ehrlichia canis* y factores de riesgo asociados en perros domiciliados en el occidente de Cuba. *Vet Parasitol Reg Stud Rep.* 2018;14:170-5.
- Da Silva CB, Santos HÁ, Navarrete MG, Ribeiro CCDU, Corona B, Zaldivar MF, *et al.* Detección y caracterización molecular de *Anaplasma platys* en perros y garrapatas en Cuba. *Ticks Tick Borne Dis.* 2016;7:938-44.
- Margos G, Vollmer SA, Ogden NH, Fish D. Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Infect Genet Evol.* 2011;11:1545-63.
- Vélez JCQ, Faccini-Martínez AA, González JDR, Díaz FJ, García RR, Ordosgoitia PS, *et al.* Fatal *Rickettsia rickettsii* infection in a child, Northwestern Colombia, 2017. *Ticks Tick Borne Dis.* 2019;10:995-6.
- Corona González B, 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 Biomed Sci.* 2018;3(4):158-9. Disponible en: DOI: <https://doi.org/10.29413/abs.2018-3.4.25>
- González N, Díaz C, Bezerra da S, Sandes P, Díaz U, Cabezas Cruz A, Massard C, Roque L, *et al.* Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia canis vogeli* in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks from Cuba. *Rev Bras Med Vet.* 2016;38(Supl.3):63-7.
- Estrada Peña A, Bouattour A, Camicas J, Walker AR. Garrapatas de los animales domésticos en la región mediterránea: Guía para la identificación de especies; Prensa de la Universidad de Zaragoza: Zaragoza, España, 2004; 130-3p.
- Sieber Ruckstuhl N, Meli M, Boretti FS, Gönczi E, Lutz H, Reusch C. Quantitative Real-time PCR for the Measurement of 11?-HSD1 and 11?-HSD2 mRNA Levels in Tissues of Healthy Dogs. *Horm Metab Res.* 2007;39:548-54.
- Pusterla N, Huder JB, Feige K, Lutz, H. Identification of a Granulocytic Ehrlichia Strain Isolated from a Horse in Switzerland and Comparison with Other Rickettsiae of the Ehrlichia phagocytophila Genogroup. *J Clin Microbiol.* 1998;36:2035-37.
- Hofmann Lehmann R, Wagmann N, Meli ML, Riond B, Novacco M, Joekel D, *et al.* Detección de 'Candidatus Neoehrlichia mikurenensis' y otras Anaplasmataceae y Rickettsiaceae en cánidos de Suiza y países mediterráneos. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde.* 2016;158:691-700.
- Leutenegger CM, Pusterla N, Mislin CN, Weber R, Lutz, H. Evidencia molecular de la coinfección de garrapatas con *Borrelia*

- burgdorferi Sensu Lato y el agente de la ehrlichiosis granulocítica humana en Suiza. J Clin Microbiol. 1999;37:3390-91.
15. Foley J, Drazenovich N, Leutenegger CM, Chomel BB. Asociación entre la poliartritis y la trombocitopenia y el aumento de la prevalencia de patógenos transmitidos por vectores en perros californianos. Vet Rec. 2007;160:159-62.
  16. Stenos J, Unsworth NB, Graves SR. A highly sensitive and specific real-time PCR assay for the detection of spotted fever and Typhus group Rickettsiae. Am J Trop Med Hyg. 2005; 73:1083-1085.
  17. Barlough JE, Madigan JE, DeRock E, Bigornia L. Nested polymerase chain reaction for detection of Ehrlichia equi genomic DNA in horses and ticks (Ixodes pacificus). Vet Parasitol. 1996;63:319-29.
  18. Alberti A, Zobba R, Chessa B, Addis MF, Sparagano OAE, Pargaglia MLP, *et al.* Equine and Canine Anaplasma phagocytophilum Strains Isolated on the Island of Sardinia (Italy) Are Phylogenetically Related to Pathogenic Strains from the United States. Appl Environ Microbiol. 2005;71:6418-22.
  19. Marsilo F, Di Martino B, Meridiani I, Bianciardi P. Direct Identification of Ehrlichia Canis by a Novel Polymerase Chain Reaction Method and Molecular Analysis of the Citrate Synthase (glcA) Gene from Various Italian Strains. J Vet Diagn Investig. 2006;18:215-17.
  20. Labruna MB, McBride JW, Bouye, DH, Camargo LMA, Camargo EP, Walker DH. Evidencia molecular de una especie de Rickettsia del grupo de la fiebre manchada en la garrapata Amblyomma longirostre Brasil. J Med Entomol. 2004;41:533-37.
  21. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Mol Biol Evol. 2016;33:1870-4.
  22. Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. Mol Biol Evol. 2013;30:772-80.
  23. Castresana, J. Selection of Conserved Blocks from Multiple Alignments for Their Use in Phylogenetic Analysis. Mol Biol Evol. 2000;17:540-52.
  24. Castresana J. Selection of Conserved Blocks from Multiple Alignments for Their Use in Phylogenetic Analysis. Mol Biol Evol. 2000;17:540-52.
  25. Coles E.H. Veterinary Clinical Pathology, 1st, W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1967:72-5p.
  26. Sieber-Ruckstuhl NS, Meli ML, Boretti FS, Gonczi E, Lutz H, Reusch CE. Quantitative real-time PCR for the measurement of 11beta-HSD1 and 11beta-HSD2 mRNA levels in tissues of healthy dogs. Horm Metab Res. 2007;39(8):548-54.
  27. Criado Fornelio A, Buling A, Cunha Filho NA, Ruas JL, Farias NA, Rey- Valeiron C, Pingret JL, *et al.* Development and evaluation of a quantitative PCR assay for detection of Hepatozoon sp. Vet. Parasitol. 2007;150(4):352-6. Disponible en: DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.09.025>
  28. Criado Fornelio A, Ruas JL, Casado N, Farias NAR, Soares MP, Müller G, Brum JGW, *et al.* New molecular data on mammalian Hepatozoon species (Apicomplexa: Adeleorina) from Brazil and Spain. J Parasitol. 2006;92(1):93-9.
  29. Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. Mol Biol. Evol. 2013;30(4):772-80.
  30. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Mol Biol Evol. 2018;35(6):1547-9.
  31. Tamura K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition- transversion and G+C-content biases, Mol Biol Evol. 1992;9(4):678-87.
  32. Altman DG. Practical Statistics for Medical Research, CRC Press. 1990.
  33. Nava S, Venzal JM, González-Acuña D, Martins TF, Guglielmo AA. Chapter 2-Genera and Species of Ixodidae. En: Nava S, Venzal JM, González Acuña D, Martins TF, Guglielmo AA, editor(es). In Ticks of the Southern Cone of America. Academic Press: 2017:25-267p.
  34. Lempereur L, Beck R, Fonseca I, Marques C, Duarte A, Santos M, *et al.* Guidelines for the Detection of Babesia and Theileria Parasites. Vector borne and zoonotic diseases. 2017;17(1): Disponible en: DOI: <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.19552017>
  35. Ćoralčić A, Gabrielli S, Zahirović A, Stojanović NM, Milardi GL, Jažić A, Zuko A *et al.* First molecular detection of Babesia canis in dogs from Bosnia and Herzegovina. Ticks Tick Borne Dis. 2018;9(2):363-8.
  36. Birkenheuer AJ, Levy MG, Breitschwerdt EB. Development and evaluation of seminested PCR for detection and differentiation of Babesia gibsoni (Asian genotype) and B. canis DNA in canine blood samples. J Clin Microbiol. 2003;41:4172-7.
  37. Perez M, Bodor M, Zhang C, Xiong Q, Rikihisa Y. Human Infection with Ehrlichia Canis Accompanied by Clinical Signs in Venezuela. Ann N Y Acad Sci. 2006;1078:110-7.
  38. Maggi RG, E Mascarelli P, Havenga LN, Naidoo V, Breitschwerdt EB. Coinfección por Anaplasma platys, Bartonella henselae y Candidatus Mycoplasma haematoparvum en un veterinario. Parasites Vectors. 2013;6:103.
  39. Oteo JA, Portillo A, Santibañez S, Blanco J, Pérez-Martínez L, Ibarra V. Cluster de casos de infección por Rickettsia felis humana del sur de Europa (España) diagnosticados por PCR. J Clin Microbiol. 2006;44:2669-71.
  40. Chisu V, Zobba R, Lecis R, Sotgiu F, Masala G, Foxi C, Pisu D *et al.* GroEL typing and phylogeny of Anaplasma species in ticks from domestic and wild vertebrates. Ticks Tick Borne Dis. 2018;9:31-6.
  41. Barros-Battesti DM, Hernández MR, Famadas KM, Onofrio VC, Beati L, Guglielmo AA. Las garrapatas ixodidas (*Acarí: Ixodidae*) de Cuba. Syst Appl Acarol. 2009;12:101.
  42. Noda AA, Rodríguez I, Miranda J, Mattar S, Cabezas-Cruz A. Primer informe del grupo de la fiebre manchada Rickettsia en Cuba. Ticks Tick Borne Dis. 2016;7:1057-58.
  43. Aktas M, Özübek S, Altay K, Balkaya İ, Utuk AE, Kirbas A, Şimsek S, *et al.* A molecular and parasitological survey of Hepatozoon canis in domestic dogs in Turkey, Vet Parasitol. 2015;209(3-4):264-7.
  44. Rubini AS, dos Santos Paduan K, Von Ah Lopes V, O'Dwyer LH. Molecular and parasitological survey of Hepatozoon canis (Apicomplexa: Hepatozoidae) in dogs from rural area of Sao Paulo state, Brazil, Parasitol Res. 2008;102(5):895-9.
  45. Mitková B, Hrazdilová K, Steinbauer V, D'Amico G, Mihalca AD, Modrý D. Autochthonous Hepatozoon infection in hunting dogs and foxes from the Czech Republic, Parasitol Res. 2016;115(11):4167-71.
  46. Otranto D, Dantas Torres F, Weigl S, Latrofa MS, Stanneck D, Decapriariis D, Capelli G, *et al.* Diagnosis of Hepatozoon canis in young dogs by cytology and PCR. Parasit Vectors. 2011;4(1):55.



47. Starkey LA, Newton K, Brunner J, Crowdis K, Edourad EJP, Me-neus P, Little SE. Prevalence of vector-borne pathogens in dogs from Hait. *Vet Parasitol.* 2016;224:7-12.
48. Kelly PJ, Xu C, Lucas H, Loftis A, Abete J, Zeoli F, Stevens A, *et al.* Ehrlichiosis, Babesiosis, Anaplasmosis and Hepatozoonosis in Dogs from St. Kitts, West Indies. *PloS One.* 2013;8(1):e53450.
49. Aktas M, Özübek S, Altay K, Balkaya İ, Utuk AE, Kirbas A, Şimsek S, *et al.* A molecular and parasitological survey of Hepatozoon canis in domestic dogs in Turkey. *Vet Parasitol.* 2015;209(3-4):264-7.
50. O'Dwyer LH, Lopes VVA, Rubini AS, Paduan KDS, Ribolla PEM. Babesia spp. infection in dogs from rural areas of Sao Paulo State Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet Jaboticabal.* 2009;18:23-26.
51. Singh A, Singh H, Singh N, Singh K, Rath S. Canine Babesiosis in Northwestern India: Molecular Detection and Assessment of Risk Factors. *BioMed Research International.* 2014;741785.
52. Singh A, Singh H, Singh N, Singh K, Rath S. Canine Babesiosis in Northwestern India: Molecular Detection and Assessment of Risk Factors. *BioMed Research International.* 2014;741785.
- Investigación: Adrián A. Díaz Sánchez, Lisset Roblejo Arias, Anisleidy Pérez Castillo, Ernesto Vega Cañizares, Roxana Marrero Perera, Cristian Díaz Corona, Elianne Piloto Sardiñas.
  - Metodología: Adrián A. Díaz Sánchez, Belkis Corona González, Regina Hofmann Lehmann, Marina L. Meli, Neil B. Chilton, Evelyn Lobo Rivero.
  - Administración del proyecto: Belkis Corona González, Regina Hofmann-Lehmann, Marina L. Meli.
  - Recursos: Regina Hofmann Lehmann, Neil B. Chilton.
  - Supervisión: Belkis Corona-González, Regina Hofmann Lehmann, Marina L. Meli, Neil B. Chilton.
  - Visualización: Adrián A. Díaz Sánchez, Belkis Corona-González, Regina Hofmann Lehmann, Marina, L. Meli Neil B. Chilton.
  - Redacción-borrador original: Adrián A. Díaz Sánchez
  - Redacción-revisión y edición: Adrián A. Díaz Sánchez, Belkis Corona González, Regina Hofmann Lehmann, Marina L. Meli, Neil B. Chilton.

---

Recibido: 15/07/2022  
Aprobado: 12/09/2022

---

### Agradecimientos

Los autores desean agradecer a Yanet López Dorta, Evelio Castellón Madruga, Marcelina Santos Ordaz, Enrique Pérez Pérez, Oscar Fernández Martínez, Kelvin Estrada Porra, Michel Torres González-Chávez, Rafael Grabiél Matos Rodríguez, Yendry Zamora Montalvo, Duniel Pino Rodríguez y Alberto Alfaro Pérez por la colaboración brindada para la realización de este trabajo.

### Conflictos de intereses

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

### Contribuciones de los autores

- Conceptualización: Adrián A. Díaz-Sánchez, Belkis Corona González, Regina Hofmann Lehmann, Marina L. Meli, Neil B. Chilton.
- Curación de datos: Adrián A. Díaz Sánchez, Osvaldo Fonseca-Rodríguez, Regina Hofmann Lehmann, Marina L. Meli, Lisset Roblejo Arias.
- Análisis formal: Evelyn Lobo Rivero, Ernesto Vega Cañizares, Roxana Marrero Perera, Cristian Díaz Corona, Elianne Piloto Sardiñas.
- Adquisición de fondos: Adrián A. Díaz-Sánchez, Belkis Corona-González, Regina Hofmann Lehmann, Neil B. Chilton.

### Financiamiento

Adrián Alberto Díaz Sánchez fue beneficiario de una beca de excelencia del Gobierno suizo apoyada por la Comisión Federal de Becas para Estudiantes Extranjeros (FCS) (número de referencia de la beca: 2016.0828). Adrián Alberto 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 (número de referencia de la beca: 2018.509).

### Cómo citar este artículo

Corona González B, Díaz Sánchez AA, Hofmann Lehmann R, Meli ML *et al.* Detección e identificación molecular de patógenos transmitidos por garrapatas en perros de La Habana, Cuba. *An Acad Cienc Cuba [internet]* 2023 [citado en día, mes y año];13(1):e1281. Disponible en: <http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/1281>

El artículo se difunde en acceso abierto según los términos de una licencia Creative Commons de Atribución/Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0), que le atribuye la libertad de copiar, compartir, distribuir, exhibir o implementar sin permiso, salvo con las siguientes condiciones: reconocer a sus autores (atribución), indicar los cambios que haya realizado y no usar el material con fines comerciales (no comercial).

© Los autores, 2023.

