

AISLAMIENTO Y RIBOTIPIFICACIÓN BACTERIANA, DURANTE INFECCIÓN DE LA GARRAPATA DE GANADO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Bernardo Sachman-Ruiz¹, Enrique Reynaud¹, Estefan Miranda-Miranda² y Raquel Cossio-Bayugar². ¹Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. 510-3, C.P., 62210, Cuernavaca, Morelos, México bsachman@gmail.com, enrique@ibt.unam.mx.; ²Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Boulevard Cuauhnahuac No. 8534, Colonia Progreso Jiutepec, Morelos, México, C.P. 62550, miranda.estefhan@inifap.gob.mx, cossio.raquel@inifap.gob.mx.

RESUMEN: Las hembras ingurgitadas de la garrapata del ganado *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no ovopositan cuando presentan signos de infección bacteriana genital. Bajo condiciones experimentales el 5% de las garrapatas hembras presentan infección bacteriana. Los signos que muestran son secreción de un exudado amarillento por el orificio genital y muerte sin completar su ciclo biológico. En este trabajo se obtuvieron 63 aislados bacterianos a partir de exudados genitales de garrapatas ingurgitadas con signos de infección bacteriana bajo condiciones experimentales, estos aislados se tipificaron filogenéticamente con el marcador universal de la subunidad ribosomal 16S. Nuestros resultados demuestran que los exudados están constituidos por una mezcla de diferentes especies bacterianas de las cuales 40 pertenecen al género *Staphylococcus*, 18 al género *Enterococcus*, 4 al género *Actinobacter* y 1 al género *Pseudomonas*. Los resultados de este trabajo permiten definir nuevas especies bacterianas que podrían constituir la base de un procedimiento de biocontrol de la garrapata.

Palabras clave: garrapata, infección, ganado, 16S.

Ribotyping of bacterial isolates from infection of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

ABSTRACT: The cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* engorged females failed to lay eggs. Under experimental conditions 5% of engorged female ticks spontaneously showed symptoms of bacterial infection, which exhibit a characteristic a distinctive yellow exudate through the genital orifice and eventually died without completing their life cycle. During this study we obtained 63 bacterial isolates from genital exudates from infected ticks kept under experimental conditions, the bacterial isolates were phylogenetically typed using the universal ribosomal subunit 16S. Our results show that exudates contained a mixture of bacterial population from which 40 belong to genus *Staphylococcus*, 18 to genus *Enterococcus*, 4 to genus *Actinobacter* and 1 to genus *Pseudomonas*. These results allow us to consider new bacterial species that may be used as biocontrol of the cattle tick.

Key words: tick, infection, cattle, 16S.

Introducción

La garrapata del ganado *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* es un artrópodo hematófago, responsable de pérdidas considerables en la industria del ganado (Oldiges *et al.*, 2012). Estos ectoparásitos hematófagos son persistentes y vectores de enfermedades infecciosas que afectan a una gran variedad de animales (de Castro, 1997; Nuñez *et al.*, 1985), sin embargo, estos ácaros ixódidos también cuentan con numerosos enemigos naturales que los depredan y/o los infectan con notables efectos en sus poblaciones (Miranda-Miranda *et al.* 2011, 2012). Se han aislado diferentes patógenos en garrapatas pertenecientes al género *Rhipicephalus* en diferentes partes del mundo, incluyendo géneros como *Aeromonas*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Castelaniella*, *Comamonas*, *Kocuria*,

Microbacterium, (Zimmer *et al.*, 2013a) *Babesia*, *Theileria*, *Anaplasma*, *Ehrlichia* (Tonetti *et al.*, 2009) y *Staphylococcus* (Miranda-Miranda *et al.*, 2010).

Tal vez el género *Staphylococcus*, con 46 especies y 24 subespecies (<http://www.bacterio.net>), sea el más promisorio para ser utilizado como biocontrol de garrapatas. Se ha demostrado que *Staphylococcus saprophyticus*, es un virulento patógeno natural de la garrapata del ganado *R. microplus*, el cual hace que las garrapatas infectadas sean incapaces de ovipositar y mueran sin completar su ciclo biológico (Miranda-Miranda *et al.*, 2010). Los signos de infección son evidentes, las hembras secretan un exudado amarillo por el orificio genital y eventualmente mueren, aún con ello poco se ha estudiado de la microbiota asociada durante la infección. En el presente trabajo se identificaron varios géneros bacterianos tipificados filogenéticamente a nivel molecular, asociados a la patología de *S. saprophyticus* en la garrapata *R. microplus*.

Materiales y Método

Obtención de garrapatas. Las garrapatas usadas en este estudio fueron cultivadas en las instalaciones del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET) en Jiutepec, Morelos. Se infestaron bovinos con 10,000 larvas de garrapatas de 15 días de edad y 21 días después de la infestación, se recolectaron las hembras ingurgitadas, se pusieron a ovipositar en cajas Petri y se incubaron a 28°C y 80% de humedad relativa hasta antes de la ovoposición (Cossio-Bayugar *et al.*, 2012). Se identificaron garrapatas adultas repletas que mostraran oscurecimiento de la cutícula y exudados a nivel de poro genital. Se tomaron muestras del exudado de las garrapatas que lo presentaban acorde a metodología ya reportada (Miranda-Miranda *et al.*, 2010).

Aislamiento bacteriano. Los aislados bacterianos se obtuvieron de garrapatas en estadio adulto, que mostraban signos de infección y/o presentaban exudado en el orificio genital, mediante un asa bacteriológica estéril e inoculando en cajas petri que contenían agar tripcasa de soya (STA), preparadas con las especificaciones del proveedor (Difco-BD) y estas se incubaron a 37°C. Las colonias obtenidas se propagaron continuamente en STA hasta obtener unidades formadores de colonias (UFC). Una vez que se obtuvieron las UFC se pasaron a 5 ml de medio STA líquido, se separaron 2 alícuotas de 2 ml de cada tubo, a uno se le agregó 0.3 ml de glicerol y se guardó a -70 °C. A la otra alícuota se le extrajo el ADN total con el kit de QIAmp DNA MiniKit, siguiendo las instrucciones del fabricante (Miranda-Miranda *et al.*, 2010).

Para la caracterización molecular, se amplificó el gen 16S DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), utilizando 20 ng de ADN genómico, 10 µM del oligonucleótido fD1 (CCG AAT TCG TCG ACA ACA GAG TTT GAT CCT GGC TCA G) y rD1 (CCC GGG ATC CAA GCT TAA GGA GGT GAT CCA GCC) (Weisbur *et al.* 1991) 2.5 unidades de *Taq* polimerasa Platinum (Invitrogen) 200mM de dNTP's. La PCR se realizó en el termociclador ARKTIK (ThermoScientific®) siguiendo las condiciones reacción: 1 ciclo 94 °C 5 min; 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 56 °C por 30 s y 72 °C durante 30 s; finalmente 1 ciclo 72 °C por 10 min. Las amplificaciones se observaron en un gel de agarosa al 1%. El producto de PCR fue purificado con el DNA Clean & Concentrator kit de ZYMO Research siguiendo las instrucciones del fabricante y secuenciado por la Unidad de Secuenciación del IBT-UNAM.

Una vez obtenidas las secuencias se alinearon con el programa online MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) y se buscó el mejor método de inferencia filogenética con FindModel (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/findmodel/findmodel.html>). El análisis filogenético se realizó bajo el método de máxima verosimilitud, con el modelo GTR+G (General Time Reversible plus Gamma distribution), y 1500 réplicas de Bootstrap.

Resultados

A partir de garrapatas hembras presuntamente infectadas se obtuvieron 63 aislados bacterianos, los cuales se tipificaron filogenéticamente con el marcador universal de la subunidad ribosomal 16S; 40 pertenecen al género *Staphylococcus*, 18 al género *Enterococcus*, 4 al género *Actinobacter* y 1 al género *Pseudomonas*.

De las cepas obtenidas del género *Staphylococcus*, 15 se relacionaron filogenéticamente con el clado formado por *S. saprophyticus* y *S. xylosus*; 2 con la especie *S. sp* OJ82; 1 con el clado *S. carnosus* y 19 quedaron fuera de alguno de los clados (Figura 1). Además se aislaron bacterias pertenecientes a otros géneros: uno de ellos se relaciona filogenéticamente con el género *Pseudomonas*, específicamente en el clado de *P. syringae* y *P. sp* GM41; 4 pertenecen al género *Actinobacter*, donde un aislado se relaciona con *A. sp* DR1 y 3 quedan afuera de los clados; 18 aislados pertenecen al género *Enterococcus*, donde un aislado se relaciona filogenéticamente con *E. cloacae*, 4 con *E. sp* 1054, 10 con *E. sp* BSP6 y 3 sin relación directa con alguno de los clados (Fig. 1).

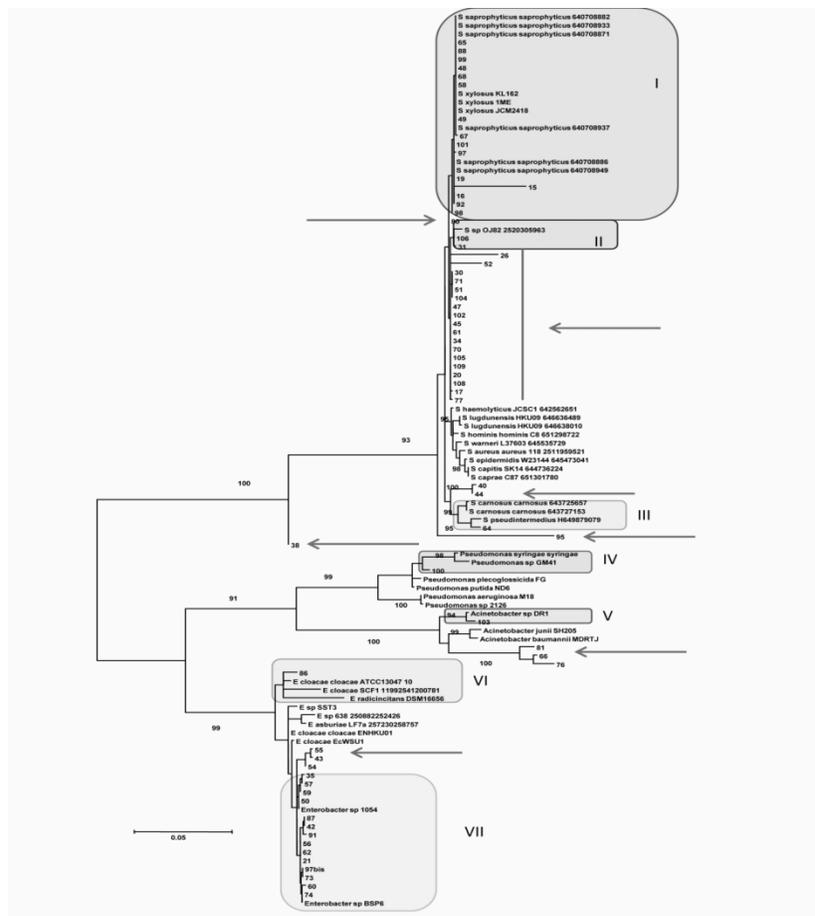


Figura 1. Inferencia filogenética de los aislados bacterianos obtenidos de las garrapatas. El árbol filogenético se construyó con secuencias de 16S, bajo el método de máxima verosimilitud, con el modelo de GTR+G y 1500 réplicas de Bootstrap en el programa MEGA 5. Donde se observa en globos a los aislados que se relacionan filogenéticamente con alguna cepa previamente tipificada (I-VII) y en flechas a los aislados que no se relacionan con algún clado del árbol.

Discusión

Las garrapatas del género *Rhipicephalus* spp son vectores que transmiten diferentes enfermedades al ganado y animales domésticos y bajo condiciones excepcionales al humano, debido a ello y como alternativa al uso de pesticidas que contaminan el ambiente, se ha planteado utilizar como biocontrol algunos patógenos y depredadores de la garrapata del ganado (Miranda-Miranda *et al* 2011, 2012), los cuales incluyen cepas bacterianas que se han reportado como agentes etiológicos de infección bacteriana en este género de garrapatas, las más promisorias son las que provocan que la ovoposición se vea afectada, como el caso de *S. saprophyticus* (Miranda-Miranda *et al.*, 2010). También se ha reportado que la garrapata del ganado han sido una fuente de aislados bacterianos que producen compuestos que inhiben la formación de biofilms y la actividad del parásito *Trichomonas foetus* (Zimmer *et al*, 2013). Durante este trabajo hemos comprobado que la infección de *S. saprophyticus* en la garrapata de ganado está acompañada con otras bacterias que podrían coadyuvar en establecer y hacer más letal esta enfermedad de manera sinérgica, lo cual se vería reflejado en la mejora de la eficiencia de su uso como biocontrol y también existe la posibilidad que alguno de los géneros de bacterias encontrados pudiese constituir por si solo un nuevo patógeno de la garrapata. En trabajos posteriores se podrían plantear diferentes combinaciones de aislados bacterianos encontrados durante este trabajo que mejoren la efectividad en el biocontrol de la garrapata en el ganado.

Conclusión

La infección bacteriana de la garrapata del ganado asociada con *S. saprophyticus*, se acompañada con otras especies bacterianas de 12 diferentes especies pertenecientes a 4 diferentes géneros que podrían ser coadyuvantes en la patogenicidad y virulencia, los resultados de este trabajo podrían ser aplicados en el control biológico de *R. microplus*.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el donativo SEP-CONACyT No.103026.

Literatura Citada

- De Castro, J. J. 1997. Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries. *Veterinary Parasitology*, 71(2-3), 77–97.
- Miranda-Miranda, E., Cossio-Bayugar, R., Quezada-Delgado, M. D. R., Sachman-Ruiz, B. y E. Reynaud. 2010. *Staphylococcus saprophyticus* is a pathogen of the cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. *Biocontrol Science and Technology*, 20(10), 1055–1067.
- Miranda-Miranda E, Cossío-Bayúgar R, Martínez-Ibañez F y C. Bautista-Garfias. 2011. *Megaselia scalaris* (diptera: phoridae), reared on *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (acari: ixodidae) laboratory cultures. *Medical and Veterinary Entomology*, 25(3) 344-347.
- Miranda-Miranda E., Cossio-Bayugar, R., Martínez-Ibañez, F., Casasanero-Orduña R y J. Folch-Mallol. 2012. Natural occurrence of lethal aspergillosis in the cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (acari: ixodidae). *Parasitology*. 138:1-5.
- Nuñez, J. L., Muñoz-Cobeñas, M. E. y H. L. Moltedo. 1985. *Boophilus microplus*: the common cattle tick (p. 204). Berlin: Springer-Verlag.
- Oldiges, D. P., Parizi, L. F., Zimmer, K. R., Lorenzini, D. M., Seixas, A., Masuda, A. y C. Termignoni. 2012. A *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* cathepsin with dual peptidase and antimicrobial activity. *International Journal for Parasitology*, 42(7), 635–645.

- Tonetti, N., Berggoetz, M., Rühle, C., Pretorius, a M. y L. Gern. 2009. Ticks and tick-borne pathogens from wildlife in the Free State Province, South Africa. *Journal of Wildlife Diseases*, 45(2), 437–446.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., y D. J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697–703.
- Zimmer, K. R., Macedo, A. J., Nicastro, G. G., Baldini, R. L. y C. Termignoni. 2013a. Egg wax from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* inhibits *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 4(5), 366–376.
- Zimmer, K. R., Seixas, A., Conceição, J. M., Zvoboda, D. A, Barros, M. P., Tasca, T. y C.Termignoni. 2013. Cattle tick-associated bacteria exert anti-biofilm and anti-*Trichomonas foetus* activities. *Veterinary Microbiology*, 164(1-2), 171–176.