

Artículo Original

Garrapatas (Ixodidae), potenciales transmisores de *Rickettsia rickettsii* en un municipio con alta frecuencia de infección por Rickettsiosis

Braga Ordóñez Jorge¹, Balmaceda Lucero¹, Pérez Osorio Carlos¹, Peniche Lara Gaspar¹

¹ Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Yucatán, México.

RESUMEN

Introducción: En el estado de Yucatán, la rickettsiosis del tipo Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas es responsables de un gran número de cuadros febriles agudos, la cual es una infección producida por bacterias de género *Rickettsia*, siendo transmitidas por especies de garrapatas principalmente de la familia Ixodidae. Durante el año 2014, se identificaron 9 casos de rickettsiosis en la comisaría de Komchén, Yucatán, no identificándose la especie de *Rickettsia* infectante ni su vector transmisor. **Objetivo:** Identificar molecularmente, las especies de garrapatas (Ixodidae) como vectores de *Rickettsia sp.*, en la comisaría de Komchén, Yucatán, México. **Material y Métodos:** La comisaría de Komchén se encuentra localizado a 15 kilómetros al norte de la ciudad de Mérida (21°06'13" y 89°39'45"), capital del estado de Yucatán. Se realizó una colecta de ectoparásitos en animales de convivencia en viviendas del sitio de estudio. Los ectoparásitos colectados fueron caracterizados taxonómicamente en base a guías taxonómicas actualizadas. La presencia de ADN rickettsial en las muestras colectadas se realizó mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa de Punto Final y análisis de los polimorfismos por longitud en fragmentos de restricción realizado a los fragmentos de ADN obtenidos de los genes *gltA* (381pb) así como se empleó la amplificación de un fragmento del gen *ARN 16s* (426pb), ambos genes son comunes para todas las especies de *Rickettsia*. **Resultados:** Se identificó la presencia de bacterias del género *Rickettsia* específicamente de la especie *Rickettsia rickettsii* en garrapatas de la especie *Amblyomma*. **Discusión:** Debido a la alta presencia en el Estado de Yucatán de garrapatas de la familia Ixodidae como lo es *Amblyomma* es importante implementar acciones de control y prevención de vectores enfocadas en garrapatas y/o pulgas como transmisores de enfermedades como rickettsiosis e inclusive enfermedad de lyme o borreliosis.

Palabras clave: *Rickettsia*, rickettsiosis, fiebre manchada de las Montañas Rocallosas.

SUMMARY

Introduction: In the Yucatan State, Rocky Mountain Spotted Fever is responsible for a large number of acute febrile illness, which is an infection caused by bacteria of *Rickettsia*, species, transmitted mainly from the Ixodidae family. During 2014, 9 cases of rickettsial diseases were identified in Komchén municipality in Yucatan State, not identifying the *Rickettsia* species responsible or vector. **Objective:** To identify by molecular biology methods, tick species (Ixodidae) as vectors of *Rickettsia* species, at Komchén municipality, Yucatan State, Mexico. **Material and Methods:** Komchén municipality is located 15 kilometers north of the city of Merida (21°06'13" and 89°39'45"), the capital of Yucatan State. A collection of ectoparasites was collected from animals living in homes at the study site. The collected ectoparasites were characterized taxonomically based on updated taxonomic

guides. The presence of rickettsial DNA in the collected samples was performed by the technique of polymerase chain reaction Endpoint and analysis of polymorphisms length restriction fragment carried the DNA fragments obtained from the *gltA* genes (381pb) and the amplification of a fragment of the 16S RNA gene (426pb) was used, both genes are common to all *Rickettsia* species. **Results:** The presence of *Rickettsia* species specifically *Rickettsia rickettsii* in ticks from the *Amblyomma* species. **Discusión:** Due to the high presence in Yucatan State of ticks from Ixodidae family as it is *Amblyomma* species is important to implement actions prevention and control of vectors focused on ticks and / or fleas as transmitters of diseases such as rickettsial and even lyme disease or borreliosis

Key words: *Rickettsia*, rickettsioses, Rocky Mountain spotted fever.

Autor de correspondencia: Jorge Braga Ordóñez. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México Correo electrónico: bates_88@hotmail.com

Fecha de Recepción: 26 de marzo de 2016

Fecha de Aceptación: 16 de agosto de 2016

Introducción.

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos obligados durante todos los estadios de su ciclo vital, que, como consecuencia de sus hábitos hematófagos, están implicadas en el mantenimiento y la transmisión de microorganismos patógenos, tales como las bacterias del género *Rickettsia*, las cuales pueden causar cuadros febriles agudos en la población humana, que pueden ser fatales si no son tratados oportuna y adecuadamente(1).

En el estado de Yucatán se han reportado varias especies de garrapatas de la familia Ixodidae, las cuales son consideradas vectores en la transmisión de enfermedades leves a severas, del tipo febril(2).

Una de estas enfermedades es la rickettsiosis del tipo FMMR, que se caracteriza por ser una zoonosis, ocasionada por la bacteria *Rickettsia rickettsii* transmitida por garrapatas de la familia Ixodidae (3).

En el estado de Yucatán, los estudios enfocados a determinar la distribución geográfica de las distintas especies de *Rickettsia* presentes así como su ciclo biológico aun se encuentra en estudio. Estudios recientes han demostrado la presencia de *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Rickettsia felis* y *Rickettsia akari* causando afectaciones en humanos (4-7). Sin embargo, estos estudios se han realizado en poblaciones abiertas.

El presente trabajo tiene como objetivo identificar las especies ectoparásitas que habitan en la comisaría de Komchén, Yucatán, la cual es una zona elegida por la

reciente presencia de casos confirmados de rickettsiosis. De la cual se desconoce el vector transmisor de la bacteria en la población y así complementar el conocimiento epidemiológico de la rickettsiosis en Yucatán cuya afectación es frecuentemente subdiagnosticada.

Material y Métodos

Área de estudio: Se realizó un muestro en la comisaría de Komchén, Yucatán, la cual se encuentra localizada a 9 metros sobre el nivel del mar con una posición geo-referenciada con una latitud 21°06'13"N, y longitud 89°39'45"W. La comisaría de Komchén, cuenta con una población de 4,259 habitantes (2010) en su mayoría dedicados a actividades agrícolas y ganaderas. Esta cuenta con un clima cálido subhúmedo con una media anual de 26 ° C, una máxima de 40° C y una mínima de 14° C, una precipitación anual promedio de 740 mm, y posee una vegetación clasificada como Selva con agricultura nómada. La localidad de estudio presentó en el año 2014, 9 casos de rickettsiosis en la población humana, no identificándose la especie de *Rickettsia* infectante ni su vector transmisor.

Obtención de ectoparásitos: Se realizó un muestreo por conveniencia en la población de animales domésticos de la comisaría de Komchén, Yucatán durante el período comprendido de septiembre de 2015 a febrero de 2016, para lo cual, se inspeccionaron manualmente piel y pelo, previa

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados y sus condiciones para su amplificación por PCR.

Gen	Secuencia oligonucleótidos (5' – 3')	Condiciones PCR		
ARN 16S (426pb)	fd1: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1 ciclo	95°C	2 min
	Rc16S.452n: AACGTCATTATCTTCCTTGC	30 ciclos	95°C	20seg
			59°C	30seg
			72°C	45seg
		1 ciclo	72°C	5min
gltA (381pb)	RpCS.877p: GGGGGCCTGCTCACGGCGG	1 ciclo	95°C	1min
	RpCS.1258n: ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA	35 ciclos	95°C	20seg
			49°C	30seg
			60°C	2min
		1 ciclo	60°C	7min

autorización por parte de los dueños de los animales: perros, gatos, vacas e inclusive caballos a fin de encontrar ectoparásitos como pulgas y/o garrapatas. Las muestras fueron almacenadas en tubos de 1.5mL conteniendo alcohol etílico al 70% y transportadas al laboratorio de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias I de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Yucatán para su posterior análisis taxonómico y molecular. Las viviendas se visitaron hasta en 3 ocasiones a fin de obtener el mayor número de ectoparásitos posibles.

Clasificación taxonómica: Debido a que en el estudio solo se colectaron especies de garrapatas, se emplearon claves taxonómicas de identificación de garrapatas de la familia Ixodidae (8, 9).

Purificación de ADN: La extracción y purificación de ADN a las muestras obtenidas fue realizada mediante el kit de purificación de ADN: ZR Tissue & Insect DNA MiniPrep (Zymo Research). Previo a la extracción de ADN, las muestras fueron lavadas agregando 500 µL de agua estéril y agitando vigorosamente en dos ocasiones. Posteriormente las muestras fueron cortadas en tamaños pequeños mediante tijeras.

Identificación y detección de especies de *Rickettsia*: La identificación de ADN rickettsial en las muestras analizadas se realizó por medio de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa de punto final (PCR) amplificando un fragmento de 426 pb del gen ARN 16s común para todas las especies de *Rickettsia*. Las muestras positivas a esta prueba serán sometidas posteriormente a una segunda PCR para amplificar un fragmento de 380 pb del gen *gltA* común para todas las especies y que permite la detección de la especie rickettsial presente.

Los oligonucleótidos cebadores empleados para la amplificación del fragmento de 426 pb del gen ARN 16s así como para el gen *gltA* se presentan en el cuadro 1 (10). En todas las pruebas de PCR realizadas, se adicionaron controles positivos y controles negativos para validar la prueba. El control negativo estaba conformado por agua estéril como muestra y el control positivo estaba conformado por una muestra de ADN de *Rickettsia africae* como muestra.

Los productos de PCR del gen *gltA* fueron purificados mediante el kit de purificación de productos de PCR: Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research).

Los productos purificados fueron sometidos al análisis de polimorfismos por longitud en fragmentos de restricción (RFLP) (11)adicionando la enzima de restricción *AluI* (Invitrogen), incubando durante 1 hora a 37°C. posteriormente, los productos de la digestión fueron resueltos por electroforesis en gel de acrilamida al 12%, teñidos en bromuro de etidio y visualizados en un fotodocumentador en luz ultravioleta.

Resultados

Se colectaron un total de 139 ectoparásitos provenientes de 32 perros con dueño inspeccionados. No se encontraron ectoparásitos en gatos, caballos y borregos inspeccionados. Únicamente se obtuvieron ectoparásitos de la familia Ixodidae, es decir, garrapatas. No se colectaron especies pertenecientes a la familia Pulicidae. Se obtuvieron 82 garrapatas de la especie *Rhipicephalus sanguineus*. Una garrapata de la especie *Amblyomma mixtum* y 56 garrapatas de la especie *Amblyomma parvum*. Respecto a la presencia de bacterias del género *Rickettsia*, se

identificó su presencia en 49 y 25 garrapatas de la especie *R. sanguineus* y *Amblyomma parvum* respectivamente. Los resultados a detalle se presentan en el cuadro 2.

Producto del análisis por RFLP, se identificó un patrón de restricción correspondiente a *Rickettsia rickettsii* en todas las muestras positivas, figura 1.

Conclusiones

La importancia de la rickettsiosis en la actualidad radica en su aparente re-emergencia de la enfermedad a finales del siglo XX (12) ya que desde mediados de los años cuarenta, cuando el Doctor mexicano Francisco Ruiz Sánchez aportó el conocimiento acerca del tratamiento del tifo exantémico, para lo cual se consideró a la rickettsiosis como una enfermedad erradicada en México (13). Actualmente, su presencia en México se ha reportado inicialmente en Yucatán y posteriormente estados como Baja California, Veracruz, Michoacán y recientemente Quintana Roo (13-16).

Los estudios enfocados a la rickettsiosis en Yucatán han presentado información acerca del tipo de especie de *Rickettsia* presente y los agentes transmisores de la bacteria, siendo estos estudios realizados en poblaciones abiertas con presencia de ectoparásitos, donde inclusive, no se han reportado casos de rickettsiosis en humanos. El estudio se realizó en una comisaría donde previamente se han reportado casos de rickettsiosis humana con ausencia de información de la especie rickettsial infectante, la cual proporcionaría información sugestiva acerca del agente transmisor de la bacteria para general acciones de control vectorial específicas para el

ectoparásito responsable. El estudio permitió identificar que *Rickettsia rickettsii* es potencialmente el agente causal de los cuadros clínicos de rickettsiosis previamente reportados, donde los cuales, gracias al diagnóstico oportuno de la enfermedad se logró dar un tratamiento adecuado sin consecuencias fatales en los pacientes. Sin embargo, la alta presencia de bacterias del género *Rickettsia* en la población ectoparásita estudiada, refleja la importancia de la generación de acciones de control y prevención de vectores principalmente garrapatas, donde no se puede excluir las pulgas que son también vectores de *Rickettsia*, aun cuando en el estudio no se colectaron especies de pulgas, esto no quiere decir que la comisaría de Komchén se encuentra libre de especies de pulgas, la posterior evaluación de la ausencia de pulgas o el comportamiento posiblemente estacional de las pulgas es un área de estudio biológico.

Este estudio permitió realizar un abordaje inicial del comportamiento de *Rickettsia rickettsii* en la población de Komchén, Yucatán, donde la problemática de la rickettsiosis deberá ser abordado con acciones interdisciplinarias.

No es posible afirmar que la especie causante de los cuadros clínicos de rickettsiosis fue *Rickettsia rickettsii* pero si se puede confirmar su presencia y posible afectación a la población humana.

La detección de *Amblyomma parvum* habitando en la población de estudio potencializa la importancia de generar acciones de control debido a que esta especie de garrapata puede parasitar humanos, contrario a *Rhipicephalus sanguineus* cuyo parasitismo en humanos es accidental.

Tabla 2. Resultados obtenidos en las colectas y análisis molecular de *Rickettsia*.

Especie de garrapata	Total muestras colectadas	Total muestras positivas	Especie de <i>Rickettsia</i>
<i>R. sanguineus</i>	82	49	<i>Rickettsia rickettsii</i>
<i>A. mixtum</i>	1	0	---
<i>A. parvum</i>	56	25	<i>Rickettsia rickettsii</i>
Total	139	74	

Referencias

1. Klompen JS, Black WCt, Keirans JE, Oliver JH, Jr. Evolution of ticks. *Annu Rev Entomol.* 1996;41:141-61.
2. Rodríguez-Vivas R, Domínguez-Alpizar J. Grupos entomológicos de importancia veterinaria en Yucatán. *Rev Biomed.* 1998;9:26 - 37.
3. Chen LF, Sexton DJ. What's new in Rocky Mountain spotted fever? *Infect Dis Clin North Am. United States;* 2008. p. 415-32, vii-viii.
4. Zavala-Castro JE, Zavala-Velázquez JE, Walker DH, Ruiz Arcila EE, Laviada-Molina H, Olano JP, et al. Fatal human infection with *Rickettsia rickettsii*, Yucatán, Mexico. *Emerg Infect Dis.* 2006 Apr;12(4):672-4.
5. Dzul-Rosado K G-MP, Peniche-Lara G, Zavala-Velázquez J, Zavala-Castro J. Murine Typhus in Humans, Yucatan, Mexico. *Emerging Infectious Disease.* 2013 2013-05-06;19(6).
6. Zavala-Castro JE, Zavala-Velázquez JE, Peniche-Lara GF, Sulú Uicab JE. Human rickettsialpox, southeastern Mexico. *Emerg Infect Dis.* 2009 Oct;15(10):1665-7.
7. Zavala-Castro J, Zavala-Velázquez J, Walker D, Pérez-Osorio J, Peniche-Lara G. Severe human infection with *Rickettsia felis* associated with hepatitis in Yucatan, Mexico. *Int J Med Microbiol.* 2009 Nov;299(7):529-33.
8. Faccioli V. Garrapatas (Acari: Ixodidae y Argasidae) del la colección de invertebrados del Museo Provincial de Ciencias Naturales "Florentino Ameghino". In: Ameghino MPdCNF, editor. Argentina; 2011. p. 38.
9. Voltzit OV. A REVIEW OF NEOTROPICAL AMBLYOMMA SPECIES (ACARI: IXODIDAE). *Acarina.* 2007;15(1):3 - 134.
10. Oteo JA, Nava S, Sousa R, Mattar S, Venzal JM, Abarca K, et al. [Latinamerican guidelines of RIICER for diagnosis of tick-borne rickettsioses]. *Rev Chilena Infectol.* 2014 Feb;31(1):54-65.
11. Regnery RL, Spruill CL, Plikaytis BD. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *J Bacteriol.* 1991 Mar;173(5):1576-89.
12. Zavala-Velazquez JE, Yu XJ, Walker DH. Unrecognized spotted fever group rickettsiosis masquerading as dengue fever in Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 1996 Aug;55(2):157-9.
13. Peniche-Lara G, Perez-Osorio C, Dzul-Rosado K, Zavala-Castro J. Rickettsiosis: Enfermedad Re-emergente en México. *Ciencia Humanismo Salud.* 2015;2(2):76-84.
14. Oliveira KA, Pinter A, Medina-Sanchez A, Boppana VD, Wikel SK, Saito TB, et al. *Amblyomma imitator* ticks as vectors of *Rickettsia rickettsii*, Mexico. *Emerg Infect Dis.* 2010 Aug;16(8):1282-4.
15. Field-Cortazares J, Escarcega-Avila AM, Lopez-Valencia G, Barreras-Serrano A, Tinoco-Gracia L. [Seroprevalence of risk factors associated with rickettsiosis (*Rickettsia rickettsii*) in humans in Baja California, Mexico]. *Gac Med Mex.* 2015 Jan-Feb;151(1):42-6.
16. Cuitun-Borges M, Castellanos-Escalante P, Carrillo-González N, Aguayo-Romero M, Balmaceda L. Presencia de *Rickettsia* sp en garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* parasitando perros domésticos en la isla de Cozumel, Quintana Roo, México. *Ciencia Humanismo Salud.* 2015;2(3):89-93.