

## DETECCIÓN DE *RICKETTSIA* SPP. EN GARRAPATAS FIJADAS EN PERSONAS EN CASTILLA Y LEÓN

### *Detection of Rickettsia spp. in ticks fixed on people in Castilla y León*

Luis HERNÁNDEZ; Carmen VIERA; Antonio MURO

Departamento Biología animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química agrícola. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca. Licenciado Méndez Nieto. 37001 Salamanca

Correo-e: [luishnz.10@usal.es](mailto:luishnz.10@usal.es)

**RESUMEN:** Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos de gran importancia por ser transmisores de agentes patógenos. El objetivo principal del trabajo es el estudio de las garrapatas fijadas a personas en la Comunidad Autónoma de Castilla y León en época estival y, más en concreto, la detección de rickettsiosis transmitidas por ellas. Se recibieron 709 garrapatas retiradas a personas en los diferentes servicios de salud de la comunidad. En el laboratorio se llevó a cabo su identificación y extracción de ADN. A continuación, se realizó una PCR individualizada a cada muestra con el fin de conocer si son portadoras de *Rickettsia* spp. Para ver los resultados de la PCR, se hizo una electroforesis en gel de agarosa, el cual se visualiza. Por último, los productos positivos fueron purificados y cuantificados. De las muestras analizadas, para los genes *gltA* y *OmpA*, se obtuvieron 67 positivos (9,44%), presentando mayor prevalencia en las provincias de Ávila y Burgos. Por tanto, en este estudio podemos observar el indiscutible interés creciente por las enfermedades transmitidas por garrapatas, siendo los datos obtenidos de gran utilidad para orientar las medidas de control y prevención de dichas enfermedades.

*Palabras clave:* garrapata; *Rickettsia* spp.; ixodidos; Castilla y León.

**ABSTRACT:** Ticks are hematophagous parasites of terrestrial vertebrates with great importance because they are transmitters of pathogenic agents. The aim of this study consisted of the analysis of ticks fixed on people in Castilla y León in summer, more specifically the detection of rickettsiosis. We received 709 ticks removed to people in the different health center or hospital in this community. In the laboratory was carried out its identification and extraction of DNA by a commercial kit *Genomic DNA from Tissue*. Then, we performed an individualized PCR to each sample in order to know if they are carriers of *Rickettsia* spp. To see the results of the PCR, was made an electrophoresis gel agarose, which is displayed with a transilluminator *BioDoc-it2 Imaging Systems*. Finally, the positive products were purified and quantified. Of the samples analyzed, for genes *gltA* and *OmpA*, were obtained 67 positive (9.44%), presenting greater prevalence in the provinces of Ávila and Burgos. Therefore, this study concludes that the growing interest in tick-borne diseases is indisputable, and the data obtained are very important in guiding measures to control and prevent these diseases.

*Keys words:* tick; *Rickettsia* spp; ixodides; Castilla y León.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son arácnidos ectoparásitos con 4 pares de patas en estado adulto y 3 en fases inmaduras. Presentan un cuerpo redondeado sin segmentación, llamado *idiosoma*. Todas las garrapatas presentan las piezas bucales separadas del idiosoma, recibiendo el nombre de *gnathosoma* o *capítulo*. Algunos de los estadios inmaduros y adultos tienen *placas espiraculares* donde se origina el sistema de traqueolas respiratorias. Salvo excepciones, todas las especies son parásitos de vertebrados terrestres. Todos los estadios posteriores al huevo son hematófagos. Tienen distribución mundial.

Las garrapatas pertenecen al orden Ixodida, que consta de tres familias: Ixodidae, Argasidae y Nuttalliellidae (Estrada-Peña, 2015).

La familia Ixodidae son garrapatas grandes de entre 0.2 y 0.5 cm. Se conocen como «garrapatas duras», por presentar un escudo dorsal que, en el caso de los machos, cubre por completo la superficie, mientras que en las hembras solo lo hace en la mitad anterior. Presentan un capítulo en posición anterior, con áreas porosas en el caso de las hembras y placas espiculares. Poseen un ciclo gonotrófico (la hembra se alimenta una única vez y pone huevos una sola vez). El número de hospedadores varía entre 1 y 3, pudiendo ser de especies diferentes. Su alimentación

puede durar días o semanas. Se conocen unos 12 géneros que comprenden aproximadamente 600 especies (Estrada-Peña, 2015).

La familia Argasidae a diferencia de la familia anterior es conocida como «garrapatas blandas» por no tener escudo dorsal, ya que presentan una cutícula de aspecto correoso. El capítulo se encuentra en la cara ventral y tienen placas espiculares pequeñas a los lados del cuerpo. No presentan áreas porosas. Tienen un ciclo gonotrófico múltiple (la hembra pone huevos varias veces en su vida). Pueden tener múltiples hospedadores, aunque en muchas ocasiones sean de la misma especie o incluso el mismo individuo. Al contrario que los ixodidos, se alimentan de forma rápida. Se conocen 4 géneros que abarcan unas 190 especies.

La familia Nuttalliellidae solamente presenta una especie conocida: *Nuttallie-lla namaqua*; se piensa que pudiera ser un eslabón perdido o una rama biológica entre ambas (Estrada-Peña, 2015).

Las garrapatas son parásitos obligados de gran importancia, no solo epidemiológica y clínica por ser transmisores de gran variedad de agentes patógenos, sino también desde el punto de vista veterinario por las pérdidas económicas que pueden causar.

En la península Ibérica encontramos principalmente 4 géneros de garrapatas que pican al hombre: *Ixodes*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus* e *Hyalomma*, transmisoras de *Borrelia burgdorferi* sensu lato, varias genoespecies de *Rickettsia*, *Anaplasma phagocytophila* y el virus Crimea-Congo.

Existen diferentes mecanismos de transmisión de los agentes patógenos entre las garrapatas. Destacan la transmisión transtadial y la transmisión transovárica. La combinación de ambos mecanismos, aun en ausencia en la zona de los reservorios de los que estos ácaros adquieren la infección, permite que algunos agentes infecciosos puedan ser vehiculizados por varias generaciones de garrapatas (3 o más). Estos mecanismos de vehiculación tienen una gran importancia en la epidemiología de algunas enfermedades infecciosas transmitidas por garrapatas.

Las características ecológicas de estos vectores afectan a su epidemiología. Los ciclos de actividad están íntimamente relacionados con los factores ambientales. Por lo general son más activas en primavera alcanzando su máxima actividad en verano. Durante el invierno casi la totalidad de especies entran en diapausa (estado de hibernación).

Su ciclo vital consta de tres fases evolutivas (larva, ninfa y adulto), necesitando alimentarse en cada una de ellas para pasar a la siguiente.

Las garrapatas de la familia Ixodidae pueden presentar tres tipos de ciclos en función del número de hospedadores, mientras que la familia Argasidae tiene un único ciclo.

## 2. *RICKETTSIA* SPP. Y RICKETTSIOSIS

**Etiología:** El género *Rickettsia* pertenece a la familia Rickettsiaceae, del orden Rickettsiales (Cdc, 2017). Este género conforma un grupo muy amplio de bacterias pleomorfas Gram negativas e intracelulares que requieren de una célula hospedadora para replicarse. Las rickettsiosis son un grupo de zoonosis transmitidas por vectores artrópodos (garrapatas, pulgas y piojos) (Brouqui, 2007).

El género *Rickettsia* abarca 21 especies clasificadas en 3 grupos:

- Grupo de los tifus, que se subdivide en dos subgrupos: agentes responsables de las fiebres tíficas (*R. prowazekii*) y agentes responsables del tifus murino (*R. typhi*) (Brouqui, 2007).
- Grupo de las fiebres manchadas, en su mayoría asociadas a garrapatas, aunque también se pueden observar asociadas a pulgas y ácaros (Brouqui, 2007). En este grupo se encuentran las especies *R. rickettsii*, *R. conorii* y *R. peacockii*, entre otras.
- Grupo ancestral: compuesto por las especies *R. bellii*. y *R. canadensis* (Quintero, 2013).

En la actualidad, hay 21 especies reconocidas, sin embargo, se conocen a mayores, más de 20 especies, que todavía no han sido caracterizadas completamente y/o su clasificación no está clara.

**Epidemiología:** Las rickettsias, dentro de los vectores, actúan generalmente como parásitos comensales conviviendo con la garrapata. En su mayoría las rickettsias se transmiten por vía transovárica (Herrero, 2010), es decir, mediante la transferencia de bacterias a través de los huevos, desde las garrapatas adultas a la siguiente generación. Esta vía de transmisión es muy importante, ya que el periodo de bacteriemia es muy corto, y esto, unido a que muchas garrapatas solo se alimentan una vez en cada estadio vital, hace que sea muy difícil que se complete el ciclo vital por otras vías.

Hay constancia de la existencia de otros dos métodos de infección por *Rickettsia* spp., mucho menos frecuentes: el primero de ellos se trata de la transmisión sexual de un macho infectado a una hembra no infectada; esta vía de transmisión se ha observado en *R. rickettsii*. El segundo método es la alimentación conjunta, que se produce cuando varias garrapatas se alimentan en zonas cercanas (Parola, 2005).

Las características geográficas son importantes porque la localización de cada especie coincide con la de sus vectores, lo que puede representar una limitación geográfica más o menos extensa. Algunas especies (*R. typhi* o *R. prowazekii*) tienen como hospedador el hombre, con una incidencia que depende en gran medida de las condiciones sanitarias (Herrero, 2010).

*Patogenia:* La patogenia es muy similar en todas ellas; se producen vasculopatías en pequeños vasos por acción directa sobre el endotelio. La infección comienza en la zona de inoculación y se extiende célula a célula, pasando posteriormente a vía sistémica provocando una diseminación generalizada. El daño endotelial va a producir un aumento de la permeabilidad capilar que favorece la extravasación de líquido intravascular, edema, hipotensión, e incluso estado de shock. Se puede producir disminución del número de plaquetas, y en casos más raros insuficiencia prerrenal secundaria, trombocitopenia y desarrollo de fenómenos hemorrágicos, trombopenia y coagulación intravascular diseminada (Bernabeu-Wittel, 2005).

### 3. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Las garrapatas tienen gran importancia en Salud Pública debido a que pueden actuar como vectores de distintos patógenos. La identificación de las garrapatas y el posterior análisis de los patógenos transmitidos por ellas podrían ser de gran ayuda a la hora de establecer medidas de prevención.

El objetivo principal del trabajo es el estudio de las garrapatas fijadas a personas en la Comunidad Autónoma de Castilla y León en época estival y, más en concreto, la detección de rickettsiosis transmitidas por ellas.

#### 3.1. *Objetivos específicos*

- Extracción del ADN de garrapatas.
- PCR para detección del ADN de *Rickettsia* spp. (Reacción de Polimerasa en cadena).
- Purificación y cuantificación de las muestras positivas para su posterior secuenciación.

### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.1. *Muestras estudiadas*

Se lleva a cabo un estudio de 709 garrapatas fijadas a personas en Castilla y León. Estas garrapatas han sido retiradas a pacientes de los diferentes centros de salud u hospitales de dicha Comunidad Autónoma, durante el periodo comprendido entre mayo y julio del 2018 y posteriormente enviadas al Laboratorio de Enfermedades Infecciosas y Tropicales (IBSAL-CIETUS). Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca.

#### 4.2. Extracción del ADN

Previa identificación de las garrapatas, y siguiendo las claves de Gil-Collado (Gil-Collado, 1979), utilizamos el protocolo para la extracción de ADN de tejidos del kit comercial Genomic DNA from Tissue (NucleoSpin®Tissue, Macherey-Nagel). Las muestras son cortadas y sometidas a lisis mediante su incubación con proteinasa K/SDS. Mediante la adicción de sales y etanol al lisado, se propicia la fijación del ADN a la columna (NucleoSpin®Tissue columns). Sucesivos lavados permiten la eliminación de contaminantes, siendo finalmente eluido el ADN genómico en un buffer de elución.

El extracto de ADN se conserva a -20 °C hasta su uso.

#### 4.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Una vez extraído el ADN, se realiza la PCR a todas y cada una de las muestras de forma individual, con el fin de averiguar si son portadoras de *Rickettsia* spp. utilizando un Termociclador *Biometra's T-Personal Thermal Cycler*.

En todas las reacciones de PCR se utilizan controles positivos y controles negativos (usando agua en lugar de ADN).

La amplificación de fragmentos de distintos genes de *Rickettsia* spp. nos permite detectar su presencia en las muestras analizadas. Se utilizan dos PCR en las que amplificamos el gen *OmpA* (Regnery, 1991; Roux, 1996) y el gen *gltA* (Regnery, 1991) (Tabla 1).

TABLA 1. Cebadores y condiciones de amplificación.

*gltA*

Cebador	Secuencia (5'-3')	Fragmento amplificado (pb)	95	1 min	1
					20 s
RpCS.877p	GGGGGCTGCTCACGGCGG	380-397	48	30 s	35
RpCS.1258n	ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA		60	2 min	
			72	7 min	1

*OmpA*

Cebador	Secuencia (5'-3')	Fragmento amplificado (pb)	95	3 min	1
					20 s
Rr190.70p	ATGGCGAATATTCTCCAAAA	629-632	46	20 s	35
Rr190.701n	GTTCCGTTAATGGCAGCATCT		63	1 min	
			72	7 min	1

#### 4.4. Electroforesis en gel de agarosa

Para visualizar el resultado de la PCR se lleva a cabo una electroforesis en gel de agarosa, en la que los distintos fragmentos de ADN migran en función de su peso gracias a la aplicación de una corriente eléctrica.

Se realiza un gel de agarosa al 1.5%, usando Midori Green *Nippon Genetics Europe GmbH*, en una cubeta de electroforesis *Labnet International, Inc* y una fuente *BIO-RAD Power Supply Model. 200/2.0*.

Para la visualización del gel se emplea un transiluminador *BioDoc-It2 Imaging Systems*. El marcador de pesos moleculares usado se encuentra en un rango de 100-3000 pb (*Nippon Genetics Europe GmbH*).

#### 4.5. Purificación y cuantificación de las muestras positivas a *Rickettsia*

Los productos de PCR de las muestras que resultaron positivas fueron purificados mediante el Kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (*Macherey-Nagel*), y cuantificadas mediante espectrofotometría con un Nanodrop *NanoDro ND-1000 Spectrophotometer*.

### 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las 709 muestras analizadas, pertenecen a 5 géneros de garrapatas (*Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Hyalomma*, *Haemaphysalis* e *Ixodes*) en distintos estadios de su ciclo vital, siendo la especie *Ixodes ricinus* la más abundante (Remesar, 2019).

#### 5.1. PCR para la amplificación de fragmentos *gltA* y *OmpA*

La PCR se realizó utilizando las concentraciones y condiciones recogidas en Materiales y métodos (Tabla 1). De las 709 muestras, 67 resultan positivas para *Rickettsia* spp (9.44% de positividad). Observamos datos muy heterogéneos en cuanto a los géneros y especies portadoras, así como en su distribución por provincias, de la siguiente manera: León 8, Zamora 5, Salamanca 9, Palencia 3, Valladolid 7, Ávila 20, Burgos 12, Soria 2 y Segovia 1.

#### 5.2. PCR para amplificación *gltA*

En el caso de las muestras positivas vemos una única banda de 390 pb, correspondiente al peso molecular esperado, y sin amplificaciones inespecíficas (Figura 1).

Hay amplificación de ADN de *Rickettsia* spp. en 54 muestras: 3 *Dermacentor*, 29 *Rhipicephalus*, 12 *Ixodes*, 8 *Hyalomma* y 1 *Haemaphysalis* (Tabla 2).

### 5.3. PCR para amplificación *OmpA*

En el caso de las muestras positivas vemos una única banda de 630 pb, correspondiente al peso molecular esperado, y sin amplificaciones inespecíficas (Figura 1).

Hay amplificación de ADN de *Rickettsia* spp. en 37 muestras: 4 *Dermacentor*, 17 *Rhipicephalus*, 8 *Ixodes* y 8 *Hyalomma* (Tabla 2).

FIGURA 1. En la parte superior se observa la separación electroforética de los productos de PCR para *gltA*. En la parte inferior se observan dichos productos para *OmpA*. M: marcador de pesos moleculares, C+: control positivo, C-: control negativo

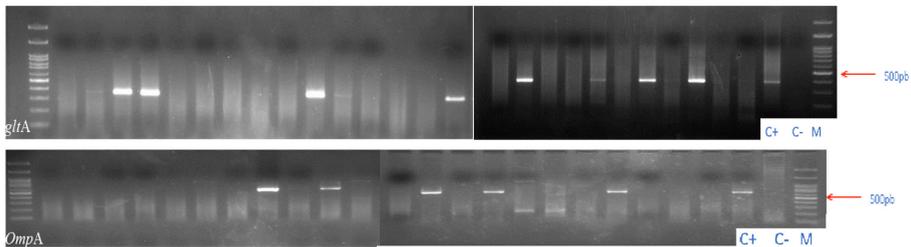


TABLA 2. Especies portadoras de *Rickettsia* spp.

	+	<i>gltA</i>	<i>OmpA</i>	<i>gltA-OmpA</i>
<i>R. bursa</i>	17	7	2	8
<i>D. marginatus</i>	4	1	1	2
<i>I. ricinus</i>	17	8	2	7
<i>R. turanicus</i>	13	7	2	4
<i>H. marginatum</i>	8	1	2	5
<i>R. sanguineus</i>	3	2	-	1
<i>D. reticulatus</i>	1	-	-	1
<i>H. punctata</i>	1	1	-	-
<i>H. lusitanicum</i>	3	1	1	1
TOTAL	67	28	10	29

Es indiscutible el interés creciente por las enfermedades transmitidas por las garrapatas.

Los datos obtenidos de la identificación de las especies que pican a las personas, así como la distribución de los patógenos transmitidos por ellas, son fundamentales para orientar las medidas de control y prevención.

## 6. CONCLUSIONES

- La prevalencia de *Rickettsia* spp. en las garrapatas retiradas a personas en Castilla y León durante los meses de mayo y julio del 2017 es de un 9,44%.
- Las garrapatas portadoras de *Rickettsia* spp. son principalmente *Rhipicephalus bursa* e *Ixodes ricinus*.
- La mayor transmisión de *Rickettsia* spp. tiene lugar en la provincia de Ávila (2,79%), seguida por Burgos (1,69%) y Salamanca (1,26%).

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Bernabeu-Wittel M, Segura-Porta F. Enfermedades producidas por *Rickettsia*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005; 23(3):156-162.
- Brouqui P *et al.* Spotted fever rickettsioses in southern and eastern Europe. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007; 49(1):2-12.
- Cdc.gov [Internet]. Estados Unidos: Department of Health & Human Services; [actualizado 31 dic. 2017]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/dpdx/ticks/index.html>.
- Estrada-Peña A. Orden Ixodida: Las garrapatas. *Revista IDE@-SEA*. 2015; 13:1-15.
- Gil-Collado J *et al.* Claves para la identificación de los Ixodoidea españoles (adultos). *Revista Ibérica de Parasitología*. 1979; 39:107-118.
- Herrero QJA *et al.* Infecciones por rickettsias y fiebre. *Medicine*. 2010; 10(57):3881-3888.
- Parola P *et al.* Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *J Clin Microbiol* 2005; 18(4):719-756.
- Quintero JC *et al.* Ecoepidemiología de la infección por rickettsias en roedores, ectoparásitos y humanos en el noroeste de Antioquia, Colombia. *Biomedica*. 2013; 33(1):38-35.
- Regnery RL *et al.* Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *J Bacteriol*. 1991; 173(5): 1576-1589.
- Remesar S *et al.* Tick species diversity and population dynamics of *Ixodes ricinus* in Galicia (north-western Spain). *Ticks Tick-Borne Dis*. 2019; 10:132-137.
- Roux V *et al.* Differentiation of spotted fever group rickettsiae by sequencing and analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA of the gene encoding the protein rOmpA. *J Clin Microbiol*. 1996; 34:2058-2065.