

## DETECCIÓN DE PARÁSITOS HEMOTRÓPICOS CANINOS EN GARRAPATAS *Rhipicephalus sanguineus* (ACARI: IXODIDAE) INGURGITADAS

✉ José Juan Lira-Amaya<sup>1</sup>, Jesús Antonio Álvarez-Martínez<sup>1</sup>, Carmen Rojas-Martínez<sup>1</sup>, Francisco Martínez Ibáñez<sup>2</sup>, Julio Vicente Figueroa-Millán<sup>1</sup>, Carlos Ramón Bautista-Garfías<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>CENID-PAVET, INIFAP. Km 11.5 Carretera Fed. Cuernavaca-Cuatla Col. Progreso, C.P. 62550 Jiutepec, Morelos, México Tel. (777) 319-28-60 ext.115.

<sup>2</sup>CENAPA, SENASICA Km 11.5 Carretera Fed. Cuernavaca-Cuatla Col. Progreso, C.P. 62550 Jiutepec, Morelos, México.

✉ Correo: lira.juan@inifap.gob.mx.

**RESUMEN.** Con el objeto de identificar la presencia de parásitos hemotrópicos caninos, se colectaron 30 muestras sanguíneas de perros, y además se incluyeron garrapatas colectadas de 18 perros, 17 de ellos clínicamente sanos y 1 infectado por *Babesia* spp., diagnosticado por microscopía. Las muestras fueron procesadas para extracción y amplificación de ADN por PCR con iniciadores genéricos para los patógenos *Babesia* spp. y *Mycoplasma* spp. En el caso de *Babesia* spp. los amplicones sirvieron como molde para la prueba de (RFLP) mediante el uso de enzimas de restricción (*TaqI* y *HinfI*) y además se probaron los iniciadores específicos para la subespecie de *Babesia canis vogeli* (PCR semi-anidada). De las muestras analizadas, el PCR genérico para *Babesia* spp., permitió detectar 2 muestras positivas de sangre y 3 positivas en garrapatas, mientras que con los iniciadores para *Mycoplasma* spp. se identificaron amplicones del tamaño esperado en 20 y 4 de las muestras de sangre y garrapatas, respectivamente. El uso de iniciadores específicos para *B. canis vogeli* pudo corroborar la presencia de 3 muestras PCR positivas en sangre y en 3 de las garrapatas analizadas.

**Palabras Clave:** Garrapatas, hemoparásitos, ADN, PCR

### Hemotropic canine parasite detection in fed *Rhipicephalus sanguineus* ticks

**ABSTRACT.** In order to identify the presence of canine hemotropic parasites, 30 blood samples from dogs were collected, in addition to ticks collected from 18 dogs, including 17 clinically healthy and 1 infected with *Babesia* sp. diagnosed by light microscopy. Extracted DNA from samples was amplified by PCR using generic primers for *Babesia* spp. and *Mycoplasma* spp. Amplicons obtained served as template for a RFLP test by using restriction enzymes (*TaqI* and *HinfI*). Specific primers were also tested for the subspecies of *B. canis vogeli* (semi-nested PCR). The generic PCR allowed detection of two positive blood samples and three samples out of the tested ticks, whereas the primers for *Mycoplasma* spp. allowed the identification of amplicons of the expected size in 20 and 4 blood and tick samples, respectively. By using species specific primers the presence of *B. canis vogeli* was confirmed in three blood samples and three ticks analyzed.

**Key Words:** Ticks, hemoparasites, ADN, PCR

## INTRODUCCIÓN

La babesiosis canina es una enfermedad cosmopolita transmitida por garrapatas que afecta a los perros domésticos, y la distribución se relaciona con la presencia del vector siendo más prevalente en regiones con climas tropicales y subtropicales. La enfermedad es causada por los parásitos intra-eritrocíticos *B. canis* y *B. gibsoni* (Birkenheuer *et al.*, 2003). La especie de *B. canis* ha sido re-clasificada en tres subespecies con base en el vector que la transmite y su distribución: *B. canis canis*, cuyo vector para la transmisión es la garrapata *Dermacentor*

*reticulatus*; *B. canis rossi* transmitida por *Ixodes ricinus*; y *B. canis vogeli* transmitida por *Rhipicephalus sanguineus* en zonas tropicales y subtropicales. Estas se encuentran distribuidas en Europa, Sudáfrica y América, respectivamente (Uilenberg *et al.*, 1989), aunque recientemente se ha reportado la presencia de *B. canis rossi* en los EEUU y de *B. canis vogeli* en Sudáfrica y Europa (Allison *et al.*, 2011; Caccio *et al.*, 2002; Cardoso *et al.*, 2008). El diagnóstico directo del parásito se realiza mediante la observación microscópica de frotis sanguíneo teñidos con colorante Giemsa, y el de tipo indirecto mediante serología utilizando paquetes comerciales. El nombre trivial de hemoplasmas se aplica a las bacterias que se adosan a los glóbulos rojos de los mamíferos y que aún no han podido ser cultivados *in vitro*. Estos hemoparásitos recientemente fueron reclasificados del género *Haemobartonella* y *Eperythrozoon* al género *Mycoplasma* derivado del análisis de la secuencia del gen 16S rARN (Barker *et al.*, 2010). *Mycoplasma haemocanis* es una especie de bacteria hemotrópica que tiene tropismo por los eritrocitos de los perros, causando hemolisis y anemia en animales esplenectomizados o inmunocomprometidos (Pryor and Bradbury, 1975; Kemming *et al.*, 2004).

En México, no se ha implementado el diagnóstico molecular para la babesiosis canina, por lo tanto no hay reportes que demuestren e identifiquen que subespecie del parásito está presente en la sangre de perros domésticos infectados, ni en la garrapata vector. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido utilizada para la amplificación del gen 18S rRNA, lo que ha facilitado la identificación de *B. canis rossi*, *B. canis vogeli* en muestras de perros naturalmente infectados en regiones de Italia y Croacia (Caccio *et al.*, 2002), en el norte de Portugal también han sido descritas las subespecies antes mencionadas lo que hace suponer la presencia y distribución del vector (Cardoso *et al.*, 2008), mientras que en Brazil solo se ha identificado la subespecie de *B. canis vogeli* (Garcia *et al.*, 2006). El análisis de polimorfismos en longitud de fragmentos amplificados y digeridos con enzimas de restricción (PCR-RFLP), es una alternativa para la discriminación entre las subespecies de *B. canis*. En Francia e Italia, la amplificación por PCR del fragmento del gen 18S rRNA (400 pb) ha permitido diferenciar las subespecies *B. canis canis*, *B. canis vogeli* y *B. canis rossi* utilizando las enzimas *TaqI* y *HinfI*, obteniéndose fragmentos de 203, 171 y 26 pb para *B. canis vogeli* y de 227 y 174 pb para *B. canis rossi*. En el caso de *B. canis canis*, y dado que la secuencia amplificada no cuenta con sitios de restricción para ambas enzimas (Carret *et al.*, 1999; Solano *et al.*, 2008) el fragmento no se digiere con ninguna de estas enzimas, permitiendo así discriminar la subespecie de *B. canis*.

Actualmente en México se tiene escasa información sobre infección de garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* por *Babesia canis*, sin embargo en otros países como Australia, Francia y Túnez han logrado implementar la caracterización molecular del parásito mediante el uso de la técnica de PCR. (Jefferies *et al.*, 2003; René *et al.*, 2012; M'ghirbi and Bouattour, 2008). El propósito de este trabajo fue implementar un esquema de genotipificación de *B. canis* mediante las pruebas de PCR-RFLP y PCR-anidada que permita discernir la(s) sub-especie(s) de *B. canis* en muestras presentes en México, en muestras de sangre y en garrapatas *Rhipicephalus sanguineus*. El estudio incluyó también la búsqueda por PCR de animales y garrapatas portadoras de *Mycoplasma* spp.

## **MATERIALES Y MÉTODO**

**Preparación de muestras.** Se colectaron muestras sanguíneas de 30 perros mediante la punción de la vena cefálica en tubos con anticoagulante (EDTA). Los perros fueron referidos a una clínica particular en la ciudad de Cuautla, Morelos con signología de fiebre, anemia, letargia ó epistaxis, consistente y sospechosa de hemoparásitos e historia de previa exposición o presencia de garrapatas. Se tomó una alícuota y se extendió en un portaobjetos para ser fijado con metanol y

teñido con colorante Giemsa, cada laminilla fue observada por microscopía durante al menos 20 minutos. El paquete celular conteniendo glóbulos rojos y blancos fue separado del plasma mediante centrifugación a 4,000 rpm en centrífuga clínica y almacenado a -20°C hasta su utilización. Se analizaron 18 garrapatas (*Rhipicephalus sanguineus*) colectadas de perros de manera aleatoria, las cuales fueron identificadas mediante claves taxonómicas, solamente una de ellas se pudo comprobar por microscopía óptica que provenía de un perro infectado con *Babesia canis* logrando así estimar una parasitemia  $\leq 80\%$ .

**Extracción de ADN y PCR.** La extracción del material genético a partir del paquete celular se realizó con un kit comercial (ZR Genomic DNA II Kit; ZYMO RESEARCH). Para la extracción de ADN de las garrapatas analizadas en este estudio se utilizó el método de trituración con mortero, previa a la utilización de un kit comercialmente disponible (ZR Tissue and Insect DNA Miniprep ZYMO RESEARCH) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La prueba de PCR se realizó con la enzima Polimerasa Go Taq Green Master Mix, 2X (PROMEGA), con un volumen final de 25  $\mu$ l en un termociclador (BIO-RAD Icycler). La detección de *Babesia* sp. se realizó mediante la amplificación de la porción variable del gen 18S rRNA utilizando el par de iniciadores genéricos denominados PIRO-A sentido (5'-AATACCCAATCCTGACACAGGG-3') y PIRO-B anti-sentido (5'-TTAAATACGAATGCCCCCACC-3'), bajo el siguiente protocolo: 94°C por 5 min en la desnaturalización inicial, (94°C, 1 min; 55°C 1 min; 72°C 1min) por 35 ciclos y 72°C por 15 min para la extensión final. La prueba de PCR semi-anidada incluyó un primer paso con los iniciadores externos 455-479 sentido (5'-GTCTTGTAATTGGAATGATGGTGAC-3') y 793-772 anti-sentido (5'-ATGCCCCCAACCGTTCCTATTA-3) bajo el protocolo de amplificación (95°C 5 min; 95°C 45 seg; 58°C 45 seg; 72 °C 45 seg; 72°C 5 min con 50 ciclos de repetición, posteriormente la segunda PCR (semi-anidada) incluyó los iniciadores internos para cada una de las subespecies de *B. canis* [*B. canis canis* (BCC) sentido (5'-TGCGTTGACGGTTTGACC-3'); *B. canis rossi* (BCR) sentido (5'-GCTTGCGGTTTGTTC-3'); y *B. canis vogeli* (BCV) sentido (5'-GTTCGAGTTTGCCATTCGTT-3')], y anti-sentido 793-772 (5'-ATGCCCCCAACCGTTCCTATTA-3') con el mismo protocolo de amplificación anterior con 30 ciclos de repetición. La detección de *Mycoplasma* spp. se realizó mediante la amplificación de la porción variable del gen 16S rRNA utilizando el par de iniciadores genéricos denominados Mh sentido (5'-ACGAAAGTCTGATGGAGCAATA -3') y Mh anti-sentido (5'-ACGCCCAATTCGRATAAT-3'), bajo el siguiente protocolo: 95°C por 2 min en la desnaturalización inicial, (95°C, 1 min; 60°C 1 min ; 72°C 30 seg) por 45 ciclos y 72°C por 5 min para la extensión final (Jensen *et al.*, 2001). Los productos de PCR amplificados con los iniciadores genéricos se probaron con las enzimas de restricción *TaqI* y *HinfI* para la discriminación de especies de *Babesia* sp.

Para el análisis de los productos de PCR y PCR-RFLP se utilizaron geles de agarosa al 3% y sometidos a electroforesis por 45 min a 100V. Los amplicones obtenidos se clonaron en un vector T y la transformación se llevó a cabo con células químicamente competentes de *E. coli* utilizando un kit comercial. Se seleccionaron 2 colonias blancas (recombinantes) representativas, las cuales se estriaron en cajas con medio LB y ampicilina. La purificación del DNA plasmídico se realizó con un kit comercial, para posteriormente utilizarlo como molde para secuenciación por el método de terminación con didesoxinucleótidos fluoromarcados en un secuenciador automatizado (Applied Biosystems). Las secuencias de ADN obtenidas fueron analizadas mediante una búsqueda por homología en las bases de datos utilizando la aplicación blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/blastn>).

## RESULTADOS

Se identificaron 2 muestras positivas mediante análisis microscópico, con predominancia de estadios trofozoitos en una muestra y trofozoitos y merozoitos consistentes con *Babesia* spp. en la segunda muestra. Sin embargo, las parasitemias fueron muy bajas como para ser cuantificadas (>0.01%). La amplificación de ADN por medio de la prueba de PCR con los iniciadores genéricos para la especie de *B. canis* permitió identificar dos muestras de sangre positivas del total de muestras analizadas, mientras que de las muestras de garrapatas que se analizaron en este estudio demostró de manera consistente la presencia de un fragmento de 400 pb en tres muestras (Figura 1). Los resultados de los amplicones que se sometieron a digestión con las enzimas antes mencionadas, se pudo observar digestión parcial con la enzima *TaqI* en dos muestras sanguíneas y solamente una en las muestras de las garrapatas sometidas a la reacción, mismas que corresponden con el tamaño de los fragmentos obtenidos 203 pb, 171pb y 26 pb (no visible en el gel éste último) coincidente con el patrón RFLP correspondiente a *B. canis vogeli* (Carret *et al.*, 1999). El análisis de resultados con la prueba de PCR semianidada permitió identificar tres muestras positivas a partir de sangre y tres a partir de garrapatas consistentes con la amplificación de un fragmento de 192 pb cuando se utiliza el iniciador específico de subespecie BCV en la prueba de PCR semi-anidada (Birkenheuer *et al.*, 2003).

Con el propósito de identificar la presencia de *Mycoplasma* spp. en las garrapatas que fueron incluidas en el presente estudio mediante la prueba molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los iniciadores genéricos, se logró detectar como positivas cuatro del total de muestras analizadas, mientras tanto en las muestras sanguíneas 20 de ellas mostraron un amplicón de la talla esperada (aproximadamente 190 ó 170 pb) (Figura 2).

Se comprueba así que la técnica de semianidamiento tiene mayor sensibilidad analítica y una mejor especificidad para la discriminación de subespecies de *B. canis*, identificándose por primera vez en México la subespecie *B. canis vogeli*, como agente patógeno asociado a la babesiosis canina. El resultado del análisis blastn arrojó una similitud en secuencia de nucleótidos del 100%, existente entre las secuencias de los dos casos mexicanos de *B. canis vogeli* y las correspondientes a los aislados de Brazil, Venezuela, Japón y Estados Unidos.

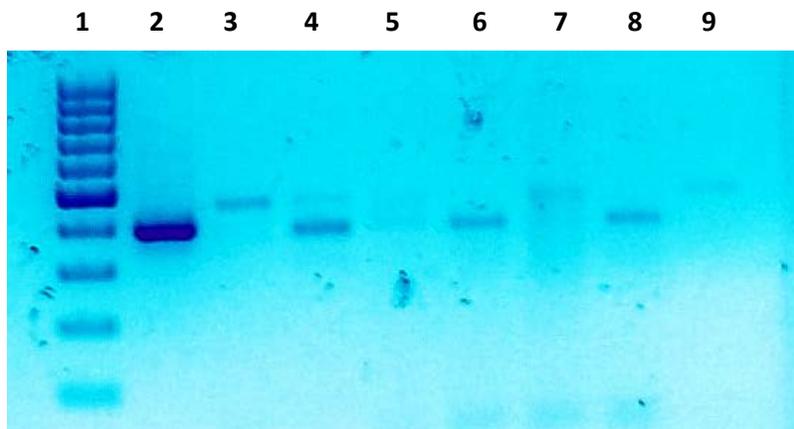


Figura 1. Productos de PCR amplificados con los iniciadores genéricos PIROA-PIROB (400 pb) en muestras de garrapatas *Rhipicephalus sanguineus*. Carril 1, Marcador molecular 100 pb; Carril 2, Control positivo, Carriles 3-9 garrapatas *R. sanguineus*.

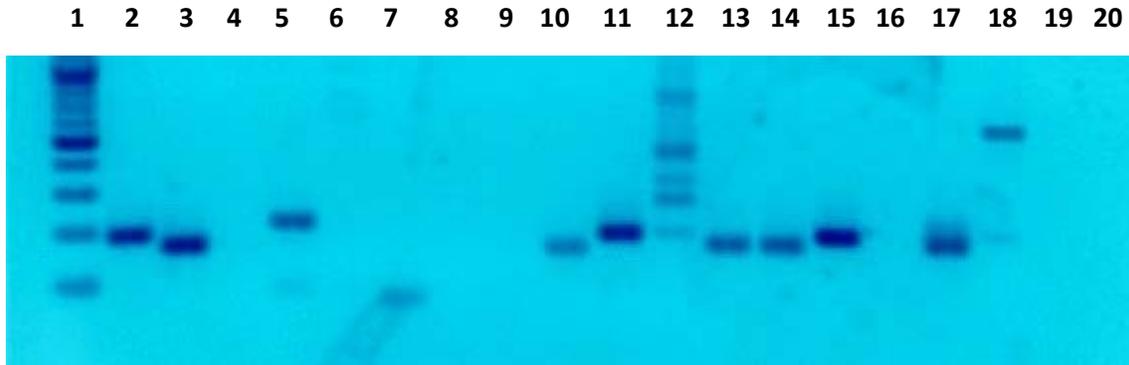


Figura 2. Productos de PCR amplificados con los iniciadores genéricos para *Mycoplasma* sp. (190 o 170 pb). Carril 1, Marcador molecular 100 pb; Carriles 2-19 muestras sanguíneas de perros; Carril 20, control negativo.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La forma clásica para la detección de *Babesia canis* es mediante la observación de las formas intra-eritrocíticas en laminillas teñidas con colorante Giemsa, la cual es considerada como la prueba de oro al ser una técnica relativamente sencilla de realizar. Las pruebas moleculares son herramientas altamente confiables para la genotipificación de los microorganismos causantes de la babesiosis canina, son un recurso válido y necesario, ya que permite clasificar a las diferentes subespecies de *B. canis* a nivel regional y mundial, para determinar el origen o la posible ruta de transmisión de *B. canis* de la garrapata al hospedero canino, como se ha realizado en otras latitudes (Carret *et al.*, 1999; Caccio *et al.*, 2002; García *et al.*, 2006; Cardoso *et al.*, 2008; Solano *et al.*, 2008). Sin embargo la PCR anidada resultó ser la prueba con mayor sensibilidad analítica y especificidad para la diferenciación de especies *B. canis* tanto en muestra de ADN a partir de sangre como de garrapatas (Jefferies *et al.*, 2003; René *et al.*, 2012; M'ghirbi, and Bouattour, 2008).

El gen 16S rRNA es el más utilizado para esta prueba, permitiendo incluso la diferenciación de las distintas especies de *Mycoplasma* spp. (Anteriormente clasificadas como *Haemobartonella* o *Eperythrozoon*) que afectan a los mamíferos, incluyendo los perros, siendo *Mycoplasma hameocanis* el principal agente causal de la hemoplasmosis en perros (Jensen *et al.*, 2001). La importancia de la garrapata vector radica en que por sus hábitos hematófagos, son capaces de transmitir mecánica y biológicamente distintas enfermedades, algunas tan graves que alcanzan niveles epidemiológicos alarmantes, porque afectan al hombre (Morales y Nava, 2006).

De acuerdo a los trabajos realizados sobre la distribución de la garrapata café del perro (*Rhipicephalus sanguineus*) en Morelos, coincide con los resultados del presente estudio sobre las garrapatas del genero *Rhipicephalus sanguineus* que fueron encontradas en los perros con lo reportado previamente en el valle de Cuernavaca (Morales y Cruz, 1998) y en la ciudad de Cuautla (Morales y Nava, 2006).

La detección de infección en las garrapatas positivas de este estudio sugiere que *B. canis vogeli* muy probablemente es transmitida por esta garrapata, coincidente con lo reportado previamente en la literatura (Uilenberg *et al.*, 1989; Carret *et al.*, 1999; Birkenheuer *et al.*, 2003). Estudios previamente realizados han demostrado la presencia de *Babesia canis* en México (Rodríguez *et al.*, 2000), hasta donde sabemos, este es el primer reporte de la identificación de la subespecie *B. canis vogeli* en nuestro País y confirmado por secuenciación. La secuenciación de las muestras amplificadas de *Mycoplasma* spp. podrán brindar información sobre la especie que

infectan a los perros y que está presente en las garrapatas que fueron analizadas en el presente trabajo.

## LITERATURA CITADA

- Allison, R. W., Yeagley, T. J., Levis, K. and M. V. Reichard. 2011. *Babesia canis rossi* infection in a Texas dog. *Vet. Clin. Pathol.* 40:345-350.
- Barker, E. N., Tasker, S., Day, M. J., Warman, S. M., Woolley, K., Birtles, R., Georges, K. C., Ezeokoli, C. D., Newaj-Fyzul, A., Campbell, M. D., Sparagano, O. A. E., Cleaveland, S. and C. R. Helps. 2010. Development and use of real-time PCR to detect and quantify *Mycoplasma haemocanis* and 'Candidatus *Mycoplasma haematoparvum*' in dogs. *Vet. Microbiol.* 140: 167-170.
- Birkenheuer, A. J., Levy M. G. and E. B. Breitschwerdt. 2003. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. *J. Clin. Microbiol.* 41:4172-4177.
- Caccio, S. M., Antunovic, B., Moretti, A., Mangili, V., Marinculic, A., Baric, R. R., Slemenda S. B. and N. J. Pieniazek. 2002. Molecular characterization of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* from naturally infected European dogs. *Vet. Parasitol.* 106:285-292.
- Cardoso, L., Costa, A., Tuna, J., Vieira, L., Eyal, O., Mekuzas, Y. Y. and G. Baneth. 2008. *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* infections in dogs from northern Portugal. *Vet. Parasitol.* 156:199-204.
- Carret, C., Walas, F., Carcy, B., Grande, N., Precigout, E., Moubri, K., Schetters T. H. and A. Gorenflot. 1999. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: Differentiation of the three subspecies by a Restriction Fragment Length Polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46:298-303.
- Garcia de Sá, A., Figueiredo, A., O'Dwyer, L. H., Barros, D., Silva, F., Fernandes, R., Muller, A., Bittencourt, P. and N. R. Pereira. 2006. Detection and molecular characterization of *Babesia canis vogeli* from naturally infected Brazilian dogs. *Int. J. Appl. Res. Vet. Med.* 4:163-168.
- Jefferies, R., Ryan, U. M., Muhlneckel, C. J. and P. J. Irwin. 2003. Two species of canine *Babesia* in Australia: Detection and characterization by PCR. *J. Parasitol.* 89: 409-412.
- Jensen, W. A., Lappin M. R., Kamkar, S. and W. J. Reagan. 2001. Use of a polymerase chain reaction assay to detect and differentiate two strains of *Haemobartonella felis* in naturally infected cats. *Am. J. Vet. Res.* 62: 604-608.
- Kemming, G. I., Messick, J. B., Enders, G., Boros, M., Lorenz, B., Muenzing, S., Wedel, H. K., Mueller, W., Mueller, A. H., Messmer, K. and E. Thein. 2004. *Mycoplasma haemocanis* infection. A kennel disease?. *Lab. Anim. Sci.* 54: 404-409.
- M'ghirbi, Y. and A. Bouattour. 2008. Detection and molecular characterization of *Babesia canis vogeli* from naturally infected dogs and *Rhipicephalus sanguineus* ticks in Tunisia. *Vet. Parasitol.* 152: 1-7.
- Morales, S. M. y C. Cruz. 1998. Fluctuaciones poblacionales de *Rhipicephalus sanguineus*, garrapata parásita de perros en el valle de Cuernavaca, Morelos, México. Estudio preliminar. *Vet. Méx.* 29: 299-301
- Morales, S. M., y R. A. Nava. 2006. Construcción de un control integral de *Rhipicephalus (Rhipicephalus) sanguineus* (LATREILLE) (ACARIDA: IXODIDAE) en Morelos, México. *Investigación Agropecuaria.* 3:112-122.

- Pryor, W. H. and R. P. Bradbury. 1975. *Haemobartonella canis* infection in research dogs. *Lab. Anim. Sci.* 25: 566–569.
- René, M., Chêne, J., Beaufils, J. P., Valiente M. C., Bourdoiseau, G., Mavingui, P. and L. Chabanne. 2012. First evidence and molecular characterization of *Babesia vogeli* in naturally infected dogs and *Rhipicephalus sanguineus* ticks in southern France. *Vet. Parasitol.* 187: 399-407.
- Rodríguez, V. R. I., Cob, L. A. y J. L. Domínguez. 2000. Hemoparásitos en bovinos, caninos y equinos diagnosticados en el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán (1984-1999). *Rev. Biomed.* 11:277-282.
- Solano, G. L., Trotta, M., Carli, E., Carcy, B., Caldinand, M. and T. Furlanello. 2008. *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease. *Vet. Parasitol.* 157:211-221.
- Uilenberg, G., Franssen, F. F., Perie, N. M. and A. A. Spanjer. 1989. Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. *Vet. Q.* 11:33-40.