


AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS SIMBIONTES DE *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (ACARI: IXODIDAE)

Eliud A. Lucero-Velasco , Zinnia J. Molina-Garza y Lucio Galaviz-Silva

Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Pedro de Alba s/n, Cd. Universitaria, C. P. 66450, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

 Autor de correspondencia: alonsolucerovelasco@gmail.com

RESUMEN. La garrapata café del perro *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) es la de mayor distribución a nivel mundial y es vector reconocido de muchos patógenos que afectan al perro y ocasionalmente al humano. Sin embargo, poco se conoce sobre las bacterias que conforman la microbiota autóctona de estos artrópodos y la influencia que presenta en procesos nutricionales y el establecimiento de bacterias patógenas. Durante esta investigación se analizaron 70 garrapatas colectadas de 18 perros de diferentes municipios del área metropolitana de Nuevo León, México; de los cuales se aislaron 15 cepas bacterianas. Las cepas bacterianas aisladas de *R. sanguineus* presentan una gran diversidad de géneros, con mayor incidencia de Gram positivas, como *Staphylococcus* sp. (40 %), *Bacillus* sp. (20 %), *Oceanobacillus* sp., *Serratia* sp., *Micrococcus* sp., *Pseudomonas* sp. y *Jeotgalicoccus* sp. (40 % restante).

Palabras clave: Microbiota, Simbiontes, Garrapatas.

Isolation and Identification of Bacterial Symbionts of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae)

ABSTRACT. The brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) is the most widespread tick in the world and a well-recognized vector of many pathogens affecting dogs and occasionally humans. Nevertheless, few is known about the autochthonous microbiota of this arthropods and the influence that this present in nutritional processes and the establishment of pathogenic bacteria. During this work, we analyzed 70 ticks collected from 18 dogs from different localities of the metropolitan area of Nuevo Leon, Mexico; from them 15 bacterial strains were isolated. The bacterial strains of *R. sanguineus* represent a wide diversity of genera, with most incidence of Gram positive, like *Staphylococcus* sp. (40%), *Bacillus* sp. (20%), *Oceanobacillus* sp., *Serratia* sp., *Micrococcus* sp., *Pseudomonas* sp. y *Jeotgalicoccus* sp. (40% rest).

Keywords: Microbiota, Symbionts, Ticks.

INTRODUCCIÓN

De 899 especies de garrapatas conocidas cerca de un 10 % está implicada en el mantenimiento y transmisión de diferentes tipos de patógenos, tales como virus, protozoarios, bacterias y helmintos, tanto en los animales como en las personas. Esto hace que las garrapatas constituyan el grupo de artrópodos vectores de mayor importancia, comparable a los mosquitos (León-Artzqui, 2011). La garrapata café del perro (*Rhipicephalus sanguineus sanguineus*) es la de mayor distribución a nivel mundial, es vector de muchos agentes patógenos como *Coxiella burnetti*, *Ehrlichia canis*, *Rickettsia conorii* y *R. rickettsii* (Dantas-Torres, 2008).

Debido a su importancia veterinaria y en salud pública, *R. sanguineus* es una de las garrapatas más estudiadas. Se han realizado estudios sobre su ecología y biología alrededor de todo el mundo (Szabó y Bechara, 1999; Rechav y Nuttall, 2000; Little *et al.*, 2007; Dantas-Torres *et al.*, 2009;). Además de la transmisión de patógenos, las garrapatas sirven de hospederos a otras bacterias en una relación comensal, mutualista o parasitaria (Noda *et al.*, 1997; Sacchi *et al.*, 2004; Scoles, 2004). Las interacciones microbianas desarrolladas dentro de las garrapatas pueden

afectar las características de las bacterias patógenas, incluidas su establecimiento y transmisión (Macaluso *et al.*, 2002; De la Fuente *et al.*, 2003). Sin embargo, muy poco se conoce sobre la microbiota de estos artrópodos, ya que la mayoría de los estudios solamente se enfocan en la detección de bacterias patógenas, dejando de lado los llamados simbios (Smith *et al.*, 1978; Rahman & Rahman, 1980; Murrel *et al.*, 2003).

Hasta el momento la información que se encuentra disponible sobre la microbiota cultivable de garrapatas es bastante limitada, solamente cinco trabajos se han realizado a nivel mundial, Martin y Schmidtman (1998), realizaron aislamientos de 43 garrapatas de la especie *Ixodes scapularis*, de las cuales obtuvo 14 cepas exclusivamente del interior de los artrópodos. Murrel *et al.* (2003) realizaron un estudio de la microbiota de pulgas, piojos y garrapatas (*R. microplus*, *I. holocyclus*, *Aponomma fimbriatum*, *Amblyomma triguttatum* y *Haemaphysalis longicornis*), en el cual reportaron una amplia diversidad de cepas bacterianas, la mayoría Gram positivas. Stojek y Dutkiewicz (2004) reportaron 79 aislados de bacterias correspondientes a nueve géneros de gram-negativas, de la garrapata *I. ricinus*. Rudolf *et al.* (2009) realizó 151 aislamientos de garrapatas de los géneros *D. reticulatus*, *H. concinna* e *I. ricinus*, y asiló a *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Pseudomonas*. Por último László y László (2014) reportaron 116 aislamientos con las mismas especies de garrapatas que Rudolf *et al.* (2009). El presente trabajo tuvo como objetivo ampliar los conocimientos sobre la microbiota de la garrapata café del perro *R. sanguineus*, debido a la importancia que tienen, por ser hospedera de las principales mascotas del ser humano.

MATERIALES Y MÉTODO

Las garrapatas de este estudio fueron colectadas de los municipios Monterrey, Apodaca, San Nicolás de los Garza y Guadalupe del área metropolitana del estado de Nuevo León, durante los meses junio-septiembre del 2014. Los ectoparásitos se mantuvieron vivos hasta el momento de la disección. Las garrapatas se procesaron en el Laboratorio de Patología Molecular y Experimental del Departamento de Zoología de Invertebrados, de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Cada garrapata fue sometida a esterilización de superficie con etanol 96 % durante 5 minutos. Posteriormente se lavaron en solución salina 0.65 % por 1 minuto (Niebylski *et al.*, 1997). La obtención de los órganos internos y hemolinfa de las garrapatas se realizó de forma aséptica de acuerdo al método modificado de Edwards *et al.* (2009). Todas las garrapatas se encontraban vivas antes del tratamiento con etanol.

Una vez obtenidos los órganos internos y hemolinfa, estos se maceraron en microtubos de 1.5 ml conteniendo un ml de caldo TSB esteril conformando 13 "pools" (los cuales contenían los órganos internos y hemolinfa de cinco garrapatas adultas del mismo sexo, hospedero y localidad). Estos tubos se incubaron a 30 °C por 24 h en orden de aumentar la cantidad de simbios presentes. Tras el periodo de incubación se inocularon por siembra en estría cruzada en placas de agar sangre y se incubaron por 72 h a 30 °C. Una vez que las placas presentaron crecimiento bacteriano se realizaron resiembras de cada colonia aislada que presentó diferencias morfológicas en orden de obtener cultivos puros.

La extracción del material genético se llevó a cabo de acuerdo a la metodología de extracción por ebullición en presencia de PBS 1X + Tween 20 0.05 % realizada por López y Mejía (2012). El DNA extraído se amplificó con los siguientes primers F (5'-CTYAAAKRAATTGRCGRRSSC- 3') y R (5'-CGGGCGGTGTGTRCAARRSSC- 3') con una concentración de 0.2 µm para una mezcla de reacción de 50 µl (Cetina *et al.*, 2010).

El producto de PCR se purificó con el estuche de purificación QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN®, Germany) seguido de una electroforesis, el cual amplificó una banda de 500 pb. El producto de PCR purificado se secuenció (CINVESTAV-LANGEBIO, Servicios Genómicos-

Irapuato, Gto) y la secuencia obtenida fue sometida al GenBank-BLAST para su comparación con la base de datos del NCBI.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En total se muestrearon 10 perros infestados en los municipios, seis del sexo masculino y cuatro hembras, de los cuales se colectaron un total de 70 garrapatas. Sin embargo esto no demuestra una tendencia significativa por alguno de los sexos, como ocurre en roedores y renos (Moore y Wilson, 2002; Folstad *et al.*, 1989).

Cuadro 1. Cantidad de garrapatas colectadas, sexo y lugar de colecta.

Localidad	Perros Muestreados	Hembras/Machos	Garrapatas Colectadas	Hembras/Machos
Apodaca	2	1 / 1	20	10 / 10
Monterrey	3	1 / 2	10	10 / 0
San Nicolás	3	2 / 1	20	10 / 10
Guadalupe	2	0 / 2	20	5 / 15
Total	10	4 / 6	70	35 / 35

Las bacterias aisladas muestran una diversidad entre cocos y bacilos, con una mayor incidencia de bacterias Gram positivas. Estudios anteriores respaldan esta misma relación en aislamientos realizados en garrapatas distintas a *R. sanguineus* (Martin y Schmidtman, 1998; Murrel *et al.*, 2003; Rudolf *et al.*, 2009; László y László, 2014). Una de los géneros que más se identificó en *R. sanguineus* se trata de *Staphylococcus*, este se encontró en cuatro de las cinco localidades muestreadas, este género había sido reportado anteriormente para *H. longicornis*, *I. holocyclus*, *R. microplus* (Murrel *et al.*, 2003), *I. ricinus*, *D. reticulatus* y *H. concinna* (László y László, 2014; Rudolf *et al.*, 2009). El segundo género encontrado con mayor frecuencia fue *Bacillus*, el cual ha sido reportado en una alta incidencia en los trabajos realizados por Martin y Schmidtman (1998) y Rudolf *et al.* (2009).

En cuanto a las bacterias Gram negativas aisladas en este trabajo *Serratia*, *Pseudomonas* y *Acinetobacter*, las primeras dos habían sido reportadas por varios autores (Martin y Schmidtman, 1998; Murrel *et al.*, 2003; Stojek y Dutkiewicz, 2004; Rudolf *et al.*, 2009; László y László, 2014), mientras que la última solo ha sido reportada por Murrel *et al.* (2003).

Una de los géneros aislados *Jeotgalicoccus*; se trata de una bacteria marina reportada de erizos del mar de las costas de Corea (Chen *et al.* 2009); no se ha reportado en garrapatas.

La microbiota autóctona de un organismo presenta gran importancia para el mismo pues al encontrarse en una relación simbiótica mutualista o comensalista, le proporciona ya sea factores nutricionales, ayuda en procesos digestivos o influir en el establecimiento de microorganismos externos potencialmente patógenos (Brune y Ohkuma, 2011; Cazemier *et al.*, 1997). De las cepas aisladas el 33.3 % presenta hemólisis, esta característica puede estar involucrada en la dieta hematófaga de las garrapatas y favorecer la digestión de la sangre por parte de los ectoparásitos.

Cuadro 2. Descripciones macroscópicas y microscópicas de las cepas aisladas.

Pool	Sexo	Localidad	Cepa	Morfología	Gram	Observaciones	
						morfológicas de las colonias	Hemólisis
1	Hembras	San Nicolás	1	Bacilos	+	Colonias translucidas con borde liso y centro oscuro	Presente
2	Hembras	San Nicolás	2	Cocos	+	Colonias blancas y pequeñas con borde liso	Ausente
3	Machos	San Nicolás	3	Cocos	+	Colonias blancas y pequeñas con borde liso	Ausente
			4	Cocobacilos	+	Colonias naranjas cremosas con borde liso	Ausente
			5	Cocos	+	Colonias blancas y pequeñas con borde liso	Ausente
4	Machos	Guadalupe	6	Cocos	+	Colonias claras cremosas con borde liso	Ausente
5	Machos	San Nicolás	7	Bacilos	-	Colonias rojizas cremosas con borde liso	Ausente
6	Hembras	Apodaca	8	Bacilos	-	Colonias cremosas con borde filamentosos	Presente
			9	Bacilos	+	Colonias blancas/translucidas con bordes irregulares	Presente
			10	Cocos	+	Colonias blancas cremosas con borde liso	Ausente
7	Hembras	Guadalupe	11	Bacilos	+	Colonias grandes cremosas con granulaciones al centro	Ausente
8	Machos	Apodaca	13	Cocos	+	Colonias blancas pequeñas con borde liso	Ausente
9	Machos	Guadalupe	12	Cocobacilos	-	Colonias translucidas con borde liso	Presente
13	Machos	Apodaca	14	Cocos	+	Colonias blancas y pequeñas con borde liso	Ausente
14	Hembras	Monterrey	15	Bacilos	+	Colonias blancas/translucidas con bordes lisos	Presente

Cuadro 3. Géneros identificados de las cepas aisladas según la base de datos del NCBI.

Cepa	Posible genero identificado	Porcentaje de similitud con el NCBI
1	<i>Oceanobacillus</i> sp.	98%
2	<i>Staphylococcus</i> sp.	96%
3	<i>Staphylococcus</i> sp.	95%
4	<i>Micrococcus</i> sp.	90%
5	<i>Staphylococcus</i> sp.	99%
6	<i>Jeotgalicoccus</i> sp.	93%
7	<i>Serratia</i> sp.	95%
8	<i>Pseudomonas</i> sp.	98%
9	<i>Bacillus</i> sp.	99%
10	<i>Staphylococcus</i> sp.	98%
11	<i>Bacillus</i> sp.	93%
12	<i>Acinetobacter</i> sp.	98%
13	<i>Staphylococcus</i> sp.	95%
14	<i>Staphylococcus</i> sp.	96%
15	<i>Bacillus</i> sp.	99%

CONCLUSIÓN

A pesar de la importancia que presentan las garrapatas como vectores y la diversidad de sus simbiotas, aún es muy escaso el conocimiento que se tiene sobre su microbiota natural y el efecto que ejerce en el desarrollo de la garrapata y contra el establecimiento de bacterias patógenas.

La microbiota de *R. sanguineus* presenta una diversidad bacteriana con mayor incidencia de Gram positivos. Con excepción de *Jeotgalicoccus*, los géneros aislados han sido reportados con anterioridad para especies de garrapatas distintas a la de estudio.

Agradecimientos

A los compañeros del Laboratorio de Patología Molecular y Experimental de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la UANL, por su colaboración y entusiasmo en este proyecto, especialmente a Ricardo Sánchez Díaz por su asesoría.

Literatura citada

- Brune, A. and M. Ohkuma. 2011. Role of the termite gut microbiota in symbiotic digestion. Pp. 439–475. *In: Bigne, D. E., Roisin, Y. and N. Lo (Eds.). Biology of termites: a modern synthesis.* Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Cazemier, A. E., Hackstein, J. H. P., Op den Cam, H. J. M., Rosenberg, J. and C. Van Der Drift. 1997. Bacteria in the intestinal tract of different species of arthropods. *Microbiology Ecology*, 33: 189–197.
- Cetina, A., Matos, A., Garma, G., Barba, H., Vázquez, R., Zepeda-Rodríguez, A., Jay, D., Monteon, V. and R. López. 2010. Antimicrobial activity of marine bacteria isolated from Gulf of Mexico. *Revista Peruana de Biología*, 17(2): 231–236.
- Chen, Y., Zhang, Y., Shi, J., Xiao, H., Tang, S., Liu, Z., Huang, K., Cui, X. and W. Li. 2009. *Jeotgalicoccus marinus* sp. nov. A marine bacterium isolated from a sea Urchin. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59: 1625–1629.
- Dantas-Torres, F. 2008. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Veterinary Parasitology*, 152: 173–185.
- Dantas-Torres, F., Melo, M. F., Figueredo, L. A. and S. P. Brandão-Filho. 2009. Ectoparasite infestation on rural dogs in the Municipality of São Vicente Férrer, Pernambuco, Northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 18: 75–77.
- De la Fuente, J., Blouin, E. and K. Kocan. 2003. Infection exclusion of the rickettsial pathogen *Anaplasma marginale* in the tick vector *Dermacentor variabilis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10(1): 182–184.
- Edwards, K., Goddard, J. and S. Varela-Stokes. 2009. Examination of the internal morphology of the ixodid tick, *Amblyomma maculatum*. Koch, (Acari: Ixodidae); a “How-to” pictorial dissection guide. *Midsouth Entomologist*, 2: 28–39.
- Folstad, I., Nilssen, A. C., Halvorsen, O. and J. Anderson. 1989. Why do male reindeer (*Rangifer t. tarandus*) have higher abundance of second and third instar larvae of *Hypoderma tarandi* than females? *Oikos*, 55: 87–92.
- Lázló, E. and M. Lázló. 2014. Cultivable internal bacterial flora of ticks isolated in Hungary. *Experimental and Applied Acarology*, 63: 107–122.
- León-Artozqui, M. 2011. Garrapatas (Ixodidae) I: Anatomía, biología y ecología. Rincón Focus Technical Assistance - Focus 19.
- Little, S. E., Hostetler, J. and K. M. Kocan. 2007. Movement of *Rhipicephalus sanguineus* adults between co-fused dogs during active feeding. *Veterinary Parasitology*, 150: 139–145.
- Lopez, L. and C. Mejia. 2012. Evaluation of DNA extraction methods for detection of *Listeria monocytogenes* in meat products. *Revista MVZ Córdoba*, 17(3): 3169–3175.

- Macaluso, K., Sonenshine, D., Ceraul, S. and A. Azad. 2002. Rickettsial infection in *Dermacentor variabilis* (Acari:Ixodidae) inhibits transovarial transmission of a second rickettsia. *Journal of Medical Entomology*, 39(6): 809–813.
- Martin, P. A. and E. T. Schmidtman. 1998. Isolation of aerobic microbes from *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae), the vector of Lyme Disease in the Eastern United States. *Journal of Economic Entomology*, 91: 864–868.
- Moore, S. L. and K. Wilson. 2002. Parasites as a viability cost of sexual selection in natural populations of mammals. *Science*, 297: 2015–2018.
- Murrel, A., Dobson, S., Yang, X., Lacey, E. and S. Barker. 2003. A survey of bacterial diversity in ticks, lice and fleas from Australia. *Parasitology Research*, 89: 326–334.
- Niebylski, M., Peacock, M., Fischer, E., Porcella, S. and T. Schwan. 1997. Characterization of an endosymbiont infecting wood ticks, *Dermacentor andersoni*, as a member of the genus *Francisella*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(10): 3933–3940.
- Noda, H., Munderloh, U. and T. Kurtti. 1997. Endosymbionts of ticks and their relationship to *Wolbachia* spp., and tick-borne pathogens of humans and animals. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(10): 3926–3932.
- Rahman, M. H. and M. M. Rahman. 1980. Occurrence of some bacterial isolates in ticks found in Madhupur forest area. *Bangladesh Journal Veterinary Medicine*, 14: 43–47.
- Rechav, Y. and P. A. Nuttall. 2000. The effect of male ticks on the feeding performance of immature stages of *Rhipicephalus sanguineus* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). *Experimental Applied Acarology*, 24: 569–578.
- Rudolf, I., Mendel, J., Sikutova, S., Svec, P., Masarikova, J., Novakova, D., Bunkova, L., Sedlacek, I. and Z. Hubalek. 2009. 16S rRNA gene-based identification of cultured bacterial flora from host-seeking *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* and *Haemaphysalis concinna* ticks, vectors of vertebrate pathogens. *Folia Microbiologica*, 54: 419–428.
- Sacchi, L., Bigliardi, E., Corona, S., Beninati, T., Lo, N. and A. Franceschi. 2004. A symbiont of the tick *Ixodes ricinus* invades and consumes mitochondria in a mode similar to the parasitic bacterium *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Tissue and Cell*, 36: 43–53.
- Scoles, G. 2004. Phylogenetic Analysis of the Francisella-like endosymbionts of *Dermacentor* ticks. *Journal of Medical Entomology*, 41(3): 277–286.
- Smith, R. D., Brener, J., Osorno, M. and M. Ristic. 1978. Pathobiology of *Borrelia theileri* in the tropical cattle tick *Boophilus microplus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 32: 182–190.
- Stojek, N. M. and J. Dutkiewicz. 2004. Studies on the occurrence of gram-negative bacteria in ticks: *Ixodes ricinus* as a potential vector of *Pasteurella*. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 11: 319–322.
- Szabó, M. P. and G. H. Bechara. 1999. Sequential histopathology at the *Rhipicephalus sanguineus* tick feeding site on dogs and guinea pigs. *Experimental and Applied Acarology*, 23: 915–928.