

Infecciones transmitidas por garrapatas en Cuba: una alerta basada en evidencias científicas

Infecciones transmitidas por garrapatas en Cuba: una alerta basada en evidencias científicas

Rodríguez, Islay; Noda, Ángel Alberto; Fuentes, Omar; Echevarria, Eduardo; Espinosa, Yudeimys

 Islay Rodríguez

revistaacc@academiaciencias.cu

Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK). La Habana, Cuba, Cuba

 Ángel Alberto Noda

Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK). La Habana, Cuba, Cuba

 Omar Fuentes

Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK). La Habana, Cuba, Cuba

 Eduardo Echevarria

Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK). La Habana, Cuba, Cuba

 Yudeimys Espinosa

Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK). La Habana, Cuba, Cuba

Anales de la Academia de Ciencias de Cuba

Academia de Ciencias de Cuba, Cuba

ISSN-e: 2304-0106

Periodicidad: Cuatrimestral

vol. 11, núm. 2, e860, 2021

revistaacc@academiaciencias.cu

Recepción: 20 Mayo 2020

Aprobación: 16 Septiembre 2020

URL: <http://portal.amelica.org/ameli/jatsRepo/444/4442245025/index.html>

Financiamiento

Fuente: Esta investigación se realizó con fondos del MINSAP.

Autor de correspondencia: revistaacc@academiaciencias.cu

Resumen: Introducción: Las garrapatas duras son ectoparásitos hematófagos, vectores de patógenos zoonóticos emergentes. Hasta 2011 en Cuba existían evidencias de infección/exposición a *Borrelia burgdorferi* en seres humanos, pero se desconoce sobre la circulación de otros agentes. **Objetivo:** implementar nuevas herramientas diagnósticas, explorar infección/exposición de seres humanos a patógenos transmitidos por garrapatas, presencia de estos en vectores y nivel de conocimientos en personal médico. **Métodos:** se implementó PCR múltiple para detección de *B. burgdorferi* sl-*Anaplasma* spp. -*Babesia* spp., PCR para *Borrelia* spp., e infección artificial de garrapatas. Se describió la positividad a infección por *B. burgdorferi* (2011-2018), se exploró la presencia de anticuerpos contra borrelias en donantes de sangre de una región de baja exposición, anticuerpos contra otros agentes zoonóticos en población de riesgo, presencia de estos agentes en garrapatas, así como el nivel de conocimientos sobre enfermedad de Lyme en médicos. **Resultados:** Se fortalecieron capacidades del IPK para detección molecular de patógenos transmitidos por garrapatas. Se encontraron nuevas evidencias serológicas de infección por *B. burgdorferi* en pacientes con sospechas de enfermedad de Lyme. Se demostró ausencia de anticuerpos específicos contra *B. burgdorferi* en donantes de sangre. Se encontraron evidencias de anticuerpos contra *Anaplasma phago-cytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis* y *Babesia microti*. Se demostró presencia de *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., *Rickettsia amblyommii* y *Coxiella burnetii* en garrapatas. Se constataron conocimientos insuficientes sobre enfermedad de Lyme en personal médico. **Conclusiones:** estos resultados alertan a las autoridades nacionales de salud pública y personal médico sobre el riesgo de infección en individuos expuestos a picaduras de garrapatas.

Palabras clave: infecciones transmitidas por garrapatas, garrapatas, Cuba.

Abstract: Introduction: Hard ticks are hematophagous ectoparasites, vectors of emerging zoonotic pathogens. Until 2011, there was evidence of infection/exposure to *Borrelia burgdorferi* in humans in Cuba, but the circulation of other agents is unknown. **Aim:** implement new diagnostic tools, explore infection/exposure of humans to tick-borne pathogens,

their presence in vectors and level of knowledge in medical personnel. Methods: Multiplex PCR to detect *B. burgdorferi*–*Anaplasma* spp.–*Babesia* spp., PCR for *Borrelia* spp., and artificial infection of ticks were implemented. Positivity to infection by *B. burgdorferi* (2011-2018) was described. Presence of antibodies against borrelias in blood donors from a low-exposure region, antibodies against other zoonotic agents in a population at risk, presence of these agents in ticks, as well as the level of knowledge about Lyme disease in doctors were explored. **Results:** IPK capabilities for molecular detection of tick-borne pathogens were strengthened. New serological evidence of *B. burgdorferi* infection was found in patients with suspicion of Lyme disease. Absence of specific antibodies against *B. burgdorferi* was demonstrated in blood donors. Evidence of antibodies to *Anaplasma phagocytophilum*, Ehrlichia chaffeensis and Babesia microti were found. The presence of *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., *Rickettsia amblyommii* and *Coxiella burnetii* was demonstrated in ticks. Insufficient knowledge about Lyme disease was found in medical personnel. **Conclusions:** these results alert the national public health authorities and medical personnel about the risk of infection in individuals exposed to tick bites.

Keywords: tick-borne infections, ticks, Cuba.

INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son ectoparásitos obligados hematófagos de gran importancia médica y veterinaria, pues producen daños a sus hospedadores por acción directa (hematofagia y parálisis) o por la inoculación de organismos patógenos. Ellas constituyen los artrópodos que mayor diversidad de patógenos transmiten (virus, bacterias, protozoos, hongos, nemátodos).^(1,2)

La fauna cubana de garrapatas está compuesta por 31 especies, de las aproximadamente 850 que se reportan a nivel mundial. De ellas, 22 especies pertenecen a la familia Argasidae (garrapatas blandas) y nueve a la familia Ixodidae (garrapatas duras), siendo estas últimas las de mayor impacto para la salud humana y animal.^(1,3) Entre las garrapatas duras se describen *Dermacentor nitens*, *Rhipicephalus microplus*, *R. sanguineus sensu lato* (sl) y *Amblyomma cajennense* sl.

En Cuba durante 1998-2010 se demostró la infección autóctona por *Borrelia burgdorferi* sl en muestras clínicas de pacientes con sospechas clínicas y epidemiológicas de enfermedad de Lyme,^(4,5) así como la presencia de anticuerpos específicos contra este agente en individuos de una población expuesta a mordeduras de garrapatas;⁽⁶⁾ sin embargo, no se detectó material genético de *B. burgdorferi* sl en garrapatas duras de importancia médica y veterinaria, lo que no las señalaba ni excluía como posibles vectores.

Dados estos reportes previos y los niveles de infestación por garrapatas mantenidos en el país, tanto en animales del sector privado como estatal, se hace necesario conocer si existen nuevas evidencias de infección por *B. burgdorferi*, así como por otros patógenos transmitidos por garrapatas y realizar una primera aproximación a la evaluación del conocimiento acerca de enfermedad de Lyme en personal médico.

NOTAS DE AUTOR

islay@ipk.sld.cu

MÉTODOS

La presente contó con seis investigaciones, que se describen a continuación.

I. Diseño, evaluación e implementación de herramientas moleculares para la detección de patógenos transmitidos por garrapatas e implementación de la infección artificial de garrapatas con capilares

PCR múltiple convencional para *B. burgdorferi* *sl-Ana-plasma* spp-Babesia spp. ADN controles: *B. burgdorferi sensu stricto* (B31), *A. phagocytophilum* (Webster) y *B. microti* (HK).

Muestras biológicas y extracción de ADN: se empleó ADN obtenido de sangre de bovinos infectada con aislado suizo de *A. phagocytophilum* y extraído con NucliSens easyMAG

(bioMérieux, Suiza). ADN de cuatro ninfas *Ixodes ricinus* de la naturaleza e infectadas artificialmente con *B. burgdorferi*, obtenido con DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Alemania). ADN de gerbiles (*Meriones unguiculatus*) infectados intraperitonealmente con *B. microti*, extraído con QIAamp DNA Blood mini-kit (Qiagen, Alemania). Estos ensayos respetaron las legislaciones suizas sobre experimentación animal y estaban autorizados por el Servicio de Veterinaria del Canton de Neuchatel (Autorización No. 1/2003).

Se realizó la evaluación *in silico* de cebadores reportados previamente (genes *gltA*, *groESL*, *ankA* y *epank1*, *p 44/msp2*, ADNr 16 S) de *Anaplasma/Ehrlichia*, seleccionando los de la región hipervariable V1 del ADNr 16S. Para *B. burgdorferi* *sl* se emplearon los descritos por Postic *et al.* (1994);⁽⁷⁾ mientras que para *Babesia* sp. se seleccionaron secuencias parciales del gen ARNr 18S, a partir de las cuales se diseñaron los cebadores utilizando programas computacionales. Los juegos de cebadores se utilizaron para estandarizar una PCR que permitiera bajo las mismas condiciones la amplificación simultánea de los tres grupos microbianos.

Infección artificial de garrapatas duras con cultivos de borrelias. Siete garrapatas *RR. microplus* (Cayo Coco) se alimentaron con microcapilares⁽⁸⁾ con un subcultivo de 15 días de *B. burgdorferi sensu stricto* (B31), con ayuda de un cepo para inmovilizar las garrapatas con la cara ventral hacia arriba. Se incubaron en una cámara húmeda bajo la incidencia directa de un bombillo incandescente durante toda la noche. Al día siguiente las garrapatas se recuperaron. Se continuó con la extracción de ácidos nucleicos por el método de hidróxido de amonio y calor.⁽⁹⁾ Se evaluó eficacia de la extracción y ausencia de inhibidores en los extractos.⁽¹⁰⁾ A los que resultaron positivos se les aplicó una PCR para amplificar un fragmento del gen ADNr 16 S *Borrelia* spp., que se describe a continuación.

PCR-Borrelia spp. Se realizó la evaluación *in silico* de los cebadores Bf1 y Br1, 16S1A y 16S1B,⁽¹¹⁾ 16S2A y 16S2B⁽¹²⁾ correspondientes al gen ADNr 16 S, y los cebadores Bor1 y Bor2⁽¹³⁾ para el gen *flaB*. Se analizaron 31 secuencias del gen ADNr 16 S de 16 especies y 22 secuencias del gen *flaB* de 13 especies, con las que se diseñaron dos juegos de cebadores y estandarizaron dos PCR utilizando ADN de borrelias del grupo de enfermedad de Lyme y de fiebre recurrente. Las nuevas PCR se evaluaron con extractos de ADN obtenidos de garrapatas y mezclas de sueros y líquidos cefalorraquídeos infectados artificialmente con subcultivos de *B. burgdorferi* s.s.

II. Detección de infección por *B. burgdorferi sensu lato* en pacientes cubanos con sospechas clínico-epidemiológicas de enfermedad de Lyme

Se realizó revisión documental de los Registros de Diagnóstico entre 2011-2018 del LNR-TPE/IPK para conocer el nú-

mero de muestras procesadas según año de estudio, tipo de muestra clínica recibida, información clínica y epidemiológica de los pacientes y resultados de las pruebas serológicas. Para el análisis de los resultados se emplearon medidas de estadística descriptiva.

III. Exploración de respuesta de anticuerpos específicos contra *B. burgdorferi* s1 en individuos que habitan en una región de baja exposición a picaduras de garrapatas

Se realizó estudio exploratorio durante el año 2012 en 114 sueros de donantes de sangre de La Habana, población generalmente sana y que se supone de baja exposición a la infestación por garrapatas.

A cada muestra de suero se le realizó Western blot-IgG (Ag: cepa B31 de *B. burgdorferi* ss). Se utilizaron dos criterios de interpretación de resultados: a) sistema de puntuación según Laboratorio de Microbiología de La Chaux de Fonds, Suiza, b) criterio del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de Atlanta.⁽¹⁴⁾

IV. Exploración de anticuerpos específicos contra *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis* y *Babesia microti* en individuos expuestos a picaduras de garrapatas

Se realizó un estudio exploratorio en muestras de sueros de individuos que habitan en La Terrazas, Artemisa, las que fueron tomadas durante el 2006 y conservadas a -35 oC. Las muestras de sueros se seleccionaron de forma aleatoria y la cantidad de ellas estuvo en función del número de pruebas disponibles. Para la detección de anticuerpos IgG a *A. phago- cytophilum*, *E. chaffeensis* y *B. microti* se emplearon láminas de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) (Focus, EUA) específicas para cada patógeno en 83, 55 y 61 muestras de sueros, respectivamente.

V. Detección molecular de patógenos zoonóticos en garrapatas duras de importancia médico-veterinaria

Se realizaron cuatro estudios exploratorios, en los que se colectaron garrapatas en diferentes localidades del Occidente de Cuba, en diferentes momentos y sobre reservorios animales diferentes. Cada una de las garrapatas fue tomada por extracción manual con cuidado de no estropear las estructuras bucales y conservadas en alcohol al 70 % hasta su identificación taxonómica y posterior extracción del material genético. Para la identificación hasta el taxón de especie se emplearon las claves reportadas para éstas en la región Neotropical.⁽¹⁵⁾

- Estudio 1: 84 garrapatas colectadas a partir de caballos domésticos en Las Terrazas, Artemisa en junio del 2005.
Se estudiaron por PCR-hibridación en línea reversa (RLB) para la detección de especies de *Anaplasma* sp.-*Ehrlichia* sp., y *Babesia* sp.-*Theileria* sp.⁽¹⁶⁻¹⁹⁾
- Estudio 2: 297 garrapatas colectadas entre diciembre/2008 y mayo/2009, a partir de ganado bovino, caninos y una vivienda de Artemisa y La Habana. A los extractos de ADN se les aplicó la PCR múltiple diseñada previamente.
- Estudio 3: Durante diciembre 2013 - febrero 2014 se examinaron garrapatas de 185 perros callejeros de los 15 municipios de La Habana. A los extractos de ADN se les aplicó la PCR múltiple para la detección de *Anaplasma* spp. y *Babesia* spp., así como la PCR-*Borrelia* spp.
- Estudio 4: Durante agosto-septiembre de 2014 se colectaron 468 garrapatas sobre caballos, perros domésticos y seres humanos (de forma accidental) en Las Terrazas, Artemisa. A los extractos de ADN

se les aplicó una PCR para la amplificación de fragmentos de los genes *ompA* y *gltA* de *Rickettsia* spp.,⁽²⁰⁾ y una PCR para la amplificación de un fragmento del gen IS1111 de *C. burnetii*.⁽²¹⁾ A los amplicones obtenidos se les realizó secuenciación.

VI. Evaluación del nivel de conocimientos sobre enfermedad de Lyme en personal médico de diferentes niveles de atención en salud

Se realizó un estudio exploratorio del nivel de conocimientos sobre enfermedad de Lyme en médicos generales o integrales, dermatólogos y especialistas de atención terciaria mediante un muestreo por conveniencia durante los años 2007-2011, de forma anónima a través de un cuestionario validado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diseño, evaluación e implementación de herramientas moleculares para la detección de patógenos transmitidos por garrapatas e implementación de la infección artificial de garrapatas con capilares

PCR múltiple convencional para *B. burgdorferi* sl – *Ana-plasma* spp. – *Babesia* spp. El análisis de los alineamientos de las secuencias de *Babesia* spp. permitió la detección de sitios altamente conservados que facilitaron el diseño de los nuevos cebadores: Bab1 (5'-TGACACAGGGAGGTAGTGACA-3') y Bab2 (5'-CAGGACATCTAAGGGCATCA-3') para la amplificación de un fragmento de 925-995 pb. La temperatura de hibridación para los tres juegos de cebadores fue 53 °C. Tanto las PCR simples como múltiples (con dos o tres juegos de cebadores) fueron eficientes con los ADN de referencia y con las mezclas entre ellos. No se obtuvo interferencia o inhibición por el uso de múltiples cebadores en la mezcla de reacción.

Al evaluar la PCR múltiple diseñada con las muestras biológicas se obtuvieron los amplicones específicos según grupo microbiano (Figura 1).

En la línea 5, se muestra la coinfección por *Anaplasma* spp. y *Babesia* spp. en garrapatas colectadas de la naturaleza e infectadas artificialmente con borrelias. Este resultado confirma la eficiencia de la PCR múltiple para amplificar las tres dianas en una única reacción. La coinfección en garrapatas de borrelias y otros patógenos emergentes como especies de *Babesia* y *Anaplasma* se ha incrementado en regiones endémicas de enfermedades transmitidas por garrapatas,⁽²²⁾ lo que refuerza la necesidad de disponer de herramientas como esta PCR múltiple.

La PCR diseñada y evaluada es útil para la pesquisa de tres grupos de patógenos transmitidos por garrapatas, especialmente en regiones donde no exista información sobre la presencia de estos; reduce el uso de reactivos y tiempo al no ser necesario el desarrollo de tres reacciones de PCR individuales. **Infección artificial de garrapatas duras con cultivos de borrelias.** Se demostró la presencia de ADN de *Borrelia* en 5 de los 6 extractos (83,3 %) con calidad, lo cual confirma que la alimentación artificial fue posible en 5/7 garrapatas. Los resultados negativos pudieron estar dados por la presencia de inhibidores en los extractos, por la sensibilidad analítica de la PCR utilizada o la no alimentación de la garrapata en cuestión.

Aun cuando los resultados de esta investigación son preliminares y se utilizó un número pequeño de ixódidos, estos corroboran la validez del método de infección utilizado y son comparables con los reportados por otros autores.^(8,23)

PCR-*Borrelia* spp. La evaluación *in silico* de los cebadores Bf1/Br1, 16S1A/16S1B, 16S2A/16S2B y Bor1/Bor2 mostraron limitaciones en algunos de los requisitos evaluados (Ej. presentan *mismatches* respecto a la

secuencia diana, posible formación de dímeros, no reconocimiento de secuencias reportadas en el banco de genes correspondientes a las especies de *Borrelia* más representativas del grupo de enfermedad de Lyme y fiebre recurrente). Teniendo en cuenta estos resultados se sugiere no utilizar los cebadores analizados para la amplificación de ADN de *Borrelia* spp., por ello se decidió diseñar nuevos cebadores. Se propuso:

B1 5'-TAGATGAGTCTGCGTCTTATTA-3' y B2 5'-CTTACAC-

CAGGAATTCTAACTT-3'

B3 5'-TCACACTGGAAGTGGAGATACG-3' y B4 5'-CAACAGA-

TTCCACCCTTACAC-3'

Los dos juegos de cebadores diseñados cumplieron con las exigencias propuestas.

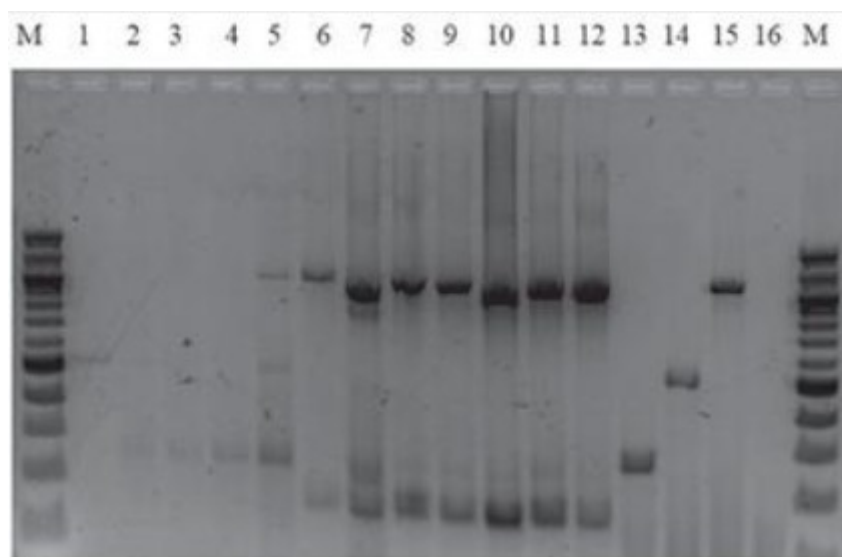


FIG. 1.

Electroforesis submarina en gel de agarosa al 2 % de los productos de amplificación por PCR múltiple de muestras infectadas artificialmente.

Líneas M: 100 bp DNA Ladder (BioLabs); Línea 1: sangre bovina infectada con *A. phagocytophilum*; Líneas 2-5: garrapata *I. ricinus* infectadas con *B. burgdorferi*; Líneas 6 - 12: sangre de gerbiles infectados con *B. microti*; Línea 13: control positivo *B. burgdorferi*; Línea 14: control positivo Anaplasma; Línea 15: control positivo *Babesia*; Línea 16: control negativo (agua).

Al usar los juegos de cebadores B1/B2 y B3/B4 en los ensayos de PCR donde se varió la temperatura de hibridación, se visualizó amplificación a cada una de las temperaturas ensayadas; aunque 59 oC y 61 oC se eligieron como temperaturas de hibridación óptimas para los mismos, respectivamente.

Al variar las concentraciones de los cebadores y las temperaturas de hibridación se evidenció para los cebadores B1/B2 disminución en el grosor de la banda del amplicón al disminuir la concentración de los cebadores, por lo que se seleccionó la concentración de 0,5 μ M, mientras que para los cebadores B3/B4 no se observaron diferencias para las concentraciones de 0,2 y 0,5 μ M, siendo entonces 0,2 μ M la concentración a utilizar. Se eligieron 59 oC y 61 oC como temperaturas de hibridación óptimas para cada PCR, respectivamente.

Los ensayos de los límites de detección o sensibilidad analítica de las PCR permitieron la observación de la amplificación, para ambos juegos de cebadores, hasta 25 fg de ADN, que equivale a diez genomas de la bacteria.

Al disminuir el número de ciclos para la reacción se observó una disminución apreciable del grosor e intensidad de las bandas, por lo que se mantuvieron los 40 ciclos en el programa de amplificación. En el ensayo de especificidad se verificó la ausencia de amplificación de ADN de las cepas ajenas a *Borrelia* spp. y se demostró la amplificación del fragmento de ADN esperado para las cepas de *Borrelia* ensayadas.

Al aplicar las PCR en los extractos de ácidos nucleicos obtenidos de garrapatas infectadas artificialmente, se visualizó con B1 y B2 la amplificación del fragmento de ADN esperado, excepto para dos garrapatas, mientras que con B3 y B4 sólo

para una no se obtuvo amplificación; ello pudo deberse a que estas garrapatas no se alimentaron con el cultivo o ingirieron una cantidad de borrelias no suficiente para alcanzar el límite de detección de la técnica. Para todas las mezclas de sueros y LCR se obtuvo amplificación.

Ambos juegos de cebadores con sus respectivas PCR mostraron resultados similares, lo que sugiere el uso de los mismos indistintamente.

I. Detección de infección por *B. burgdorferi* sensu lato en pacientes cubanos con sospechas clínico- epidemiológicas de enfermedad de Lyme

El suero y el LCR son las muestras de elección para el diagnóstico y fueron las que más se recibieron en el laboratorio, en una proporción media de 5:1 (suero: LCR). Se obtuvo positividad en el 7,6 % (12/158) de los pacientes estudiados; en 10 se detectaron anticuerpos IgM y en dos IgG (uno de ellos fue un paciente extranjero atendido en el IPK). Las principales proteínas de borrelias reconocidas en los Western blot- IgM fueron: p 72, p 41, p 34, p 31 y p 22.

Las solicitudes de análisis que acompañaban a las muestras, en su mayoría, tenían insuficiente información clínica y epidemiológica, aspecto que dificultó la orientación del personal de laboratorio para la selección de las pruebas a realizar, así como su interpretación. No obstante, con la información disponible se pudo plantear que entre los signos y síntomas que motivaron la sospecha clínica de esta entidad infecciosa aparecieron: lesiones en piel (en algunos casos eritematosas y compatibles con lo descrito para el eritema migratorio), adenopatías regionales, fiebre, parálisis faciales unio bilaterales (recurrentes en un paciente), lesiones corticales, artritis dolorosa, disminución de agudeza visual, cefalea hemisférica y paresia de III y VI pares craneales, debilidad muscular y dificultad para la marcha, paraparesia espástica, uveítis y otros. Como aspectos epidemiológicos predominó para algunos casos de pacientes cubanos, el antecedente de picaduras por insectos o garrapatas, residencia o visita a áreas rurales y en un caso la estancia previa en el extranjero.

Las nuevas evidencias de la infección por *B. burgdorferi* sensu lato sugieren que esta debe ser tomada en cuenta en pacientes con sintomatologías compatibles con enfermedad de Lyme, y que es un fenómeno que se mantiene vigente en el país.

II. Exploración de respuesta de anticuerpos específicos contra *B. burgdorferi* sl en individuos que habitan en una región de baja exposición a picaduras de garrapatas

La aplicación del Western blot-IgG en las muestras de suero (Figura 2) reveló una disminución considerable en el número e intensidad de las bandas de proteínas de borrelias,

respecto a las que se habían identificado previamente en muestras de sueros de personas expuestas a picaduras de garrapatas en una región de Cuba. ⁽⁶⁾ Las proteínas reveladas se corresponden fundamentalmente a proteínas no específicas de *B. burgdorferi*.

Atendiendo a los criterios de interpretación de los resultados se encontró que ninguna de las muestras estudiadas era positiva a exposición previa a *B. burgdorferi* (0 %); lo que demuestra la ausencia de respuesta de anticuerpos específicos a este agente en población de baja exposición a picaduras de garrapatas, y refuerza el resultado de seroprevalencia reportado anteriormente en Cuba, así como los de diagnóstico serológico.

III. Exploración de anticuerpos específicos contra *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis* y *Babesia microti* en individuos expuestos a picaduras de garrapatas

En las muestras de sueros ensayadas para la búsqueda de anticuerpos IgG contra los patógenos zoonóticos en estudio, se encontró que el 7,2 % (6/83) de ellas eran positivas *A. phagocytophilum*; el 3,6 % (2/55) a *E. chaffeensis*, las que a su vez también presentaban anticuerpos a *A. phagocytophilum*, lo que supone exposición previa a ambos agentes; y el 11,5 % (7/61) tenían anticuerpos contra *B. microti*, y en una de estas muestras se detectó además anticuerpos a *A. phagocytophilum*. Los niveles de anticuerpos eran iguales o superiores a 64, punto de corte en las IFI para criterio de diagnóstico de infecciones por patógenos transmitidos por garrapatas.

De Keukeleire y otros (2017) sugieren emplear como punto de corte títulos iguales o superiores a 128, ya que al comparar con 64 se pueden reportar valores de seroprevalencia elevados en regiones donde es conocida la circulación de estos patógenos.⁽²⁴⁾ En Cuba solo se tiene información de un estudio de seroprevalencia a *B. bigemina* y *B. bovis* en trabajadores agropecuarios y donantes en la provincia Ciego de Ávila, en los que se reportaron valores de 7,0 % y 3,9 %, respectivamente, predominando la positividad a *B. bovis*.⁽²⁵⁾ El cambio del punto de corte para las muestras en estudio modificaría los valores de seroprevalencia a 6,0 % (5/83) y 3,2 % (2/61) para *A. phagocytophilum* y *B. microti*, respectivamente; no así para *E. chaffeensis*.

Estos resultados son las primeras evidencias de anticuerpos específicos contra estos tres grupos microbianos en personal expuesto a picaduras de garrapatas en Cuba, lo que sugiere la circulación de los mismos en garrapatas y sus reservorios.

IV. Detección molecular de patógenos zoonóticos en garrapatas duras de importancia médico-veterinaria

En el estudio 1 *Dermacentor nitens*, *Amblyomma cajennense* y *Rhipicephalus microplus* son las especies de garrapatas encontradas y en las mismas se detectó *Anaplasma*

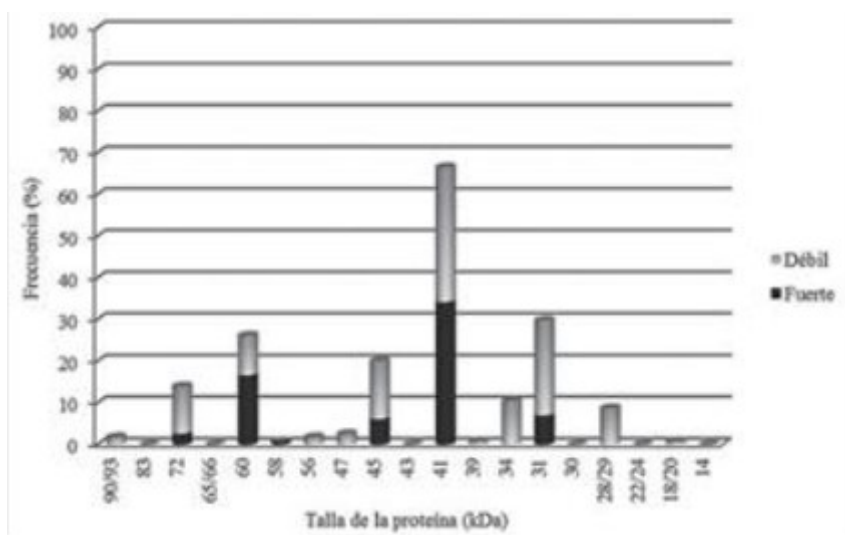


FIG. 2.

Frecuencias de reconocimiento e intensidad de las bandas de proteínas de *B. burgdorferi* ss reveladas en el Western blot-IgG en muestras de sueros de donantes de sangre.

sp.-*Ehrlichia* sp, y *Babesia* sp.-*Theileria* sp. Las sondas utilizadas en la RLB no permitieron discriminar exactamente las especies dentro de estos grupos.

En Cuba se ha detectado la presencia de *B. bovis* y *B. bigemina* infectando frecuentemente la sangre de los bovinos,^(26,27) siendo *Rhipicephalus microplus* la principal especie de garrapata que transmite estos hemoparásitos; sin embargo, no existen en el país reportes anteriores publicados sobre estos patógenos en *D. nitens*.

En el estudio 2 se identificó en caninos a *R. sanguineus* como única especie (100 %); mientras que en bovinos a *R. microplus* (100 %). La garrapata colectada en la vivienda resultó ser *R. sanguineus*. De estas se seleccionaron 98 *R. sanguineus* y 57 *R. microplus* para la búsqueda de patógenos en ellas, a partir de las cuales se obtuvieron 48 extractos de ADN. Se detectó *Anaplasma* spp. en el 52,0 % (25/48) de los extractos, que se correspondían tanto a *R. microplus* como *R. sanguineus*, mientras que *Babesia* spp. en el 8,3 % (4/48) de los extractos, los que provenían de *R. sanguineus*.

Como se puede apreciar los bovinos estaban siendo afectados por garrapatas infectadas por *Anaplasma* sp. Estos bovinos pertenecían todos a un mismo rebaño, por lo que pudo ocurrir una transmisión de este patógeno entre ellos, siendo

R. microplus su principal vector. En cambio, en las garrapatas colectadas sobre los caninos, se encontró que éstas estaban infectadas por *Anaplasma* sp. y *Babesia* sp., existiendo incluso la infección mixta en uno de los animales, al detectar cada uno de estos gérmenes en diferentes extractos a partir de mezclas de garrapatas del mismo animal, aunque no se encontró la coinfección en un mismo extracto, lo que implica que no existía la coinfección a nivel de garrapata individual.

B. burgdorferi s.l. no fue detectada en ninguno de los extractos de ADN examinados, aunque las especies de garrapatas reportadas como vector son las del género *Ixodes*, las

cuales no se describen en Cuba, excepto la autóctona *I. capromydis* cuyo hospedero es la jutía Conga.⁽³⁾

En el estudio 3, el 40,5 % (75/185) de los perros presentaron infestación por garrapatas; el 72,2 % (13/18) de los perros jóvenes y el 37,1 % (62/167) de los adultos, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos etarios ($p = 0,0086$). En relación a las condiciones corporales se encontró que el 39,2 % (62/158) de los perros de peso adecuado, el 54,5 % (12/22) de los desnutridos y el 20,0 % (1/5) de los caquécticos estaban infestados por garrapatas.

Se identificó a *R. sanguineus* como especie de garrapata mayoritaria, infestando el 98,7 % (74/75) de los perros, mientras que en un animal se encontró *R. microplus* (1,3 %).

Al aplicar las PCR para la detección de los tres grupos microbianos (*Borrelia* spp., *Anaplasma/Ehrlichia* spp. y *Babesia* spp.) en los extractos de ácidos nucleicos que no mostraron inhibición se encontró que el 27,8 % y 1,4 % resultaron positivos para *Anaplasma/Ehrlichia* spp. y *Babesia* spp., respectivamente. En ninguno se obtuvo amplificación de ADN de *Borrelia* spp.

El extracto positivo para *Babesia* spp. estaba coinfectado con *Anaplasma/Ehrlichia* spp.

En Cuba, hasta la fecha solo se reporta *A. marginale*, que afecta fundamentalmente a bovinos y equinos y *E. canis* principal agente de la ehrlichiosis canina,⁽²⁸⁾ y entre las especies de *Babesia* se encuentran *B. bovis* y *B. bigemina* afectando bovinos, aunque se han encontrado en otras especies animales como los caballos (estudio 1).

En el estudio 4 las especies de garrapatas identificadas fueron *Amblyomma mixtum* (67,0 %), una de las especies del complejo *A. cajennense* sl, *R. sanguineus* sl (27,0 %) y *D. nitens* (6,0 %). *A. mixtum* se encontró en caballos, perros y humanos, mientras que *D. nitens* y *R. sanguineus* sl solo se colectaron de caballos.

Se amplificó ADN de *Rickettsia* en el 73,0 % de las mezclas de *Amblyomma* y el análisis de las secuencias demostró que se trataba de *R. amblyommii*. Todas las secuencias de los genes *ompA* y *gltA* fueron idénticas (Números de acceso en Banco de genes: KU234520 y KU214431). El árbol filogenético (Figura 3) indica que *R. amblyommii* identificada en Cuba se

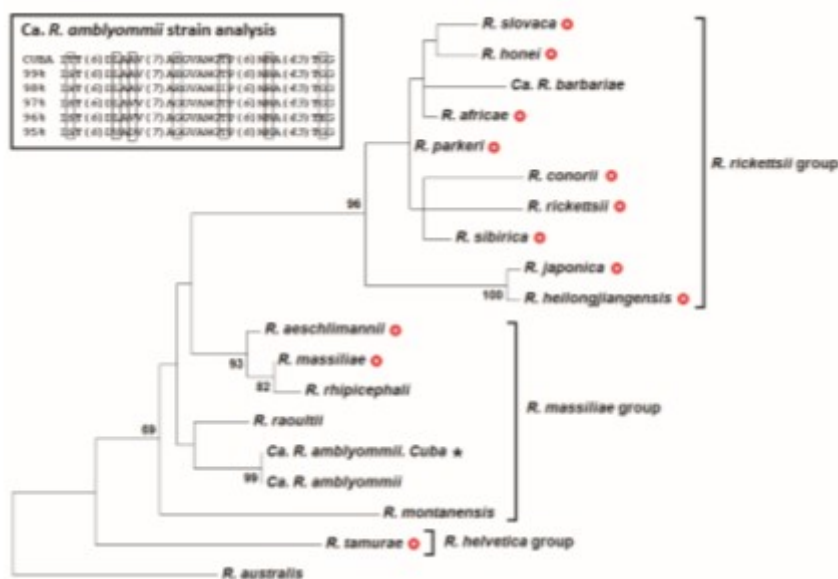


FIG. 3.

Árbol filogenético de *Rickettsia* spp. construido con MEGA6.

La clasificación de los grupos de *Rickettsia* spp. se basó en Merhej y Raoult (2011). El aislado de *R. amblyommi* identificado en garrapatas cubanas está indicado con un asterisco. Los números de los brazos son los valores de bootstrap. *Rickettsia* spp. con patogenicidad conocida en vertebrados están indicadas con círculos. Las especies de *Rickettsia* utilizadas para el análisis y sus códigos de acceso al Banco de genes son: *Candidatus R. amblyommi* (AKZ20801, AIU98746), *R. rickettsii* (AAC15675, AED88252), *R. conorii* subsp. Indica (AFK77691, WP 010977866), *R. africae* (AEJ87980, AER27861), *R. parkeri* (ALI96913, AIK25438), *R. sibirica* (ALB00644, AGA84543), *R. slovacae* (AFK77692, AIT11544), *R. honei* (AAB49564, AAB02974), *R. japonica* (ABI84239, AMK48118), *R. heilongjiangensis* (BAJ09685, AAG43416), *Candidatus R. barbariae* (AEJ87979, ALE33680), *R. massiliae* (ADC32092, ADH15757), *R. rhipicephali* (ABW90982, ABI96975), *R. aeschlimannii* (ALS39863, ADU77462), *R. montanensis* (AAC15678, AAB18272), *R. raoultii* (AGA12765, AKN34277), *R. tamurae* (BAC79495, AMK48116) y *R. australis* (AAD39531, WP 014412205). se utilizó *R. australis* como externa al grupo.

agrupa con rickettsias del grupo de *R. massiliae*. El análisis del fragmento aminoacídico de OmpA sugiere que el aislado cubano es una nueva cepa de *R. amblyommi*, muy similar a las cepas de Estados Unidos y Sudamérica. Se encontraron siete polimorfismos en la secuencia de aminoácidos. Al comparar las secuencias de OmpA con otras 19 secuencias disponibles en el Banco de genes mostraron 99,0 % de similitud, solo se encontró una sustitución de un aminoácido (Treonina por Serina). Las 19 secuencias se corresponden con aislados de EE. UU. (11), Brasil (4), Panamá (2), Costa Rica (1) y Honduras (1)

En relación a *C. burnetii*, se identificó y secuenció ADN específico (código de acceso: KP7634869 en dos mezclas de *A. mixtum*, que se correspondían con cuatro adultos machos y dos adultos hembras colectadas de un mismo caballo. El análisis de la secuencia nucleotídica por BLAST demostró que tenía más de 99,0 % de identidad con otros aislados de *C. burnetii* (Ej. JF970261 de Brasil, LK937696 de HOLANDA, KF146935 de Irán), y 97,0% con la secuencia del ADN usado como control, lo que confirmaba la ausencia de contaminación. Las secuencias de ambas mezclas fueron idénticas.

Los hallazgos de este estudio, sugieren que la circulación del agente de fiebre Q en la región no está restringida a Argentina y Brasil, constituyendo el primer reporte en Cuba.

V. Evaluación del nivel de conocimientos sobre enfermedad de Lyme en personal médico de diferentes niveles de atención en salud

Los médicos encuestados poseían desde 0 a 40 años de experiencia. El 70,0 % de ellos expresó que conocían sobre borreliosis de Lyme, pero fueron los médicos generales o especialistas en MGI quienes admitieron

poseer menos competencia en el tema. Un aspecto crítico en todas las categorías, fue la falta de conocimiento sobre las principales manifestaciones clínicas de esta enfermedad y las pruebas de laboratorio a indicar para el diagnóstico. El tratamiento con antibióticos se reconoció por más del 80,0 % en cada categoría, aun cuando el reconocimiento de la etiología bacteriana de la infección por los dermatólogos fue inferior.

Es importante destacar que los porcentajes mayores de aceptación en las respuestas se obtuvieron en los médicos generales integrales, superiores a los obtenidos por los dermatólogos y médicos de la asistencia terciaria.

La presente evaluación demostró debilidad en el conocimiento de dicha enfermedad, lo que implica una valoración sobre su inclusión en los programas de estudio de medicina y sus especialidades, así como la realización de capacitaciones y actualizaciones. Igualmente se sugiere la divulgación del tema en la comunidad médica para lograr en ella adecuada

percepción de riesgo de la enfermedad y una mejor orientación clínica de los casos con sospechas de borreliosis.

CONCLUSIONES

El conjunto de resultados mostrados en este trabajo permitió el fortalecimiento de las capacidades del Laboratorio Nacional de Referencia del IPK para la detección molecular de patógenos transmitidos por garrapatas, al contar con herramientas nuevas de laboratorio, así como con la implementación del ensayo de infección artificial de garrapatas. Además, los hallazgos serológicos en sueros humanos y las evidencias moleculares de patógenos zoonóticos en garrapatas de importancia médica y veterinaria constituyen una alerta a las autoridades nacionales de Salud Pública y personal médico sobre el riesgo de infección a estos agentes en individuos expuestos a picaduras de garrapatas, ello unido a la necesidad de capacitaciones/actualizaciones en estas temáticas al personal médico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores del presente trabajo agradecen la colaboración de los profesores Lise Gern, Reto Lienhard, autoridades y personal de los laboratorios ADMed Microbiología de la Chaux de Fonds y de Ecoepidemiología de los parásitos de la Universidad de Neuchatel, Suiza por facilitar y contribuir al intercambio científico en el tema, así como a Yanisia Duarte, Arianna Pérez y Milagro Mayet por su ayuda en la ejecución práctica de algunas tareas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Venzal JM, Castro O, Cabrera PA, de Souza CG, Guglielmone AA. Garrapatas de importancia médica y veterinaria en Uruguay. *Entomol Vect* 2003; 10(4): 635-50.
2. Mastropaolo M, Beltrán-Saavedra LF, Guglielmone AA. The ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Bolivia. *Ticks Borne Dis* 2014; 5(2): 186-94.
3. Guglielmone AA, Estrada-Peña A, Keirans JK, Robbins RG. Ticks (Acari: Ixodida) of the neotropical zoogeographic region. *The Netherlands: Atalanta*. 2003.
4. Rodríguez I, Fernández C, Cinco M, Pedroso R, Fuentes O. Do anti-borrelial antibodies suggest Lyme disease in Cuba? *Emerg Infect Dis* 2004; 10(9): 1690-1700.
5. Rodríguez I, Ortega LM, Fernández C, Rodríguez ME, Scheurer C, Lienhard R. Borreliosis de Lyme en Cuba. A propósito de nuevos casos. *Rev Panam Infectol* 2009; 11(3): 37-41.

6. Rodríguez I, Fernández C, Sánchez L, Martínez B, Siegrist HH, Lienhard R. Prevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* sensu stricto in humans from a Cuban village. *Braz J Infect Dis* 2012; 16(1): 82-85.
7. Postic D, Assous MV, Grimont PAD, Baranton G. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of rrf(5S)-rrl(23S) intergenic spacer amplicons. *Int J Syst Bacteriol*. 1994; 44(4): 743-752.
8. Gern L, Toutoungi LN, Hu CM, Aeschlimann A. *Ixodes (Pholeoixodes) hexagonus*, an efficient vector of *Borrelia burgdorferi* in the laboratory. *Med Vet Entomol* 1991; 5:431-5.
9. Humair PF, Douet V, Moran-Cadenas F, Schouls L, Van de Pol I, Gern L. Molecular identification of blood meal source in *Ixodes ricinus* ticks using 12S rDNA as a genetic marker. *J Med Entomol*. 2007; (44):869-80.
10. Halos L, Taoufik J, Vial L, Maillard R, Suau A, Le Menach A, *et al*. Determination of an efficient and reliable method for DNA extraction from ticks. *Vet Res*. 2004; (35):709-13.
11. Raoult D, Ndiokubwayo JB, Tissot-Dupont H, Roux V, Faugere B, Abegbinni R. Outbreak of epidemic typhus associated with trench fever in Burundi. *Lancet* 1998; 352:353-58.
12. Ritcher D, Schlee DB, Matuschka FR. Relapsing Fever–Like Spirochetes Infecting European Vector Tick of Lyme Disease Agent. *Emerg Infect Dis* 2003; (15):234-42.
13. Picken RN. Polymerase chain reaction primers and probes derived from flagellin gene sequences for specific detection of the agents of Lyme disease and North American relapsing fever. *J Clin Microbiol* 1992; (30):99-114.
14. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for test performance and interpretation from the Second National Conference on Serologic Diagnosis of Lyme Disease. *MMWR Morbid Mortal Weekly Rep* 1995; 44(31): 590-91.
15. Barros-Battesti DM, Arzua M, Becharra GH. Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: ICTTD-3/Butantan. 2006.
16. Schouls LM, Van de Pol I, Rijpkema SGT, Schot CS. Detection and identification of Ehrlichia, Borrelia burgdorferi sensu lato, and Bartonella species in Dutch Ixodes ricinus ticks. *J Clin Microbiol* 1999; 37(7): 2215-22.
17. Gubbels JM, de Vos AP, van der Weide M, Viseras J, Schouls LM, de Vries E, *et al*. Simultaneous detection of bovine Theileria and Babesia species by reverse line blot hybridization. *J Clin Microbiol* 1999; 37(6): 1782-89.
18. Georges K, Loria GR, Riili S, Greco A, Caracappa S, Jongejan F, *et al*. Detection of haemoparasites in cattle by reverse line blot hybridization with a note on the distribution of ticks in Sicily. *Vet Parasitol* 2001; (99): 273-86.
19. Bekker CP, De Vos S, Taoufik A, Sparagano OA, Jongejan F. Simultaneous detection of Anaplasma and Ehrlichia species in ruminants and detection of Ehrlichia ruminantium in Amblyomma variegatum ticks by reverse line blot hybridization. *Vet Microbiol* 2002; (89): 223-38.
20. Labruna MB, Whitworth T, Horta MC, Bouyer DH, McBride JW, Pinter A *et al*. Rickettsia species infecting Amblyomma cooperi ticks from an area in the State of Sao Paulo, Brazil, where Brazilian Spotted Fever is endemic. *J Clin Microbiol* 2004; (42):90–98.
21. Panning M, Kilwinski J, Greiner-Fischer S, Peters M, Kramme S, Frangoulidis D. High throughput detection of Coxiella burnetii by real-time PCR with internal control system and automated DNA preparation. *BMC Microbiol* 2008; 8(1):77–85.
22. Chen Z, Liu Q, Liu JQ, Xu BL, Lv S, Xia S, Zhou XN. Tick-borne pathogens and associated co-infections in ticks collected from domestic animals in central China. *Parasit Vectors* 2014;(7): 237.
23. Broadwater AH, Sonenshine DE, Hynes WL, Ceraul S, de Silva AM. Glass Capillary tube feeding: A method for infecting nymphal Ixodes scapularis (Acari: Ixodidae) with the Lyme disease spirochete Borrelia burgdorferi. *J Med Entomol*. 2002; (39):285-92.
24. De Keukeleire M, Vanwambeke SO, Cochez C, Heyman P, Fretin D, Deneys V *et al*. Seroprevalence of Borrelia burgdorferi, Anaplasma phagocytophilum, and Francisella tularensis Infections in Belgium: Results of Three Population-Based Samples. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2017;17(2):108-115.
25. Suárez M, Alonso M, Peláez R, Sánchez B, Bravo JR, Sánchez A. Pesquisa de Babesia em trabalhadores agropecuários y donantes en la provincia de Ciego de Avila. *Rev Cubana Med Trop* 1997; 49(2): 130-35.

26. Alonso M, Blandino T, Mendoza S, Fedraga M, Baudin C, Rodríguez D, *et al.* Evaluación de una vacuna de *Babesia bovis* atenuada. Rev cubana Cienc Vet 1992; 23(1):25-32.
27. Rodríguez ON, Espaine L, Rivas A, Rodríguez P. Epizootiología de las enfermedades de los bovinos causados por hemoparásitos en la República de Cuba. Rev cubana Cienc Vet 1989; 20: 37-56.
28. León A, Demedio J, Márquez M, Castillo E, Perera A, Zuaznaba O et al. Diagnóstico de Ehrlichiosis en caninos en la ciudad de La Habana. RECVET 2008; III (5).