



CIENCIAS AGRARIAS Y DE LA PESCA

El búfalo (*Bubalus bubalis*) como reservorio de *Babesia bovis*, *B. bigemina* y *Anaplasma marginale* en el Occidente de Cuba

ENTIDAD EJECUTORA PRINCIPAL: Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria

Entidades ejecutoras participantes: Universidad Agraria de la Habana; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil; Embrapa Pecuária Sudeste, Brasil; Universidade Estadual Paulista de Brasil, São Paulo, Brasil; French National Institute for Agricultural Research, Department of Animal Health (INRA), Francia

AUTORES PRINCIPALES: Dasiel Obregón Álvarez^{1,2}, Belkis Corona González¹, Pastor Alfonso Zamora¹

Otros autores: Yoandri Hinojosa López¹ Yasmani Armas Valdez², Eugenio Roque López², Adrian Díaz Sánchez¹, Siomara Martínez Marrero¹, Ernesto Vega Cañizares¹, Adivaldo Henrique Fonseca³, Marcia Cristina Oliveira⁴, Rosangela Zacarias Machado⁵, Alejandro Cabezas-Cruz⁶

Filiación: ¹Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria; ²Universidad Agraria de la Habana; ³Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil; ⁴Embrapa Pecuária Sudeste, Brasil; ⁵Universidade Estadual Paulista de Brasil, São Paulo, Brasil; ⁶French National Institute for Agricultural Research, Department of Animal Health (INRA), Francia

RESUMEN

Palabras clave

B. bovis; *B. bigemina*; *A. marginale*; coinfecciones; bubalinos; Cuba

En el presente trabajo se reporta por primera vez la alta prevalencia de coinfección por *Babesia bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale* en búfalos y se diagnóstica la presencia de *Babesia bigemina* en búfalos del Occidente de Cuba. Se diagnosticaron las infecciones subclínicas por *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale* en los búfalos y se analizaron varias características epidemiológicas de estas infecciones en los rebaños bubalinos, específicamente, los factores relacionadas con la participación de la especie bubalina como reservorio de estos patógenos en las condiciones ganaderas de la región occidental del país. Se demostró que existe similitud genética en el gen *msp1a* entre los aislados de *A. marginale* procedentes de bovinos y búfalos, lo que sugiere que ambas especies de hospederos están conectadas en la cadena de transmisión de esta rickettsia. Se concluyó que los rebaños bubalinos tienen capacidad de reservorio para *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale* y que, junto a las poblaciones de *R. microplus* y los rebaños bovinos, conforman los reservorios de estos hemoparásitos en los ecosistemas ganaderos de Cuba. Los resultados demuestran la necesidad de incluir los bufalinos en los programas de vigilancia y control de estos hemoparásitos.

En este trabajo se encontró que los valores de prevalencia para los tres patógenos superaron el 50 % en los rebaños bubalinos analizados, que estuvieron relacionados con altas prevalencias de infecciones subclínicas por estos hemoparásitos en los rebaños bovinos que coexistían en los mismos ecosistemas. Los valores de prevalencia molecular encontrados superaron los descritos en rebaños bubalinos de otras regiones del mundo (Sivakumar *et al.*, 2014). Las seroprevalencias de *B. bovis* y *B. bigemina* superaron las encontradas en búfalos en Brasil (Silva *et al.*, 2014). Los valores de seroprevalencia sobrepasaron los de prevalencia molecular para los tres hemoparásitos, lo que coincidió con lo observado en rebaños bubalinos de otras regiones del mundo.

El total de animales positivos por nPCR o por ELISAi fue de 264 (76 %) para *B. bovis*, 247 (72 %) para *B. bigemina* y 257 (74 %) para *A. marginale*, por lo que existe amplia circulación de estos tres hemoparásitos en los rebaños bubalinos en el Occidente de Cuba. Estas prevalencias indican que la especie bubalina puede tener capacidad de reservorio para estos patógenos en los ecosistemas ganaderos en la región estudiada y se infiere que la prevalencia de estos hemoparásitos depende, como en los bovinos, de los factores epidemiológicos locales, sobre todo de la dinámica poblacional de *R. microplus*.

En el 100 % de los rebaños estudiados se encontró la presencia de coinfecciones por los tres hemoparásitos, específicamente cuando se analizaron por pares de patógenos. Los rangos de coinfección fueron del 20 %, 24 %, y 26 % para *B. bovis/B. bigemina*, *B. bigemina/A. marginale* y *B. bovis/A. marginale*, respectivamente. Estos resultados coinciden con la coexistencia de estos patógenos en áreas endémicas, donde las coinfecciones son comunes en los bovinos.

En el análisis de la asociación entre la prevalencia molecular y la edad de los hospederos se encontró que las crías fueron el grupo con mayor prevalencia de *B. bovis*. De forma similar, las crías fueron el grupo etario de mayor riesgo de presentar la infección por *A. marginale*. En cuanto a la infección por *B. bigemina*, la prevalencia fue similar en las crías y los animales adultos; sin embargo, tuvieron menor prevalencia que los animales jóvenes.

El hecho de que las primeras infecciones se presenten en búfalos con menos de un año pudiera estar asociado con la infestación por el vector *R. microplus*, y puede ser indicativo de que los bucerros sean el grupo con mayor capacidad de reservorio para estos patógenos dentro de los rebaños bubalinos. Además, la infección de los búfalos en edades tempranas pudiera contribuir en la resistencia natural de la especie frente a estos hemoparásitos.

Niveles de parasitemia de *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale* en búfalos y bovinos portadores

Se desarrolló un sistema de PCR en tiempo real para la detección y cuantificación de *B. bovis* y *B. bigemina*. Ambos ensayos se optimizaron en protocolos similares, por lo que es posible su uso como una qPCR múltiple en un solo paso. Este método es una herramienta útil para estudios epidemiológicos sobre la participación de la especie bubalina en el proceso epidémico de la babesiosis y la anaplasmosis bovina (Obregón *et al.*, 2016).

En cuanto a los niveles de parasitemia, aun cuando los valores encontrados en búfalos fueron inferiores a los de los bovinos portadores, se comprobó que pueden ser suficientes para la infección de las teleoginas de *R. microplus*. Estos resultados indicaron que los búfalos pueden ser hospederos competentes para estos hemoparásitos y que los rebaños bubalinos son capaces de mantener estos patógenos en los ecosistemas ganaderos de Cuba. Los niveles bajos de parasitemia por *B. bovis* y *A. marginale* encontrados en búfalos, unido a la alta prevalencia en los rebaños, puede ser un indicador de que la infección por estos hemoparásitos también se establece persistentemente en los búfalos. Este aspecto es importante para la capacidad de reservorio de los rebaños bubalinos para estos patógenos en los ecosistemas ganaderos de Cuba.

La prevalencia de *B. bigemina* en los rebaños bubalinos, con niveles de parasitemia similares que en bovinos, indican que ambas especies son infectadas de forma sostenida por este protozoario, ya que la infección por este patógeno no se establece persistentemente y se mantiene por solo pocos meses en los hospederos portadores. Estos resultados, junto a las altas prevalencias en búfalos adultos y las bajas intensidades de infestación por garrapatas, indican que también pudieran presentarse las infecciones persistentes en los búfalos, lo que puede contribuir significativamente en la capacidad de reservorio de los rebaños bubalinos.

Estos resultados confirman la resistencia natural de los búfalos a las hemoparasitosis, fenómeno que se atribuye a su capacidad para reducir la infección y multiplicación de los patógenos, lo cual es un determinante de la capacidad de reservorio de las especies frente a los patógenos (Hily *et al.*, 2014). Además, demuestran que la especie bubalina es un hospedero competente para estos hemoparásitos, con niveles de parasitemia que permiten la infección de las garrapatas vectores, lo que favorece la subsecuente transmisión a otros hospederos.

Infestación por *R. microplus* en búfalos: su capacidad de transmisión transovárica de *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale* desde estos hospederos

La caracterización de una población reservorio requiere de la identificación de las vías que la conectan con la población diana. En este trabajo se confirmó que los búfalos se infestan por *R. microplus* y que son capaces de sostener poblaciones de estos vectores. Además, se comprobó que las teleoginas ingurgitadas en bubalinos portadores tienen descendencias viables e infectadas con *B. bovis* y *B. bigemina*, con niveles de infección similares a los que se encontraron en larvas procedentes de teleoginas ingurgitadas en bovinos. Esto indica que la interacción búfalos-garrapatas constituye una comunidad de mantenimiento para estos protozoarios.

En este trabajo no se analizaron las vías de transmisión de *A. marginale*. No obstante, se señaló la presencia de *R. microplus* en búfalos portadores como la principal vía de infección para la especie bubalina, por la eficiencia con que las garrapatas transmiten esta rickettsia a partir de hospederos con bajos niveles de parasitemia. Las poblaciones de garrapatas y los rebaños bubalinos pueden conformar comunidades de mantenimiento para *A. marginale*, sin descartar la posible transmisión mecánica por moscas hematófagas que pueden ser vectores en Cuba.

Por otro lado, las prevalencias de *B. bovis* y *A. marginale* fueron más altas en los bucerros que en los búfalos adultos, y una tendencia similar mostró la infestación por garrapatas. Este hecho pudiera caracterizar la dinámica del proceso infeccioso en búfalos, con predominio de las primeras infecciones en los bucerros con edades próximas al primer año de vida, lo que constituye un factor epidemiológico que puede contribuir a la resistencia natural de la especie bubalina frente a estos patógenos. Además, los valores de prevalencia y los niveles de infestación por garrapatas sugieren que los bucerros y los animales jóvenes pueden tener mayor capacidad de reservorio que los búfalos adultos en los rebaños, por lo que resulta necesario incluir los bucerros en el programa de lucha contra las garrapatas.

Diversidad genética de *A. marginale* en bovinos y búfalos en el Occidente de Cuba

Se determinó la similitud genética del gen *mSP1a* entre los aislados de *A. marginale* procedentes de bovinos y búfalos. Los resultados coincidieron con estudios realizados en Brasil, que encontraron similitud entre los aislados procedentes de ambas especies (Silva *et al.*, 2014). La similitud de los

aislados sugiere que ambas especies de hospederos están interconectadas en la cadena de transmisión de esta rickettsia en la región occidental de Cuba.

En el análisis de los microsatélites se encontraron los genotipos G, C, H y D; el genotipo G fue el más frecuente, seguido por el genotipo C, y los dos se encontraron en bovinos y búfalos. Los resultados de este trabajo mostraron que la especie del hospedero no fue un factor de diferenciación de los genotipos presentes en los rebaños. Los genotipos H y D solo se encontraron en bovinos o búfalos, respectivamente, pero se encontraron en ecosistemas diferentes, por lo que la variabilidad pudo ser consecuencia de la localización geográfica.

En la clasificación de las secuencias de MSP1a, según la estructura de los TR, se encontraron 16 tipos de TR conocidos, que estuvieron presentes en bovinos y búfalos. En este trabajo se encontró similitud entre los TR que se encuentran aislados de *A. marginale* procedentes de Cuba y los de otros países de América, sobre todo de los EE. UU. Además, se encontraron cuatro nuevas secuencias de TR; el Cu1 se encontró en un aislado de búfalos y los otros en tres bovinos.

En la clasificación de las proteínas MSP1a se encontraron 14 tipos de secuencias. Tales resultados mostraron que existe amplia diversidad entre los aislados de *A. marginale* en estos ecosistemas e indican que la especie bubalina es un hospedero competente para *A. marginale* en áreas endémicas, especialmente donde bovinos y bubalinos cohabitan y *R. microplus* es el principal vector. Teniendo en cuenta lo planteado por Viana *et al.* (2014), consideramos que los rebaños de búfalos son parte del reservorio de *A. marginale* en varias áreas ganaderas de Cuba.

Los resultados de esta investigación demuestran la importancia de mantener una rigurosa vigilancia epidemiológica sobre la anaplasmosis y la babesiosis, e indican la necesidad de incluir la especie bubalina en la vigilancia epidemiológica de las hemoparasitosis en Cuba.

Referencias bibliográficas

- Obregón, D., Alfonso, P., Armas, Y., Silva, J., Fonseca, A.H., Oliveira, M., André M., Machado, R., Cabezas, A., Corona, B. (2019). High co-infection rates of *Babesia bovis*, *B. bigemina* and *Anaplasma marginale* in water buffalo in Western Cuba. *Parasitology research*, 118(3), 955-967.
- Obregón, D., Corona, B., de la Fuente, J., Cabezas, A., Gonçalves, L., Matos, C.A., Armas, Y., Hinojosa, Y., Alfonso, P., Oliveira, M., Machado, R. (2018). Molecular evidence of the reservoir competence of water buffalo (*Bubalus bubalis*) for *Anaplasma marginale* in Cuba. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* 13; 180-187.
- Obregón, D., Rabelo, M., Gigliotti, R., Bilhassi, T., Néo, T., Corona, B., Alfonso, P., Machado, R., Oliveira, M. (2016). Standardization of a

- SYBR Green Based Real-Time PCR System for Detection and Molecular Quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina* in Water Buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Journal of Buffalo Science*, 2016, 5, 44-52. DOI: <http://dx.doi.org/10.6000/1927-520X.2016.05.02.4>
- Corona, B., Díaz, A., Hinojosa, Y., Obregón, D., Bezerra, C., Peckle M., et al. (2016). Análisis de la secuencia de la proteína principal de superficie 1a en aislados cubanos de *Anaplasma marginale*. *Rev Salud Anim.* 38(1), 14-18. ISSN: 2224-4700.
- Chauvin, A.C., Oreau, E.M., Onnet, S.B., Lantard, O.P. y Alandrin, L.M. (2009). *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Veterinary Research*, 40(37), 1-13. doi:10.1051/vetres/2009020
- Silva, J.B., Cabezas, C.A., Fonseca, A., Barbosa, J. y de la Fuente, J. (2014). Infection of water buffalo in Rio de Janeiro Brazil with *Anaplasma marginale* strains also reported in cattle. *Veterinary Parasitology*, 205(3-4), 730-734. doi:10.1016/j.vetpar.2014.09.009
- Sivakumar, T., Tattiyapong, M., Fukushi, S., Igarashi, I. y Yokoyama, N. (2014). Genetic characterization of *Babesia* and *Theileria* parasites in water buffaloes in Sri Lanka. *Veterinary Parasitology*, 200(1-2), 24-30. doi:10.1016/j.vetpar.2013.11.029
- Viana, M., Mancy, R., Biek, R., Cleaveland, S., Cross, P. C., Lloyd-smith, J. O. y Haydon, D. T. (2014). Assembling evidence for identifying reservoirs of infection. *Trends in Ecology & Evolution*, 29(5), 270-279. doi:10.1016/j.tree.2014.03.002

AUTOR PARA LA CORRESPONDENCIA

Dr. C. Belkis Corona González. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. Carretera de Tapaste y Autopista Nacional. CP 32700. Correo electrónico: bcorona@censa.edu.cu