

AÑO 2016

DETECCION MOLECULAR DE *Anaplasma* sp., *Ehrlichia* sp. Y *Rickettsia* sp. EN GARRAPATAS DE LA FAMILIA *IXODIDAE* (Acari: Ixodidae) EN IBAGUE, TOLIMA

Autor: Monica Osorio Tangarife

RESUMEN

Introducción. El Orden Rickettsiales, comprende bacterias que actúan como parásitos intracelulares obligados, que incluyen las familias *Rickettsiaceae* y *Anaplasmataceae*, son coccobacilos gram-negativos que no sobreviven fuera de un vector, infectan las células endoteliales y del sistema inmune, monocitos o granulocitos destruyen el fagosoma y se multiplican por fisión binaria en el citoplasma y algunas en el núcleo de las células infectadas. Estas generan enfermedades zoonóticas transmitidas por artrópodos, como garrapatas, pulgas y piojos. Muchas especies de animales son los hospederos (reservorios) de estos agentes etiológicos, entre los que se destacan mamíferos, aves, roedores y animales silvestres.

Objetivo. Detectar molecularmente especies de *Anaplasma*, *Ehrlichia* y *Rickettsia*, en garrapatas de la familia *Ixodidae* (Acari: Ixodidae) recolectadas de animales en el área de influencia de Ibagué, Tolima.

Métodos. Se realizó un estudio observacional y descriptivo tendiente a la identificación a nivel molecular de *Anaplasma* sp, *Ehrlichia* sp. y *Rickettsia* sp. El tipo de muestreo fue por conveniencia. Se recolectaron especímenes de garrapatas de hospederos caninos n=50, equinos n=16 y vacunos n=13, las garrapatas del mismo género y especie fueron distribuidos en grupos de individuos de dos a cinco. Las garrapatas se clasificaron siguiendo claves taxonómicas de Benavidez y López, Faccioli, Osorio y Solari. Se clasificó la tasa de infestación de las garrapatas en los hospederos por categorías baja (0-5 garrapatas), reducida (6-12), moderada (13-17) y alta (≥ 18). A las garrapatas agrupadas se les realizó extracción de ADN utilizando el método de extracción por columnas (Qiagen). Posteriormente a la extracción del ADN, se llevó a cabo una PCR convencional con el fin de detectar la presencia de *Anaplasma* sp., *Ehrlichia* sp. y *Rickettsia* sp. Se usaron iniciadores específicos para género *Rickettsia* CS-78 y CS-323 (gen *gltA*) y 120.2788 y 120.3599 (gen *ompB*) y para *Ehrlichia* y *Anaplasma* GE2'F2 y HE3 (gen *16S rRNA*) y *Ehrlichia* *dsb*-330 y *dsb*-728 (gen *dsb*). Posteriormente, se analizaron las secuencias nucleotídicas de las muestras positivas a través del GenBank del NCBI, el alineamiento de las mismas se realizaron a través de los software Geneious R9 y MEGA 7, los árboles filogenéticos fueron construidos por el método de Neighbor-Joining.

Resultados. Se recolectaron 1.247 garrapatas todas en estadio adulto distribuidas así: en caninos n=705, equinos n=371 y vacunos n=171. La infestación de los hospederos por garrapatas es como se indica: *R. microplus* y *R. sanguineus* en caninos tuvo una

indigencia baja, es decir, solo se encontraron hasta 5 garrapatas. *D. nitens*, la incidencia osciló entre reducida y alta en los equinos muestreados. La amplificación con el gen *gltA* y *ompB* para *Rickettsia* fue negativa, para *Anaplasma* y *Ehrlichia* se detectaron trece muestras y se les realizó secuenciación. Las muestras positivas eran de los municipios de Alvarado e Ibagué y de garrapatas *R. microplus* y *R. sanguineus*, recolectadas en bovinos y caninos. Al realizar la amplificación con el gen *16S rRNA*, se obtuvieron resultados positivos para las extracciones de ADN de *R. microplus* 4.2% (5/119) y para el gen *dsb* se obtuvo una positividad de 6.72% (8/119) así: *R. microplus* 4.2% (5/119) y *R. sanguineus* 2.52% (3/119). De las amplificaciones con los genes *dsb* y *16S rRNA*, las muestras 23, 33, 44 y 46 tienen una similitud con *E. canis*. Las secuencias nucleotídicas de las muestras 7, 9A, 9B y 35 similitud con *E. mineirensis*. Solo se detectó que la muestra 64 es similar en sus secuencias nucleotídicas con la especie *A. phagocytophilum* y la 8 con *A. marginale*. **Conclusiones.** El estudio permitió evaluar garrapatas de la familia Ixodidae en estado adulto en tres tipos de hospederos distribuidos en animales, en diferentes sistemas de producción animal y clínicas veterinarias en Ibagué, Tolima. Las especies de garrapatas colectadas en este estudio, concuerdan con las investigaciones realizadas, *D. nitens* son más adaptadas a equinos, *R. sanguineus* a caninos y *R. microplus* a vacunos, sin embargo, éste último también se detectó en caninos y equinos. La información se evidencia en este estudio con la distribución de frecuencias de las especies de garrapatas frente a los hospederos. La importancia de detectar especies de la familia *Rickettsiaceae* y *Anaplasmataceae* patógenas identificadas como causantes de enfermedades emergentes en Ibagué, son importantes para aportar información que permita prevenir enfermedades causadas por este tipo de microorganismos. Los análisis del presente estudio representan una indicación de reemergencia de patógenos de *Anaplasma* y *Ehrlichia* y que de una manera precisa y contundente deben alertar a las autoridades de vigilancia epidemiológica de Ibagué, el Tolima y el país. La variedad de hospederos fue limitada en virtud a las pocas especies de garrapatas encontradas en Ibagué y su área metropolitana, al parecer en función de las condiciones climáticas durante el tiempo de colecta.

PALABRAS CLAVE: *Anaplasma*. *Ehrlichia*. *Rickettsia*. Garrapatas. PCR. Filogenia.

ABSTRACT

Introduction. The order Rickettsiales comprises bacteria that act as obligate intracellular parasites, including families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae, they are gram-negative coccobacilli and do not survive outside a vector, they infect endothelial and immune system cells, monocytes or granulocytes destroy the phagosome and they multiply themselves by binary fission in the cytoplasm and some in the nucleus of infected cells. These generate zoonotic diseases transmitted by arthropods such as ticks, fleas and lice. Many species of

animals are the hosts of these etiological agents, including mammals, birds, rodents and wild animals comprising the reservoir of these etiological agents. **Objective.** Molecular detect species of *Anaplasma*, *Ehrlichia* and *Rickettsia* in ticks of the family *Ixodidae* (Acari: Ixodidae) collected from animals in the area of influence of Ibagué, Tolima. **Methods.** An observational and descriptive study aimed at identifying the molecular level of *Anaplasma* sp., *Ehrlichia* sp. and *Rickettsia* sp. The sampling was by convenience. Canine tick specimens hosts n = 50, n = 16 horses and cattle n = 13 ticks of the same genus and species were collected and distributed in groups of two to five individuals. Ticks were classified according to Benavidez and Lopez, Facciolli, Osorno and Solari taxonomic keys. The rate of infestation of ticks in the host by low categories (0-5 ticks), reduced (6-12), moderate (13-17) and high (≥ 18) was classified. Ticks grouped were performed DNA extraction by using extraction columns method (Qiagen). Following DNA extraction, there was carried out a conventional PCR in order to detect the presence of *Anaplasma* sp., *Ehrlichia* sp. and *Rickettsia* sp. Specific primers for *Rickettsia* genus CS-78 and CS-323 (*gltA* gene) and 120.2788 and 120.3599 (*ompB* gene) and *Ehrlichia* and *Anaplasma* GE2'F2 and HE3 (*16S rRNA* gene) and *Ehrlichia* dsb-330 and dsb-728 (*dsb* gene). Subsequently, the nucleotide sequences of the positive samples were analyzed through GenBank of NCBI, the alignment thereof was performed through Geneious R9 and MEGA 7 software and phylogenetic trees were built by the method of Neighbor-Joining. **Results.** 1,247 ticks all adult stage were collected and distributed like following: n = 705 dogs, n=371 horses and n=171 cattle. Tick hosts Infestation is as it follows: *R. microplus* and *R. sanguineus* in dogs had a low incidence, which means, only up to 5 ticks and *D. nitens* was found, the incidence ranged between low and high in horses sampled. Amplification with the *gltA* and *ompB* gene for *Rickettsia* revealed no positive samples, however, for *Anaplasma* and *Ehrlichia* thirteen were detected, which were subjected to sequencing these same genes. The positive samples were from Alvarado and Ibagué municipalities and extracted from *R. microplus* and *R. sanguineus* tick, collected from cattle and dogs. When performing amplification with the *16S rRNA* gene, positive results were obtained for DNA extractions from *R. microplus* 4.2% (5/119) and for *dsb* gene positivity of 6.72% was obtained (8/119) as follows: *R. microplus* 4.20% (5/119) and *R. sanguineus* 2.52% (3/119). From amplifications with *dsb* and *16S rRNA* genes, the samples 23, 33, 44 and 46 have a similarity with *E. canis*. The nucleotide sequences of samples 7, 9A, 9B and 35 are similar to *E. mineirensis*. It was detected only that sample 64 is similar in their nucleotide sequences with *A. phagocytophilum* species and 8 with *A. marginale*. **Conclusions.** The study allowed us to evaluate the *Ixodidae* ticks family in adulthood distributed in three types of host animals, in different systems of animal production and veterinary clinics from Ibagué, Tolima. Tick species collected in this study, are consistent with previous investigations, *D. nitens* are more suited to horses, *R. sanguineus* to dogs and *R. microplus* to cattle, however, this last one was also detected in dogs and horses as well. The information is evidenced in this study with the frequency distribution of tick species against the host. The importance of detecting pathogenic gram negative bacteria identified as causing emerging diseases in Ibagué, are important to provide information that would prevent diseases caused by such microorganisms. The analyses of this study represent an indication of diseases reemergence and accurately and decisively should alert epidemiological surveillance authorities from Ibagué,

Tolima and the rest of the country. The variety of hosts was limited due to the few species of ticks found in Ibagué and its metropolitan area, apparently depending on weather conditions during the time of collection.

KEYWORDS. *Anaplasma*. *Ehrlichia*. *Rickettsia*. Ticks. PCR. Phylogenetic analysis.