



V Simposio Internacional Garrapatas y Enfermedades que Transmiten:

"Acciones locales inmediatas para la preparación
ante cambios globales"

16, 17 y 18 de octubre de 2024



Universidad Autónoma de Querétaro

Dra. Silvia Amaya Llano

Rectora

Dra. Oliva Solís Hernández

Secretaria Académica

Dr. Eduardo Núñez Rojas

Secretario de Extensión Universitaria

Dr. José Guadalupe Gómez Soto

Director de la Facultad de Ciencias Naturales

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Organizador General

Iván Corona Guerrero, Daniel Gustavo López Díaz

Diseño y formación editorial

Iván Corona Guerrero

Diseño de Portada

D.R. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

Centro Universitario, Cerro de las Campanas s/n

C.P. 76010, Santiago de Querétaro, Qro., México

ISBN:

Primera edición, octubre de 2024

Hecho en México



Comité Organizador

Aldo Josué Pavón Rocha

Alma Cárdenas Flores

Chyntia Pérez Almeida

Daniel Gustavo López Díaz

Diego Josimar Hernández Silva

Iván Corona Guerrero

José Rodrigo Morales García

Juan Joel Mosqueda Gualito

Lineth Juliana Veja Rojas

Ma. del Consuelo Almazán García

María Martina Esperanza Pérez Soria

Roberto Ilwikatzin Guerrero Solorio

Comité Científico y Editorial

Aldo Josué Pavón Rocha

Alma Cárdenas Flores

Chyntia Pérez Almeida

Daniel Gustavo López Díaz

Diego Josimar Hernández Silva

Iván Corona Guerrero

Ma. del Consuelo Almazán García

Rodrigo Morales García

Rolando Mendoza Zúñiga

Sergio Hugo Nieves Morán



El contenido de los resúmenes es responsabilidad exclusiva de los autores y no necesariamente refleja el punto de vista de los editores, organizadores, patrocinadores, directivos ni de la Universidad Autónoma de Querétaro



Índice

Índice.....	1
Conocimientos y Actitudes de Veterinarios sobre Garrapatas y Enfermedades Asociadas en Mérida, Yucatán.....	3
BmVDAC SE UNE AL PLASMINÓGENO IN SILICO E IN VITRO Y LA UNIÓN POTENCIALIZA LA ACTIVACIÓN DEL PLASMINÓGENO.....	8
Diseño y expresión de una proteína recombinante multiantigénica y multiepitópica contra la babesiosis bovina causada por <i>Babesia bovis</i>	14
EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE PÉPTIDOS CON EPÍTOPOS B CONSERVADOS DE <i>RHIPICEPHALUS MICROPLUS</i> Y DE SU EFICACIA PARA REDUCIR LA CAPACIDAD REPRODUCTIVA.....	19
BACTERIAS DE INTERÉS CLÍNICO TRANSMITIDAS POR GARRAPATAS EN MUNICIPIOS DE CHIHUAHUA CON CASOS DE FMMR	23
Composición y topología de la microbiota de <i>Rhipicephalus microplus</i> durante la infección con <i>Babesia bovis</i>	29
RESISTENCIA A COUMAPHOS EN POBLACIONES DE LA GARRAPATA DEL PERRO, <i>Rhipicephalus sanguineus</i> sensu lato, EN DIFERENTES ENTIDADES DE MÉXICO	36
Vacunas de mRNA para Patógenos Transmitidos por Artrópodos.....	41
Análisis del Transcriptoma de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> : Evaluación de Mecanismos de Resistencia a Fipronil en Cepas Resistentes y Susceptibles	46
NANOIXODICIDA BASADO EN FIPRONIL PARA EL CONTROL DE <i>Rhipicephalus microplus</i>	52
Secuenciación de siguiente generación (NGS-16S) para determinar microbiota bacteriana y agentes zoonóticos de garrapatas de la Comarca Lagunera, México	58
MAPPING TICK-BORNE DISEASE RISKS IN CATTLE: A PRELIMINARY DATABASE FOR PREDICTIVE MODELS IN NORTH AMERICA.....	64
NANOIXODICIDA BOTÁNICO PARA EL CONTROL DE <i>Rhipicephalus microplus</i> 70	
EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE LA VITELOGENINA PARA EL DESARROLLO DE UNA VACUNA CONTRA LA GARRAPATA <i>Amblyomma mixtum</i>	¡Error! Marcador no definido.
Detección molecular de patógenos transmitidos por artrópodos en <i>Desmodus rotundus</i> de México.....	82
DISMINUCIÓN DE LA CAPACIDAD BIOLÓGICA DE GARRAPATAS AL INMUNIZAR BOVINOS CON PÉPTIDOS QUE CONTIENEN EPÍTOPOS B PREDICHOS DE BMVDAC Y α -VORAXINA DE <i>Rhipicephalus microplus</i>	88

ANÁLISIS SEROLÓGICO EVIDENCIA LA EXPOSICIÓN DE DOS VOLUNTARIOS A <i>BORRELIA</i> SP. ASOCIADA A LA FIEBRE RECURRENTE EN NAYARIT, MÉXICO	94
Caracterización de la proteína TCTP de <i>Babesia bigemina</i> y su expresión diferencial en las fases infectantes del parásito	100
INMUNOGENICIDAD DE EPITOPOS B CONSERVADOS DE ANTÍGENOS PRESENTES EN EL INTESTINO Y OVARIO DE LA GARRAPATA <i>R. microplus</i> (Bm86, Bm95 y Vitelogenina).	105
DETECCIÓN DE BACTERIAS DE LOS GÉNEROS <i>BARTONELLA</i> Y <i>RICKETTSIA</i> EN GARRAPATAS DE VERTEBRADOS EN MÉXICO	110
LA INMUNIZACIÓN DE CONEJOS CON PÉPTIDOS DE RI-86 Y VDAC AFECTAN NEGATIVAMENTE LOS PARÁMETROS BIOLÓGICOS DE <i>Rhipicephalus linnaei</i> ADULTAS	117
CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA TUMORAL TRADUCCIONALMENTE CONTROLADA (TCTP) EN <i>BABESIA BOVIS</i> Y EVALUACIÓN DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTABLECIMIENTO DE LA INFECCIÓN	124
Expresión y purificación de TCTP recombinante de <i>Babesia bovis</i> y de <i>Bos taurus</i>	130
PATÓGENOS ZONÓTICOS EN GARRAPATAS Y ROEDORES DE LA SELVA LACANDONA.....	136
DESARROLLO Y APLICACIÓN DE UN PROTOCOLO DE REPRODUCCIÓN BASADO EN CÁPSULA PARA GARRAPATAS MULTI HOSPEDERAS (<i>Amblyomma Mixtum</i>)	141
GARRAPATAS Y OTROS ECTOPARÁSITOS EN MURCIÉLAGOS CAVERNÍCOLAS DE UN REFUGIO EN EL NEOTROPICO, LAS ESPECIES OLVIDADAS.....	1
DISPONIBILIDAD DE REGISTROS DE PRESENCIA DE GARRAPATAS Y PATÓGENOS QUE TRANSMITEN PARA DESARROLLAR MODELOS DE NICHOS ECOLÓGICO Y DE DISTRIBUCIÓN	7



Conocimientos y Actitudes de Veterinarios sobre Garrapatas y Enfermedades Asociadas en Mérida, Yucatán

Knowledge and Attitudes of Veterinarians about Ticks and Associated Diseases in Merida, Yucatan

*Bibiana Aguilar Fuentes, Karla Alejandra Arroyo Solís, Edgar Villarreal Jiménez, Fernando Puerto Manzano, Henry Noh Pech, Karla Rossanet Dzul Rosado**

Centro de Investigaciones Regionales, Dr. Hideyo Noguchi, Universidad Autónoma de Yucatán

*Autor responsable: karla.dzul@correo.uady.mx

ABSTRACT

The present study was designed with the objective of evaluating the level of knowledge, attitudes, and practices of veterinary professionals in Mérida, Yucatán, regarding ticks and tick-borne diseases.

Methodology: The study included 90 veterinary professionals from Mérida, Yucatán, who were given an online survey. The collected data were divided into three main sections: knowledge, attitudes, and practices.

Based on Knowledge: Six questions about ticks were evaluated, with a majority being correctly answered by more than 53% of the respondents. Topics included the definition of rickettsia as a bacterium (58.9%), the means of disease transmission (60%), and the organisms involved in the bacterium's life cycle (64.4% responded arthropods). Symptoms such as fever (72.2%) and joint pain (31.1%) were highlighted.

Based on Attitudes: 82.2% reported having been bitten by a tick, and the majority (51.1%) removed the tick immediately. 50% perform daily checks for ticks after being bitten. 87.8% regularly clean their facilities.

Based on Practices: 64.4% use bleach to clean the facilities, and 71.1% follow fumigation protocols. 58.9% use personal protective equipment when handling animals.

Conclusions: Although many veterinarians in Mérida are familiar with ticks and their associated diseases, there are significant variations in knowledge and practices. There is a need to improve continuing education on ticks and tick-borne diseases among veterinarians to enhance practices and disease management in both animals and public health.

This study suggests that targeted educational programs could close knowledge gaps and improve tick-borne disease management within the veterinary community in Mérida, Yucatán.

Keywords: Veterinarian, Rickettsia, Ticks, Mérida, Tick-borne diseases

INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos obligados. Durante su alimentación pueden transmitir patógenos (bacterias, parásitos y virus) a seres humanos y animales. En los últimos años se ha observado un aumento considerable de enfermedades transmitidas por garrapatas y se ha relacionado con la expansión territorial de las garrapatas hacia nuevas regiones del mundo, debido principalmente al aumento de las temperaturas [1-2], afectando tanto a animales como personas, siendo los profesionales veterinarios uno de los grupos vulnerables debido a la constante exposición ocupacional [3-4].

Las garrapatas transmiten patógenos mediante su proceso de alimentación, generalmente durante 3-5 días tras adherirse a la piel [5], siendo las ninfas y hembras adultas principalmente. Con el cambio climático, se espera que la propagación de estas enfermedades se extienda a nuevas áreas [6]. Sin embargo, en Yucatán, la falta de vigilancia estandarizada de las enfermedades transmitidas por garrapatas genera incertidumbre entre la población vulnerable, dificultando la prevención y tratamiento de estas enfermedades.

Tener mascotas aumenta el riesgo de contacto con garrapatas, ya que tanto los animales de compañía como los humanos pueden infectarse por las mismas enfermedades transmitidas por vectores [7]. En este sentido, los veterinarios juegan un papel clave no solo en la atención de los animales, sino también en informar a los dueños de mascotas sobre los riesgos para la salud pública.

Las garrapatas y los patógenos que transmiten representan un problema significativo para la salud animal y, en algunos casos, para la salud pública. En zonas tropicales como Mérida, Yucatán, donde las condiciones climáticas favorecen la proliferación de estos parásitos, el conocimiento y las actitudes de los veterinarios son clave para el manejo adecuado de este riesgo. Este estudio explora el nivel de comprensión y las prácticas adoptadas por los profesionales veterinarios en relación con las garrapatas y las enfermedades asociadas, con el objetivo de identificar áreas de mejora en la prevención, diagnóstico y tratamiento. Una mejor capacitación y sensibilización de estos profesionales es esencial para reducir el impacto de las enfermedades transmitidas por garrapatas en la región.

MATERIALES Y MÉTODOS

El diseño del presente estudio es observacional descriptivo y transversal.

Población y muestra. 17 clínicas veterinarias en Mérida, Yucatán de las cuales participaron 90 profesionales veterinarios de Mérida, Yucatán.

Reclutamiento de participantes. Se utilizó una lista de clínicas veterinarias en Mérida de fecha y procedencia desconocidas para inicializar una lista de reclutamiento de posibles participantes. Dado que se descubrió que muchas de estas clínicas estaban cerradas permanentemente, se realizó una búsqueda en Google de “[condado] Y clínica veterinaria”

para todos los condados potenciales y todas las clínicas identificadas se agregaron a la lista. Se contactó a todas las clínicas de la lista combinada ubicadas en el centro o sur de Mérida. La línea fronteriza que delimita las regiones de Illinois se estableció basándose en el programa de divisiones climáticas de Mérida para la congruencia de la comparación

Desarrollo de cuestionarios. La encuesta fue desarrollada mediante un software de encuestas gratuito proporcionado por Google, "google forms". Dicha encuesta fue diseñada a modo de que fuera compatible con todos los dispositivos móviles, posteriormente la encuesta fue proporcionada a los participantes por medio de un link.

La encuesta constó de 21 preguntas abiertas y de opción múltiple propias, divididas en cuatro dominios: demografía, conocimientos, actitudes y prácticas. Las preguntas basadas en estos conceptos se presentaron en este orden y se agruparon por dominio.

Análisis de datos. Los datos obtenidos fueron pre-procesados antes de su análisis ya que algunas preguntas eran abiertas y por tal motivo debían ser homogéneos para evitar confusiones en el análisis. Asimismo, el análisis de datos se realizó en el programa Excel y todas las variables categóricas fueron descritas por frecuencia y porcentajes.

RESULTADOS

Se contactó a responsables de 17 clínicas veterinarias en Mérida, Yucatán por correo electrónico. En respuesta, 90 personas dieron su consentimiento para participar y contestaron el cuestionario (n=90).

El 66.7% (60/90) de los participantes fueron mujeres y el 33.3% (30/90) fueron hombres. La mayoría de los participantes tenía una edad entre los 31-45 años (32.2%) o 25-30 años (31.1%). Así mismo la mayoría de los encuestados eran veterinarios (64.4%). El 62.2% trabajaba más de 40 horas semanales, y el 34.4% atendía más de 26 perros semanalmente, mientras que el 30% atendía entre 6-10 gatos.

El 53% de los participantes tienen un alto nivel de conocimiento sobre las garrapatas y las enfermedades asociadas, destacando que el 58.9% (53/90) mencionó tener conocimiento sobre qué es la rickettsias. De igual forma el 60% (54/90) identificó correctamente el mecanismo de transmisión de enfermedades causadas por garrapatas y el 72.2% (65/90) identificó las sintomatologías principales que estas enfermedades provocan.

Respecto a las actitudes, el 82.2% (74/90) mencionó haber sido mordido por una garrapata, y el 51.1% (46/90) retiró la garrapata inmediatamente después de su detección. Además, el 87.8% (79/90) mencionó realizar limpieza en sus instalaciones con la finalidad de reducir el riesgo de infestaciones por garrapatas.

En cuanto a las prácticas, el 64.4% (58/90) mencionó el uso de cloro para limpiar las superficies e instalaciones de las clínicas, mientras que el 71.1% (64/90) mencionó que sigue protocolos de fumigación. El 58.9% (53/90) usa equipo de protección personal al manejar animales, y el 95.6% (86/90) promueve el uso de sustancias o dispositivos antiparasitarios en los animales que atienden.

DISCUSIÓN

Los resultados de la encuesta a profesionales veterinarios en Mérida, Yucatán, revelan que, aunque la mayoría tiene conocimientos sobre garrapatas y las enfermedades asociadas, existen notables variaciones en la comprensión y la aplicación de protocolos. Un aspecto preocupante es que el 28.9% (26/90) de los encuestados desconocen en qué partes de México se presentan estas enfermedades, lo cual es crítico dado que las zonas tropicales son particularmente propensas a brotes.

Respecto a las prácticas de fumigación, el 33.3% de los encuestados realiza este protocolo cada 1-5 meses, pero un 31.1% no respondió a la pregunta, lo que sugiere que algunos profesionales no siguen procedimientos preventivos adecuados. Asimismo, el 38.9% (35/90) mencionó no utilizar materiales de protección al manipular animales, lo que plantea serias preocupaciones sobre la higiene y la seguridad, ya que la falta de protección puede facilitar la transmisión de enfermedades zoonóticas.

En cuanto a los métodos de diagnóstico, el 45.6% (41/90) de los encuestados mencionó la PCR como la prueba más común para detectar enfermedades transmitidas por garrapatas, mientras que solo un 3.3% (3/90) mencionó el uso de la prueba IDEXX 4DX. Es alarmante que el 10% no tenga conocimiento de las pruebas disponibles, lo que resalta la necesidad de una mejor capacitación en diagnóstico veterinario.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran que los veterinarios en Mérida, Yucatán, tienen un nivel considerable de conocimiento sobre las garrapatas y las enfermedades asociadas, con más de la mitad de los encuestados identificando correctamente los patógenos que transmiten estos ectoparásitos y sus mecanismos de transmisión. Además, el alto porcentaje de profesionales que reconoce las principales sintomatologías destaca su preparación teórica. Sin embargo, las actitudes y prácticas varían, ya que aunque la mayoría ha sido mordida por una garrapata, solo la mitad retira al parásito de inmediato. En cuanto a las prácticas preventivas, una mayoría significativa sigue protocolos de limpieza y fumigación, y casi todos promueven el uso de antiparasitarios en los animales que atienden. Estos hallazgos reflejan un buen nivel de conocimiento y compromiso en la prevención de infestaciones, pero también señalan áreas donde se pueden reforzar las prácticas para minimizar riesgos.

REFERENCIAS

Las garrapatas como agentes transmisores de enfermedades para los animales y el hombre. Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario. (s/f). Serida.org. Recuperado el 25 de julio de 2024, de <http://www.serida.org/publicacionesdetalle.php?id=4812>

Garrapatas. (2021, noviembre 15). Public Health Madison & Dane County. <https://publichealthmdc.com/es/salud-ambiental/plagas/garrapatas>



Crist, S. D., Kopsco, H., Miller, A., Gronemeyer, P., Mateus-Pinilla, N., & Smith, R. L. (2022). Knowledge, attitudes, and practices of veterinary professionals towards ticks and tick-borne diseases in Illinois. *One Health*, 14, 100391. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2022.100391>

Carson DA, Kopsco H, Gronemeyer P, Mateus-Pinilla N, Smith GS, Sandstrom EN, Smith RL. Knowledge, attitudes, and practices of Illinois medical professionals related to ticks and tick-borne disease. *One Health*. 2022 Jul 31;15:100424. doi: 10.1016/j.onehlt.2022.100424.

Chakraborty S, Kopsco H, Evans C, Mateus-Pinilla N, Smith RL. Assessing knowledge gaps and empowering Extension workers in Illinois with information on ticks and tickborne diseases through KAP surveys. *Heliyon*. 2024 Feb 3;10(3):e25789. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e25789.

Eleftheriou A, Swisher S, Arruda A, Berrian A, Pesapane R. A survey of knowledge, attitudes, and practices of veterinary professionals regarding ticks and tick-borne diseases: Insights from Ohio, USA. *One Health*. 2023 Jun 22;17:100592. doi: 10.1016/j.onehlt.2023.100592.

Madison-Antenucci S., Kramer LD, Gebhardt LL, Kauffman E. Enfermedades emergentes transmitidas por garrapatas. *Clin. Microbiol. Rev.* 2020;33 doi: 10.1128/cmr.00083-18.



BmVDAC SE UNE AL PLASMINÓGENO *IN SILICO* E *IN VITRO* Y LA UNIÓN POTENCIALIZA LA ACTIVACIÓN DEL PLASMINÓGENO.

BmVDAC BINDS PLASMINOGEN *IN SILICO* AND *IN VITRO* AND THE BINDING ENHANCES PLASMINOGEN ACTIVATION.

Mariana Amaro Ibarra*, Minerva Camacho Nuez*, Elizabeth J. Castañeda Ortiz*, Marcos Morales Reyna*, Juan Mosqueda**, María E. Álvarez Sanchez*.

*Universidad Autónoma de la Ciudad de México

**Universidad Autónoma de Querétaro

Correo electrónico: mariana.amaro96@gmail.com

ABSTRACT

VDAC is a mitochondrial porin that has been described as a multifunctional protein. We previously reported a VDAC homologous in *Rhipicephalus microplus* (*BmVDAC*) whose expression increases in ticks during infection with the parasite *Babesia bigemina*. In addition, we demonstrated the efficacy of *BmVDAC* in a bovine vaccination trial; hence, we are interested in studying the function of this protein. In this work, through molecular docking, we predicted that *BmVDAC* binds to Kringle 5 domain of plasminogen, and using ligand blotting techniques, we demonstrated the specific binding of these two proteins. Additionally, the results of plasminogen activation assay showed that *BmVDAC* increases plasminogen activation. The binding of *BmVDAC* to Hplg and its role in enhancing the conversion of HPLg into plasmin could have a relevant function during *B. bigemina* infection in ticks, helping the parasite invade tick immune cells in the same way that has been reported for the enolase proteins of several parasites.

Key words

Rhipicephalus microplus, mitochondrial porin VDAC, plasminogen binding.

INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son parásitos artrópodos hematófagos presentes en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo (McCoy et al., 2013) y son el segundo vector después de los mosquitos (De La Fuente et al., 2008), que transmiten la mayor cantidad de patógenos a humanos y animales. En México, las infestaciones por *Rhipicephalus microplus* representan una amenaza importante para la industria ganadera a nivel mundial. Este parásito puede dañar al ganado directamente por sus picaduras en casos severos. infestaciones e indirectamente mediante la transmisión de múltiples patógenos.

México cuenta con un clima adecuado para el óptimo desarrollo y finalización del ciclo de vida de esta garrapata, por esta razón, la industria ganadera enfrenta un complejo desafío en el control de las infestaciones de garrapatas y los patógenos que éstas transmiten.

Se estima que más de 24 millones de cabezas de ganado corren el riesgo de sufrir una infestación por garrapatas en este país, causando pérdidas económicas directamente relacionadas con las garrapatas de más de 500 millones de dólares anuales en carne, leche, cuero y reproducción de ganado (Rodríguez-Vivas et al., 2017).

Para poder controlar múltiples especies y cepas de garrapatas, es necesario desarrollar una nueva vacuna contra las garrapatas. Para ser considerada una vacuna candidata viable, una proteína debe cumplir los siguientes criterios: múltiples especies de garrapatas deben codificar un homólogo altamente conservado, debe ser inmunogénica y debe bloquear el ciclo de vida tanto de las garrapatas como de los patógenos transmitidos por garrapatas (de la Fuente y Merino, 2013).

El canal aniónico dependiente de voltaje de *R. microplus* (*BmVDAC*) se ha probado como antígeno para una vacuna contra las garrapatas. Los ensayos de vacunación tuvieron resultados prometedores, mostrando una eficacia general que osciló entre el 34% y el 82% en bovinos infectados y no infectados con *B. bigemina*, respectivamente (Ortega-Sánchez et al., 2020). Las proteínas VDAC desempeñan un papel importante en el metabolismo mitocondrial al regular el transporte de iones como Ca^{+2} y Mg^{+2} y moléculas pequeñas como ADP, ATP y citocromo-C; también puede regular la vía intrínseca de la apoptosis ya sea oligomerizando y liberando el citocromo-C del espacio intermembrana o bloqueando el tráfico de esta molécula (Shoshan-Barmatz et al., 2017, 2010).

Adicionalmente VDAC tiene funciones importantes en patógenos apicomplexos; en *Plasmodium spp.* VDAC está regulado positivamente en los eritrocitos infectados y se relocaliza en la membrana celular (Bouyer et al., 2011); de manera similar, *BmVDAC* está regulado positivamente en las células del intestino medio de las garrapatas y se reubica en grupos durante la infección por *B. bigemina* (Rodríguez-Hernández, et al., 2015). Es bien sabido que los parásitos intracelulares necesitan traspasar la matriz extracelular para invadir sus células huésped, y se ha demostrado que para ello la activación del plasminógeno del huésped es un paso crucial.

VDAC-1 ha sido propuesto como un ligando del dominio kringle-5 del plasminógeno humano (Liang y Bian, 2016), de ahí nuestro interés en estudiar si *BmVDAC* podría unirse al plasminógeno (Pg) y si esta unión podría mejorar su activación. Los resultados nos ayudarán a comprender mejor la función de *BmVDAC* durante la infección garrapatas por *B. bigemina*.

MATERIALES Y MÉTODOS

DOCKING PROTEÍNA-PROTEÍNA

Actualmente, no existe ninguna estructura cristalográfica publicada para el canal aniónico dependiente del voltaje (*BmVDAC*) de *R. microplus*. La secuencia de aminoácidos de *BmVDAC* (GU994210) se usó para generar un modelo 3D basado en homología con SWISS-MODEL (Waterhouse et al., 2018), utilizando la estructura cristalina del canal aniónico dependiente del voltaje 2 del pez cebra (PDB: 4BUM) como referencia, así mismo

se usó la secuencia de aminoácidos del plasminógeno humano (HPIg) (NP_000292.1) para generar un modelo 3D basado en homología usando el plasminógeno de *Pongo abelii* (PDB: Q5R8X6.1.A) como referencia, la estructura resultante fue utilizado como ligando para ensayos de acoplamiento molecular y se seleccionó el dominio Kringle 5 (K5HPIg) para la interacción proteína-proteína. Se utilizó como receptor la estructura basada en homología *BmVDAC*.

Ambas proteínas se prepararon para la interacción proteína-proteína utilizando el software UCSF ChimeraX (Pettersen et al., 2004), eliminando las moléculas de agua, ligandos y cofactores que pudieran estar presentes, las predicciones de acoplamiento se realizaron en el servidor HADDOK 2.4 (van Zundert et al., 2016). Todos los modelos generados se inspeccionaron utilizando el visualizador Discovery Studio y la aplicación PyMOL para observar las interacciones entre ambas proteínas. Además, las bolsas moleculares de *BmVDAC* se predijeron utilizando el servidor CASTp 3.0 (Tian et al., 2018). Solo las regiones de bolsillo y no transmembranales de *BmVDAC* se consideraron accesibles para la interacción proteína-proteína.

INDUCCIÓN, EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE BMVDAC RECOMBINANTE (RBMVDAC)

Se utilizó una construcción pColdI/*BmVDAC* previamente reportada para inducir y purificar la proteína recombinante *BmVDAC* (*rBmVDAC*) como publicamos anteriormente (Rodríguez-Hernández et al., 2015). Brevemente, la proteína *rBmVDAC* se indujo con isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM a 15°C durante 24 h y se expresó en células competentes de *Escherichia coli BL21 (DE3)*, la proteína se purificó en condiciones desnaturalizadas mediante cromatografía de afinidad HisTrap en un sistema FPLC AKTA prime Plus (GE Healthcare, SE). Las fracciones recogidas se comprobaron en acrilamida SDS/PAGE al 10%, se dializaron y cuantificaron mediante método de Bradford.

ENSAYO LIGAND-BLOTTING

20µg de plasminógeno humano (HPIg), de *rBmVDAC* y de albúmina de suero bovino (BSA) como control negativo, se resolvieron en 3 geles preparativos al 10% SDS/PAGE y se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa (BioRad, CA, EE. UU.) que se bloquearon durante la noche con 5% de leche descremada en PBS-Tween 0,05% (PBS-T). Se incubaron tiras que contenían 1,8µg de HPIg o BSA con 14µg de *rBmVDAC* purificada durante la noche a 4°C. Después de tres lavados, las tiras se incubaron con un suero bovino anti *rBmVDAC* (1:500) durante 1 h a 37°C, luego se realizaron tres lavados con PBS-T y las tiras se incubaron con anticuerpo anti-bovino conjugado con peroxidasa (1:1750). Las proteínas se detectaron mediante quimioluminiscencia utilizando un sistema de detección de transferencia ECL-Plus (Promega, EE. UU.). Se incubaron tiras que contenían HPIg o *rBmVDAC* con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-HPIg (1:3500) y anti-*rBmVDAC* de suero bovino respectivamente como controles del reconocimiento de antígeno por parte de los anticuerpos.

ENSAYO DE ACTIVACIÓN DEL PLASMINÓGENO

Se mezclaron [15 µg/ml] de *rBmVDAC* y [20 µg/ml] de plasminógeno y se incubaron en un microtubo de 1.5ml durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se agregaron 100µL de cada

tubo en una placa de cultivo celular de 96 pocillos por triplicado, luego se agregaron 50 μ L de tPA (activador de plasminógeno tisular humano, Sigma Aldrich #T0831) a 500ng/mL por pocillo y se incubaron a 37°C durante 15 minutos. Por último, se añadieron 50 μ L de Chromozyme PL [0,3 mM] (Roche, n.º 10378461001) por pocillo y se incubaron a 37 °C. La absorbancia se leyó a 405 nm cada 2 minutos los primeros 10 minutos, luego cada 5 minutos hasta los 40 minutos, luego cada 10 minutos hasta los 60 minutos y finalmente cada 15 minutos hasta los 120 min. Se utilizaron como controles pocillos que contenían sólo plasminógeno con tPA, o rBmVDAC con plasminógeno sin tPA o rBmVDAC sin plasminógeno. Se aplicó un ANOVA de dos vías para los resultados dando un valor de p <0.0001.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las garrapatas tienen un gran impacto en la salud humana y animal, por lo que la investigación para encontrar proteínas para el desarrollo de una vacuna anti-garrapatas es un esfuerzo de muchos investigadores. Anteriormente hemos informado que la proteína BmVDAC está regulada positivamente y reubicada en células del intestino medio de garrapatas *R. microplus* infectadas con *B. bigemina* (Rodríguez-Hernández et al., 2015) además BmVDAC es inmunogénica y confiere protección a los bovinos contra la infestación por garrapatas (Ortega-Sánchez et al., 2020), por lo que el objetivo de esta investigación es explorar la posible función de BmVDAC durante la infección de las garrapatas con el parásito.

VDAC es una proteína identificada en la membrana externa de las mitocondrias (Colombini, 1989) y también ha sido localizada en la membrana plasmática de varias células (De Pinto et al., 2010).

Hay algunos informes sobre la interacción de VDAC humano y el plasminógeno (Gonzalez-Gronow et al., 2014a, 2014b, 2013, 2007, 2003), particularmente con el dominio Kringle 5 del plasminógeno. En nuestra investigación hemos predicho la interacción de BmVDAC con el plasminógeno y específicamente con el dominio Kringle 5. La interacción entre VDAC y plasminógeno se informó anteriormente en un modelo humano-humano donde VDAC es un ligando para el dominio K5 que es necesario para activar el zimógeno en plasmína (Liang y Bian, 2016) (Zhang et al., 2022).

El presente trabajo sugiere que podría haber una interacción similar entre BmVDAC y Plasminógeno. El modelo BmVDAC-HPg tenía un ΔG previsto de -220,241 kcal/moles, lo que sugiere una interacción espontánea entre las moléculas. Entre las interacciones, se identificó que ocho residuos de aminoácidos interactúan mediante enlaces de hidrógeno, los residuos de aminoácidos que participan en BmVDAC se localizan principalmente en la región carboxilo terminal de la proteína entre ASP185 y LYS27, ambos residuos de aminoácidos se conservan en varias especies según nuestro alineamiento reportado anteriormente (Rodríguez-Hernández et al., 2012). Además, se identificó una superficie enterrada de 2664.29 Å², lo que indica una interacción significativa entre los componentes del complejo. Dado que el único plasminógeno disponible comercialmente para los

ensayos *in vitro* fue de plasminógeno humano, se realizó un alineamiento entre plasminógeno humano y bovino (BPIg).

La alineación por Clustal Omega mostró una identidad del 78.15% entre las secuencias de plasminógeno humano y bovino. Para demostrar experimentalmente que las predicciones anteriores podrían suceder, desarrollamos un ensayo de transferencia de ligando que demostró que *BmVDAC* se une específicamente al plasminógeno. Esta interacción podría tener una función relevante en la activación del plasminógeno; para demostrarlo, realizamos un ensayo de activación del plasminógeno. Los resultados mostraron que en presencia de *rBmVDAC* la cantidad de plasmina aumentó significativamente a partir de los 10 min. La unión de *BmVDAC* al plasminógeno y su papel potenciador de la activación del plasminógeno en plasmina podría tener una función relevante durante la infección por *B. bigemina* en las garrapatas, ayudando al parásito a invadir las células de la garrapata como se ha informado para la proteína Enolasa en varios parásitos (Ghosh y Jacobs-Lorena, 2011) o la activación de la apoptosis (Li et al., 2014) que aún no ha sido descrita para la infección de *R. microplus* con *B. bigemina*.

CONCLUSIONES

Hasta donde sabemos, este es el primer informe de una proteína VDAC de un organismo no mamífero que interactúa y activa al plasminógeno; además, la alta identidad de VDAC entre diferentes garrapatas de importancia en la salud humana y animal hace que estos resultados sean más relevantes. Se deberían desarrollar más experimentos en el futuro cercano para discernir la función específica de *BmVDAC* durante la infección de garrapatas *R. microplus* por *B. bigemina*.

LITERATURA CITADA

Bouyer, G., Cueff, A., Egée, S., Kmieciak, J., Maksimova, Y., Glogowska, E., Gallagher, P.G., Thomas, S.L.Y., 2011. Erythrocyte peripheral type benzodiazepine receptor/voltage-dependent anion channels are upregulated by *Plasmodium falciparum*. *Blood* 118, 2305–2312. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-329300>

Colombini, M., 1989. Voltage gating in the mitochondrial channel, VDAC. *J Membr Biol* 111, 103–111. <https://doi.org/10.1007/BF01871775>

De La Fuente, J., Estrada-Pena, A., Venzal, J.M., Kocan, K.M., Sonenshine, D.E., 2008. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Frontiers in Bioscience* 13, 6938–6946. <https://doi.org/10.2741/3200>

De la Fuente, J., Merino, O., 2013. Vaccinomics, the new road to tick vaccines. *Vaccine* 31, 5923–5929. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.10.049>

De Pinto, V., Messina, A., Lane, D.J.R., Lawen, A., 2010. Voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) in the plasma membrane. *FEBS Lett* 584, 1793–1799. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.02.049>

- Ghosh, A.K., Jacobs-Lorena, M., 2011. Surface-expressed enolases of Plasmodium and other pathogens. Mem Inst Oswaldo Cruz 106, 85–90. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000900011>
- Liang, Y.K., Bian, L.J., 2016. Voltage-dependent anion channel-1, a possible ligand of plasminogen kringle 5. PLoS One 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164834>
- McCoy, K.D., Léger, E., Dietrich, M., 2013. Host specialization in ticks and transmission of tick-borne diseases: a review. Front Cell Infect Microbiol 3. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00057>
- Ortega-Sánchez, R., Camacho-Nuez, M., Castañeda-Ortiz, E.J., Martínez-Benítez, M.B., Hernández-Silva, D.J., Aguilar-Tipacamú, G., Mosqueda, J., 2020. Vaccine efficacy of recombinant BmVDAC on Rhipicephalus microplus fed on *Babesia bigemina*-infected and uninfected cattle. Vaccine 38, 3618–3625. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.12.040>
- Rodríguez-Hernández, E., Mosqueda, J., León-Ávila, G., Castañeda-Ortiz, E.J., Álvarez-Sánchez, M.E., Camacho, A.D., Ramos, A., Camacho-Nuez, M., 2015. BmVDAC upregulation in the midgut of Rhipicephalus microplus, during infection with *Babesia bigemina*. Vet Parasitol 212, 368–374. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.06.016>
- Rodríguez-Vivas, R.I., Grisi, L., Pérez de León, A.A., Silva Villela, H., Torres-Acosta, J.F. de J., Frago Sánchez, H., Romero Salas, D., Rosario Cruz, R., Saldierna, F., García Carrasco, D., 2017. Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review. Rev Mex Cienc Pecu 8, 61–74. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v8i1.4305>
- Shoshan-Barmatz, V., De, S., Meir, A., 2017. The Mitochondrial Voltage-Dependent Anion Channel 1, Ca²⁺ Transport, Apoptosis, and Their Regulation. Front Oncol 7. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00060>

Diseño y expresión de una proteína recombinante multiantigénica y multiepitópica contra la babesiosis bovina causada por *Babesia bovis*.

Design and expression of a multi-antigenic and multi-epitopic recombinant protein against bovine babesiosis caused by *Babesia bovis*.

Alma Cárdenas-Flores^{1,2}, Diego Josimar Hernández-Silva^{1,3}, Angelina Rodríguez-Torres³, Alma Rosa Tamayo-Sosa⁴, Rocío Alejandra Ruiz-Manzano⁵, Mario Hidalgo-Ruiz⁶, Chyntia Quetzalli Pérez-Almeida⁷, Massaro Ueti⁸ y Juan Mosqueda.^{1,3} alma.cardenas@uaq.mx

¹Laboratorio de Inmunología y Vacunas, Facultad de Ciencias Naturales, UAQ. Querétaro, Qro. ²Doctorado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Naturales, UAQ. Querétaro, Qro. ³Cuerpo Académico de Salud Animal y Microbiología Ambiental, Facultad de ciencias Naturales, UAQ. Querétaro, Qro. ⁴Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, UABC. Mexicali, B.C. ⁵Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Ciudad de México. ⁶Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNACH, Tuxtla Gutiérrez, CHIS. ⁷Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. Ciudad de México. ⁸Animal Diseases Research Unit, USDA-ARS, Pullman, Washington, US.

Abstract

Bovine babesiosis is the most important tick-borne cattle disease worldwide, distributed across tropical and subtropical regions where its vector, the *Rhipicephalus* tick, is endemic. Babesiosis caused by *Babesia bovis* results in the most severe clinical manifestation. The development of next-generation vaccines represents a safe and sustainable approach to combating this and other diseases. Although various proteins involved in pathogen establishment in both cattle and ticks have been identified, their use as individual vaccine candidates has yielded unsatisfactory results. Therefore, a vaccine combining different antigens from the pathogen's life cycle represents a promising alternative. In this study, a chimeric protein was designed *in silico*, composed of 16 peptides containing B-cell and T-cell epitopes from 8 different *B. bovis* proteins, each peptide's immunogenicity and/or biological effect having been previously evaluated. The *in silico* design included predictions of molecular weight, isoelectric point, and hydrophilicity. A synthetic gene with the nucleotide sequence corresponding to the chimeric protein was obtained and subsequently cloned into a *Bacillus subtilis* expression system. The result was a 1,116-nucleotide gene encoding a 372-amino acid protein, with a predicted molecular weight of 41.69 kDa and an isoelectric point of 5.07, predicted as hydrophilic. This protein was obtained in a soluble form in the culture medium of *B. subtilis* transformed with the chimeric gene and was recognized by specific antibodies.



Palabras Clave: *Babesia*, epitopes, vaccine, chimeric, *in silico*.

Introducción

La babesiosis bovina es una enfermedad transmitida por garrapatas causada por protozoarios intraeritrocitarios del género *Babesia*, principalmente causada por *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Babesia divergens*, siendo *B. bovis* la que genera los cuadros clínicos más graves. En México, las garrapatas del género *Rhipicephalus*, vectores de esta enfermedad, están ampliamente distribuidas gracias a las condiciones climáticas, lo que expone de manera constante al ganado mexicano a la babesiosis. Las vacunas actuales para esta enfermedad se basan en sangre bovina infectada, lo que presenta varias desventajas en cuanto a manejo, bioseguridad y efectividad contra diferentes aislados, además de no estar disponibles comercialmente en el país. El desarrollo de nuevas vacunas utilizando ingeniería genética y basadas en proteínas que intervienen en diferentes etapas del ciclo de vida de *Babesia* se perfila como una alternativa más segura, viable y sostenible para combatir esta enfermedad (Bock et al., 2004; J. Mosqueda et al., 2012; Rodríguez-Vivas et al., 2017).

Las vacunas basadas en proteínas recombinantes poseen ventajas sobre las basadas en el propio patógeno respecto a seguridad, su fácil y económica obtención en el laboratorio, además de que se pueden obtener proteínas totalmente optimizadas y diseñadas de acuerdo con objetivos en específico. Sin embargo, su producción en sistemas bacterianos Gramnegativos como *E. coli*, puede traer ciertas desventajas entre las cuales se encuentran proteínas mal plegadas, tener modificaciones postraduccionales no deseadas que pueden hacer a la proteína de interés tóxica al momento de administrarse, poco soluble o ser degradada rápidamente. En este sentido, los sistemas de producción de proteínas en la bacteria Grampositiva *B. subtilis* son reconocidos por tener una gran capacidad de secreción, altos rendimientos de producción, y por no ser tóxicas (Cid & Bolívar, 2021; Souza et al., 2021).

Vacunas multiepitópicas, basadas en péptidos con epítomos B predichos, ya han sido desarrolladas previamente en organismos similares a *Babesia*, como *Toxoplasma gondii* y *Plasmodium falciparum*, obteniendo resultados prometedores. En este proyecto, se desarrolló un candidato vacunal experimental contra la babesiosis bovina causada por *B. bovis*, basado en regiones conservadas de proteínas del parásito implicadas tanto en la invasión de eritrocitos, interacción con el sistema inmunitario del hospedante vertebrado como en las células intestinales de la garrapata vector (Draper et al., 2015; J. Mosqueda et al., 2012; Marcelino et al., 2012). A partir de secuencias reportadas de 8 diferentes proteínas, TCTP, RON2, AMA1, MSA-2c, HSP20 y RAP-1, Enolasa y HAP-2, se seleccionaron péptidos con epítomos B y T predichos a los cuales se les evaluó previamente su inmunogenicidad y efecto biológico de los anticuerpos generados. Los péptidos seleccionados se ensamblaron *in silico* en un constructo quimérico, del cual se predijo la secuencia de nucleótidos codificante y se obtuvo en un gen sintético, el cual fue usado para clonarse en un sistema de expresión de *B. subtilis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA

Los péptidos seleccionados de las proteínas Enolasa, HAP2, TCTP, RON2, AMA-1, RAP-1, MSA-2c y HSP20 se usaron para diseñar una proteína quimérica *in silico*. Los péptidos seleccionados primero fueron agrupados por antígeno, disponiendo uno seguido de otro para ser evaluados con la finalidad de no generar epítomos yuxtapuestos. Estos acomodos de péptidos se analizaron en los servidores del BCEpred, ABCpred e IEDB. Si se identificó una región yuxtapuesta como epítomo B por más de un servidor, se prosiguió a mover de orden los péptidos. Si con esta estrategia no se logró eliminar epítomos yuxtapuestos se añadió una secuencia espaciadora.

Una vez obtenidos los grupos de péptidos de todos los antígenos en un orden donde no se identificaron epítomos yuxtapuestos, se prosiguió a distribuirlos en orden siguiendo las mismas instrucciones antes descritas. Una vez seleccionada la versión de la proteína quimérica, se predijeron sus cualidades fisicoquímicas con el servidor ExPasy.

El gen que codifica a la proteína quimérica diseñada se envió a sintetizar químicamente para obtenerse en un vector plasmídico a GeneArt de Thermo Fisher Scientific (Regensburg, Alemania).

Generación recombinante de la proteína quimérica

El gen sintético se amplificó mediante PCR con oligonucleótidos específicos con sitios de restricción para las enzimas SmaI y XbaI, para posteriormente clonarse dentro del plásmido pBE-s (Takara-Bio Inc., Kusatsu, Japan), el plásmido obtenido se usó para transformar células *E. coli* TOP10 las cuales se crecieron en agar LB+Ampicilina (100ug/ml). De las colonias obtenidas se realizó PCR de colonias para identificar aquellas colonias positivas, una de ellas se creció en medio LB con ampicilina, y se extrajo ADN plasmídico. A dicho ADN plasmídico se le realizó una digestión con las enzimas MluI y Eco52I para posteriormente insertar la mezcla de péptidos señal SP DNA Mix (Takara-Bio Inc., Kusatsu, Japan) y se ligaron con el kit In Fusion (Takara-Bio Inc., Kusatsu, Japan). La librería de plásmidos con diferentes péptidos señal se usó para transformar células TOP10 y se sembraron en agar LB con ampicilina. Las colonias obtenidas se cosecharon en conjunto y se les extrajo ADN plasmídico. Dicho ADN plasmídico obtenido fue usado para transformar células *B. subtilis* RIK1285, las cuales se sembraron en agar LB con kanamicina (10 ug/ml) y las colonias obtenidas se sembraron en medio LB con kanamicina y se incubaron 24 horas a 200 rpm a 37°C. Posteriormente el cultivo se centrifugó para separar el medio de cultivo del paquete celular. Con el medio de cultivo obtenido se realizaron SDS-PAGE y Western Blot para detectar la etiqueta de Histidinas de la proteína recombinante.

Resultados y discusión

Se consiguió ensamblar una proteína quimérica con 16 péptidos de las 8 proteínas antes descritas, no se identificaron epítomos yuxtapuestos por más de un servidor bioinformático y que no mostraba identidad con proteínas del bovino, la proteína se nombró

BbovCHPv14.2.8, esta proteína cuenta con 372 aminoácidos, peso molecular de 41.69 Kda, punto isoeléctrico de 5.07 e índice GRAVY de -0.599.

El gen que codifica a la proteína recombinante se clonó eficientemente en el plásmido pBE-s junto con la librería de péptidos señal. Se obtuvieron 10 colonias de *B. subtilis* que contenían el gen quimérico. La presencia de la proteína recombinante fue confirmada mediante el reconocimiento específico por anticuerpos anti-His en el medio de cultivo en las colonias 1,2,3, 7,8,9 y 10.

Este conjunto de resultados muestra un gran avance hacia el desarrollo de una vacuna recombinante eficaz contra la babesiosis bovina. La producción exitosa de la proteína quimérica en *Bacillus subtilis*, un sistema de expresión sin endotoxinas, ofrece ventajas sobre otros sistemas bacterianos, ya que permite una mayor biocompatibilidad y menores costos de producción (Yang et al., 2021). Sin embargo, futuros estudios deben centrarse en la evaluación inmunogénica de BbovCHPv14.2.8, tanto *in vitro* como *in vivo*, para determinar su capacidad de inducir una respuesta protectora robusta y específica en bovinos. Finalmente, los ensayos de neutralización y desafío con el parásito *Babesia bovis* serán críticos para validar la eficacia de este candidato vacunal en condiciones reales. Si bien estos resultados preliminares son prometedores, el éxito de BbovCHPv14.2.8 como vacuna depende de la confirmación de su inmunogenicidad y protección contra la infección en modelos animales (Palmer & McElwain, 1995; Vos & Bock, 2006).

LITERATURA CITADA

- Bock, R., Jackson, L., De Vos, A., & Jorgensen, W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology*, 129(S1), S247-S269. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005190>
- Cid, R., & Bolívar, J. (2021). Platforms for Production of Protein-Based Vaccines: From Classical to Next-Generation Strategies. *Biomolecules*, 11(8), 1072. <https://doi.org/10.3390/biom11081072>
- Draper, S. J., Angov, E., Horii, T., Miller, L. H., Srinivasan, P., Theisen, M., & Biswas, S. (2015). Recent advances in recombinant protein-based malaria vaccines. *Vaccine*, 33(52), 7433-7443. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.09.093>
- Marcelino, I., De Almeida, A. M., Ventosa, M., Pruneau, L., Meyer, D. F., Martinez, D., Lefrançois, T., Vachiéry, N., & Coelho, A. V. (2012). Tick-borne diseases in cattle: Applications of proteomics to develop new generation vaccines. *Journal of Proteomics*, 75(14), 4232-4250. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.03.026>
- Mosqueda, A. Olvera-Ramirez, G. Aguilar-Tipacamu, & G. J. Canto. (2012). Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis. *Current Medicinal Chemistry*, 19(10), 1504-1518. <https://doi.org/10.2174/092986712799828355>

Palmer, G. H., & McElwain, T. F. (1995). Molecular basis for vaccine development against anaplasmosis and babesiosis. *Veterinary Parasitology*, 57(1-3), 233-253. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(94\)03123-E](https://doi.org/10.1016/0304-4017(94)03123-E)

Rodríguez-Vivas, R. I., Grisi, L., Pérez De León, A. A., Silva Villela, H., Torres-Acosta, J. F. D. J., Fragoso Sánchez, H., Romero Salas, D., Rosario Cruz, R., Saldierna, F., & García Carrasco, D. (2017). Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 8(1), 61. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v8i1.4305>

Souza, C. C. D., Guimarães, J. M., Pereira, S. D. S., & Mariúba, L. A. M. (2021). The multifunctionality of expression systems in *Bacillus subtilis*: Emerging devices for the production of recombinant proteins. *Experimental Biology and Medicine*, 246(23), 2443-2453. <https://doi.org/10.1177/153537022111030189>

Vos, A. J., & Bock, R. E. (2006). Vaccination against Bovine Babesiosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 916(1), 540-545. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05333.x>

Yang, H., Qu, J., Zou, W., Shen, W., & Chen, X. (2021). An overview and future prospects of recombinant protein production in *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(18), 6607-6626. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11533-2>



EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE PÉPTIDOS CON EPÍTOPOS B CONSERVADOS DE *RHIPICEPHALUS MICROPLUS* Y DE SU EFICACIA PARA REDUCIR LA CAPACIDAD REPRODUCTIVA

EVALUATION OF THE IMMUNOGENICITY OF PEPTIDES WITH CONSERVED B-CELL EPITOPES FROM *RHIPICEPHALUS MICROPLUS* AND THEIR EFFICACY TO REDUCE REPRODUCTIVE CAPACITY.

E, Castañeda-Villafranca^{1,2}, V.H, González-Álvarez¹, M.A, Mendoza-Núñez¹, C.E, Sollano-Mendieta¹, F.J, Mayren-Mendoza¹, R, Jiménez-Ocampo³, Mosqueda Juan¹

1Maestría en Producción de Bovinos en el Trópico, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 2, UAGro, 2 Laboratorio de Investigación en Inmunología y Vacunas, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro.3 Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias INIFAP, Campo Experimental Valle del Guadiana, Durango.

23500312@uagro.mx

ABSTRACT

Rhipicephalus microplus, also known as the cattle tick, is an ectoparasite that infests more than half of the cattle population, mainly in tropical and subtropical areas, affecting bovine health by being responsible for transmitting diseases such as babesiosis and bovine anaplasmosis, and therefore causing significant economic losses to the livestock industry. Currently, there are different control methods ranging from the use of acaricides to the use of vaccines. In this work, the immunogenicity of vitellogenin and chitinase conserved peptides, containing B-cell epitopes of *R. microplus* was evaluated as well as their efficacy in reducing the reproductive fitness of this tick. For this purpose, three bovines were immunized subcutaneously with 100 µg of each peptide, emulsified in commercial adjuvant. Four immunizations were applied with 21-day intervals between each application. Subsequently, blood serum samples were obtained from each immunization, which were used to perform indirect ELISA analysis to determine antibody generation. To evaluate the efficacy in reducing the reproductive capacity of *R. microplus*, groups of recently moulted adult ticks were artificially fed with serum from each of the challenged peptides until their feeding period was over. Reproductive parameters such as: weight of egg mass and hatched larvae were then evaluated.

Palabras clave: anticuerpos protectores, garrapatas, vacunas recombinantes

INTRODUCCIÓN

La garrapata *Rhipicephalus microplus* es el principal ectoparásito que afecta al ganado bovino, principalmente en zonas tropicales y subtropicales, se estima que el 80 % de la población mundial de bovinos se encuentra infestada y afectada por esta garrapata (Rodríguez-Vivas et al., 2018) (Demessie y Derso, 2015). En general, las garrapatas



representan un problema para la salud, tanto de humanos, como para animales domésticos y silvestres, esto se debe a la gran cantidad de enfermedades que transmiten (Rodríguez-Vivas et al., 2011) (Dai et al., 2010). En el caso particular de *R. microplus*, representa un riesgo potencial por ser responsable de transmitir patógenos importantes para la ganadería entre los que destacan *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, y *Anaplasma marginale* (Betancur-Hurtado y Giraldo-Ríos, 2019).

Para combatir las infestaciones de garrapatas, los productos comúnmente utilizados son los acaricidas (Almazan et al., 2018) (Sousa et al., 2022). Los cuales no resultan de todo eficaces, ya que hoy en día *R. microplus* ha creado una resistencia contra los acaricidas convencionales (De La Cruz Díaz et al., 2023). Existen alternativas para el control, denominado control biológico el cual consiste en el uso de agentes biológicos que afecten directamente a la garrapata, entre ellos están bacterias, parásitos y hongos, los cuales han tomado relevancia para amortiguar los efectos negativos de los métodos de control químico (Samish et al., 2004).

También se han probado vacunas de proteínas recombinantes, estas resultan ser una alternativa bastante atractiva debido a que resulta ser más económica y al ser utilizadas en conjunto con acaricidas convencionales puede incrementar su efectividad y reducir el periodo de aplicación (Galván Arellano et al., 2023). Actualmente se buscan proteínas de garrapatas que pueden funcionar como antígenos para el control de estos ectoparásitos (Guerrero et al., 2012)

MATERIAL Y MÉTODOS

ANIMALES

Para el desafío de inmunización se utilizaron 15 bovinos mestizos de razas europeas (*Bos taurus*). Estos animales pertenecen al hato del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), campo experimental “Valle del Guadiana”, ubicado en Durango, Dgo. México. Dicho hato se encuentra libre de garrapatas. Los animales seleccionados se encontraban sanos y con un peso inicial promedio de 465 kg y se mantuvieron en pastoreo extensivo en las mismas instalaciones.

DESAFÍO DE INMUNOGENICIDAD

Se prepararon las dosis vacunales por cada péptido, las cuales consistían en una mezcla y emulsión del péptido (antígeno) en una solución oleosa, cada dosis tuvo 100 µg del antígeno respectivo y un volumen final de 1 ml la cual estuvo constituida por una fase acuosa conformado por la dilución del péptido en buffer PBS estéril con un pH de 7,4, y una fase oleosa, para la cual se utilizó un adyuvante Montanide™ ISA 201 VG (Seppic, Francia), que se emulsionó por sonicación. A la par se realizaron las dosis control las cual consistió en partes iguales de buffer PBS y el adyuvante. Se destinaron tres animales por péptido y tres animales como control. Los animales fueron inmunizados por vía subcutánea un total de 4 veces con intervalos de 21 días. Se recogieron muestras de suero sanguíneo antes de cada inmunización y 12 días posterior a la última.

ANÁLISIS DE INMUNOGENICIDAD

Las muestras de suero obtenidas fueron analizadas con la técnica de ELISA indirecta para determinar la respuesta de anticuerpos para cada péptido en cada inmunización. Para esto, se utilizaron placas de ELISA de 96 pozos, las cuales fueron recubiertas con 100 μL del péptido diluido en buffer de carbonatos (carbonato/bicarbonato pH 9,6) en una concentración que oscila entre 1 y 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (previamente estandarizada para cada péptido) y se incubó a 4°C durante 12 horas. Después de la incubación, se procedió a lavar los pocillos con 200 μL de buffer PBS Tween 0.005% por 3 veces, una vez seca la placa se procedió a bloquear cada pozo con 200 μL de una dilución al 5% de leche descremada disuelta en PBS Tween 0,005%. La placa se cubrió y se incubó a 37°C agitando a 200rpm durante 1 hora. Transcurrido el tiempo se procedió a lavar nuevamente 3 veces. Se agregaron 100 μL de una dilución del suero sanguíneo en PBS Tween 0.005% en una dilución de 1:500. Cada muestra de suero se evaluó por triplicado. Se procedió a tapar e incubar a 37 °C agitando a 200rpm durante 1 hora. Se lavaron 3 veces para luego añadir 100 μl de una dilución de IgG H+L con HRP de bovino (Goat anti bovine IgG conjugated to horseradish peroxidase) en buffer PBS Tween 0.005% en una concentración de 1:2000 para nuevamente incubar a 37°C con agitación a 200rpm durante 1 hora. Nuevamente se procedió a realizar una ronda de lavado final, por último, se añadió una mezcla de ácido cítrico, fosfato de sodio dibásico y 4 μL de peróxido de hidrógeno al 30% en cada pocillo y se dejó reposar por 25 minutos para posteriormente ser leída en un lector de placa ELISA a una longitud de onda de 450 nm.

RESULTADOS

Los datos obtenidos en las pruebas de ELISA indirecta muestran que tres péptidos de vitelogenina tuvieron una respuesta significativa a partir de la segunda inmunización. En el caso de Vitelogenina 1 dos de los tres bovinos tuvieron una respuesta inmune a partir de la segunda inmunización, para la tercera inmunización los tres bovinos ya contaban con anticuerpos y así la mantuvieron. Para el caso de Vitelogenina 2 solo dos bovinos presentaron anticuerpos específicos al antígeno a partir de la segunda y tercera inmunización.

Vitelogenina 3 solo dos bovinos tuvieron respuesta inmunológica a partir de la segunda inmunización, en el caso de chitinasa 4 solo un bovino presento anticuerpos a partir de la tercera inmunización. Todos los péptidos fueron comparados con bovinos control los cuales no presentaron respuesta contra ninguno de los péptidos desafiados.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se demostró que los péptidos desafiados resultaron producir anticuerpos en los bovinos inmunizados. De los péptidos desafiados, los de vitelogenina 1, 2 y 3 generaron respuesta en al menos dos individuos después de la segunda inmunización, mientras que la quitinasa 4 solo tuvo efecto en uno de los bovinos.

BIBLIOGRAFÍA

Almazan, C., Aguilar Tipacamú, G., Rodríguez, S., Mosqueda, J., & Perez de Leon, A. (2018). Immunological control of ticks and tick-borne diseases that impact cattle health and production. *Frontiers in Bioscience*, 23(8), 1535-1551. <https://doi.org/10.2741/4659>

Betancur Hurtado, O. J., & Giraldo-Ríos, C. (2019). Economic and Health Impact of the Ticks in Production Animals. En M. Abubakar & P. K. Perera (Eds.), *Ticks and Tick-Borne Pathogens*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81167>

Dai, J., Narasimhan, S., Zhang, L., Liu, L., Wang, P., & Fikrig, E. (2010). Tick histamine release factor is critical for *Ixodes scapularis* engorgement and transmission of the lyme disease agent. *PLoS Pathogens*, 6(11), e1001205. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001205>

De La Cruz Díaz, A., González Garduño, R., Vila Pena, M., Castañeda Arriola, R. O., & Maldonado Simán, E. (2023). Prevalencia y diagnóstico de resistencia a ixodicidas en garrapatas de ganado bovino en municipios de Chiapas y Tabasco, México. *Revista Chapingo Serie Agricultura Tropical*, 3(2), 1-14. <https://doi.org/10.5154/r.rchsagt.2023.03.09>

Demessie, Y., & Derso, S. (2015). *Tick Borne Hemoparasitic Diseases of Ruminants: A Review*. 4(9), 210-224.

Galván Arellano, D. M., Vieyra Reyes, P., Montes De Oca Jiménez, R., Ortega Lopez, J., Martínez Arzate, S. G., Rivas Santiago, B., & Vázquez Chagoyán, J. C. (2023). Proteína Bm86 y su potencial uso como vacuna contra garrapatas en el ganado bovino. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 14(3), 672-695. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v14i3.6255>

Guerrero, F. D., Miller, R. J., & Pérez De León, A. A. (2012). Cattle tick vaccines: Many candidate antigens, but will a commercially viable product emerge? *International Journal for Parasitology*, 42(5), 421-427. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.04.003>

Rodríguez-Vivas, R. I., Jonsson, N. N., & Bhushan, C. (2018). Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. *Parasitology Research*, 117(1), 3-29. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5677-6>

Rodríguez-Vivas, R. I., Ojeda Chi, M. M., Pérez Cogollo, L. C., & Rosado Aguilar, J. A. (2011). Epidemiología y control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en México. En *Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos* (Primera). compact disc cd-rom.

Samish, M., Ginsberg, H., & Glazer, I. (2004). Biological control of ticks. *Parasitology*, 129(S1), S389-S403. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005219>

Sousa, A. B. B. D., Bianchi, D., Santos, E. M., Dias, S. R., Peleja, P. L., Santos, R. R., Mercado Caruso, N., & Minervino, A. H. H. (2022). First Description of Acaricide Resistance in Populations of *Rhipicephalus microplus* Tick from the Lower Amazon, Brazil. *Animals*, 12(21), 2931. <https://doi.org/10.3390/ani12212931>

BACTERIAS DE INTERÉS CLÍNICO TRANSMITIDAS POR GARRAPATAS EN MUNICIPIOS DE CHIHUAHUA CON CASOS DE FMRR

BACTERIA OF CLINICAL INTEREST TRANSMITTED BY TICKS IN MUNICIPALITIES OF CHIHUAHUA WITH CASES OF FMRR

I. Valeria Chavarría Bencomo^{1*}, Erick de Jesús de Luna Santillana², M. David Mejía Zúñiga³, L. Janet Moncada Hernández³, Jorge A. Carmona Sawatsky³, G. Pável Espino Solís⁴, Carlos A. Rodríguez Alarcón⁵, Javier A. Garza Hernández⁵, G. Virginia Nevárez Moorillón¹, Jaime R. Adame Gallegos¹.

*e-mail: ibencomo@uach.mx

¹Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua.

²Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional.

³Unidad de Investigación Entomológica y Bioensayos, Secretaría de Salud de Chihuahua.

⁴Laboratorio de Citometría de Flujo Sede Chihuahua, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Chihuahua.

⁵Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.

ABSTRACT

Ticks are vectors of pathogenic microorganisms for humans and animals. Due to the increase in cases of TBD, the identification in ticks of bacteria with pathogenic potential can support the control of these diseases. Therefore, the objective of this work is to preliminarily evaluate the prevalence of *Rickettsia*, *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia canis* in ticks from Chihuahua. Ticks were collected from municipalities of Chihuahua, PCR analysis was performed for the identification of *Rickettsia* sp. from Spotted Fever Group (SFG) and Typhus Group (TG), *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia canis*, in addition to the analysis by 16S ribosomal sequencing. A total of 1961 *Rhipicephalus sanguineus* ticks were collected in 2022, mainly from Nuevo Casas Grandes and Juárez. An overall prevalence of 12% of *Rickettsia* SFG, 7% of *Borrelia burgdorferi* and 2% of *Ehrlichia canis* was found. Of 35 tick samples from homes with confirmed clinical cases of Spotted Fever, 3 (8.57%) were positive for *Rickettsia* SFG. The total minimum range of infection (MRI) was 2.49% for *Rickettsia* SFG, 2.10% for *B. burgdorferi* and 0.6% for *E. canis*. This work gives a preliminary overview of the prevalence of *Rickettsia* SFG and TG, *B. burgdorferi* and *E. canis* in municipalities of Chihuahua, which may contribute to the control of TBD.

PALABRAS CLAVE

Rickettsia, *Ehrlichia*, *Borrelia*, garrapatas, Chihuahua

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por garrapatas (ETG) engloban una extensa gama de padecimientos zoonóticos que afectan a humanos y animales. Producen sintomatologías que pueden ir desde casos leves hasta severos e incluso mortales. Ocurren en ambientes donde existe el traslape entre garrapatas, que actúan como vectores competentes, el



agente etiológico y el hospedador reservorio. Estas enfermedades son transmitidas por garrapatas de diferentes géneros y especies hacia los hospedadores adecuados, dentro de los que se encuentran animales domésticos y silvestres como rumiantes, aves de corral, roedores y perros. Ocasionalmente, las garrapatas muerden a los humanos y le transmiten patógenos; sin embargo, son considerados hospedadores accidentales y no forman parte del ciclo biológico de las garrapatas (Rochlin & Toledo, 2020).

Las ETG son producidas por patógenos bacterianos, virales y protozoos que se difunden a través del torrente sanguíneo a varios órganos. En el caso de las bacterias transmitidas por garrapatas, el 90% forma parte de las familias *Rickettsiaceae*, *Anaplasmataceae* y *Spirochaetaceae* (Rochlin & Toledo, 2020). Causan enfermedades zoonóticas caracterizadas por fiebre, dolor de cabeza, artralgia, escalofríos y mialgia; en casos particulares, síntomas gastrointestinales como vómitos y dolor abdominal, y sintomatología que puede llegar a ser severa e incluso mortal (Rodríguez & Oteo, 2020).

Las especies del género *Rickettsia* que principalmente provocan enfermedad en humanos se encuentran dentro de los grupos de las Fiebres Manchadas (SFG) y de las Fiebres Tíficas (TG) aunque existen otros grupos. Uno de los patógenos más comunes para los humanos reportados en América es *Rickettsia rickettsii*, agente causal de la Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas (FMMR). Diversas especies del género *Ehrlichia* causan enfermedades en humanos. *E. chaffensis* provoca la ehrlichiosis monocítica humana caracterizada por fiebre, mialgias, dolor de cabeza y malestar general, por lo que el diagnóstico suele confundirse con otros síndromes febriles (Anaya-Ramírez et al., 2017). La enfermedad de Lyme es ocasionada por la bacteria *Borrelia burgdorferi*, ocasiona en humanos síntomas similares al resfriado y el eritema migrans (Strnad et al., 2023).

EPIDEMIOLOGÍA DE LAS ETG

En México, se realiza el reporte y seguimiento de la FMMR y de otras rickettsiosis a través de la Dirección General de Epidemiología. En el 2023, Chihuahua fue el estado con mayor número de casos de FMMR y el cuarto lugar en otras rickettsiosis. Hasta la semana 37 de 2024, Chihuahua ocupa el tercer lugar casos confirmados de FMMR y otras rickettsiosis (DGE, 2024). Existen estudios realizados en distintos estados de la República Mexicana que han documentado la presencia de *Rickettsia spp.*, *R. rickettsii*, *Ehrlichia spp.*, *A. phagocytophilum* y *Borrelia burgdorferi* en garrapatas, perros o animales silvestres; esto resulta importante ya que la identificación de bacterias causales de ETG en animales y garrapatas, es indicativo de la circulación de los mismos en una zona en particular (Sosa-Gutiérrez et al., 2021).

El incremento en la incidencia además de la falta de vacunas efectivas contra ETG, ha convertido a estos padecimientos en una preocupación en temas de salud pública, debido al impacto sobre la salud humana y animal. La Organización Mundial de la Salud (OMS) desarrolló el concepto de “Una Salud” (One Health) que promueve el estudio de la circulación y diseminación de patógenos entre animales y humanos para un mejor cuidado de la salud pública. Con base en este enfoque, es de importancia el estudio de la expansión de las poblaciones de garrapatas y de los patógenos que circulan en las diferentes zonas geográficas para el desarrollo de estrategias de control de ETG (Banović et al., 2021).

Por lo anterior, es importante actualizar el conocimiento de la prevalencia de géneros bacterianos como *Rickettsia*, *Ehrlichia* y *Borrelia* a través de la identificación de los microorganismos circulantes en la zona y de esta forma coadyuvar en la planificar estrategias apropiadamente adaptadas a la región de Chihuahua para la prevención de la expansión de las garrapatas y por lo tanto de la transmisión de bacterias patógenas. Por lo que el objetivo de este trabajo fue realizar la evaluación preliminar de *Rickettsia spp.* del Grupo de las Fiebres Manchadas (SFG) y Grupo de las Fiebres Tíficas (TG), *Borrelia burgdorferi* y *Ehrlichia canis* en garrapatas de zonas con reporte de casos de FMRR en municipios de Chihuahua.

MATERIALES Y MÉTODOS

RECOLECCIÓN DE GARRAPATAS

Las garrapatas se recolectaron de domicilios con casos sospechosos de FMRR en siete municipios del estado de Chihuahua. Se removieron directamente de las casas, patios o perros de cada domicilio. Todas las garrapatas se mantuvieron en etanol al 70%. Se recolectaron datos de la ubicación geográfica y lugar de la recolección. La identificación de las garrapatas a nivel de especie fue realizada por un taxónomo experto de la Secretaría de Salud de Chihuahua de acuerdo con los criterios utilizados en las guías taxonómicas.

EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

Para la extracción del ADN de las garrapatas se realizaron pools de 2 a 10 garrapatas por domicilio. Las garrapatas se retiraron de los viales para evaporar el etanol. Se lavaron con agua destilada estéril y se dejaron secar. La homogenización de las garrapatas se realizó mediante disrupción completa utilizando un homogenizador manual. Se utilizó el kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Germantown, MD, E.U.A) para la extracción de ADN de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las concentraciones y la calidad del ADN se cuantificaron en Nanodrop One (Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, E.U.A.).

DETECCIÓN DE PATÓGENOS POR PCR

La amplificación del gen *ompB* de *Rickettsia* del grupo de las Fiebre Manchada (SFG) y del Grupo de las Fiebres Tíficas (TG) se realizó en una reacción anidada utilizando para la primera reacción las concentraciones finales de 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 0,1 μm de los cebadores rompB OF y rompB OR, 0,05 u/ml de taq polimerasa y 30 ng de ADN. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización de 5 min a 95°C seguido de 35 ciclos a 95 °C por 15 s, 54°C durante 15 s y 72°C durante 30 s y un ciclo final a 72°C durante 3 min. Para la segunda reacción las concentraciones de amplificaciones fueron de 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,05 μm de primers rompB SFG/TG IR, rompB TG IF y rompB SFG IF, 0,05 u/ml de Taq polimerasa y 30 ng de ADN. La condición de amplificación fue desnaturalización a 95°C durante 5 min, 35 ciclos de elongación a 95°C durante 15 s, 56°C durante 15 s y 72°C durante 30 s, y una extensión final de 3 min a 72°C. La detección de *Ehrlichia canis* se realizó con la amplificación del gen *18S rRNA* con las concentraciones finales de 3mM MgCl₂, 0.2mM dNTPs, 0.1μm primers HE3-2F y ECA-2R, 0.05 u/ml Taq polimerasa y 30 ng de ADN. Las condiciones de PCR fueron 94°C por 5 min, 35 ciclos a 94°C, 30 s, 63°C, 30 s, 72°C, 30 s, y una extensión final a 72°C por 1 min. Para la detección del gen *ospA* de *Borrelia burgdorferi*, las concentraciones finales fueron 3mM

MgCl₂, 0.2mM dNTPs, 0.05µm de primers BSLF y BSLR, 0.025 u/ml Taq polimerasa y 30ng de ADN; las condiciones de PCR fueron 95°C por 2 min, 40 ciclos de 95°C por 20 s, 56°C por 30 s, 72°C por 30 s y una extensión final de 72°C por 7 min (Ortega-Morales et al., 2019; Sosa-Gutiérrez et al., 2021).

SECUENCIACIÓN DEL GEN 16S RIBOSOMAL

Se secuenció la región hipervariable V3-V4 del gen 16S ribosomal de 14 muestras. La secuenciación se realizó en el Centro de Biotecnología Genómica del IPN mediante MiSeq Illumina de acuerdo con las guías del fabricante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se recolectaron 1961 garrapatas duras totales provenientes de 208 pools de domicilios con casos probables de FMMR de municipios de Chihuahua. Fueron identificadas como *Rhipicephalus sanguineus*. Los pools obtenidos en cada municipio fueron: 1 en Balleza, 28 en Buenaventura, 13 en Casas Grandes, 79 en Juárez, 83 en Nuevo Casas Grandes, 3 en Hidalgo del Parral y 1 en Villa Ahumada.

A partir de los 208 pools analizados, se obtuvo una prevalencia general del 7% para *B. burgdorferi*, del 2% para *E. canis*, del 12% para *Rickettsia* del Grupo de las Fiebres Manchadas y de 0% para *Rickettsia* del Grupo de las Fiebres Tíficas.

Los municipios con las mayores prevalencias para *Rickettsia* SFG, *E. canis* y *B. burgdorferi* fueron Juárez con prevalencias del 10%, 2.5% y 7.6% respectivamente y Nuevo Casas Grandes con prevalencias del 15%, 2.4% y 10.8% respectivamente.

En el análisis preliminar de 14 pools por secuenciación de 16S ribosomal provenientes de Casas Grandes y Nuevo Casas Grandes, fueron identificadas bacterias de interés médico, encontrando *Diplorickettsia masiliensis* en 12 pools, *Coxiella burnetii* en 7 pools, *Rickettsia* spp. en 6 pools, *Coxiella cheraxi* en 5 pools, *Rickettsia akari* en 1 pool y a *Rickettsia montanensis* en 1 pool.

Se determinó un rango de infección mínima general de 2.49%, 1.8% y 0.6% para *Rickettsia* SFG, *B. burgdorferi* y *E. canis* respectivamente. De 35 pools de garrapatas provenientes de domicilios con confirmación de FMMR (mediante PCR realizada por el INDRE) solo el 8.57% fue positivo a *Rickettsia* SFG. En el 9.09% de 44 pools de domicilios con casos descartados para FMMR por el INDRE se identificó a *Rickettsia* SFG.

La identificación de posibles microorganismos patógenos transmitidos por garrapatas es de importancia en salud pública, ya que desde un enfoque “Una Salud”, es necesario conocer los patógenos circulantes en la región de Chihuahua para orientar la sospecha clínica de patógenos de enfermedades transmitidas por garrapatas. En este estudio se encontró una prevalencia del 12% de *Rickettsia* perteneciente al Grupo de Fiebres Manchadas, la cual es mayor en comparación con otros trabajos realizados en Juárez donde la prevalencia fue del 5% (López-Pérez et al., 2022); Esto puede deberse a que las garrapatas de este trabajo provienen de zonas con casos sospechosos de FMMR. Por otro lado, la prevalencia de *E. canis* fue del 2%, menor que reportes previos donde se encontró una prevalencia de 7% en perros de Cd. Juárez (Lira-Amaya et al., 2023). *B. burgdorferi*

tuvo una prevalencia del 7%, mayor a la reportada en estudios realizados en la Biosfera de Janos donde se identificó en el 2% de las muestras provenientes de garrapatas *R. sanguineus* (López-Pérez et al., 2019).

Uno de los patógenos encontrados por secuenciación del 16S ribosomal en siete muestras fue *C. burnetii*, el cual es el agente causal de la fiebre Q, aunque se transmite en las garrapatas de forma transovárica y transestadial, la infección no es homogénea en todas las garrapatas, por lo que es un hallazgo importante (Duron et al., 2015). El género *Rickettsia* fue menos abundante que el género *Coxiella*; en trabajos anteriores se ha planteado la hipótesis de la competencia entre ambos géneros por la colonización de la garrapata, lo que podría explicar su diferencia en este trabajo ((René-Martellet et al., 2017).

Se observó que la cantidad de casos confirmados es mayor en comparación con las muestras de garrapatas positivas a *Rickettsia* SFG recolectadas del mismo domicilio donde se produjo el caso clínico. Lo anterior puede deberse a que no todas las garrapatas se encuentran infectadas con *R. rickettsii* u otro patógeno, lo cual puede explicarse ya que el rango mínimo de infección para *Rickettsia* del SFG fue de 2.10%, similar a otros lugares con casos endémicos de rickettsiosis (Ortega-Morales et al., 2019).

Los resultados de este estudio pueden contribuir a la comprensión de la dinámica de transmisión de enfermedades por garrapatas en las localidades analizadas. Este estudio tuvo interés en el abordaje de la problemática de las ETG desde un punto de vista de “Una Salud” debido a que es necesario estudiar los patógenos que pueden ser transmitidos por *R. sanguineus* en Chihuahua.

CONCLUSIONES

Este trabajo proporcionó un panorama preliminar de la prevalencia de *Rickettsia* de los grupos SFG y TG, *B. burgdorferi* y *E. canis* en municipios de Chihuahua, además de identificar otros posibles patógenos en garrapatas de Chihuahua, lo cual puede contribuir al desarrollo de políticas de salud pública locales.

LITERATURA CITADA

Banović, P., Díaz-Sánchez, A. A., Galon, C., Foucault-Simonin, A., Simin, V., Mijatović, D., Papić, L., Wu-Chuang, A., Obregón, D., Moutailler, S., & Cabezas-Cruz, A. (2021). A One Health approach to study the circulation of tick-borne pathogens: A preliminary study. *One Health* (Amsterdam, Netherlands), 13. <https://doi.org/10.1016/J.ONEHLT.2021.100270>

Dirección General de Epidemiología (DGE). (2024). Boletín epidemiológico. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Único de información. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/823701/sem17.pdf>

Duron, O., Sidi-Boumedine, K., Rousset, E., Moutailler, S., & Jourdain, E. (2015). The Importance of Ticks in Q Fever Transmission: What Has (and Has Not) Been Demonstrated? *Trends in Parasitology*, 31(11), 536–552. <https://doi.org/10.1016/J.PT.2015.06.014>

Lira-Amaya, J. J., Beristain-Ruiz, D. M., Racanco-Delgado, J., Garza-Hernández, J. A., Vital-García, C., Santamaria-Espinosa, M., Martínez-García, G., Alvarez-Martínez, A.,

Quezada-Casasola, A., Rojas-Martínez, C., Alvarado-Robles, B., & Figueroa-Millán, J. V. (2023). Molecular Detection and Characterization of Ehrlichia canis Isolates from Three Geographic Regions in Mexico: A Retrospective Study. *Life (Basel, Switzerland)*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/LIFE13081629>

López-Pérez, A. M., Sánchez-Montes, S., Foley, J., Guzmán-Cornejo, C., Colunga-Salas, P., Pascoe, E., Becker, I., Delgado-de la Mora, J., Licona-Enriquez, J. D., & Suzan, G. (2019). Molecular evidence of Borrelia burgdorferi sensu stricto and Rickettsia massiliae in ticks collected from a domestic-wild carnivore interface in Chihuahua, Mexico. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 10(5), 1118–1123. <https://doi.org/10.1016/J.TTBDIS.2019.05.018>

López-Pérez, A. M., Chaves, A., Sánchez-Montes, S., Foley, P., Uhart, M., Barrón-Rodríguez, J., Becker, I., Suzán, G., & Foley, J. (2022). Diversity of rickettsiae in domestic, synanthropic, and sylvatic mammals and their ectoparasites in a spotted fever-epidemic region at the western US-Mexico border. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(2), 609–622. <https://doi.org/10.1111/TBED.14027>

Ortega-Morales, A. I., Nava-Reyna, E., Ávila-Rodríguez, V., González-Álvarez, V. H., Castillo-Martínez, A., Siller-Rodríguez, Q. K., Cabezas-Cruz, A., Dantas-Torres, F., & Almazán, C. (2019a). Detection of Rickettsia spp. in Rhipicephalus sanguineus (sensu lato) collected from free-roaming dogs in Coahuila state, northern Mexico. *Parasites and Vectors*, 12(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3377-z>

René-Martellet, M., Minard, G., Massot, R., Van Tran, V., Valiente Moro, C., Chabanne, L., & Mavingui, P. (2017). Bacterial microbiota associated with Rhipicephalus sanguineus (s.l.) ticks from France, Senegal and Arizona. *Parasites & Vectors*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/S13071-017-2352-9>

Rochlin, I., & Toledo, A. (2020). Emerging tick-borne pathogens of public health importance: A mini-review. In *Journal of Medical Microbiology* (Vol. 69, Issue 6, pp. 781–791). Microbiology Society. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001206>

Rodriguez, C., & Oteo, J. A. (2020). Enfermedades transmitidas por garrapatas. *AEPap Congreso Actualización Pediatría 2020*, 3, 265–273.

Strnad, M., Rudenko, N., & Rego, R. O. M. (2023). Pathogenicity and virulence of Borrelia burgdorferi. *Virulence*, 14(1). <https://doi.org/10.1080/21505594.2023.2265015>

Sosa-Gutierrez, C. G., Cervantes-Castillo, M. A., Laguna-Gonzalez, R., Lopez-Echeverria, L. Y., Ojeda-Ramírez, D., & Oyervides, M. (2021). Serological and Molecular Evidence of Patients Infected with Anaplasma phagocytophilum in Mexico. *Diseases*, 9(2), 37. <https://doi.org/10.3390/diseases9020037>



Composición y topología de la microbiota de *Rhipicephalus microplus* durante la infección con *Babesia bovis*

COMPOSITION AND TOPOLOGY OF *Rhipicephalus microplus* DURING THE *Babesia bovis* INFECTION

Iván Corona-Guerrero^{1,2}, Rodrigo Morales-García¹, Emmanuel Castañeda-Villafranca¹, Apolline Maitre^{4,5,6}, Consuelo Almazán¹, Alejandro Cabezas-Cruz⁴, Diego Josimar Hernández Silva^{1,2}, Olga Patricia García Obregón², Juan Mosqueda^{1,3} (joel.mosqueda@uaq.mx).

¹Immunology and Vaccines Laboratory, C. A. Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, Mexico.

²Doctorado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México.

³C.A. Salud Animal y Microbiología Ambiental. Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, Mexico.

⁴ANSES, INRAE, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, UMR BIPAR, Laboratoire de Santé Animale, Maisons-Alfort, F-94700, France

⁵INRAE, UR 0045 Laboratoire de Recherches sur le Développement de l'Élevage (SELMET-LRDE), 20250, Corte, France.

⁶EA 7310, Laboratoire de Virologie, Université de Corse, Corte, France.

Palabras clave: *Rhipicephalus microplus*, *Babesia bovis*, modulación de microbiota, vacunas anti-microbiota, redes microbianas.

ABSTRACT

Rhipicephalus microplus is the primary vector of bovine babesiosis. Both vector and pathogen represent severe economic loss for the livestock industry. Altering the tick microbiota is a novel, promising approach to prevent pathogen transmission and lower the tick's offspring viability. The present study examines the microbiota changes in *R. microplus* during *Babesia bovis* infection. Two calves were infested with 1 g of *R. microplus* larvae, with one calf subsequently infected with *B. bovis*. Engorged female ticks were collected and dissected at 0- and 72-hours post-repletion. Total DNA from midgut was extracted, sequenced using the Illumina MiSeq platform and analyzed with Aldex2, Qiime2, and NetSwan R packages. Results indicated that uninfected ticks at 0h have a more diverse microbiota in comparison to infected ticks at the same post-repletion time or uninfected ticks at 72hh post-repletion. Network topology also showed a more modular arrangement in the infected and 72-h post-repletion networks. The relative abundance and centrality values of the network nodes allowed us to identify 6 keystone taxa for the uninfected groups and the 0-h infected group, and 4 keystone taxa in the 72-h infected group. Among the keystone taxa found was *Lactobacillus*, *Moraxella* and the *Escherichia-Shigella* cluster. The present study showed that both the *B. bovis* infection and post-repletion time are factors that highly impact the diversity and topology of the microbial networks, which also impacts its keystone taxa.

INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos obligados que habitan regiones templadas, tropicales y subtropicales en todo el mundo (Sonenshine & Roe, 2014). La fecundidad, capacidad de permanencia en el ambiente, modo de alimentación y capacidad de infectar a múltiples hospedantes han hecho que las garrapatas hayan sido naturalmente seleccionadas como vectores de patógenos como *Babesia spp.*, *Anaplasma spp.*, *Rickettsia spp.*, entre otras (Estrada-Peña, 2015).

En México, la garrapata dura *Rhipicephalus microplus* es la garrapata de mayor importancia para la salud del ganado bovino, estando presente en un 65.96% del territorio nacional (SENASICA, 2023). Las infestaciones de esta garrapata son causa de pérdidas económicas en la industria de carne y lácteos a causa de la pérdida de peso de los animales y en la industria de las pieles por las lesiones que provocan las picaduras (Calvano et al., 2019). En México, las autoridades han llevado a cabo esfuerzos para controlar la población de garrapatas y disminuir su impacto (así como el de los patógenos que transmite) en la industria ganadera (SENASICA, 2023). De igual manera, *R. microplus* es el principal vector de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, causantes de la babesiosis bovina (“Tick-Borne Protozoa,” 2014). La babesiosis bovina, causada por *B. bovis* y *B. bigemina*, tiene un cuadro clínico característico que incluye fiebre aguda, anemia hemolítica, hemoglobinuria, ictericia, anorexia, abortos y la muerte del animal en casos severos (Bock et al., 2004). En particular, *B. bovis* provoca cuadros nerviosos a causa de agregación de eritrocitos infectados en capilares pulmonares y cerebrales (Bock et al., 2004). Para evitar las complicaciones causadas por las garrapatas y los patógenos que transmiten son necesarias estrategias de control efectivas, capaces de disminuir la población de garrapatas en el ambiente y la transmisión de patógenos.

El uso de acaricidas es el método de control de garrapatas más comúnmente usado actualmente. Sin embargo, el uso irresponsable de estos fármacos ha provocado la aparición de cepas multirresistentes, a la contaminación del suelo y a la disminución de insectos polinizadores (Graf et al., 2004). A causa de esto, nuevos métodos de control han sido desarrollados e implementados con diversos niveles de éxito. Por ejemplo, el uso de vacunas en conjunto con métodos previamente utilizados ha logrado disminuir la severidad de las infestaciones en algunos casos. Sin embargo, la variabilidad en los antígenos usados ha impedido un uso extendido de esta estrategia (Merino et al., 2013). De igual manera, se ha planteado el uso tanto de vacunas vivas atenuadas como de vacunas recombinantes para reducir los efectos de la babesiosis bovina. Sin embargo, algunas desventajas como el alto costo de producción y riesgo de reversión a la patogenicidad de las vacunas vivas atenuadas, como la necesidad de refuerzos constantes de las vacunas recombinantes, han impedido su uso generalizado (Jaramillo Ortiz et al., 2019).

Como respuesta a esto, se han llevado a cabo esfuerzos para desarrollar nuevas estrategias para el control de la garrapata. Una de las estrategias más prometedoras es el uso de vacunas dirigidas a la microbiota de las garrapatas. El objetivo de estas vacunas es que, tras inmunizar al hospedante mamífero, la garrapata se alimenta de sangre que contiene anticuerpos dirigidos a un taxón clave de su microbiota. Estos anticuerpos son

capaces de causar disbiosis en la microbiota del vector, afectando negativamente la nutrición y fecundidad de la garrapata, así como su propensión a adquirir patógenos como *B. bovis* y *B. bigemina* (Mateos-Hernández et al., 2021).

El objetivo del presente trabajo es el estudio de la composición de la microbiota del intestino de *R. microplus*, así como el cambio en la red microbiana que causa la infección con *B. bovis*. durante dos etapas clave del ciclo de invasión del patógeno en el vector. Conocer la composición de la microbiota del vector, así como los cambios que causan los patógenos es esencial para determinar los microorganismos que se usaran como antígenos en las vacunas contra microbiota, así como asegurar la efectividad de estas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Infestación e infección de bovinos

Dos becerros mayores de 6 meses, de menos de 250 kg de peso y libres de anticuerpos contra *Babesia spp.* fueron infestados con 1 g de larvas de *R. microplus*. Uno de los bovinos fue posteriormente infectado con *B. bovis* mediante transfusión de un vial con 1×10^8 eritrocitos infectados. Ambos bovinos se mantuvieron parcialmente inmovilizados con acceso a agua y comida *ad libitum* durante el periodo de infestación de las garrapatas. El estado de salud de los bovinos se monitoreó diariamente para realizar un retiro en caso de presentar síntomas graves.

Las hembras repletas fueron colectadas durante 5 días una vez detectada parasitemia en el bovino infectado. Las garrapatas colectadas fueron trasladadas al Laboratorio de Investigación en Inmunología y Vacunas de la Universidad Autónoma de Querétaro para ser procesadas. Las garrapatas fueron lavadas con cloruro de benzalconio al 10% y divididas en 2 grupos: el grupo de 0 horas, que fueron disectadas el mismo día de la colecta y el grupo de 72 horas que fueron incubadas durante 72 h a 28 °C con humedad relativa del 80% antes de ser disectadas. Las muestras fueron catalogadas de acuerdo con sus estado de infección y tiempo post repleción en no infectadas a las 0 h (0HN), no infectadas a las 72 h (72HN), infectadas a las 0 h (0HI) e infectadas a las 72 h (72HI).

Disección de garrapatas, extracción de DNA total y secuenciación.

La disección se llevó a cabo fijando la región dorsal de los especímenes en placas de Petri con la zona ventral hacia arriba. La región posterior de las garrapatas se abrió realizando un corte longitudinal y se retiró el intestino. El tejido extraído se lavó con buffer fosfato salino (PBS) estéril y se almacenó a -80 °C. Los intestinos congelados fueron macerados con un micropistilo y la extracción de ADN total se realizó usando el kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN, USA). La integridad de las muestras fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. La concentración y pureza de las muestras fue verificada mediante espectrometría usando un NanoDrop 2000. Las muestras de ADN fueron enviadas a la empresa Novogene (Novogene Corporation Inc.) para realizar la secuenciación de la región V4 del gen 16s bacteriano.

Análisis bioinformáticos

Los resultados de la secuenciación fueron procesados usando la plataforma QIIME2 para remover lecturas de baja calidad. La identidad de las unidades taxonómicas operativas (OTUs), así como su abundancia fueron calculados usando el paquete de R ALDEx2. Los datos de abundancia fueron transformados a abundancia relativa mediante relación centro-logarítmica (CLR) y a partir de los datos transformados se calcularon medidas de diversidad alfa y beta.

Las redes de coocurrencia microbiana fueron construidas a partir de los datos de abundancia relativa usando el paquete NetSwan con un punto de cohorte de 0.75. y graficadas usando el software Gephi para filtrar nodos no conectados. Las redes de coocurrencia fueron comparadas entre sí usando el paquete de R NetCoMi para determinar diferencias significativas entre métricas de las redes de diferentes grupos. La resistencia de las redes a la remoción de nodos fue evaluada usando el paquete NetSwan para retirar nodos de las redes de cada grupo mediante diferentes criterios (al azar, mayor grado, mayor conectividad y mayor conectividad recalculada tras cada remoción). Finalmente, la determinación de los taxa clave se realizó tomando como puntos clave la abundancia (valor de CLR mayor a la media) y la conectividad (centralidad de vector propio mayor a 0.75) de cada nodo en las redes de cada grupo.

RESULTADOS

Diversidad alfa y beta de la microbiota de *R. microplus*

La comparación pareada entre muestras demostró diferencia significativa en la riqueza de taxa entre los grupos de 0HI y 72HI (Kruskall-Wallis, $p \leq 0.05$), mientras que en resto de muestras no se observó diferencia. De igual manera, no se observó diferencia significativa en la uniformidad entre las muestras (Kruskall-Wallis, $p \geq 0.05$).

La composición de las comunidades fue calculada usando el índice de disimilaridad de Bray-Curtis y calculada mediante la diferencia de la prueba de la diferencia significativa honesta (DSH) de Tukey. La HSD no mostró diferencia significativa en la composición de las diferentes muestras (Tukey's HSD, $p \geq 0.05$).

Generación de redes de coocurrencia

Las redes de coocurrencia fueron ensambladas tomando como base los valores CLR de abundancia relativa de cada grupo. Los nodos no conectados (grado = 0) fueron descartados. La red del grupo 0HN contó con 128 nodos unidos mediante 753 aristas. La red del grupo 72HN estuvo conformada de 58 nodos y 90 aristas. La red del grupo 0HI se conformó de 44 nodos con 51 aristas. Finalmente, la red de 72HI incluyó 44 nodos unidos por 64 aristas. Las redes de 0HN, 0HI y 72HI se conformaron exclusivamente por correlaciones positivas, mientras que la red de 72HN incluyó 5 correlaciones negativas (5.6%). En conjunto de todas las redes, se identificaron 220 taxa únicos.

Comparación de redes

El paquete NetCoMi de R fue usado para comparar la composición y topología entre redes y se usó la métrica del índice de Jaccard para para comparar métricas claves de las redes



(grado, centralidad de interrelación, centralidad de proximidad, centralidad de vector propio y taxones centrales) de los nodos con mayor conectividad en cada red. La prueba de Jaccard demostró que existía una mayor diferencia entre la composición de las redes 0HN contra 72HN y 0HI contra 72HI que entre redes generadas al azar. Esto demuestra que las diferencias fueron causadas por el cambio de composición *per se* ($P(\leq \text{Jacc})$) y no un producto del azar.

Cambio en la robustez de las redes

La robustez de las redes se evaluó calculando el porcentaje de conectividad perdido tras la remoción de nodos mediante diferentes métodos. La remoción aleatoria de nodos no mostró diferencia en pérdida de conexión entre ningún grupo. Al remover primero nodos con mayor grado se observó que la red 72HN perdió la mayor conectividad con la menor fracción de nodos removida, seguido del grupo 72HI. Comenzar con la remoción de nodos de mayor centralidad de interrelación resultó en una mayor pérdida de conectividad con una menor fracción de nodos del grupo 72HN, mientras que el resto de los grupos no tuvieron diferencia en la pérdida de conectividad. El método de cascada mostró que el grupo 72HN pierde conectividad con el menor número de nodos removidos, seguido de 0HN, 72HI y 0HI.

Identificación de taxa clave

El estado de taxa clave se reconoció en los nodos que cumplieran con las condiciones de CLR mayor a la media y centralidad de vector propio mayor a 0.75. El grupo 0HN tuvo 6 taxa clave: Xanthobacteraceae (no cultivado) (familia), *Lactobacillus*, *Moraxella*, Acidobacteria subgrupo 2 (phylum), *Xanthomonas* and Elsterales (orden). Los 6 taxa clave del grupo 72HN fueron: *Cetobacterium*, *Dolosigranulum*, *Lactobacillus*, *Moraxella*, *Muribaculaceae* y *Turicibacter*. Los taxa clave del grupo 0HI fueron: *Acidibacter*, *Anaerococcus*, *Candidatus Nomurabacteria*, *Escherichia-Shigella*, *Haliangium* y *Ralstonia*. El grupo 72HI únicamente tuvo los siguientes 4 taxa clave: Planococcaceae (familia), *Bacteroides*, *Koukoulia*, Burkholderiales SC-I-84 (orden).

DISCUSIÓN

Entender los cambios que ocurren en la microbiota de *R. microplus* durante la infección con *B. bovis* es crucial para el desarrollo de vacunas anti-microbiota. La composición de la microbiota es uno de los factores que determina tanto la fecundidad de las garrapatas y su progenie, como de su capacidad vectorial. Los resultados aquí presentados demuestran que tanto la infección con *B. bovis* como el tiempo post repleción son dos factores que alteran significativamente la composición de la microbiota del intestino de *R. microplus*.

El intestino de las garrapatas sirve como un reservorio de sangre, la cual es progresivamente digerida de manera intracelular por células intestinales especializadas. A medida que progresa la maduración de los ovocitos, el tejido intestinal se degrada progresivamente hasta el momento de la oviposición. Este proceso de degradación explicaría la disminución de diversidad bacteriana que se observa entre las 0 y las 72 h post repleción en las redes de garrapatas no infectadas. En cambio, la pérdida de diversidad observada entre los grupos 0HN y 0HI se puede atribuir a la infección con *B.*

bovis. Este tipo de disminución de la diversidad de la microbiota se ha observado en otros vectores al ser infectados por patógenos.

La diversidad microbiana no fue la única en disminuir en respuesta a la infección o tras el paso de 72 h después de la repleción. Una pérdida en la conectividad y la robustez también fue observada. Las redes menos interconectadas adoptaron una estructura más modular en la que los taxa interactúan en clústeres pequeños, manteniéndose aisladas de bacterias ubicadas en agrupamientos diferentes. La red del grupo 0HN tuvo la mayor resistencia a la remoción de nodos en comparación con otras redes. Esto puede explicarse a que su comunidad microbiana más compleja permite conexiones redundantes. Aun se necesita estudiar el perfil funcional de las redes para determinar si estos cambios afectan únicamente a la composición o también a la función.

Si bien el presente estudio no permite conocer precisamente el papel que los taxa clave desempeñan en las redes, se puede examinar el papel que se ha reportado que tienen en la microbiota de otros artrópodos. Por ejemplo: *Lactobacillus* ha sido reportado como probiótico en la microbiota del gusano de seda *Bombyx mori* y con una alta prevalencia en la microbiota de *Ornithodoros moubata*. *Moraxella* se ha asociado con el metabolismo de lípidos en insectos, el cuál es necesario para la vitelogénesis en garrapatas. El clúster *Escherichia-Shigella* está involucrado en vías metabólicas de degradación de lisina. Este tipo de funciones aunadas al estatus de taxa clave hacen a estas bacterias potenciales candidatos vacunales efectivos para la modulación de la microbiota de garrapatas, esto previamente explorado en estudios donde el clúster *Escherichia-Shigella* ha sido usado efectivamente como un antígeno inmunomodulador de la microbiota del género *Ixodes*.

CONCLUSIÓN

R. microplus es un parásito difícil de controlar, altamente prevalente en tierras destinadas a la ganadería, donde actúa como vector de patógenos como *B. bovis*. Comprender los efectos de *B. bovis* en la microbiota del huésped es esencial para entender la relación vector-microbiota-patógeno. Este estudio determinó diferencias en la microbiota intestinal de *R. microplus* en distintos tiempos post-repleción y estados de infección. Los resultados indican que la infección por *B. bovis* altera la conformación y disminuye la diversidad bacteriana de la microbiota intestinal de *R. microplus*. Encontramos bacterias clave reportadas en otras especies de garrapatas, como *Lactobacillus* y el clúster *Escherichia-Shigella*, útiles para desarrollar vacunas anti-microbiota. Usar estos taxones clave como antígenos podría ser una estrategia óptima de control de garrapatas, reduciendo la capacidad vectorial de *R. microplus* y la transmisión de *B. bovis*.

El presente proyecto fue financiado por el proyecto CONAHCYT número 321162 en colaboración con ANUIES- ECOS NORD (Francia).

Bibliografía citada

Bock, R., Jackson, L., De Vos, A., & Jorgensen, W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology*, 129(S1), S247–S269. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005190>

Calvano, M. P. C. A., Brumatti, R. C., Garcia, M. V., Barros, J. C., & Andreotti, R. (2019). Economic efficiency of *Rhipicephalus microplus* control and effect on beef cattle performance in the Brazilian Cerrado. *Experimental and Applied Acarology*, 79(3–4), 459–471. <https://doi.org/10.1007/s10493-019-00446-5>

Estrada-Peña, A. (2015). Ticks as vectors: Taxonomy, biology and ecology: -EN- -FR- Les tiques en tant que vecteurs : taxonomie, biologie et écologie -ES- Las garrapatas como vectores: taxonomía, biología y ecología. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 34(1), 53–65. <https://doi.org/10.20506/rst.34.1.2345>

Graf, J.-F., Gogolewski, R., Leach-Bing, N., Sabatini, G. A., Molento, M. B., Bordin, E. L., & Arantes, G. J. (2004). Tick control: An industry point of view. *Parasitology*, 129(S1), S427–S442. <https://doi.org/10.1017/S0031182004006079>

Jaramillo Ortiz, J. M., Paoletta, M. S., Gravisaco, M. J., López Arias, L. S., Montenegro, V. N., de la Fournière, S. A. M., Valenzano, M. N., Guillemi, E. C., Valentini, B., Echaide, I., Farber, M. D., & Wilkowsky, S. E. (2019). Immunisation of cattle against *Babesia bovis* combining a multi-epitope modified vaccinia Ankara virus and a recombinant protein induce strong Th1 cell responses but fails to trigger neutralising antibodies required for protection. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 10(6), 101270. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101270>

Mateos-Hernández, L., Obregón, D., Wu-Chuang, A., Maye, J., Bornères, J., Versillé, N., de la Fuente, J., Díaz-Sánchez, S., Bermúdez-Humarán, L. G., Torres-Maravilla, E., Estrada-Peña, A., Hodžić, A., Šimo, L., & Cabezas-Cruz, A. (2021). Anti-Microbiota Vaccines Modulate the Tick Microbiome in a Taxon-Specific Manner. *Frontiers in Immunology*, 12, 704621. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.704621>

Merino, O., Alberdi, P., Pérez De La Lastra, J. M., & De La Fuente, J. (2013). Tick vaccines and the control of tick-borne pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00030>

SENASICA. (2023). *Situación actual Campaña Nacional para el control de la garrapata *Boophilus* spp.* Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. <https://www.gob.mx/senasica/documentos/situacion-actual-del-control-de-la-garrapata-boophilus-spp>

Sonenshine, D. E., & Roe, R. M. (2014). *Biology of Ticks* (2nd ed., Vol. 1). Oxford University Press.

Tick-borne Protozoa. (2014). In A. A. Leon, E. Vannier, C. Almazán, & P. J. Krauze, *Biology of Ticks* (2nd ed., Vol. 2). Oxford University Press.

RESISTENCIA A COUMAPHOS EN POBLACIONES DE LA GARRAPATA DEL PERRO, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, EN DIFERENTES ENTIDADES DE MÉXICO

RESISTANCE TO COUMAPHOS IN POPULATIONS OF THE DOG TICK, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, IN DIFFERENT ENTITIES OF MEXICO

Cruz-Vázquez, Carlos¹, Martínez-Ibáñez, Francisco^{1,2}, Vitela-Mendoza, Irene¹, Medina-Esparza, Leticia¹

¹ Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes, Km. 18 carretera Aguascalientes - San Luis Potosí, El Llano, 20330, Aguascalientes, México. ² Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal, CENAPA-SENASICA. Carretera Cuernavaca-Cuautla 8534, Col. Progreso, Jiutepec, 62550, Morelos, México. Correspondencia: cruva18@gmail.com

ABSTRACT

The objective of the present study was to identify the presence of phenotypic resistance to coumaphos in different populations of *R. sanguineus* sl in the country. Engorged ticks were collected from 28 naturally infested dogs in different locations in 13 states of Mexico, which were transferred to the laboratory for taxonomic identification and its subsequent processing so that its progeny were subjected to the larval package test, exposing them to six different concentrations, the data on mortality were subjected to Probit analysis with the objective of determining the Lethal Concentration 50% and thereby calculating the Resistance Ratio (RR). The results indicated the presence of 5 susceptible samples (17.8%), 6 with incipient resistance (21.4%) and 17 resistant to coumaphos (60.7%), with samples from the three groups existing in all the states considered in the work; in the resistant samples, the RR ranged from 2.01 to 11.63. This study documents for the first time resistance to coumaphos in populations of *R. sanguineus* sl in Mexico.

Keywords: *Rhipicephalus sanguineus*, Perros, Coumaphos, Resistencia, México

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue identificar la presencia de resistencia fenotípica a coumaphos en diferentes poblaciones de *R. sanguineus* sl del país. Se colectaron garrapatas ingurgitadas de 28 perros naturalmente infestados en diferentes localidades de 13 estados de México, las cuales fueron trasladadas al laboratorio para su identificación taxonómica y su posterior procesamiento para que su progenie fuera sometida a la prueba de paquete de larvas exponiéndolas a seis diferentes concentraciones, los datos sobre la mortalidad se sometieron al análisis Probit con el objetivo de determinar la Concentración Letal 50% y con ello calcular el Índice de Resistencia (I.R.). Los resultados indicaron la presencia de 5 muestras susceptibles (17.8%), 6 con resistencia incipiente (21.4%) y 17 resistentes a coumaphos (60.7%), existiendo muestras de los tres grupos en todos los estados considerados en el trabajo; en las muestras resistentes los I.R. estuvieron en un rango de 2.01 a 11.63. Este estudio documenta por primera ocasión la resistencia a coumaphos en poblaciones de *R. sanguineus* sl en México.

INTRODUCCIÓN

Rhipicephalus sanguineus sensu lato (sl) (Latreille) (Acari: Ixodidae), también conocida como garrapata del perro, es un parásito externo que tiene un ciclo biológico de tres huéspedes, en el cuál el perro actúa como huésped principal, sin embargo puede afectar a otras especies de animales domésticos y silvestres, así como de manera accidental al ser humano; se le considera la garrapata más ampliamente distribuida en el mundo. En los perros, la infestación por este ectoparásito causa daños directos en la salud por su hábito de alimentación hematófago así como molestias y lesiones dérmicas debido a sus “piquetes”, siendo también un eficiente vector de diversos agentes patógenos de importancia médica y veterinaria, entre ellos, *Rickettsia rickettsi*, *R. conorii*, *Babesia canis* y *Ehrlichia canis* (Dantas-Torres 2008). En los últimos años ha sido responsable de brotes de Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas en el norte de México, ocasionando una alerta sanitaria desde entonces.

En la práctica clínica diaria, el control de las infestaciones se realiza generalmente prescribiendo y aplicando un tratamiento con productos acaricidas, como por ejemplo de las familias de los piretroides, organofosforados, amitraz o fipronil, a través de baños medicados o aplicación de formulaciones pour-on o spot-on, estas últimas de largo efecto residual. Sin embargo, el control y prevención de la infestación resulta complicado debido a las características biológicas de esta garrapata, como lo es su ciclo de vida de tres huéspedes y la capacidad que tienen sus estadios evolutivos de poder sobrevivir por largos periodos sin huésped (Dantas-Torres, 2010). El uso indiscriminado de los acaricidas de contacto así como de las formulaciones de largo efecto residual provocan una presión importante sobre las poblaciones y eventualmente pueden aparecer signos de tolerancia y resistencia, como ha sido reportado en la literatura (Coles and Dryden, 2014; Tian, et al., 2023).

En México, *R. sanguineus* sl., se encuentra ampliamente distribuida (Galindo-Velasco et al., 2020), y a la fecha se ha documentado la presencia de resistencia a diversos acaricidas en el centro-sur y sureste del país (Rodríguez-Vivas et al., 2017a, b; Martínez-Ibáñez et al., 2023a); sin embargo, no se conoce el estado y distribución de este fenómeno en otras regiones de México. El acaricida organofosforado coumaphos, fue introducido a México hace más de 60 años y desde entonces se ha usado sin ninguna restricción para el control de la garrapata del ganado, *Rhipicephalus microplus*, así como para *R. sanguineus* sl.

El objetivo del presente estudio fue identificar la presencia de resistencia toxicológica a coumaphos en diferentes poblaciones de *R. sanguineus* sl del país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron garrapatas ingurgitadas de 28 perros naturalmente infestados en diferentes localidades de 13 estados de la república mexicana. Todos los perros se encontraban domiciliados y los propietarios manifestaron que no habían recibido algún tratamiento reciente con acaricidas, ellos también otorgaron su consentimiento verbal para revisar y colectar garrapatas de sus animales.

Para la colecta de especímenes, se realizó una inspección física exhaustiva de los perros en búsqueda de hembras ingurgitadas, las cuáles fueron removidas manualmente a contrapelo y usando guantes de neopreno, siendo colocadas en cajas de Petri para ser transferidas al laboratorio para realizar su identificación taxonómica. El proyecto de

investigación fue aprobado por el Comité de Uso y Bienestar de los Animales del Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes.

En el laboratorio, los ejemplares (> 10 mm de largo), se lavaron con agua destilada y se secaron colocándolas sobre toallas de papel. Posteriormente, se colocaron de forma individual en cajas de Petri y se mantuvieron a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y 80-90% de humedad relativa, en un régimen de luz/oscuridad de 12:12 h para permitir la puesta de huevos. Después de 25 días de incubación, los huevos puestos por cada hembra se colocaron en un vial de vidrio y se incubaron bajo las mismas condiciones para esperar la eclosión de las larvas, dejándolas madurar de 15 a 30 días post-eclosión antes de utilizarlas en las pruebas toxicológicas.

El diagnóstico de susceptibilidad / resistencia a coumaphos se realizó en dos pasos, en el primero las larvas fueron expuestas aplicando la Dosis Discriminante (D.D.) de 0.43% determinada previamente por Martínez-Ibáñez et al. (2023b), y en el segundo las muestras identificadas como resistentes se sometieron a diferentes concentraciones del acaricida para identificar el índice de resistencia.

En ambos pasos, la técnica de diagnóstico toxicológico utilizada fue la del paquete de larvas (FAO, 2004). Los ensayos se realizaron de acuerdo a lo descrito por Martínez-Ibáñez et al. (2023b), con tres repeticiones por muestra y un tratamiento control. La lectura de las pruebas se realizó 24 horas después del tratamiento; todas las larvas que podían caminar o deslizarse se consideraron vivas, el porcentaje de mortalidad se ajustó utilizando la fórmula de Abbott. La información de las muestras resistentes se sometió a un análisis Probit usando el programa Polo Plus, con el objetivo de determinar la CL50% y con ello calcular el Índice de Resistencia (I.R) en cada muestra, que fue calculado así: CL50 de la población de larvas de campo / CL50 de la población de larvas susceptible (Robertson et al., 2006). Las muestras se consideraron como susceptibles si los I.R. fueron menores de 1.5, resistencia incipiente de 1.5 a 2 y resistentes si eran mayores de 2 (Castro-Janer et al., 2010).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se encontró la presencia de 5 muestras susceptibles (17.8%), 6 con resistencia incipiente (21.4%) y 17 resistentes a coumaphos (60.7%), existiendo muestras de los tres grupos en todos los estados considerados en el trabajo. Los I.R. para cada muestra estuvieron en un rango de 2.01 a 11.63. El más alto correspondió al estado de Tamaulipas (11.63), seguido por Baja California (6.88), Guanajuato (5.97), Guerrero (5.87), Veracruz y Campeche (5.85). Las muestras susceptibles se encontraron en Morelos, Nayarit, Veracruz y Yucatán. Otros estados incluidos en el estudio fueron Chiapas, Querétaro, Oaxaca y Sonora, todos con muestras resistentes.

La prevención y control de la infestación por la garrapata *R. sanguineus* sl, puede resultar complejo particularmente cuando las condiciones ambientales, de alojamiento y manejo de los perros brindan las facilidades para que el ectoparásito vaya cumpliendo con sus etapas de desarrollo evolutivo, lo que puede dar lugar a la presentación de reinfestaciones en animales que fueron tratados con algún acaricida e incluso en aquellos que recibieron tratamiento con efecto residual (Dantas-Torres, 2008), lo que induce a los propietarios a repetir los tratamientos de forma indiscriminada ya que todas las moléculas con propiedades acaricidas son de venta libre en México; la literatura reporta que en

condiciones favorables pueden presentarse 2 a 3 generaciones por año en México (Galindo-Velasco et al., 2020).

El acaricida organofosforado coumaphos, tiene más de 60 años que se comercializa en nuestro país, de manera que es muy probable que las poblaciones de *R. sanguineus* sl, hayan tenido varios contactos con esta molécula y que en algunos casos exista una baja eficacia debido a tolerancia o resistencia toxicológica. En el presente estudio, se identificó resistencia en el 60.7% y resistencia incipiente en 21.4% de las muestras evaluadas, lo que demuestra que en la actualidad el fenómeno de resistencia a coumaphos está instalado en amplias regiones del país. Es interesante mencionar que hasta donde es de nuestro conocimiento, no se tienen reportes documentados al respecto en México, sin embargo, si se han publicado casos de resistencia a cipermetrina, amitraz e ivermectina en el centro-sur y sureste del país (Rodríguez-Vivas et al., 2017a, b; Martínez-Ibáñez et al., 2023a).

CONCLUSIONES

Se documenta la detección de resistencia fenotípica a coumaphos en una alta proporción de las muestras estudiadas, por lo que es recomendable limitar su uso y recurrir a otras moléculas ya que existen amplias posibilidades de que el tratamiento sea de baja eficacia y que por ello se esté promoviendo la presión de selección en la población de garrapatas. La rotación de acaricidas es una práctica recomendable con la finalidad de limitar el desarrollo de resistencia en las poblaciones al igual que aplicar tratamiento al ambiente en donde habita el perro para evitar reinfestaciones.

LITERATURA CITADA

Castro-Janer, E., Martins, J. R., Mendes, M. C., Namindome, A., Klafke, G. M., and Schumaker, T. T. (2010). Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) using in vitro larval bioassays. *Veterinary Parasitology*, 173, 300-306. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.06.036>

Coles, T. B., and Dryden, M. W. (2014). Insecticide/acaricide resistance in fleas and ticks infesting dogs and cats. *Parasite and Vectors*, 7: 8. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-8>

Dantas-Torres, F. (2008). The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Veterinary Parasitology*, 152, 173-185. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.030>.

Dantas-Torres, F. (2010). Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasite and Vectors*, 3, 26. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-26>

FAO. (2004). *Resistance management and integrated parasite control in ruminants—guidelines*, module 1— ticks: acaricide resistance: diagnosis, management and prevention. Food and Agriculture Organization, Animal Production and Health Division, Rome. <https://www.fao.org/3/ag014e/ag014e.pdf>

Galindo-Velasco, E., Cruz-Vázquez, C., Díaz-Chapula, H., Lezama-Gutiérrez, R., Chan-Copul, W. (2020). Annual Infestation Pattern of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* on naturally infested dogs in a tropical sub-humid region of Mexico. *Southwestern Entomology*, 45, 351-356. <https://doi.org/10.3958/059.045.0203>

Martínez-Ibañez, F., Cruz-Vázquez, C., Osorio-Miranda, J., Vitela-Mendoza, I., Medina-Esparza, L., Lagunes-Quintanilla, R., and Chávez-Rodríguez, A. 2023a. Determination of a discriminant dose to identify resistance to amitraz in *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (Acari: Ixodidae) from Mexico. *Insects*, 14, 662. <https://doi.org/10.3390/insects14070662>

Martínez-Ibañez, F., Cruz-Vázquez, C., Lagunes-Quintanilla, R., Vitela-Mendoza, I., Medina-Esparza, L., Chávez-Rodríguez, A. (2023b). Determination of the discriminant doses to identify resistance to fipronil, flumethrin and coumaphos, in *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (Acari: Ixodidae) from Mexico. *Experimental and Applied Acarology*, 91: 331-338. <https://doi.org/10.1007/s10493-023-00836-w>

Robertson, J. L., Russell, R. M., Preisler, H. K., Savin, N. E. (2006). *Pesticide Bioassays with Arthropods*, second ed. CRC Press, Boca Raton.

Rodríguez-Vivas, R. I., Ojeda-Chi, M.M., Trinidad-Martínez, I., and de Pérez, A. A. (2017a). First documentation of ivermectin resistance in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 233, 9-13. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.11.015>

Rodríguez-Vivas, R. I., Ojeda-Chi, M. M., Trinidad-Martínez, I., and Bolio-González, M. E. (2017b). First report of amitraz and cypermethrin resistance in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato infesting dogs in Mexico. *Medical and Veterinary Entomology*, 31, 72-77. <https://doi.org/10.1111/mve.12207>

Tian, Y., Taylor, C. E., Lord, C. C., and Kaufman, P. E. (2023). Evidence of permethrin resistance and fipronil tolerance in *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (Acari: Ixodidae) populations from Florida and California. *Journal of Medical Entomology*, 60, 412-416. <https://doi.org/10.1093/jme/tjac185>



Vacunas de mRNA para Patógenos Transmitidos por Artrópodos

mRNA Vaccine Technologies for Arthropod-borne Pathogens

Alejandro Diaz^{1*}, William Taylor¹ and Cesar Lopez-Camacho¹

¹The Jenner Institute, University of Oxford, Oxford, United Kingdom

*alejandro.diazhernandez@ndm.ox.ac.uk

Abstract

Ticks, as other arthropods, can carry and transmit a broad range of viral and bacterial pathogens. Such tick-borne diseases are currently affecting humans and animals by promoting zoonosis and infecting mammals directly. The use of mRNA as a vaccine platform has rapidly matured in the recent years, proving its scalability and efficacy in the field of infectious diseases. Hence, mRNA vaccines may offer the potential to fulfil the urgent need of prophylactic agents to prevent arthropod-borne pathogens across the world.

This work explores the use of mRNA as a vaccine platform, using two approaches: tick-borne pathogen vaccines and anti-tick vaccines. For the first approach, I am working with the Kyasanur Forest Disease Virus (KFVD), a flavivirus found in ticks and transmitted to mammals and humans, causing hundreds of deaths annually. During my DPhil studies, I have generated expression plasmids encoding different regions of the KFVD viral envelope genome, and they were tested by HEK-293T transfection to assess subcellular localisation. Such versions of KFVD contain a poly Histidine-tag to allow purification and be used as a coating reagent in serological studies. Importantly, T7-promoter versions have also been constructed to produce mRNA in vitro transcription (IVT), allowing mRNA vaccine formulation with Lipid nanoparticles (LNPs).

All the mRNA vaccines are encapsulated using commercial LNPs for preclinical studies, and there is ongoing work to generate in-house LNPs to explore different ways to do the encapsulation process, looking at cheaper -but not less effective- methodologies.

RESUMEN

Las garrapatas, como otros artrópodos, pueden portar y transmitir una amplia gama de patógenos víricos y bacterianos. Estas enfermedades transmitidas por garrapatas afectan actualmente a humanos y animales, favoreciendo la zoonosis e infectando directamente a los mamíferos. El uso del ARNm como plataforma de vacunas ha madurado rápidamente en los últimos años, demostrando su escalabilidad y eficacia en el campo de las enfermedades infecciosas. De ahí que las vacunas de ARNm puedan ofrecer la posibilidad de satisfacer la urgente necesidad de agentes profilácticos para prevenir los patógenos transmitidos por artrópodos en todo el mundo.

Este trabajo explora el uso del ARNm como plataforma de vacunas, utilizando dos enfoques: vacunas contra patógenos transmitidos por garrapatas y vacunas contra garrapatas. Para el primer enfoque, estoy trabajando con el virus de la enfermedad forestal de Kyasanur (KFVD), un flavivirus que se encuentra en las garrapatas y se transmite a mamíferos y humanos, causando cientos de muertes al año. Durante mis estudios de

doctorado, he generado plásmidos de expresión que codifican distintas regiones del genoma de la envoltura vírica del KFVD, y los he probado mediante transfección HEK-293T para evaluar la localización subcelular. Estas versiones de KFVD contienen una etiqueta de poli-histidina que permite su purificación y su uso como reactivo de recubrimiento en estudios serológicos. Es importante señalar que también se han construido versiones del promotor T7 para producir ARNm de transcripción in vitro (IVT), lo que permite la formulación de vacunas de ARNm con nanopartículas lipídicas (LNP).

Todas las vacunas de ARNm se encapsulan utilizando LNPs comerciales para los estudios preclínicos, y se está trabajando en la generación de LNPs propias para explorar diferentes formas de realizar el proceso de encapsulación, buscando metodologías más asequibles - pero no por ello menos eficaces-.

INTRODUCTION

KYASANUR FOREST DISEASE VIRUS

Kyasanur Forest Disease Virus (KFDV) is a zoonotic emerging tick-borne flavivirus endemic to regions in India that naturally infects humans and nonhuman primate species. It is mainly transmitted by infected ticks like *Haemaphysalis spinigera* that disseminate the virus also to birds, cattle, bats and other ticks by co-feeding [1]. Cases of KFDV are around 500 per year with a 10% mortality rate [2]. The virus is classified as a Biosafety Level 4 pathogen and select agent in the United States [3] and shows serological cross-reactivity with the Alkhurma haemorrhagic fever virus (AHFV). The pathogenesis remains unknown and symptoms can go from mild fever to severe haemorrhagic and neurologic complications [4]. There is no specific treatment for KFDV and the only prophylactic solution is a non-approved FDA formalin-inactivated tissue culture vaccine with low efficacy that requires multiple booster immunisations due to its short immunity [5]. The virus has a single-stranded positive-sense RNA genome that encodes a polyprotein that includes the structural proteins capsid (C), precursor membrane protein (prM) and envelope protein (E) of the pathogen. Proteins prM and E play a major role in virion maturation and cell infection. This project aims to develop a KFDV mRNA vaccine construct by using the structural proteins prM and E as main antigens and eventually analyse its immunogenicity on murine models.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids for Protein Expression

From the KFDV sequence (GenBank accession number MG720089.1) contained in a pUC57-Kanamycin (GenScript), four versions of the KFDV structural proteins were generated and cloned into the expression plasmid pHLsec using the restriction sites AgeI and KpnI and a 6xHis tag at the C-terminus. All constructs were confirmed by sanger and nanopore sequencing.

IMMUNOFLUORESCENCE ASSAY

Coverslips were sterilised with ethanol and UV, then covered in 0.2% gelatine and heated at 37°C for 30 min. The excess was aspirated under the hood and allowed to air dry at room temperature. In a six-well plate with the covered coverslips, HEK293T cells were seeded and transfected at a concentration of 3×10^5 cells with 1.5 µg of plasmid DNA per well and 3 µL PEI in Dulbecco's Modified Eagle Medium with 50 mL FBS and 5 mL L-glutamine (DMEM 10% FBS and 1% L-glutamine). The transfected DNA plasmids correspond to the prM,

STEM, E and EDIII constructs. Medium was replaced 12 hr after the transfection for DMEM (10% FBS and 1% L-glutamine) supplemented with 5mL Pen/Strep [100U penicillin/100 µg streptomycin] (1% Pen/Strep) and cells were incubated for 48 hr at 37°C and 5% CO₂. Cells were gently washed twice with 1X PBS, fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at 37°C, permeabilised with 0.1% PBS Triton X100 for 20 min at RT and blocked with 5% FBS in PBS overnight at 4°C. Mouse IgG HisTag (Thermofisher) and Panflavi D1-4G2-4-15 (Merck) primary antibodies were incubated independently at RT for 2 hr with a 1:200 dilution in blocking solution. After washing three times with 1X PBS for 5 min, secondary antibody anti-mouse IgG-Alexa 488 (Thermofisher) at 1:200 was incubated for 1 hr at RT. Washing was performed before and after a 10 min incubation with 1µg/mL DAPI solution in PBS. Finally, samples were mounted in slides using ProLong™ Gold mounting media. Mounted cells were analysed under a Leica DMI3000B microscope.

TIME COURSE OF KFDV PROTEINS

A time course to analyse the protein expression of the pHLsec plasmids (prM, STEM, E and EDIII) was done in HEK293T cells. Approximately 1x10⁵ cells were seeded in a six-well plate with DMEM (10% FBS and 1% L-glutamine), transfected with Opti-MEM I, 3 µL of polyethylenimine (PEI) and 1.5 µg of each KFDV pHLsec construct. Medium was replaced after 12 hr of incubation with DMEM medium (10% FBS, 1% L-glutamine and 1% Pen/Strep). Cells were incubated at 37°C and 5% CO₂ at 39, 62, 72 and 94 hr post transfection. The supernatant was removed and centrifuged to store it at -20°C, and cells were recovered with 1X PBS and lysed with 80 µL of mammalian protein extraction reagent (M-PER), centrifuged and stored at -20°C.

Western Blot was performed for the obtained samples in reducing (adding 0.1 M dithiothreitol (DTT)) and non-reducing conditions with MES 1X buffer, loading 30 µg of cell lysate and 10 µL of supernatant. Blocking was done for 1 hr RT with 5% BSA in TBS-T 0.1%, membranes were incubated with mouse IgG HisTag (Thermofisher) and Panflavi D1-4G2-4-15 (Merck) primary antibodies independently in a 1:3000 dilution overnight at 4°C. For the secondary antibody, anti-mouse IgG-HRP (Cell Signaling) was incubated for 1 hr at RT at 1:3000 and revealed with SuperSignal West Pico PLUS (Thermofisher) substrate.

PRODUCTION OF PRM PROTEIN

HEK293T cells were transfected using 25 µg of pHLsec-prM, Opti-MEM I and 49.8 µL of PEI at a density of 5x10⁶ cells per 15-cm plate in DMEM (10% FBS and 1% L-glutamine) and incubated at 37°C and 5% CO₂. 12 hr post-transfection media was replaced for DMEM (10% FBS, 1% L-glutamine and 1% Pen/Strep) and incubated for a total of 72 hr. The supernatant was harvested, and centrifuged twice at 400 × g for 5 min and 3500 × g for 10 min, filtered by 0.45µm and 0.22 µm systems and mixed with 0.02% (w/v) of sodium azide. Protein was purified from the supernatant using a 5 mL HisTrap HP (Cytiva) in an Äkta Pure system and the elution fractions were collected in a 96-deep well plate. Amicon Ultra-15 100 kDa (Merck, Cat. UFC910024) was used to concentrate the fractions by centrifuging at 3500 × g for 10 min, recovering the flowthrough and re-centrifuging in an Amicon Ultra-15 50 kDa (Cat. UFC905024) at 3500 × g for 5 min discarding this time the flowthrough. The fraction in the tube was topped up with 14 mL of PBS and centrifuged at 3500 × g for 5 min discarding the flowthrough, this last step was done three times.

Protein purity was analysed by SDS-PAGE (coomassie blue) and Western blot in reducing and non-reducing conditions with MES 1X buffer, loading 1 µg of purified protein and

fractions from the concentration process. Blocking was done for 1 hr RT with 5% BSA in TBS-T 0.1%, membranes were incubated with mouse IgG HisTag (Thermofisher) and Panflavi D1-4G2-4-15 (Merck) primary antibodies independently in a 1:3000 dilution overnight at 4°C. For the secondary antibody, anti-mouse IgG-HRP (Cell Signaling) was incubated for 1 hr at RT at 1:3000 and revealed with SuperSignal West Pico PLUS (Thermofisher) substrate. Fractions obtained were re-purified following the aforementioned protocol to increase the purity of the protein. Protein concentration was measured by nanodrop (OD280) and stored at -80°C for its use in serological assays

PLASMIDS FOR MRNA PRODUCTION

From the KFDV sequence (GenBank accession number MG720089.1) contained in a pUC57-Kanamycin (GenScript), two more versions of the KFDV structural proteins were generated and cloned into the plasmid pUC57 with blunt ligation and Gibson techniques, to then produce *in vitro* mRNA. All constructs were confirmed by sanger and nanopore sequencing.

RESULTS

IMMUNOFLUORESCENCE ASSAY

To investigate the protein production of each construct, an indirect immunofluorescence (IF) assay was performed in HEK293T cells transfected with the pHLsec constructs of KFDV. Two antibodies were independently used to assess the subcellular localization of the different KFDV proteins, mouse IgG HisTag against the 6x His-tag at the C-terminus and mouse IgG Panflavi 4G2 against the DII of the protein E in flavivirus. The secondary antibody coupled was IgG-Alexa 488 and the nucleus was stained with DAPI. The presence of the proteins was confirmed by both antibodies, except for DIII when using Panflavi 4G2, due to the lack of required epitopes.

KINETICS OF PRM AND KFDV PROTEINS

To analyse the protein expression of the KFDV constructs in transfected HEK293T cells a Western blot time course was done in non-reducing conditions with Panflavi D1-4G2-4-15 coupled with anti-mouse IgG-HRP, detecting signal in the supernatant with an increasing tendency and expected size of 70.1 kDa for prM. For the rest of the constructs transfected in HEK293T cells another Western blot with the same conditions and antibodies was performed with samples 72 hr after transfection. Signal in the supernatant matched the expected protein sizes in the rest of the constructs, STEM: 53 kDa and E: 48.4 kDa. Signal of DIII: 13.2 kDa was detected using HisTag antibody in reducing and non-reducing conditions in cell lysate. The absence of signal in DIII matches with the IF data.

Viral Protein for Serological Studies

From the supernatant of HEK293T transfected with pHLsec-prM, the prM protein was purified using a 5 mL HisTrap HP, concentrated by centrifugation with Amicon Ultra-15 100 kDa tubes and re-centrifuged in Amicon Ultra-15 50 kDa tubes to exchange the buffer for PBS. The same process was carried to re-purify and increase prM purity. The purity of prM protein and its fractions during the purification and concentration processes was assessed by Coomassie blue and Western blot in reducing and non-reducing conditions with mouse IgG HisTag and Panflavi D1-4G2-4-15 primary antibodies independently coupled with anti-mouse IgG-HRP. Data suggests that the highest concentration of prM is found in the fraction retained at the initial concentration process (>100 kDa). The total protein concentration of

purified prM was 2 mg/mL and ELISA standardization is pending to be done to assess background levels and protein dilutions.

CONCLUSIONS

- Versions corresponding to the structural proteins of the KFDV virus have been cloned and tested.
- Protein corresponding to the pHlsec-prM plasmid has been produced and purified to do serological studies.
- Plasmids for mRNA production have been designed and constructed.
- mRNA is ready to be produced and encapsulated for its immunogenic evaluation in murine models.
- A platform for in-house encapsulation of mRNA with off-patent LNPs is being developed.

REFERENCES

- [1] M. G. R. Varma, H. E. Webb, and K. M. Pavri, "STUDIES ON THE TRANSMISSION OF KYASANUR FOREST DISEASE VIRUS BY HAEMAPHYSALIS SPINIGERA NEWMAN," *Trans R Soc Trop Med Hyg*, vol. 54, no. 6, pp. 509–516, Nov. 1960.
- [2] S. Chakraborty, W. E. Sander, B. F. Allan, and F. C. D. Andrade, "Retrospective study of Kyasanur forest disease and deaths among nonhuman primates, India, 1957-2020," *Emerg Infect Dis*, vol. 27, no. 7, pp. 1969–1973, Jul. 2021, doi: 10.3201/eid2707.210463.
- [3] D. Mourya, A. Munivenkatappa, R. Kulkarni, P. Yadav, N. Gupta, and M. Rahi, "Perspective: Re-assessing the biosafety level requirement & defining surveillance need for Kyasanur forest disease virus: Changed paradigm," *Indian Journal of Medical Research*, vol. 154, no. 6, pp. 776–780, Dec. 2021, doi: 10.4103/ijmr.IJMR_1757_19.
- [4] U. K. Srikanth *et al.*, "Studies on the sequential pathology of Kyasanur Forest Disease (KFD) in Mouse brain: KFD virus induces apoptosis of neurons in cerebrum and hippocampus," *PLoS One*, vol. 19, no. 3 March, Mar. 2024, doi: 10.1371/journal.pone.0297143.
- [5] S. Z. Shah *et al.*, "Epidemiology, pathogenesis, and control of a tick-borne disease-Kyasanur forest disease: Current status and future directions," May 09, 2018, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fcimb.2018.00149.

Análisis del Transcriptoma de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Evaluación de Mecanismos de Resistencia a Fipronil en Cepas Resistentes y Susceptibles

Transcriptional Analysis of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Assessment of Resistance Mechanisms to Fipronil in Resistant and Susceptible Strains

Eduardo Ferrara-Tijera^{1,6}, Hugo G. Castelán-Sánchez², Sonia Dávila-Ramos¹, Estefhan Miranda-Miranda³, Raquel Cossio-Bayugar³, Jorge Osorio-Miranda⁴, Juan Diego Pérez de la Rosa⁵, Juan Gay-Gutiérrez⁵

¹ Centro de Investigación en Dinámica Celular, Instituto de Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

² Department of Pathology and Laboratory Medicine, Western University.

³ Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Salud Animal e Inocuidad, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

⁴ Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA)

⁵ Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA)

eduardoferrarat@gmail.com⁶

ABSTRACT

The cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* poses a significant threat to the livestock economy due to the considerable economic losses it causes and its potential as a zoonotic agent. RNA was extracted from three distinct strains of *Rhipicephalus* tick; the fipronil-resistant field strain (Rancho Nuevo), fipronil-resistant laboratory strain (Vargas) and, the susceptible strain (Zacatecas), with three biological replicates per strain to obtain high-quality RNA for transcriptome sequencing. A total of 139,645,928 reads were generated, yielding 10.41 Gb of data with an average Phred score of 34.55. Following quality filtering, 138,217,916 reads were retrained, with only 1.02% discarded. *De novo* assembly using Trinity-BG combined with reference mapping via STAR was identified as the most effective approach, achieving 92.6% and a remarkable 61.4% improving in mapping accuracy with STAR. Differential expression analysis performed with DESeq2 revealed 13,310 isoforms in the field-resistant group compared to control, 14,175 in the laboratory-resistant group versus control, and 10,963 between the field-resistant and laboratory-resistant groups. Trinotate annotation linked 39.79% of the differentially expressed transcripts to known functions. Notably, the study highlighted metabolic detoxification pathways, with significant upregulation of cytochrome P450 and glutathione S-transferase isoforms in resistant strains compared to control. Additionally, altered expression of gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors and cholinesterase indicates a neuroregulatory response to fipronil exposure. These findings suggest that resistant strains employ both metabolic detoxification and neuroprotective mechanisms to mitigate the effects of fipronil.

Palabras clave: *Rhipicephalus (boophilus) microplus*, Resistencia, Acaricida, Fipronil, Ganado

INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son artrópodos hematófagos obligados de gran importancia veterinaria a nivel mundial. Al alimentarse, pueden causar daño directo o indirecto al hospedero, resultando en condiciones tóxicas como parálisis, alergias, abscesos, anemia, inmunosupresión y deterioro en la piel en el sitio de la mordida. Además, son vectores de una amplia variedad de patógenos, incluyendo virus, bacterias, protozoarios y helmintos (Jongejan & Uilenberg, 2004; Sahara et al., 2019).

Uno de los métodos más comúnmente utilizados para su control en el ganado ha sido la aplicación de acaricidas. Durante el siglo XX, los acaricidas más empleados incluyeron petróleo crudo, hexacloruro de benceno (BHC), diclorodifeniltricloroetano (DDT), toxafeno y arsénico (Davey et al., 1998). Actualmente, existen siete clases de pesticidas disponibles para el control de infestaciones por garrapatas: organofosfatos, piretroides sintéticos, lactonas macrocíclicas, formamidinas, benzoilureas, fenilpirazoles e isoxazolininas (Waldman et al., 2023).

En la década de 1990, se desarrolló un compuesto químico llamado fipronil, que pertenece a la clase de los fenilpirazoles, cuyo modo de acción se basa en el bloqueo de los canales GABA. El fipronil ha demostrado ser eficaz tanto en la erradicación como en la profilaxis de infestaciones por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, sin embargo, con el tiempo, las garrapatas comenzaron a desarrollar resistencia a los acaricidas tradicionales. La resistencia a estos compuestos se define como la incapacidad de un acaricida para controlar una población de parásitos, y de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) se describe como "la capacidad de una cepa de parásito para sobrevivir o multiplicarse a pesar de la administración o absorción de una droga en una dosis igual o superior a la recomendada para la erradicación del organismo (Abbas et al., 2014).

Existen varios tipos de resistencia: adquirida, cruzada y múltiple (Abbas et al., 2014). La resistencia a pesticidas en artrópodos es un fenómeno multifactorial, que incluye factores de comportamiento, bioquímicos y mecanismos metabólicos diseñados para contrarrestar los efectos de los pesticidas (Cossío-Bayúgar et al., 2020). El mecanismo más común de resistencia en garrapatas es la desintoxicación metabólica, que implica el aumento de la actividad de enzimas como la esterasa, citocromo P450 (CYP450) y glutatión S-transferasa (GTS), las cuales modifican los acaricidas para convertirlos en moléculas más hidrofílicas, facilitando así su excreción como compuestos menos tóxicos (Cossío-Bayúgar et al., 2018). Otro mecanismo de resistencia es la insensibilidad del sitio de acción; se han identificado seis mutaciones en el canal de sodio asociadas a resistencia a piretroides, y cinco mutaciones en la región GABA-Cl para fipronil (Castro Janer et al., 2019).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) ha recomendado el uso de pruebas de inmersión de adultos (PIA) para monitorear e investigar la resistencia a acaricidas, aunque existen otros métodos, como la prueba del paquete de larvas y la inmersión de larvas (FAO, 2004).

En los últimos años, la secuenciación de alto rendimiento (NGS, por sus siglas en inglés) ha ganado popularidad para la obtención de transcriptomas y genomas completos,

convirtiéndose en una herramienta clave para el análisis de datos. La mejora en la calidad de los datos y el rápido desarrollo de algoritmos han marcado el inicio de una nueva era en los análisis transcriptómicos (Sahraeian et al., 2017). Los experimentos de transcriptómica permiten medir los perfiles transcripcionales responsables de los fenotipos observados y facilitan la comparación de distintos entornos ecológicos y temporales de un organismo o comunidad. En el caso de los transcriptomas de garrapatas, estos pueden ayudar a identificar genes sobre expresados o sub expresados ante la exposición a acaricidas (Chung et al., 2021).

La secuenciación de RNA (RNA-seq) tiene diversas aplicaciones en estudios de expresión génica, basándose en la cuantificación de la expresión de un gen a partir del número de lecturas de ARN mensajero secuenciadas. Un experimento de RNA-seq exitoso depende de un diseño experimental adecuado, la selección correcta de bibliotecas, una profundidad de secuenciación apropiada y un número suficiente de réplicas para el sistema biológico estudiado. El número de réplicas es crucial para la expresión diferencial (Thawng & Smith, 2022). La reconstrucción de transcritos basada en un genoma de referencia es un método ampliamente utilizado cuando se tiene acceso al genoma secuenciado del organismo en estudio, realizando un mapeo contra secuencias conocidas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material biológico utilizado en este estudio fue obtenido en colaboración con el laboratorio de referencia regional de la FAO para el diagnóstico y monitoreo de resistencia y otros parásitos de importancia veterinaria, en el Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA-SAGARPA). Las cepas de garrapatas proporcionadas incluían: la cepa Zacatecas, susceptible a fipronil, la cepa Rancho Nuevo, recolectadas en campo, que presenta un factor de resistencia a fipronil de 12.5; y la cepa Vargas, sometida a presión artificial, con 158 de factor de resistencia a fipronil.

La extracción de ácidos nucleicos se llevó a cabo exclusivamente a partir de garrapatas vivas que sobrevivieron la prueba del paquete de larvas. El tejido fue lisado utilizando el sistema Magnalyser de Roche, y se utilizó el kit Allprep DNA/RNA/Protein Mini de QIAGEN para la extracción de ARN total. La cuantificación de los ácidos nucleicos se realizó mediante espectrofotometría, y la integridad del ARN total fue evaluada mediante electroforesis capilar utilizando el Bioanalyzer de Agilent Technologies.

La secuenciación de alto rendimiento de los transcritos se efectuó en colaboración con la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática (UUSMB) del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Se utilizó el sistema NextSeq 550 System con el el kit TruSeq Stranded mRNA HT de Illumina para la preparación de genotecas, empleando una configuración de lecturas pareadas de 75 pb. Las lecturas generadas fueron sometidas a filtrado de calidad utilizando el software Trim_Galore v0.6.7, y la reconstrucción de los transcritos se realizó con los programas Trinity-v2.13.2, SPAdes Genome Assembler v3.13, Trans-ABYSS v2.0.1, STAR v2.7.10a, BWA V0.7.17-r1188, Bowtie 2 v2.4.4, y GEM Mapper v3.0.

La cuantificación de los transcritos se llevó a cabo utilizando los softwares Salmon v1.4.0 y FeatureCounts v2.0.3, mientras que el análisis de expresión diferencial se realizó con el

lenguaje R (versión 4.3.2) utilizando el paquete DESeq2 (versión 1.42.1). Finalmente, la anotación de los transcritos se realizó utilizando el software Trinotate v4.0.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La extracción de ARN total de las tres cepas garrapatas, con tres repeticiones biológicas cada una (cepa resistente a fipronil de campo - Rancho Nuevo, cepa resistente a fipronil de laboratorio - Vargas y cepa susceptible - Zacatecas), fue exitosa y se obtuvo material de alta calidad para la secuenciación del transcriptoma. El proceso de secuenciación generó un total de 139,645,928 lecturas, correspondientes a 10.410 Gb de datos, con un tamaño promedio de lectura de 74.5 pb y una calidad promedio Phred de 34.55. Tras la aplicación de filtros de calidad, se retuvieron 138,217,916 lecturas, lo que indica solo el 1.02% no cumplió con el mínimo de calidad.

Para la reconstrucción genómica se evaluaron 12 métricas de ensamblado, seguidas de una normalización y sumatoria para cada ensamblador. Las puntuaciones normalizadas para el ensamblaje de novo fueron: Trinity-BG (Trinity bam guided) 7.2, Trinity 6.5, Trans-ABYSS 5.6 y RnaSPAdes 5.4. En el mapeo por referencia, las puntuaciones fueron: Star 9.5, Bwa 6.7, Gem_mapper 4.4 y Bowtie2 1.8. Se seleccionaron como los métodos óptimos la puntuación más alta de ensamblaje de novo y la más alta de mapeo por referencia. La cuantificación de los transcritos se realizó utilizando Salmon con Trinity-BG, mientras que el conteo de los transcritos se llevó a cabo con FeatureCounts para STAR. Con Trinity y Salmon se asignó un promedio del 92.6% de lecturas, mientras que con STAR se asignó un promedio del 31.21%. Esto indica que Trinity superó en un 61.4% la asignación de lecturas, por lo sugiere que la reconstrucción de novo fue el mejor método.

La matriz de conteos generada fue analizada con el algoritmo de Deseq2, obteniendo un total de transcritos expresados diferencialmente de 13,310 isoformas en la comparación de resistente de campo vs control (Rancho Nuevo vs Zacatecas). Para la comparación resistente de laboratorio vs control (Vargas vs Zacatecas), se identificaron un total de 14,175 isoformas, y en la comparación entre resistente de campo vs resistente de laboratorio (Rancho Nuevo vs Vargas) se registraron un total de 10,963 isoformas expresadas diferencialmente. Al vincular la anotación de Trinotate con la expresión diferencial, se obtuvo una tasa promedio de asignación de transcritos del 39.79%.

El análisis de expresión diferencial sugiere la activación de rutas de desintoxicación metabólica, evidenciada por los transcritos que codifican isoformas de la familia del citocromo p450. En la comparación resistente de campo vs control, se encontraron 30 isoformas reguladas positivamente y 31 reguladas negativamente. En la comparación resistente de laboratorio vs control, se identificaron 38 transcritos regulados positivamente y 61 transcritos regulados negativamente. De manera similar, se observó expresión diferencial en los transcritos que codifican para glutatión S-transferasa, con 5 transcritos regulados positivamente y 10 transcritos regulados negativamente en la comparación resistente de campo vs control, y 5 transcritos regulados positivamente y 14 negativamente en la comparación resistente de laboratorio vs control, la comparación Glutathion S-Transferasa Glutatión S-transferasa Mu1 mostró solo expresión diferencial en la condición resistencia laboratorio vs control (Vargas vs Zacatecas), obteniendo un total de dos

isoformas, TRINITY_GG_14074_c28_g1_i6 con una regulación positiva con un log₂foldchange de 6.7 y TRINITY_GG_14074_c28_g1_i2 con una regulación negativa con un log₂fc de -4.6, que en contraste con la literatura, se espera un log₂fc expresado negativamente para baja concentración de xenobióticos y un log₂fc expresado positivo para altas concentraciones de xenobióticos según los el transcriptoma del organismo modelo cercano (Dai et al., 2023).

CONCLUSIONES

El aislamiento y la secuenciación del ARN mensajero de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en tres condiciones de resistencia y susceptibilidad se realizó además de una comparación de metodologías para la reconstrucción de transcritos y el mapeo, lo que permitió identificar la técnica más adecuada para los datos disponibles y el modelo biológico utilizado, resultando en el ensamblaje de 170,948 transcritos. El análisis de expresión diferencial reveló genes expresados de manera significativa en cada condición, destacando aquellos relacionados con la desintoxicación metabólica, como el citocromo P450 y la glutatión S-transferasa, donde se observaron isoformas sobreexpresadas y subexpresadas, lo que sugiere la activación de procesos de desintoxicación.

LITERATURA CITADA

- Abbas, R. Z., Zaman, M. A., Colwell, D. D., Gilleard, J., & Iqbal, Z. (2014). Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. *Veterinary Parasitology*, 203(1–2), 6–20. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2014.03.006>
- Castro Janer, E., Klafke, G. M., Fontes, F., Capurro, M. L., & Schumaker, T. S. S. (2019). Mutations in *Rhipicephalus microplus* GABA gated chloride channel gene associated with fipronil resistance. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 10(4), 761–765. <https://doi.org/10.1016/J.TTBDIS.2019.03.009>
- Chung, M., Bruno, V. M., Rasko, D. A., Cuomo, C. A., Muñoz, J. F., Livny, J., Shetty, A. C., Mahurkar, A., & Dunning Hotopp, J. C. (2021). Best practices on the differential expression analysis of multi-species RNA-seq. *Genome Biology* 2021 22:1, 22(1), 1–23. <https://doi.org/10.1186/S13059-021-02337-8>
- Cossío-Bayúgar, R., Martínez-Ibañez, F., Aguilar-Díaz, H., & Miranda-Miranda, E. (2018). Pyrethroid Acaricide Resistance Is Proportional to P-450 Cytochrome Oxidase Expression in the Cattle Tick *Rhipicephalus microplus*. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8292465>
- Cossío-Bayúgar, R., Miranda-Miranda, E., Martínez-Ibañez, F., Narváez-Padilla, V., & Reynaud, E. (2020). Physiological evidence that three known mutations in the para-sodium channel gene confer cypermethrin knockdown resistance in *Rhipicephalus microplus*. *Parasites and Vectors*, 13(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/S13071-020-04227-7/FIGURES/2>
- Dai, Y., Zhang, Y., Sun, W., Chen, Y., Wang, X., Xin, T., Wan, B., Xia, B., Zhong, L., & Zou, Z. (2023). The metabolism and detoxification effects of lead exposure on *Aleurolyphus*

ovatus (Acari: Acaridae) via transcriptome analysis. *Chemosphere*, 333, 138886. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2023.138886>

FAO. (2004). *Guidelines resistance management and integrated parasite control in ruminants* FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO, Ed.).

Jongejan, F., & Uilenberg, G. (2004). The global importance of ticks. *Parasitology*, 129(SUPPL.). <https://doi.org/10.1017/S0031182004005967>

Sahara, A., Nugraheni, Y. R., Patra, G., Prastowo, J., & Priyowidodo, D. (2019). Ticks (Acari: Ixodidae) infestation on cattle in various regions in Indonesia. *Veterinary World*, 12(11), 1755. <https://doi.org/10.14202/VETWORLD.2019.1755-1759>

Thawng, C. N., & Smith, G. B. (2022). A transcriptome software comparison for the analyses of treatments expected to give subtle gene expression responses. *BMC Genomics*, 23(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S12864-022-08673-8/TABLES/3>

Waldman, J., Klafke, G. M., & Júnior, I. da S. V. (2023). Mechanisms of Acaricide Resistance in Ticks. In *Acta Scientiae Veterinariae* (Vol. 51). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.128913>



NANOIXODICIDA BASADO EN FIPRONIL PARA EL CONTROL DE *Rhipicephalus microplus*

FIPRONIL-BASED NANOIXODICIDE FOR THE CONTROL *Rhipicephalus microplus*

José Noel García Pérez¹, Jesús Jaime Hernández Escareño², Romario García Ponce²,
Sergio Arturo Galindo Rodríguez², Jose Pablo Villarreal Villarreal¹.

¹Universidad Autónoma de Nuevo León / Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

²Universidad Autónoma de Nuevo León / Facultad de Ciencias Biológicas.

*Autor de correspondencia: pablov_v@hotmail.com

ABSTRACT: The cattle tick, *Rhipicephalus microplus*, is the main problem in livestock farming in Mexico, with economic losses exceeding \$550 million. Traditional control methods use synthetic ixodicides, one of which is fipronil, an acaricide from the phenylpyrazole family that disrupts the central nervous system of ticks. However, the continuous and indiscriminate use of this acaricide has led to significant resistance issues. Due to this resistance, various alternatives have been developed, including nanoformulations. In this study, nanoparticles loaded with fipronil (NP_F) were developed and characterized using the Eudragit® E PO polymer and were tested against *R. microplus* larvae. The nanoformulation exhibited a size of 143.43 ± 1.88 nm, a polydispersity index of 0.162 ± 0.011 , and a Z potential of 21.16 ± 0.52 mV, proving to be stable for 30 days. Acaricidal activity was evaluated using the immersion test, with lethal concentrations of 50 (CL50) $0.615 \mu\text{g/ml}$ and 90 (CL90) $3.314 \mu\text{g/ml}$, showing no significant differences from fipronil. This nanoformulation proved effective in controlling *R. microplus* populations, with its main advantage being its water solubility, which allows for greater versatility in application, such as immersion in large livestock herds or spraying for more uniform distribution of the product.

PALABRAS CLAVE: Nanopartículas, Nanoixodicidas, Fipronil, Garrapatas.

1. INTRODUCCIÓN

En el mundo, existen más de mil millones de bovinos, de los cuales aproximadamente el 90% están en riesgo debido a diversas especies de garrapatas. Esta amenaza se debe a la naturaleza hematófaga de las garrapatas, que provoca una serie de pérdidas productivas significativas, como la reducción de peso, anemia, daños en la piel, disminución de la eficiencia reproductiva y una baja en la producción de leche. Además, los bovinos pueden verse afectados por enfermedades transmitidas por garrapatas como la babesiosis y la anaplasmosis (Rodríguez-Vivas, *et al.*, 2014). La garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, es la principal problemática para el ganado en México, las pérdidas económicas

estimadas causadas por esta superan los 573,608,076 dólares. (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017).

El método tradicional de control son los ixodicidas sintéticos, sin embargo, su efectividad se ve limitada principalmente por errores en la aplicación, lo que ha dado lugar a poblaciones de garrapatas resistentes (García-Ponce *et al.*, 2024). El fipronil es un ixodicida de la familia de los fenilpirazoles, el cual fue descubierto a finales de los ochenta y puesto en el mercado en 1993, este compuesto es muy efectivo contra una gran variedad de artrópodos (Tingle *et al.*, 2000).

Actualmente, su uso continuo e indiscriminado ha generado resistencia en poblaciones de *R. microplus* en México (Miller *et al.*, 2013). Además, este compuesto presenta problemas de baja solubilidad en agua, siendo una limitante de formulación para lograr una aplicación efectiva. Actualmente se comercializa en la modalidad pour-on, sin embargo, esta formulación presenta desafíos particulares en hatos ganaderos grandes, donde la administración del producto puede ser inconsistente, llevando a una dosificación inadecuada. Esta combinación de factores facilita la generación de garrapatas resistentes, lo que a su vez obliga a emplear dosis más altas o a buscar alternativas, elevando los costos y complicando la gestión de estos parásitos (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2012).

En la actualidad, el uso de nanopartículas poliméricas como vectores de principios activos ha tomado gran relevancia en áreas como la medicina veterinaria y la biotecnología (Gutiérrez *et al.*, 2016). Las nanopartículas son materiales de tamaño nanométrico el cual les otorga propiedades únicas, como su alta área superficial y la capacidad de superar diversas barreras biológicas, permitiendo su liberación controlada. Esto permite que se utilicen en sistemas de liberación de fármacos (Gómez-Gaete *et al.*, 2014). Además, permiten la aplicación del compuesto en medio acuoso, descartando la necesidad de utilizar disolventes orgánicos tóxicos, lo que las convierte en una opción viable para formular ixodicidas sintéticos (Kah *et al.*, 2014). Teniendo en cuenta estas ventajas, este estudio se centró en el desarrollo y la caracterización de nanopartículas poliméricas cargadas con fipronil, así como su evaluación *in vitro* contra larvas de *R. microplus*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación y caracterización de nanopartículas poliméricas. Las nanopartículas cargadas con fipronil se prepararon mediante la técnica de nanoprecipitación (Fessi, 1989). Brevemente se inyectó una fase orgánica compuesta por el polímero (Eudragit® E PO) y fipronil disueltos en una mezcla de solventes, en una fase acuosa que contenía alcohol polivinílico al 0.5% (p/v). Posteriormente se eliminaron los solventes con ayuda de un rotaevaporador (Control Laborota 4003, Heidolph Instruments, GER) y finalmente se obtuvieron las nanopartículas cargadas con fipronil (NP_F) en solución acuosa. Las nanopartículas blanco (NP_B) se obtuvieron siguiendo el mismo procedimiento exceptuando el ingrediente activo.

Tamaño, índice de polidispersión y potencial zeta. El tamaño de partícula y el índice de polidispersidad de las nanopartículas cargadas y blanco se midieron utilizando la dispersión dinámica de la luz en un ángulo de dispersión de 90 grados,

mientras que, la medición del potencial zeta se realizó mediante microelectroforesis láser Doppler (Zetasizer Nano-ZS90, Malvern Instruments, UK).

Estabilidad. El tamaño de partícula, el índice de polidispersidad y el potencial zeta de las nanoformulaciones se analizaron a lo largo de un periodo de almacenamiento de 1, 5, 15 y 30 días.

Análisis infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR). Se realizó un análisis del polímero (Eudragit® E PO), de las nanopartículas en blanco, de las nanopartículas cargadas, y del fipronil mediante espectroscopía IR-FT. Para investigar posibles interacciones moleculares, se llevaron a cabo análisis con 64 escaneos en un rango de 4000 a 500 cm^{-1} , utilizando un espectrofotómetro IR-FT Optical Frontier (PerkinElmer, Waltham, MA, EE. UU.).

Garrapatas. Se recolectaron en Tantoyuca, Veracruz, México (21.599693, -98.059910), garrapatas hembra ingurgitadas de *R. (B.) microplus* de hatos ganaderos con infestaciones naturales y libres de tratamiento. Las garrapatas fueron extraídas manualmente y transportadas al laboratorio donde se llevó a cabo este trabajo.

Establecimiento de la población en el laboratorio. Las garrapatas fueron transportadas al Laboratorio Multidisciplinario de Investigaciones de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL). Las garrapatas fueron incubadas a una temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y una humedad relativa del 80%-90% para inducir la oviposición. Los huevos fueron transferidos a un tubo de ensayo y se mantuvieron en las mismas condiciones hasta su eclosión. Las larvas tenían entre 7 y 14 días de edad cuando fueron usadas en el diagnóstico de resistencia y los bioensayos.

Diagnóstico de resistencia a fipronil. Se realizó el diagnóstico de resistencia a el fipronil utilizando la dosis discriminante (DD) de 0.05% (p/v) (Martínez-Ibáñez *et al.*, 2021). Se utilizó la prueba de inmersión larval modificada (Castro-Janer *et al.*, 2009), y los ensayos se realizaron por triplicado contabilizando larvas vivas y muertas.

Bioensayos con nanopartículas cargadas con fipronil. La actividad ixodida del fipronil sobre las larvas se evaluó mediante la prueba de inmersión de larvas modificada (Castro-Janer *et al.*, 2009), a concentraciones 5, 3, 2, 1, 0.6, 0.2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fipronil. De igual manera, para evaluar las NP_F se tomó un lote de nanopartículas como solución madre (1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con la cual se realizaron diluciones a 5, 3, 2, 1, 0.6, 0.2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En ambos casos se evaluó la mortalidad transcurridas 24 horas. Para los resultados de la mortalidad se corrigió la mortalidad larvaria utilizando la siguiente fórmula (FAO, 2004).

$$\%M = (\% \text{Mortalidad de la prueba} - \% \text{Mortalidad del control}) / (100\% - \text{Mortalidad del control}) \times 100$$

Análisis estadístico. Para determinar la CL50 y CL90 junto con sus intervalos de confianza del 95%, se aplicó el análisis Probit utilizando el programa Polo-Plus (LeOra Software®), utilizando las mortalidades de larvas de las diferentes

concentraciones evaluadas. Se consideraron diferencias significativas entre las concentraciones letales si los intervalos de confianza del 95% no se superponían (LeOra Software®).

3. **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Preparación y caracterización de nanopartículas poliméricas. En este trabajo se obtuvieron nanopartículas cargadas con fipronil, los tamaños, pdi y potencial z. En el estudio, las nanopartículas evaluadas mostraron un tamaño de 143.43 ± 1.88 nm, mientras que las nanopartículas blanco tuvieron un tamaño de 119.41 ± 2.05 nm. Al comparar estos resultados con las nanopartículas descritas en otro artículo, donde se encapsularon los acaricidas fluazurón y amitraz utilizando un polímero de chitosán-poly- ϵ -caprolactona (CS_PCL), se observa que estas últimas presentaron tamaños significativamente mayores, entre 260 a 295 nm.

El índice de polidispersidad (PDI) de las nanopartículas obtenidas en este estudio osciló entre 0.1 y 0.2, indicando una distribución de tamaño más uniforme y controlada. En contraste, las nanopartículas mencionadas en el artículo comparativo mostraron un PDI entre 0.3 y 0.7, lo que refleja una mayor variabilidad en los tamaños de las partículas.

Las nanopartículas cargadas con fipronil tienen un potencial Z de 21.16 ± 0.52 mV, y las nanopartículas blanco, 21.81 ± 1.27 mV. En comparación, las nanopartículas de chitosán encapsuladas con amitraz y fluazurón tienen potenciales Z más altos, de 43 ± 7 mV y 45 ± 10 mV, respectivamente, mientras que las nanopartículas blancas de CS_PCL tienen un potencial de 40 ± 10 mV. Esto sugiere que las nanopartículas del estudio actual presentan menor potencial Z en comparación con las formulaciones de CS_PCL.

En general no se encontró mucha información en la cual se hable sobre nanoencapsulación de acaricidas con nanopartículas poliméricas lo cual revela un campo inexplorado y con mucho potencial.

Estabilidad de las nanopartículas. Los parámetros de tamaño, índice de polidispersidad y potencial Z de las nanoformulaciones (NP_F y NP_B) se evaluaron en función del tiempo. No se observaron diferencias significativas en un transcurso de 30 días.

Espectro FT-IR. Se obtuvieron los espectros del fipronil, el polímero, las NP_B y NP_F para identificar la posible interacción fisicoquímica que pudiera haber ocurrido durante el proceso de preparación de las nanopartículas. Se pudo observar que los espectros de las NP_B y NP_F fueron muy similares al espectro del polímero, por lo tanto, no se produjo la formación de nuevos enlaces entre el fipronil y el polímero en la formulaciones de nanopartículas.

Diagnostico de resistencia a fipronil. En el estudio de resistencia que se realizó en este trabajo se demostró que la población de *R. (B.) microplus* con la que trabajos es susceptible a el fipronil, por otro lado, en México se ha identificado resistencia en algunas poblaciones, como en Tamaulipas, donde en 2013 se registró el primer caso de resistencia al fipronil (Miller *et al.*, 2013)

Bioensayos con nanopartículas cargadas con fipronil. La actividad del fipronil libre contra larvas de *R. (B.) microplus* se demostró obteniendo valores de CL50 de

0.526 µg/ml y para el CL90 de 2.553 µg/ml, resultados similares a los obtenidos por Castro-Janer et al., (2009) que obtuvo unas CL50 de 1.43 µg/ml y sus CL90 de 3.82 µg/ml. En cuanto a las CL50 y CL90 de las nanopartículas cargadas con fipronil, se obtuvieron unos valores de 0.615 µg/ml y 3.314 µg/ml, estos resultados no evidenciaron diferencias significativas del compuesto libre. De igual forma las nanopartículas blanco se evaluaron contra las larvas de *R. (B.) microplus* sin tener mortalidad alguna.

4. CONCLUSIONES

En este estudio se desarrolló una formulación de nanopartículas poliméricas cargadas con fipronil, la cual fue estable sin variaciones significativas durante el periodo de treinta días de almacenamiento. El tamaño de la nanoformulación cargada fue mayor que las de las blanco. Se demostró actividad larvicida por parte de las nanopartículas cargas con fipronil. No se observó una diferencia significativa al comparar las nanoformulaciones con el fipronil libre, lo que sugiere que, hasta el momento, ambos presentan una eficacia similar. Sin embargo, es importante considerar que aún falta determinar el porcentaje de encapsulación para llegar a una conclusión definitiva. Esta nanoformulación demostró ser viable para el control de poblaciones de *R. (B.) microplus*, a diferencia de la forma comercial de este acaricida, teniendo como principal ventaja la solubilidad en agua, lo que ayuda a tener aplicaciones más variadas como la inmersión para hatos ganaderos grandes o la aspersion para una mejor distribución del producto.

LITERATURA CITADA:

- Berni, E., de Melo Barbosa, R., & Durán, N. (2022). Chitosan-coated poly (ϵ -caprolactone) nanoparticles as acaricide carriers. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 13(1), 101849.
- Castro-Janer, E., Rifran, L., Piaggio, J., Gil, A., Miller, R. J., & Schumaker, T. T. S. (2009). In vitro tests to establish LC50 and discriminating concentrations for fipronil against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) and their standardization. *Veterinary Parasitology*, 162(1-2), 120-128.
- Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J.P.; Ammoury, N.; Benita, S. Nanocapsule Formation by Interfacial Polymer Deposition Following Solvent Displacement. *Int J Pharm* 1989, 55, R1–R4.
- García-Ponce, R., Villarreal-Villarreal, J. P., Álvarez-Román, R., & Rivas-Morales, C., Galindo-Rodríguez S.A. (2024) El enemigo persistente de la ganadería en México: estado actual y control de "la garrapata". *Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica*.
- Kah, M.; Hofmann, T. Nanopesticide Research: Current Trends and Future Priorities. *Environ Int* 2014, 63, 224–235.
- Martínez-Ibáñez, F., Miranda-Miranda, E., Jasso, V. C. E., & Cossio-Bayugar, R. (2021). Reference tick strains as an important biological material for acaricide resistance characterization. *The Entomological Guide to Rhipicephalus*. *Nova Science, New York*, 177-200.

- Miller, R. J., Almazán, C., Ortiz-Estrada, M., Davey, R. B., George, J. E., & De León, A. P. (2013). First report of fipronil resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* of Mexico. *Veterinary Parasitology*, 191(1-2), 97-101.
- Rodríguez-Vivas, R. I., Hodgkinson, J. E., & Trees, A. J. (2012). Resistencia a los acaricidas en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: situación actual y mecanismos de resistencia. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 3, 9-24.
- Rodríguez-Vivas, R. I., Rosado-Aguilar, J. A., Ojeda-Chi, M. M., Pérez-Cogollo, L. C., Trinidad-Martínez, I., & Bolio-González, M. E. (2014). Integrated control of ticks in bovine livestock. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 1(3), 295-308
- Tingle, C. C. D., Rother, J. A., Dewhurst, C. F., Lauer, S., & King, W. J. (2000). Health and environmental effects of fipronil. Briefing paper for Pesticides Action Network, UK, 22, 103-118.

Secuenciación de siguiente generación (NGS-16S) para determinar microbiota bacteriana y agentes zoonóticos de garrapatas de la Comarca Lagunera, México

Next-generation sequencing (NGS-16S) to determine bacterial microbiota and zoonotic agents of ticks from the Comarca Lagunera, Mexico

Cristina García-De la Peña^{1*}, Annely Zamudio López¹, Sergio Iván Barraza-Guerrero², Quetzaly Karmy Siller-Rodríguez¹, Juan Carlos Herrera-Salazar¹, Luis Manuel Valenzuela-Núñez¹ y Jesús Vásquez-Arroyo³

¹Laboratorio de Medicina de la Conservación, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez del Estado de Durango. Gómez Palacio, Durango, México.

²Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna, Torreón, Coahuila, México.

³Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango. Gómez Palacio, Durango, México.

*Autor para correspondencia: cristina.garcia@ujed.mx

ABSTRACT

Ticks are blood-sucking ectoparasites and also vectors of pathogens that cause diseases in animals and humans. Next-generation sequencing (NGS) has allowed us to explore the bacterial microbiota of ticks in greater depth, providing information on the commensal and pathogenic bacteria they contain, many of which are not culturable. This has important implications for public health, as it helps in the identification of emerging pathogens and the development of new biological control strategies. In the Comarca Lagunera, Mexico, the bacterial microbiota of the species *Rhipicephalus sanguineus*, *Otobius megnini*, *Argas persicus* and *Ornithodoros turicata* has been studied by NGS using the V3-V4 region of the 16S rRNA gene with Illumina NovaSeq technology. We found each tick species dominated by a different endosymbiont (*Coxiella mudrowiae*, *C. burnetii* or *Fransicella*-like) and that there was variability in the presence of potentially zoonotic bacteria (*Ehrlichia canis*, *Anaplasma* spp.). This shows that each tick species has a unique bacterial microbiota, composed of commensal and potentially zoonotic species that have co-evolved with their host; however, this is likely to change depending on the geographic region, so it is necessary to conduct studies in different areas where the same tick species lives. Due to the large amount of information it provides and its affordable cost, NGS is now an excellent alternative for the study of tick bacteria in Mexico and other countries.

Palabras clave: 16S rRNA, *Rhipicephalus*, *Ornithodoros*, *Argas*, *Coxiella*.

INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son artrópodos pertenecientes a la clase Arachnida que se agrupan en el orden Ixodida. Son ectoparásitos, lo que significa que viven en la superficie de otros animales (hospederos), de los cuales se alimentan succionando sangre. Existen más de 900 especies de garrapatas, que se dividen en dos familias principales: Ixodidae



(garrapatas duras) que tienen un escudo duro en la parte dorsal que las protege y Argasidae (garrapatas blandas) que no tienen el escudo duro y su cuerpo es más flexible. Las garrapatas son vectores importantes de varios patógenos que causan enfermedades en animales y humanos. Estos patógenos pueden ser bacterias, virus o protozoos, y las garrapatas los transmiten a través de su saliva mientras se alimentan.

En las últimas décadas, la secuenciación de siguiente generación (NGS, por sus siglas en inglés) se ha posicionado como una herramienta crucial para el estudio de la microbiota bacteriana de las garrapatas (Wu-Chuang et al., 2021). Esta tecnología permite explorar la compleja comunidad microbiana presente en estos vectores con un nivel de detalle sin precedentes. La comprensión de la microbiota bacteriana de las garrapatas no solo es esencial para descifrar la ecología de estos parásitos, sino que también tiene implicaciones significativas para la salud pública, al ayudar en la identificación de patógenos emergentes y en el desarrollo de estrategias de control más efectivas (Tokarz y Lipkin, 2021). Tradicionalmente, la investigación de la microbiota se basaba en medios de cultivo que limitaban el descubrimiento de nuevas especies. Sin embargo, la NGS permite la identificación de bacterias no cultivables y proporciona una visión integral de la diversidad microbiana en las garrapatas. Además, esta técnica permite analizar interacciones entre patógenos y bacterias comensales, lo que puede influir en la virulencia y la capacidad de transmisión de enfermedades. La información detallada proporcionada por la NGS sobre la microbiota bacteriana de las garrapatas también es crucial para el desarrollo de estrategias de control; la identificación de bacterias que afectan la capacidad de las garrapatas para transmitir patógenos puede abrir nuevas vías para el control biológico. Por ejemplo, algunas bacterias presentes en la microbiota de las garrapatas pueden tener propiedades antagonistas contra patógenos específicos (*Sphingomonas* vs. *Anaplasma phagocytophilum*; Mazuecos et al., 2023). Aprovechar estas bacterias para desarrollar tratamientos o estrategias de manejo podría ser una alternativa efectiva y ecológica a los métodos tradicionales de control de garrapatas basados en pesticidas.

En los últimos años se han colectado garrapatas de cuatro especies (*Rhipicephalus sanguineus*, *Otobius megnini*, *Argas persicus* y *Ornithodoros turicata*) en la Comarca Lagunera, al norte de México, para conocer su microbiota bacteriana y los agentes zoonóticos que pueden transmitir. Se ha utilizado la NGS en una región del gen 16S rRNA obteniéndose excelentes resultados. En este trabajo se presentan los hallazgos más relevantes en cuanto a la microbiota de estas garrapatas, así como de la determinación de agentes con potencial zoonótico de importancia en la salud pública para esta región.

MATERIALES Y MÉTODOS

La Comarca Lagunera es una región situada en el norte de México, que abarca partes de los estados de Coahuila y Durango. En conjunto abarca 15 municipios, entre los cuales destacan Torreón, Tlahualilo, Matamoros, Ceballos, Mapimí, Lerdo y Gómez Palacio. El clima es seco semi-árido con lluvias en verano.

La garrapata marrón del perro (Ixodidae: *Rhipicephalus sanguineus*) fue colectada en perros abandonados de las ciudades de Lerdo, Gómez Palacio y Torreón. La garrapata espinosa (Argasidae: *Otobius megnini*) se colectó de bovinos en las localidades de Ceballos y Bermejillo. Por su parte, *Argas persicus* (Argasidae) se colectó en maderos de

establos de cabras en Ceballos y *Ornithodoros turicata* (Argasidae) se encontró parasitando a la tortuga del Bolsón (*Gopherus flavomarginatus*) en la Reserva de la Biosfera Mapimí. Las garrapatas se colectaron utilizando pinzas y frascos estériles para posteriormente ser trasladadas al Laboratorio de Medicina de la Conservación de la Facultad de Ciencias Biológicas, UJED. Con ayuda de estereoscopio y bisturí se llevó a cabo la disección de garrapatas no ingurgitadas recuperando el contenido interno. Para cada especie se formaron de tres a 12 pools con el contenido de ocho a 10 garrapatas cada uno, dependiendo de su tamaño. Cada pool se colocó en un tubo de lisis BashingBead con 750 µl de solución de lisis/estabilización (Zymo Research); luego, las muestras se procesaron en un disruptor celular Terralyzer (Zymo Research). La extracción de DNA se realizó con un kit ZymoBiomics DNA Miniprep (Zymo Research) siguiendo el protocolo del fabricante.

Los pools se procesaron en Novogene Co. Inc. (Davis, CA) amplificando la región V3–V4 del gen 16S rRNA mediante los cebadores 341F (CCTAYGGGRBGCASCAG) y 806R (GGACTACNNGGTATCTAAT). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con 15 µL de Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs), 2 µM de cebadores directos e inversos y aproximadamente 10 ng de DNA molde. El programa térmico consistió en una desnaturalización inicial a 98 °C durante 1 min, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 98 °C durante 10 s, alineamiento a 50 °C durante 30 s y elongación a 72 °C durante 30 s. Se mezcló el mismo volumen de tampón de carga 1X (que contenía SYB verde) y productos de PCR para la electroforesis en un gel de agarosa al 2 % para la detección. Los productos de PCR se mezclaron en proporciones iguales. Los productos de PCR mezclados se purificaron posteriormente con un kit de extracción de gel Qiagen (Qiagen, Alemania). Las bibliotecas de secuenciación se generaron a través de un kit de preparación de muestras sin PCR de DNA TruSeq® (Illumina, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante, y se agregaron códigos de índice. La calidad de la biblioteca se evaluó en un fluorómetro Qubit® 2.0 (Thermo Scientific) y un sistema Agilent Bioanalyzer 2100. Finalmente, la biblioteca se secuenció en una plataforma Illumina NovaSeq y se generaron lecturas de extremos emparejados de 250 pb.

El análisis bioinformático se realizó en plataforma Ubuntu, utilizando el programa Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME2; Bolyen et al., 2019). Se utilizó el algoritmo DADA2 para eliminar secuencias de baja calidad, filtrar secuencias quiméricas/únicas y generar los Amplicon Sequence Variants (ASV; Callahan et al., 2017). La base de datos Greengenes2 (McDonald et al., 2023) se utilizó para asignar la taxonomía. Los ASV de los géneros se compararon con la base de datos NCBI a través de la herramienta Blast, que considera un 97% de identidad como el porcentaje mínimo de identidad para aceptar la especie.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Comarca Lagunera, México, la microbiota de *Rhipicephalus sanguineus* se encontró dominada por *Coxiella burnetii* (>60%) la cual ha sido reportada recientemente en otras especies de garrapatas como un posible endosimbionte (Shi et al., 2022). Asimismo, esta garrapata es portadora de *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys*, ambas de importancia en salud pública (Silva et al., 2014; Arraga-Alvarado et al., 2014). Es importante mencionar que en las muestras del estudio en cuestión no se registró la presencia de *Rickettsia*



rickettsii, bacteria causante de la Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas que ha provocado muertes en habitantes de la Comarca Lagunera. Su ausencia puede deberse a que al parecer *R. rickettsii* requiere que la garrapata ingiera sangre durante varias horas para poder nutrirse, multiplicarse y posteriormente ser transmitida a la persona durante la picadura (Azad y Beard, 1998), lo que significa que es difícil registrarla con NGS en garrapatas no ingurgitadas. La garrapata *Otobius megnini* parasita los oídos de los bovinos. Más del 80% de su microbiota se observó compuesta por un endosimbionte *Fransicella*-like; asimismo, mostró 12% de *Mycoplasma alkalescens* (una bacteria que ha sido aislada de la cavidad nasal de los bovinos) y un 3% de *M. yeatsii* (reportada como habitante del canal del oído externo de cabras). En el caso de la garrapata *Argas persicus*, más del 80% de su microbiota estuvo conformada por *Coxiella burnetii* y solo un pequeño porcentaje por *Rickettsia* sp. (0.30%). La bacteria *C. burnetii* es zoonótica al ser la causante de la Fiebre Q (Celina y Cerný, 2022); sin embargo, no se han reportado personas picadas por esta especie de garrapata o casos de esta enfermedad en esta región. Finalmente, la microbiota de *Ornithodoros turicata* se compuso por un 56% del endosimbionte Candidatus *Midichloria mitochondrii*, un 25% de *C. burnetii* y un 3% de *Anaplasma* sp. La bacteria *M. mitochondrii* reside en las mitocondrias de las células ováricas de las garrapatas y es capaz de ingresar dentro de la membrana mitocondrial interna. Este comportamiento no es visto en muchas otras bacterias y sugiere una relación íntima con la maquinaria celular de la garrapata. Aunque su función exacta en las garrapatas no se ha aclarado por completo, se sugiere una relación simbiótica que podría jugar un papel importante en el metabolismo y la reproducción de las garrapatas (Kolo y Raghavan, 2023). Es evidente que cada especie de garrapata mantiene una microbiota bacteriana propia, conformada por especies comensales y/o potencialmente zoonóticas, que ha co-evolucionado estrechamente con su hospedero aportado beneficios que le han permitido sobrevivir; sin embargo, la función exacta de cada bacteria en el cuerpo de las garrapatas aún no se conoce del todo. Por otra parte, es probable que la microbiota y las especies zoonóticas de cada especie de garrapata sea distinta en diferentes áreas geográficas, por lo que será necesario realizar este tipo de estudios en cada población donde exista riesgo de salud pública. En este caso la garrapata marrón del perro es el mejor ejemplo, ya que se encuentra distribuida en casi la totalidad de los estados de México donde las condiciones climáticas y de hábitat son variables.

Cabe resaltar que la secuenciación de solo una región del gen 16S rRNA (en este caso V3-V4) es económicamente accesible, sin embargo, presenta la limitante de que existen ASV que solo alcanzan a clasificarse a nivel de género. En el caso de requerir profundizar en la taxonomía de algún taxón importante, se debe recurrir a la secuenciación completa del gen 16S de la microbiota, utilizando por ejemplo la tecnología de Pacific Biosciences (PacBio) o a la PCR convencional utilizando cebadores específicos.

CONCLUSIONES

La secuenciación de siguiente generación ha transformado el estudio de la microbiota bacteriana de las garrapatas al proporcionar una visión detallada y exhaustiva de las comunidades microbianas presentes en estos vectores. Esta tecnología facilita la identificación de bacterias comensales y patógenos con potencial zoonótico en una sola corrida de muestras. Al igual que en la Comarca Lagunera, es importante que en todo México se desarrollen este tipo de estudios para conocer y en un futuro controlar a los

patógenos transmitidos por garrapatas, impactando de manera positiva la salud pública de sus habitantes.

LITERATURA CITADA

Arraga-Alvarado. C.M., B.A. Qurollo, O.C. Parra, M.A. Berrueta, B.C. Hegarty y E.B. Breitschwerdt. 2014. Case report: Molecular evidence of *Anaplasma platys* infection in two women from Venezuela. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2014 Dec;91(6):1161-5.

Azad, A.F. y C.B. Beard. 1998. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. Emerging Infectious Diseases, 4(2):179-86.

Bolyen E., J.R. Rideout, M.R. Dillon, N.A. Bokulich, C.C Abnet, et al. 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. Nat Biotechnol. 37(8):852-857. Erratum in: Nat Biotechnol. 2019;37(9):1091.

Callahan, B.J., P.J. McMurdie & S.P. Holmes. 2017. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. ISME J. 2017, 11(12):2639-2643.

Celina, S.S. y J. Cerný. 2022. Coxiella burnetii in ticks, livestock, pets and wildlife: A mini-review. Frontiers in Veterinary Science, 9:1068129.

Kolo, A.O. y R. Raghavan. 2023. Impact of endosymbionts on tick physiology and fitness. Parasitology 150, 859–865.

Mazuecos, L., P. Alberdi, A. Hernández-Jarguín, M. Contreras, M. Villar, A. Cabezas-Cruz, L. Simo, A. González-García, Sandra Díaz-Sánchez, G. Neelakanta, S. I. Bonnet, E. Fikrig y José de la Fuente. 2023. Frankenbacteriosis targeting interactions between pathogen and symbiont to control infection in the tick vector. iScience 26, 106697.

McDonald, D., Y. Jiang, M. Balaban, K. Cantrell, Q. Zhu, A. Gonzalez, et al. 2023. Greengenes2 unifies microbial data in a single reference tree. Nat. Biotechnol. 42(5):715-718. Erratum in: Nat. Biotechnol. 2024, 42(5):813.

Shi, M., T. Qin, L. Zhitong, H. Feng y Y. Sun. 2022. Molecular detection of Candidatus *Coxiella mudorwiae* in *Haemaphysalis concinna* in China. Zoonoses. 2022. 2(1). doi: 10.15212/ZOONOSES-2022-0041

Silva, A.B., S.P. Canseco, M.P.G. de la Torre, A. Mayoral-Silva, M.A. Mayoral, L. Pérez-Campos-Mayoral, J. López-Martínez y E. Pérez-Campos. 2014. Infección humana asintomática por contacto con perros. Un caso de ehrlichiosis humana. Gaceta Médica de México. 2014; 150:171-4

Tokarz R. y W. I. Lipkin. 2021. Discovery and Surveillance of Tick-Borne Pathogens. Journal of Medical Entomology, 58(4), 2021, 1525–1535.

Wu-Chuang, A., A. Hodzic, L. Mateos-Hernández, A. Estrada-Peña, D. Obregon y A. Cabezas-Cruz. 2021. Current debates and advances in tick microbiome research. Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases, 1, 2021, 100036.



MAPPING TICK-BORNE DISEASE RISKS IN CATTLE: A PRELIMINARY DATABASE FOR PREDICTIVE MODELS IN NORTH AMERICA

MAPEO DE RIESGOS DE ENFERMEDADES POR GARRAPATAS EN EL GANADO: UNA BASE DE DATOS PRELIMINAR PARA MODELOS PREDICTIVOS EN NORTEAMÉRICA

Jose-Maria Garcia-Carrasco^{1*}, Karen Poh², Massaro Ueti², David Crowder¹, Juan Mosqueda³, Javier Gutiérrez-Illán¹

* j.garciacarrasco@wsu.edu

1 Department of Entomology, Washington State University, Pullman, Washington 99164 USA

2 Animal Disease Research Unit, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, 3003 Animal Disease and Biotechnology Facility, Pullman, Washington 99164, USA

3 Immunology and Vaccines Laboratory, C. A. Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Carretera a Chichimequillas, Querétaro 76140, México

ABSTRACT

Tick-borne diseases (TBDs) represent a significant veterinary concern globally, affecting both livestock and companion animals, and posing potential zoonotic risks to humans. The spread of TBDs is influenced by the presence of vector ticks and ecological factors like climate and host availability. This study represents the first step in a broader research initiative aimed at developing predictive models for ticks associated with TBDs in North American cattle. We used several bibliographic search engines, including Google Scholar, Web of Science, and Scopus, to compile information on the various TBDs affecting cattle in North America. Additionally, we investigated the tick species involved in the transmission of these diseases. As a result, we identified four major TBDs that pose significant risks to cattle: anaplasmosis, babesiosis, theileriosis, and heartwater. Each of these diseases is associated with specific tick vectors. We identified fourteen tick species potentially involved in the transmission of these TBDs. By utilizing data from various repositories and vector surveillance programs, we developed a geo-referenced database encompassing these tick species. The distribution of ticks involved in TBDs affecting cattle was not uniform across North America, but was concentrated in specific regions, correlating with ecological and climatic conditions. The database elaborated will be used for the elaboration of TBDs risk models. These models will provide a comprehensive perspective on the distribution of vector ticks, incorporating a One Health approach by considering the environment, livestock, and wildlife. The final risk maps aim to identify regions with heightened vulnerability to tick-borne diseases, thereby assisting in the formulation of targeted interventions and disease control strategies.

RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por garrapatas (ETGs) representan una preocupación veterinaria significativa a nivel mundial, afectando tanto al ganado como a animales de



compañía, y presentando posibles riesgos zoonóticos para los humanos. La propagación de las ETGs está influenciada por la presencia de garrapatas transmisoras y factores ecológicos como el clima y la disponibilidad de huéspedes. Este estudio representa el primer paso en una iniciativa de investigación más amplia orientada al desarrollo de modelos predictivos para las garrapatas asociadas con ETGs en el ganado norteamericano. Utilizamos varios motores de búsqueda bibliográfica, incluidos *Google Scholar*, *Web of Science* y *Scopus*, para compilar información sobre las diversas ETGs que afectan al ganado en Norteamérica. Además, investigamos sobre las especies de garrapatas involucradas en la transmisión de estas enfermedades. Como resultado, identificamos cuatro ETGs principales que presentan riesgos significativos para el ganado: anaplasmosis, babesiosis, theileriosis e hidropericardias. Cada una de estas enfermedades está asociada con vectores específicos de garrapatas. Identificamos catorce especies de garrapatas potencialmente involucradas en la transmisión de estas ETGs. Utilizando datos de varios repositorios y programas de vigilancia de vectores, desarrollamos una base de datos georreferenciada que abarca estas especies. La distribución de las garrapatas involucradas en ETGs que afectan al ganado no es uniforme en toda América del Norte, sino que se concentraba en regiones específicas, correlacionadas con condiciones ecológicas y climáticas. La base de datos elaborada se utilizará para la creación de modelos de riesgo de ETGs. Estos modelos proporcionarán una perspectiva integral sobre la distribución de garrapatas vectores, incorporando un enfoque de Una Sola Salud al considerar el ambiente, ganado y vida silvestre. Los mapas de riesgo finales tienen como objetivo identificar regiones con una mayor vulnerabilidad a las enfermedades transmitidas por garrapatas, lo que ayudará en la formulación de intervenciones específicas y estrategias de control de enfermedades.

INTRODUCTION

Vector-borne diseases, particularly those transmitted by ticks, pose major threats to animal and human health. Ticks are key vectors, spreading a wide range of tick-borne diseases (TBDs) and causing significant health and economic problems (Sonenshine & Roe 2013). TBDs exemplify the intersection between human, domestic animal, and wildlife health, representing a complex challenge to livestock health and productivity worldwide (Jubb *et al.* 2015, Railey & Marsh 2021). These diseases affect livestock by reducing milk production, causing weight loss, and increasing mortality rates. Understanding the interactions between ticks, pathogens, and hosts is crucial for developing effective control and prevention strategies.

TBDs in livestock are caused by a multitude of pathogens. Each disease presents unique challenges in terms of diagnosis, treatment, and management. The geographical distribution of TBDs is influenced by the ecology and behavior of the tick vectors, which in turn are affected by abiotic factors such as the climate, temperature, and humidity, and by biotic factors such as the availability of host animals and the presence of natural predators (Estrada-Peña *et al.* 2016). Understanding these factors is crucial for developing effective

strategies to control tick populations and mitigate the impact of tick-borne diseases on cattle (Lippi *et al.* 2021).

To effectively address the issue of TBDs in cattle, a multifaceted approach is required. This includes improving our understanding of the epidemiology and transmission mechanisms of these diseases, enhancing diagnostic and treatment methods, and implementing integrated pest management strategies. The purpose of this study is to provide a comprehensive overview of the major tick-borne diseases affecting cattle in North America and create a database according to it. It will explore the distribution of the various tick species involved in transmitting these diseases to cattle. The database developed will be the starting point to elaborate risk maps for different diseases to offer a broad overview of high-risk areas across North America.

Methodology

Using various bibliographic search engines, searches were conducted to address all tick species involved in the transmission of infectious diseases in cattle. Google Scholar, Web of Science, and Scopus were used to obtain comprehensive information. Keywords such as 'tick', 'tick-borne diseases', 'vector-borne diseases', 'cattle', 'livestock', 'America', and 'pathogens' were employed. Based on the results from various documents, including scientific articles, reports, books, and book chapters, information was compiled on all diseases affecting cattle, or at risk of affecting cattle, based on the presence and distribution of ticks in North America. Our study area was composed of the countries of Canada, USA, Mexico and the ones in the Caribbean region.

After compiling information of all TBDs that pose a risk to cattle, a database was developed to include all genera and species of ticks involved in the transmission of these diseases. This database covers both native ticks found in North America and exotic species that have recently been established in the region. Once identified the tick species with potential to transmit diseases to cattle, a search was conducted for data on the distribution of these species. Various repositories, databases, reports, and scientific articles were consulted to create a comprehensive database covering most of the documented distribution of these species. The repositories used include the Global Biodiversity Information Facility (GBIF), iNaturalist, Walter Reed Biosystematics Unit, and the SPOOC package (Owens *et al.* 2024), which sources information from GBIF, iNaturalist, eBird, Integrated Digitized Biocollections (iDigBio), VertNet, the Ocean Biogeographic Information System (OBIS), and the Atlas of Living Australia (ALA).

RESULTS AND DISCUSSION

A total of four cattle TBDs are present with the potential spread in North America due to the presence of competent vectors on the American territory. These diseases are: anaplasmosis, babesiosis, theileriosis, and heartwater.

Bovine anaplasmosis are due to infection with *Anaplasma marginale*, an obligate intracellular bacterium classified under the family *Anaplasmataceae*, order *Rickettsiales*. It

is the most widespread tick-borne disease affecting cattle worldwide, predominantly occurring in tropical and subtropical regions, but also present in temperate areas (Kocan *et al.* 2010, World Organization Animal Health 2024).

Bovine babesiosis, also known as piroplasmosis, Texas fever, red water disease, and cattle tick fever is caused by *Babesia bovis* and *B. bigemina*, protozoas in the family *Babesiidae*, order *Piroplasmida*. It was widely distributed in North America, till its final eradication from the US in 1961 (Barr *et al.* 1977). Nowadays it persists in Mexico, with prevalences higher of 90% in the southern regions (Salinas-Estrella *et al.* 2022).

Theileriosis is a disease caused by protozoa of the family *Theileriidae* in the order *Piroplasmida*. Over a dozen species of *Theileria* infect livestock, with varying impacts. While some species circulate asymptotically, others can lead to severe illness, marked by high morbidity and mortality rates. The *T. buffeli*/*T. orientalis* species, particularly the Ikeda genotype (type 2), has emerged as the predominant strain in recent outbreaks of oriental theileriosis, now reported in North America (Spickler 2019).

Heartwater results from infection by *Ehrlichia ruminantium*, a bacterium in the family *Anaplasmataceae* and order *Rickettsiales*. In North America is restricted to the Caribbean region, thought to be currently in Guadeloupe, Antigua and Marie Galante. The presence of heartwater in the Caribbean significantly heightens the risk of its introduction to mainland North America, either anthropically through the traffic of animals or naturally via the migration of cattle egrets (*Bubulcus ibis*) (Corn *et al.* 1993).

Regarding these TBDs, 14 tick species are present in North America with the potential to transmit these diseases to livestock. These species include: *Dermacentor hunteri*, *D. albipictus*, *D. andersoni*, *D. variabilis*, *D. occidentalis*, *Ixodes scapularis*, *Amblyomma cajennense*, *A. maculatum*, *A. variegatum*, *Haemaphysalis longicornis*, *H. punctata*, *Rhipicephalus microplus*, *R. annulatus*, and *R. sanguineus*. The distribution of these ticks, which are involved in pathogen transmission to American livestock, spans much of the territory from southern Mexico to Canada. However, their distribution is not uniform, highlighting that the risk to livestock is not evenly spread. Risk levels vary depending on environmental conditions that favor the presence and/or abundance of different species capable of disease transmission. Environmental factors such as temperature and humidity, along with ecological factors like suitable vegetation and the presence of wildlife that serve as hosts for these species, play a key role in the persistence and spread of these vectors.

Following the creation of the database, the next phase of this project involves developing distribution models for the selected species, considering environmental factors, cattle, and wildlife hosts. The distribution of various tick species appears to be insufficiently understood in certain regions. Consequently, the development of these models is intended to address these gaps by offering crucial insights into the spatial distribution and ecological dynamics of tick populations. Additionally, based on the tick species involved in each disease, we will integrate the different models to create risk maps for each specific disease. This will provide



a large-scale perspective, grounded in a One Health approach, to better understand the processes driving tick distribution. Such insights will be crucial for implementing effective disease control measures.

CONCLUSIONS

This study underscores the significant presence and potential spread of TBDs in North America, highlighting the diverse and geographically varied tick species capable of transmitting these pathogens. The identification of four major diseases—anaplasmosis, babesiosis, theileriosis, and heartwater—along with their respective vectors, emphasizes the need for comprehensive monitoring and risk assessment. The development of a geo-referenced database serves as a crucial foundation for creating distribution models that integrate the environment, livestock, and wildlife. By adopting a One Health approach, this research aims to enhance our understanding of tick distribution dynamics and inform targeted disease control strategies to mitigate the risks posed to livestock.

REFERENCES

- Barr, A.R., Brennan, J.M., Brown, A.W.A., Clifford, C.M., Daniel, M., Downs, W.G., Drummood, R.O., Funnann, D.P., Grace, T.D.C., Holland, G.P., Hoogstraal, H., Kumada, N., Marchette, N.J., Rageau, J., Sonenshine, D.E., Traub, R., Varma, M.G.R., Zeleddn, R., Graham, O.H. & Hourrigan, J.L. 1977. *Eradication programs for the arthropod parasites of livestock*.
- Corn, J.L., Barrel, N., Thiebot, B., Creekmore, T.E., Garris, G.I. & Nettles, V.F. 1993. *Potential Role of Cattle Egrets, Bubulcus ibis (Ciconiformes: Ardeidae), in the Dissemination of Amblyomma variegatum (Acari: Ixodidae) in the Eastern Caribbean*.
- Estrada-Peña, A., Alexander, N. & Wint, G.R.W. 2016. Perspectives on modelling the distribution of ticks for large areas: So far so good? *Parasit Vectors* 9: 1–10.
- Kocan, K.M., de la Fuente, J., Blouin, E.F., Coetzee, J.F. & Ewing, S.A. 2010. The natural history of *Anaplasma marginale*.
- Lippi, C.A., Ryan, S.J., White, A.L., Gaff, H.D. & Carlson, C.J. 2021. Trends and opportunities in tick-borne disease geography.
- Owens, H., Barve, V. & Chamberlain, S. 2024. spocc: Interface to Species Occurrence Data Sources.
- Jubb, T., Shephard, R., Webb-Ware, J. & Fordyce, G. 2015. *Priority list of endemic diseases for the red meat industries*.
- Railey, A.F. & Marsh, T.L. 2021. Economic Benefits of Diagnostic Testing in Livestock: Anaplasmosis in Cattle. *Front Vet Sci* 8.
- Salinas-Estrella, E., Ueti, M.W., Lobanov, V.A., Castillo-Payró, E., Lizcano-Mata, A., Badilla, C., Martínez-Ibáñez, F. & Mosqueda, J. 2022. Babesiosis and Theileriosis in North America. *Pathogens* 11: 1–21.

Sonenshine, D.E. & Roe, R.M. 2013. *Biology of ticks*. Oxford University Press, New York, USA.

Spickler, A.R. 2019. *Theileriosis in cattle and small ruminants*.

World Organization Animal Health. 2024. Bovine Anaplasmosis. In: *WOAH Terrestrial Manual 2024*.



NANOIXODICIDA BOTÁNICO PARA EL CONTROL DE *Rhipicephalus microplus*

BOTANICAL NANOIXODICIDE FOR THE CONTROL OF *Rhipicephalus microplus*

Romario García-Ponce¹; José Pablo Villarreal Villarreal²; Jesús Jaime Hernández Escareño²; José Ezequiel Viveros Valdez¹; Rocío Álvarez Román³; Sergio Arturo Galindo Rodríguez^{3*}

¹Universidad Autónoma de Nuevo León / Facultad de Ciencias Biológicas.

²Universidad Autónoma de Nuevo León / Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

³Universidad Autónoma de Nuevo León / Facultad de Medicina.

*Autor de correspondencia: sagrod@yahoo.com.mx

RESUMEN

Rhipicephalus microplus is of extreme importance in livestock farming due to its effects on productive losses and the health of cattle. The strategy used to control ticks is the application of ixodicide chemical agents, however, their continuous and indiscriminate use has given rise to multi-resistant tick populations and to environmental impacts. Due to this, the use of botanical compounds emerges as promising and environmentally friendly alternatives; however, these compounds have limitations such as their low solubility in water and low stability in the environment. Thus, the formulation of plant extracts in polymeric nanoparticles has been proposed as an alternative to facilitate their application and protect their components from environmental conditions, having the possibility of taking advantage and enhancing their acaricidal activity. In this work, a nanoformulation based on a compound of natural origin was developed and its acaricidal activity on *R. microplus* larvae was evaluated. The compound used was nanoencapsulated by the nanoprecipitation technique and the nanoparticles obtained were characterized based on their size, polydispersity index, ζ potential and active ingredient content. Subsequently, the acaricidal activity of the free compound and that incorporated in nanoparticles was evaluated by means of the larval immersion test. The nanoformulation presented an average size of 126.4 ± 4.67 nm, a polydispersity index of 0.149 ± 0.032 and a ζ potential of -14.89 ± 4.23 mV, which corresponds to optimal physicochemical characteristics to evaluate its lethality against ticks. In biological assays, the 50% Lethal Concentration of the free active ingredient and the nanoformulation was determined, showing that the acaricidal activity was higher when the active ingredient was nanoformulated. Likewise, the nanoformulation showed acaricidal activity, and could be considered as a possible treatment for tick control.

Palabras clave: Ticks, botanical compounds, nanoparticles, nanotechnology

INTRODUCCIÓN

La especie de garrapata *Rhipicephalus microplus* tiene un alto impacto en la ganadería mexicana con pérdidas económicas anuales estimadas en los 573.61 millones de dólares (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017). Esto se debe a su alimentación hematófaga que ocasiona pérdidas productivas y a que actúa como vector de agentes patógenos que causan enfermedades como la babesiosis y la anaplasmosis (De La Fuente *et al.*, 2008).

El método de control convencional se basa exclusivamente en el uso de productos químicos. Sin embargo, su aplicación excesiva y descontrolada ha dado lugar a una serie de problemas, que incluyen la generación de resistencia, contaminación ambiental, efectos tóxicos en especies no objetivo, problemas de residuos en alimentos y riesgos para la salud humana (Valsoni *et al.*, 2020; Vilela *et al.*, 2020)

Las tendencias actuales requieren desarrollar alternativas efectivas, seguras y rentables para el control de garrapatas, los cuales aporten soluciones a la problemáticas que se enfrentan los métodos de control convencional. En este contexto, el uso de compuestos derivados de plantas como agentes ixodicidas se consideran una alternativa prometedora de baja toxicidad y si efectos a la salud y el medio ambiente, además se cree tiene el potencial de ayudar a mitigar la resistencia (Adenubi *et al.*, 2018; Pavela y Benelli, 2016). Sin embargo, a pesar de su actividad ixodicida, no se han desarrollado productos comerciales debido a que dichos compuestos enfrentan desafíos para ser estandarizados y estabilizados además de ser solubles en solventes orgánicos tóxicos. Particularmente la piperina es un alcaloide que se encuentra en los frutos de diferentes especies de pimientos del género *Piper*. Este compuesto posee diversas actividades biológicas entre las que destaca su efecto acaricida contra larvas y hembras adultas ingurgitadas de *R. microplus* (Haq *et al.*, 2021; da Silva *et al.*, 2021). Sin embargo, su baja solubilidad en medios acuosos es una limitante para su aplicación biológica en el campo.

En este contexto, la incorporación de compuestos botánicos en sistemas nanoparticulados poliméricos puede ayudar en la estabilidad de los compuestos naturales dando solución a los problemas de solubilidad, eliminando el uso de solventes orgánicos que representen alguna toxicidad. Además, pueden promover la interacción con sistemas biológicos, facilitando la absorción de los compuestos activos, convirtiéndolos en una excelente alternativa para formular productos naturales aplicados al control de garrapatas (Irache *et al.*, 2011; Armendáriz-Barragán *et al.*, 2016; Figueiredo *et al.*, 2022).

Considerando la actividad de la piperina, se desarrolló y caracterizó una formulación que consistió en la incorporación del alcaloide en nanopartículas poliméricas, del cual se evaluó su efecto ixodicida contra larvas de *R. microplus*, con la finalidad de obtener un prototipo de formulación nanoixodicida de origen natural.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación y caracterización de nanopartículas poliméricas. Las nanopartículas cargadas con piperina se prepararon mediante la técnica de nanoprecipitación (Fessi *et al.*, 1989). Brevemente, se inyectaron 5 mL de una fase orgánica que contenía el polímero y piperina disueltos en una mezcla de solventes, en una fase acuosa que contenía alcohol polivinílico al 0.5 % (p/v). Posteriormente, se eliminaron los solventes utilizando un rotaevaporador (Control Laborota 4003, Heidolph Instruments, GER). Se obtuvieron dos formulaciones de nanopartículas las que contenían piperina (NP_Pip) y las nanopartículas sin piperina (NP_Bco). Las formulaciones se caracterizaron en función del tamaño de partícula, el índice de polidispersidad y potencial ζ en un equipo Zetasizer Nano-ZS90, Malvern Instruments, UK.

Cuantificación de piperina incorporada en nanopartículas. Se desarrolló un método analítico mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para la cuantificación de la piperina incorporada en las nanopartículas (NP). Se utilizó un sistema HPLC-Varian con

detector UV-Vis (Varian ProStar Modelo 325, USA) y una columna de fase reversa C18 (ZORBAX Eclipse XDB, 2.1 x 150 mm, 5 µm, Agilent Technologies®). El volumen de inyección fue de 10 µL de muestra y se mantuvo la temperatura de la columna a 30 °C. La curva de calibración se preparó utilizando cinco niveles de concentración, y la detección se realizó a 343 nm.

Para la cuantificación, las formulación se centrifugó a 25,000 RPM durante una hora (Allegra 64R Centrifuge, Beckman-Coulter, USA). Luego, se solubilizó el sedimento en la fase móvil y se inyectó en el HPLC realizando las diluciones correspondientes para cada formulación. Cada ensayo se realizó por triplicado. Finalmente, se determinó el porcentaje de encapsulación y porcentaje de eficiencia de encapsulación (% EE) utilizando las Fórmula 1 y 2.

$$\%E = \frac{(\text{mg de Piperina en NP})}{(\text{mg del polimero} + \text{mg totales de Piperina})} \times 100 \quad (1)$$

$$\%EE = \frac{\text{mg de piperina encapsulada}}{\text{mg totales de piperina}} \times 100 \quad (2)$$

Garrapatas y diagnostico de resistencia. Se recolectaron garrapatas hembra ingurgitadas de *R. microplus* de ganado naturalmente infestado y libre de tratamiento en una unidad de producción en el municipio de Tantoyuca, Veracruz, México (21°21'07.6" N y 98°14" W). Las cuales fueron incubadas a 28 ± 2°C y una humedad relativa del 80%-90% para inducir la oviposición. Después de la oviposición, los huevos fueron transferidos a tubos de ensayo y se mantuvieron en las mismas condiciones hasta la eclosión de las larvas. Posteriormente se realizó el diagnóstico de resistencia a ixodicidas químicos y los bioensayos con las nanopartículas para los que se utilizaron larvas de entre 7 y 14 días de edad.

El diagnóstico de resistencia a los principios activos de ixodicidas convencionales: amitraz, cipermetrina, clorpirifos y fipronil se realizó utilizando las Dosis discriminantes (DD) reportadas por Martínez-Ibáñez *et al.* (2021). Todos los ensayos se realizaron por triplicado, contabilizando larvas vivas y muertas, considerando como vivas aquellas capaces de caminar y como muertas aquellas incapaces de caminar.

Bioensayos con nanopartículas cargadas con piperina. La actividad ixodicida de la piperina sobre larvas de *R. microplus* se evaluó utilizando la prueba de inmersión de larvas modificada por Castro-Janer *et al.* (2009). El compuesto libre se evaluó a concentraciones de 375, 500, 750, 1000, 2000, 4000, 6000 y 7000 µg/ml. El efecto ixodicida de los tratamientos en tubos se evaluó transcurridas las 24 horas, tras las cuales se registró la cantidad de larvas vivas y muertas. Las nanopartículas cargadas con piperina se concentraron en un rotaevaporador (Control Laborota 4003, Heidolph Instruments, GER) y se evaluaron mediante la misma prueba a 140, 280, 560, 1120, 2240, 3360, 4480 y 5600 µg/ml. En caso de que la mortalidad en el grupo de control superara el 5%, se consideraba nula la prueba de bioensayo y se repetía.

Análisis estadístico. Para determinar la CL50 y CL90 junto con sus intervalos de confianza del 95%, se aplicó el análisis Probit utilizando el programa Polo-Plus (LeOra Software®), utilizando las mortalidades de larvas de las diferentes concentraciones evaluadas. Se consideraron diferencias significativas entre las concentraciones letales si los intervalos de confianza del 95% no se superponían (LeOra Software®).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Preparación y caracterización de nanopartículas poliméricas. La nanopartículas formulación NP_Pip presento tamaño de 156.4 ± 4.67 nm, índice de polidispersidad de 0.149 ± 0.032 y un potencial de ζ -26.89 ± 4.23 mV. La formulación NP_Bco evidenció tamaño de 110.4 ± 5.67 nm, índice de polidispersidad de 0.059 ± 0.062 y un potencial de ζ -18.88 ± 5.32 mV. Estos resultados son similares a los obtenidos por de Oliveira *et al.*, (2022) quienes desarrollaron nanopartículas poliméricas cargadas con piperina como tratamiento contra *Aedes aegypti* obteniendo resultados similares con tamaños de 187 nm, índices de polidispersidad de 0.116 y potencial ζ de -28.961. Estos resultados no indican que las características obtenidas en la nanoformulación pueden evaluarse contra organismos artrópodos.

Cuantificación de piperina incorporada en nanopartículas. En el método analítico desarrollado se obtuvo una curva de calibración con un coeficiente de correlación (R^2) de 0.9985, límite de detección (LD) de $1.56 \mu\text{g/mL}$, límite de cuantificación (LC) de $5.13 \mu\text{g/mL}$ y precisión de 6.2%. Para la formulación NP_Pip el valor de %E fue de 19.53 ± 1.67 y de % EE fue del 72.89 ± 7.34 . De manera similar Oliveira *et al.*, (2022) obtuvieron % E del 98.2, sin embargo, los autores utilizaron un componente lipídico en su formulación y su método analítico de cuantificación fue desarrollado empleando espectrofotometría UV-visible.

Garrapatas y diagnóstico de resistencia. Las evaluaciones de resistencia mediante dosis discriminantes evidenciaron que la población de garrapatas utilizada era resistente a cipermetrina y amitraz y susceptible a clorpirifos y fipronil. Estudios previos han documentado que *R. microplus* en México ha desarrollado resistencia a varios acaricidas comunes, entre ellos coumafos, clorpirifos, amitraz, cipermetrina y fipronil, entre otros (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2021).

Bioensayos con nanopartículas cargadas con piperina. En el bioensayo se demostró la actividad ixodocida de la piperina libre contra larvas de *R. microplus* resistentes a cipermetrina y amitraz con una CL50 y CL90 de 1795.34 y 5891.56 $\mu\text{g/ml}$. La formulación NP_Pip contra larvas de *R. microplus* evidenció una CL50 y CL90 de 700.965 y 2813.234 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. La formulación NP_Bco no evidenció mortalidad sobre larvas de la garrapata ya que se incluyó en las pruebas como control negativo. De manera general, se logró observar que la piperina incorporada en NP presentó mayor actividad ixodocida que la piperina libre. El desarrollo de tratamientos contra garrapatas utilizando nanopartículas como sistemas de liberación de productos naturales es un área de investigación emergente, por lo que, hay pocas investigaciones al respecto destacando a nuestra investigación como el primer informe que evalúa un compuesto natural contra larvas de *R. microplus* resistentes a acaricidas convencionales.

CONCLUSIONES

Se logró obtener una formulación de nanopartículas poliméricas estable cargadas con un compuesto de origen natural, la cual presento actividad ixodocida contra larvas de *R. microplus* resistentes a cipermetrina y amitraz. Además, se observaron diferencias

significativas al compararse con la piperina no encapsulada, lo que indicó que la incorporación en nanopartículas poliméricas favoreció la actividad ixodida de la piperina. Esta formulación podrían ser una opción viable para el control de garrapatas.

LITERATURA CITADA

- Adenubi, O.T., Ahmed, A.S., Fasina, F.O., McGaw, L.J., Eloff, J.N., Naidoo, V. 2018. Pesticidal Plants as a Possible Alternative to Synthetic Acaricides in Tick Control: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ind Crops Prod*, 123, 779–806.
- Armendáriz-Barragán, B., Zafar, N., Badri, W., Galindo-Rodríguez, S.A., Kabbaj, D., Fessi, H., Elaissari, A. Plant Extracts: From Encapsulation to Application. *Expert Opin Drug Deliv* 2016, 13, 1165–1175.
- da Silva, G.D., de Lima, H.G., de Freitas, H.F., da Rocha Pita, S.S., dos Santos Luz, Y., de Figueiredo, M.P., Uzêda, R.S., Branco, A., Costa, S.L., Batatinha, M.J.M. 2021. In Vitro and in Silico Studies of the Larvicidal and Anticholinesterase Activities of Berberine and Piperine Alkaloids on *Rhipicephalus Microplus*. *Ticks Tick Borne Dis*, 12.
- De La Fuente, J., Estrada-Pena, A., Venzal, J.M., Kocan, K.M., Sonenshine, D.E. 2008. Overview: Ticks as Vectors of Pathogens That Cause Disease in Humans and Animals. *Frontiers in Bioscience*, 13, 6938.
- Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J.P., Ammoury, N., Benita, S. 1989. Nanocapsule Formation by Interfacial Polymer Deposition Following Solvent Displacement. *Int J Pharm*, 55, R1–R4.
- Figueiredo, A., Anholetto, L.A., Cola, D.F., Fantatto, R.R., Santos, I.B., Gainza, Y.A., Sousa, G.A., Pickett, L.J., Fraceto, L.F., Chagas, A.C. 2022. Nanoformulations with Synthetic and Plant-Derived Compounds for Cattle Tick Control. *Vet Parasitol*, 309.
- Irache, J.M., Esparza, I., Gamazo, C., Agüeros, M., Espuelas, S. 2011. Nanomedicine: Novel Approaches in Human and Veterinary Therapeutics. *Vet Parasitol*, 180, 47–71.
- Martínez Ibañez, F., Miranda-Miranda, E., Jasso-Villazul, C.E., Cossío-Bayúgar, R. 2021. Reference Tick Strains as an Important Biological Marker for Acaricide-Resistance Characterization. In *The Entomological Guide to Rhipicephalus*; Kumar, S., Cossio-Bayugar, R., Kumar Sharma, A., Miranda Miranda, E., Kumar Chaubey, A., Eds.; Nova Science Publishers: New York, pp. 177–200.
- Rodríguez-Vivas, R.I., España, E.R., Blanco, I.L., Ojeda-Chi, M.M., Trinidad-Martinez, I., Islas, J.A.T., Bhushan, C. 2021. Monitoring the Resistance of *Rhipicephalus microplus* to Amitraz, Flumethrin, Coumaphos, and Ivermectin on Cattle Farms in Mexico. *Vet Parasitol Reg Stud Reports*, 26.
- Rodríguez-Vivas, R.I., Grisi, L., Pérez de León, A.A., Silva Villela, H., Torres-Acosta, J.F., Fragoso Sánchez, H.F., Salas, D.R., Cruz, R.R., Saldierna, F., Carrasco, D.G. 2017. Potential Economic Impact Assessment for Cattle Parasites in Mexico. *Rev Mex Cienc Pecu*, 8, 61–74.
- Valsoni, L.M., Freitas, M.G., Echeverria, J.T., Borges, D.G.L., Tutija, J., Borges, F. 2020. Resistance to All Chemical Groups of Acaricides in a Single Isolate of *Rhipicephalus microplus* in Mato Grosso Do Sul, Brazil. *Int J Acarol*, 46, 276–280.
- Vilela, V.L.R., Feitosa, T.F., Bezerra, R.A., Klafke, G.M., Riet-Correa, F. 2020. Multiple Acaricide-Resistant *Rhipicephalus microplus* in the Semi-Arid Region of Paraíba State, Brazil. *Ticks Tick Borne Dis*, 11.

EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE LA VITELOGENINA PARA EL DESARROLLO DE UNA VACUNA CONTRA LA GARRAPATA *AMBLYOMMA MIXTUM*.

EVALUATION OF THE IMMUNOGENICITY OF VITELLOGENIN FOR THE DEVELOPMENT OF A VACCINE AGAINST *AMBLYOMMA MIXTUM* TICK.

Alejandra Guerra Elías, Roberto I. Guerrero-Solorio, Juan J. Mosqueda Gualito.

Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro.
aguerra29@alumnos.uaq.mx

Ticks are ectoparasitic arthropods that are vectors of pathogens that are important in veterinary and public health. In beef cattle, the tick *Amblyomma mixtum* is considered the second most important genus in Mexico, after *Rhipicephalus microplus*. It is capable of causing damage to animals and transmitting disease-causing pathogens, so it is advisable to design programs for its control. Vaccination is an effective, ecological and economically viable alternative to the use of Ixodocides. In studies carried out, some antigens were determined to intervene with the physiological development of the tick at all stages of its life. In this project, the immunogenicity of various Vitellogenin peptides were evaluated by immunizing a group of rabbits to select the peptides that generate considerable antibody titers. The purpose of the research is based on selecting immunogenic peptides in the animal to later carry out an experimental challenge and evaluate changes in the development of the tick and, in this way, influence the control of tick populations, reducing the impact on the country's livestock, preventing the transmission of diseases of importance to public health and the permanence of pathogens, also reducing the use of Ixodocides, generating a lower environmental impact and the reduction of chemical consumption in food of animal origin.

Palabras clave: Garrapata, *Amblyomma*, vitelogenina, anticuerpos, vacuna.

a. Introducción

Las garrapatas son artrópodos ectoparásitos de animales domésticos, silvestres y humanos que cumplen su ciclo de vida en uno o más hospedantes, son vectores de patógenos importantes en la salud veterinaria y de salud pública (Mathinson and Pritt, 2014; Cooley & Kohls, 1944). En México no se cuenta con suficiente información acerca del impacto económico que tiene el género *Amblyomma*, sin embargo, es considerada el segundo género más importante en la ganadería bovina, solo después de *Rhipicephalus microplus*, ya que se encuentra ampliamente distribuida y está implicada en problemas de salud animal (Rodríguez Vivas et al., 2006; Alonso Díaz et al., 2013; Rivera Páez et al., 2016). De manera directa, las garrapatas del género *Amblyomma* son capaces de ocasionar daño en la piel por el tamaño de las piezas bucales y el volumen de sangre que consumen, lo

que puede llevar a los animales a padecer estados de anemia en parasitosis severas; de forma indirecta, es capaz de transmitir patógenos causantes de enfermedades, como la Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas, otras Rickettsiosis, Heartwater, Tularemia enzoótica, etc. (De Lemos et al., 1997). Se ha estimado que las pérdidas por las infestaciones de garrapatas y las enfermedades que transmiten están entre los 13.9 y los 18.7 mil millones de dólares (FAO, 2010; INEGI, 2007). Dentro del género *Amblyomma* se incluyen varias especies, *A. cajennense* se describe como la de mayor importancia en México (Woodman, 1983). En trabajos previos este taxón se reorganizó en un complejo de seis especies válidas; *A. cajennense sensu stricto*, *A. mixtum*, *A. sculptum*, *A. interandinum*, *A. tonelliae* y *A. patinoi*. (Rivera Páez et al., 2016). Neumann (1899) consideró sinónimo a *A. cajennense* con *A. mixtum*, siendo la segunda garrapata de mayor importancia en bovinos en el trópico mexicano (América Nava et al., 2014). Está asociada a bovinos y equinos, sin embargo, puede parasitar varios hospedantes, incluyendo a los humanos (Rodríguez Vivas et al., 2016).

Resulta de vital importancia encontrar un método de control eficaz contra esta garrapata, la vacunación resulta una alternativa efectiva, ecológica y económicamente viable al uso de Ixodicidas. Actualmente no existe registro de alguna vacuna desarrollada contra *Amblyomma mixtum* (De la Fuente y Koncan, 2006). De la Fuente y Contreras (2015) mencionan que el desarrollo de vacunas contra garrapatas se basan en la identificación de proteínas con una función biológica relevante, es decir, aquellas que participan en la regulación fisiológica, la modulación de la respuesta inmune del hospedante y la transmisión de patógenos.

En estudios realizados (Tellam et al., 2002; Contreras y de la Fuente, 2016; Guerrero et al., 2014) se determinaron diversos antígenos con eficacia considerable en otras especies de garrapatas. Las vitelogeninas son un grupo de proteínas que se sintetizan en los ovarios, intestinos y cuerpo graso de la garrapata; se libera en la hemolinfa para que los ovocitos la tomen; interviene en el proceso de formación de huevos, en la embriogénesis y es la principal fuente de nutrientes para el embrión (Xavier et al., 2018). La interrupción de la vitelogenina puede provocar la disfunción de algunas actividades primordiales de las garrapatas, como la de las células intestinales; la proteinasa está involucrada en la digestión del alimento dentro del intestino, la detoxificación de agentes nocivos como insecticidas, la activación de la cascada de la fenoloxidasasa en respuesta a infecciones bacterianas, entre otras (Robles Graham, 2020). Con base en esto, se espera que una garrapata alimentada en un animal inmunizado con péptidos basados en la proteína Vitelogenina, tenga un cambio en su desarrollo fisiológico, principalmente disminuir la viabilidad de los ovocitos de la siguiente generación evitando la entrada de itelogenina al ovocito (Wang & Nuttall, 1999).

Los conejos son una especie animal favorable para la generación y obtención de anticuerpos contra los péptidos candidatos, esto debido a que son capaces de producir una elevada cantidad de anticuerpos de excelente calidad, logrando optimizar experimentos posteriores; otra ventaja son las áreas reducidas que los requerimientos espaciales pide, además del menor riesgo para el personal que

implica en el manejo de los animales. Se decidió la utilización de la raza Nueva Zelanda por las orejas de gran tamaño que facilitan la recolección de sangre de los vasos sanguíneos auriculares. La utilización de conejos en un sistema *in vivo* (animales vivos) es una opción económica y de manejo factible que resulta necesario para la generación de anticuerpos contra los péptidos de Vitelogenina, proteínas que se espera reconozcan los epítomos en la garrapata *Amblyomma mixtum* y así, realizar un ensayo de desafío por medio de infestaciones experimentales en animales con anticuerpos específicos contra estas proteínas e identificar aquellas que sean capaces de intervenir con la función biológica del artrópodo, es decir, la capacidad de sobrevivencia y reproductiva.

b. Materiales y Métodos

Materiales para toma y análisis de muestras sanguíneas: Aguja calibre 23-25, guante, tubos Vacutainer de extracción sanguínea, torundas de algodón y alcohol etílico.

Materiales para técnica de ELISA: Microplacas ELISA, reactivos para elaboración de placas ELISA, puntas de micropipeta 10, 20, 1000 uL, suero de animales inmunizados.

Péptidos experimentales: Diez fueron seleccionados para este trabajo, fueron previamente diseñados y sintetizados a partir de un proyecto de investigación realizado por Guerrero-Solorio (investigación en curso aún no publicada). Los cuales corresponden a Vg1Amix1, Vg1Amix2, Vg1Amix3, Vg1Amix4, Vg1Amix5, Vg2Amix1, Vg2Amix2, Vg2Amix3, Vg2Amix4 y Vg2Amix5. Para el análisis de la inmunogenicidad de cada péptido se utilizaron 2 conejos, un total de 20 animales, más 2 conejos como grupo control (22 animales en total).

Metodología:

Criterios de inclusión y exclusión: Se realizaron análisis de muestras en conejos experimentales para determinar su estado de salud. Se constató el estado de salud de los animales a través de un examen químico sanguíneo, biometría hemática y exámenes coproparasitológicos semanales (prueba de flotación y concentración para evidenciar estructuras parasitarias). Se realizó evaluación del estrés en los conejos diariamente durante todo el transcurso del proyecto para determinar su bienestar. Se realizó un examen sanguíneo con la finalidad de obtener el suero de los conejos pre inmunización.

Formulación de las dosis vacunales: Se resuspendieron los péptidos sintéticos con PBS estéril (ph 7.4) y se determinó la concentración en cada uno de ellos para realizar las dosis vacunales. Las formulaciones fueron realizadas a una dosis 50:50 (PBS + péptido : Adyuvante Montanide Isa71 by Seppic). Se prepararon 3 ml para cada dosis vacunal con la finalidad de administrar 1 ml a cada conejo de los grupos experimentales (2 conejos para cada péptido). Con la ayuda de un sonicador se realizó la homogeneización de las vacunas, con la finalidad de obtener micelas menores a 5µm, fue necesario realizar 4 ciclos de 10 minutos cada uno.

Administración de las vacunas: Se administraron las dosis vacunales vía subdérmica en la región dorsal de los animales. El traslado de las vacunas desde el laboratorio de elaboración hasta la unidad de producción se realizó con una hielera y anticongelantes en su interior. Se administraron 4 dosis vacunales en cada conejo en un intervalo de 21 días entre cada una.

Sangrado de animales: Para la recolección de sangre de conejos para la obtención de suero tras cumplir 21 días de cada inmunización, se realizó el método de extracción de sangre en conejos: La sujeción debe ser suave y firme (evitar inseguridad y forcejeo). Es necesario ubicar al conejo a la orilla de una mesa y posicionarlo al cuerpo de la persona que lo manipula, abrazarlo con la región del codo y retener su cabeza con la mano. Debe procurarse la mayor asepsia posible para las muestras serológicas mediante venopuntura, desinfectando con alcohol al 96% la región de la oreja. Para la extracción de sangre utilizar una aguja del orden 22G x 32mm. Localizar de manera exacta la arteria auricular y su dilatación antes de pinchar el vaso. Perforar la piel y la arteria con la aguja en un solo movimiento, dirigiendo la punta de la aguja un poco más arriba de la arteria, de manera que el ángulo de penetración sea casi paralelo a la arteria. Recolectar la sangre en un tubo Vacutainer, al finalizar la extracción, mantener una presión suave con un algodón limpio en el lugar y retirar la aguja, presionar durante 30-60 segundos aproximadamente, hasta detener el sangrado. Corroborar que no vuelva a producir sangrado, devolver al animal a su jaula y supervisarlos en los próximos 10-15 minutos.

Análisis estadístico: Se evaluó la eficiencia antigénica de cada péptido mediante el monitoreo de los anticuerpos por la técnica de ELISA indirecta. Se estandarizaron los valores a utilizar en la sensibilización de la placa de ELISA y la concentración del anticuerpo primario (suero de los conejos inmunizados). Se realizaron gráficas representativas de la densidad óptica de las placas de ELISA para evaluar la respuesta antigénica y realizar un descarte de los péptidos que no generen valores representativos de la experimentación.

c. Resultados y Discusión

Al momento de evaluar los criterios de inclusión y exclusión, así como la evaluación de estrés en los conejos, se determinaron 22 individuos como "aptos para continuar" en el proyecto de investigación para ser inmunizados. Las dosis vacunales se elaboraron de manera individual por cada uno de los péptidos analizados, para cada una de las inmunizaciones en los animales experimentales. Se observó en el microscopio el tamaño de las micelas de las dosis vacunales visualizando un campo homogéneo con un tamaño similar a los 2 μ m. Lindbland (2004) menciona que las micelas de 1-2 μ m de diámetro presentan un tamaño adecuado para que las células presentadoras de antígeno logren fagocitar correctamente estas micelas. Durante la inmunización de los animales experimentales, no se presentó signología en los individuos al momento de la inoculación; esto confirma la seguridad de las vacunas elaboradas (Klimka *et al.*, 2015).

Para determinar la inmunogenicidad de los péptidos inoculados en las pruebas de ELISA, se estandarizó la concentración de péptido utilizado en la sensibilización de las placas con valores de 2.50 µg/µL de péptido, dichos valores son similares a los utilizados por Robles Graham (2020) que utiliza 3-5 µg/µL para demostrar la densidad óptica en ELISAS indirectas, Patarroyo *et al* (2002) y Tafúr Gómez *et al* (2020) utilizan concentraciones de 5 y 2 µg/µL para demostrar la presencia de anticuerpos en las placas de ELISA indirecta respectivamente.

Se observaron diversas reacciones antígeno-anticuerpo específicas en cada una de las proteínas. Los péptidos Vg1Amix1 y Vg1Amix4 no presentaron diferencia significativa comparados con los valores de la densidad óptica del Grupo Control, correspondientes a valores menores a 0.1. Sin embargo, los péptidos Vg1Amix2, Vg1Amix5, Vg2Amix1, Vg2Amix2, Vg2Amix3, Vg2Amix4 y Vg2Amix5 reflejaron valores en la Densidad Óptica desde 0.15 hasta 0.35, con diluciones del anticuerpo primario de 1:200. Las proteínas Vg1Amix2, Vg1Amix5, Vg2Amix2, Vg2Amix3, Vg2Amix4 y Vg2Amix5 alcanzaron una respuesta inmunitaria más alta en la segunda aplicación y mantuvieron dichos valores hasta la cuarta inmunización. Mientras que, Vg2Amix1 alcanzó el valor más alto en la Densidad Óptica hasta la cuarta inmunización. Sin embargo, una vez que llegaron a su punto más alto de anticuerpos se mantuvieron tras aplicar las dosis subsecuentes. Se descartaron los péptidos Vg1Amix1 y Vg1Amix4 debido a que no se registró una respuesta adecuada o considerable.

El desarrollo de inmunógenos contra esta garrapata puede incidir en el control de poblaciones de la misma, evitando la afectación a la ganadería bovina del país, así como evitando la diseminación del vector en el territorio nacional, previniendo de este modo la transmisión de enfermedades de importancia en salud pública y la permanencia de patógenos en reservorios naturales que permitan su prevalencia y acceso a animales domésticos y al humano. Los trabajos de la anatomía y morfología interna de las garrapatas son muy limitados (Sonenshine, 1991) debido a la falta de estudios con respecto a la morfología del tracto reproductor femenino y al péptido Vitelogenina (Eloisi Denardia *et al*, 2004). Se hipotetiza que las garrapatas alimentadas con conejos vacunados con Vitelogenina manifiesten respuestas similares que las ocurridas con la Vitelina, proteína que deriva de un procesamiento proteolítico de la proteína precursora Vitelogenina. Se espera que se reduzca la cantidad de garrapatas ingurgitadas con pesos disminuidos y una oviposición reducida, tal como en el caso de Tellam *et al* (2001) que utilizó un ensayo de vacunación con un modelo de oveja huésped inmunizados con vitelina, para alimentar garrapatas *Boophilus microplus* y observar la reducción de la oviposición y de garrapatas hembras ingurgitadas con pesos disminuidos, concluyen que la vitelina podría incidir en respuestas inmunes que protegen al hospedante de la garrapata.

d. Conclusiones



Las dosis vacunales realizadas para inmunizar conejos con péptidos de Vitelogenina no presentan algún riesgo para los animales durante su inoculación ni posterior a ello. Los péptidos Vg1Amix1 y Vg1Amix4 no presentaron efectos inmunogénicos en conejos. Los péptidos Vg1Amix2, Vg1Amix5, Vg2Amix1, Vg2Amix2, Vg2Amix3, Vg2Amix4 y Vg2Amix5 presentaron efectos inmunogénicos considerables en conejos. Los péptidos Vg1Amix2, Vg1Amix5, Vg2Amix2, Vg2Amix3, Vg2Amix4 y Vg2Amix5 alcanzaron una respuesta inmunitaria más alta en la segunda inmunización y mantuvieron dichos valores hasta la cuarta inmunización. El péptido Vg2Amix1 generó mayor producción de anticuerpos solo hasta la cuarta inmunización. No se observó disminución en la cantidad de anticuerpos durante el periodo transcurrido entre cada inmunización con cada uno de los péptidos.

e. Literatura citada

Alonso-Diaz, M. A., Fernandez-Salas, A., Martinez-Ibanez, F. and Osorio-Miranda, J. 2013. *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) tick populations susceptible or resistant to acaricides in the Mexican Tropics. *Vet Parasitol* 197(1-2): 326-31.

Corona-Guerrero, I., Camacho-Nuez, M., Carbajal-Gámez, B. I. and Mosqueda, J. 2017. Caracterización molecular del gen del canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC) en *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Ixodida: Ixodidae) y *Rhipicephalus annulatus* Say (Ixodida: Ixodidae). *Entomología Mexicana* 4: 633 - 638.

Cooley, R. A. & Kohls, G. M. 1944. The Genus *Amblyomma* (Ixodidae) in the United States. *The Journal of Parasitology*. Vol. 30, No. 2 (Apr., 1944), pp. 77-111.

De Lemos ER, Machado RD, Pires FD, Machado SL, da Costa LM, Coura JR. Rickettsiae-infected ticks in an endemic area of spotted fever in the State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1997 Jul-Aug;92(4):477-81. doi: 10.1590/s0074-02761997000400005. PMID: 9361740.

De la Fuente J, Kocan KM. Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. *Parasite Immunol*. 2006 Jul;28(7):275-83. doi: 10.1111/j.1365-3024.2006.00828.x. PMID: 16842264.

De la Fuente J, Contreras M. Tick vaccines: current status and future directions. *Expert Rev Vaccines*. 2015;14(10):1367-76. doi: 10.1586/14760584.2015.1076339. Epub 2015 Aug 6. PMID: 26289976.

Guerrero, F. D., R. Andreotti, K. G. Bendele, R. C. Cunha, R. J. Miller, K. Yeater, and A. A. Perez de Leon. 2014. *Rhipicephalus (boophilus) microplus*

aquaporin as an effective vaccine antigen to protect against cattle tick infestations. *Parasit Vectors* 7: 475.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). *Ganadería bovina en América Latina: Escenarios 2008-2009 y tendencias del sector*. Santiago de Chile. 2010.

Rivera-Páez FA, Labruna MB, Martins TF, Sampieri BR, Camargo-Mathias MI. *Amblyomma mixtum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae): First record confirmation in Colombia using morphological and molecular analyses. *Ticks Tick Borne Dis*. 2016 Jul; 7(5):842-848. doi: 10.1016/j.ttbdis.2016.03.020. Epub 2016 Apr 1. PMID: 27062448.

Tellam, R. L., Kemp, D., Riding, S., Broscoe, D., Smith, P., Sharp, D., Irving, P. y Willadsen, P. 2001. Reduced oviposition of *Boophilus microplus* feeding on sheep vaccinated with vitellin. Elsevier Science. B.V. All right reserved. PII: S0304-4017(01)00573-8.

Wang H, Nuttall PA. Immunoglobulin-binding proteins in ticks: new target for vaccine development against a blood-feeding parasite. *Cell Mol Life Sci*. 1999 Oct 15;56(3-4):286-95. doi: 10.1007/s000180050430. PMID: 11212356.

Xavier, M.A., Tirloni, L., Pinto, A.F.M. *et al*. A proteomic insight into vitellogenesis during tick ovary maturation. *Sci Rep* 8, 4698 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23090-2>

Detección molecular de patógenos transmitidos por artrópodos en *Desmodus rotundus* de México.

Molecular detection of arthropod-borne pathogens in *Desmodus rotundus* from Mexico.

Edgar Hurtado Mendoza^{1,2}, Álvaro Aguilar-Setién⁴, Diego Josimar Hernández Silva¹, Consuelo Almazán García¹, Daniel Gustavo López Díaz^{1,3}, Chyntia Quetzalli Pérez Almeida^{1,3}, Cenia Almazán Marín⁴, Nidia Aréchiga Ceballos⁵, Ignacio Olave Leyva⁵, Rafael Flores Ávila⁷, Victoria Pando Robles⁸, Juan Mosqueda¹.

¹Laboratorio de Investigación en Inmunología y Vacunas (LINVAS), Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro.

²Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro.

³Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Querétaro.

⁴Unidad de Investigación Médica en Inmunología. Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI.

⁵Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE)

⁶Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, (UAEH)

⁷Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT)

⁸Instituto Nacional de Salud Pública (INSP)

ehurtado16@alumnos.uaq.mx

Palabras Clave: Chiroptera, vectores, *Desmodus*, arbovirus, *Orthoflavivirus*.

ABSTRACT

The order Chiroptera is a group of mammals with more than 1400 species. They have the unique ability to fly, have a long lifespan, some species migrate long distances, and other species remain in hibernation. Bats are important for ecosystem services for humans due to their role in activities such as pollination, seed dispersal and the control of arthropods, which can be potential vectors for some infectious diseases.

An important feature of chiropterans is their ability to host some agents related with some pathogens of public health concern; however, the role of bats within the dynamics of those pathogens must be studied in detail.

One of the most important groups of pathogens with great concern on public health are the arthropod-borne pathogens, which according to the WHO, represents 17% of infectious diseases, being responsible for more than 700,000 deaths in the world every year.

Desmodus rotundus is one of the three hematophagous bat species around the world. In addition to its role as a reservoir and transmitter of rabies, its importance lies in its proximity with livestock and domestic species on which it feeds, which could increase the probability of contact with humans and the probability of transmission of infectious agents in both directions.



The objective of the current study is the detection of arthropod-borne pathogens using molecular detection assays such as PCR and RT-PCR in blood and organs obtained from *Desmodus rotundus* specimens captured in three states of Mexico. Generic primers were used to detect nucleic acids from *Babesia*, *Rickettsia*, *Orthoflavivirus* and *Alphavirus*.

Keywords: Chiroptera, vectors, *Desmodus*, Arbovirus, *Orthoflavivirus*.

INTRODUCCIÓN.

Los quirópteros representan el único grupo taxonómico de mamíferos que presentan la capacidad de volar. Se trata de un grupo muy diverso, que se divide actualmente en 18 familias, 202 géneros y 1,400 especies con distribución cosmopolita, exceptuando los polos norte y sur (Scheffer et al., 2022; Xu et al., 2022) En México existen más de 140 especies de murciélagos, de las cuales cerca de veinte (aproximadamente el 13%) son endémicas (Sil-Berra et al., 2022) Se trata del segundo orden de mamíferos con mayor cantidad de especies, solo después del orden Rodentia, y representa un 20% de la diversidad de mamíferos a nivel mundial (Taylor, 2019).

Los murciélagos, constituyen un reservorio importante de microorganismo vinculados con agentes altamente patógenos responsables de enfermedades emergentes y reemergentes como: Nipah y Hendra; COVID-19 y SARS; Ébola y rabia. Así como agentes bacterianos y parasitarios algunos de ellos estrechamente relacionados con agentes zoonóticos de importancia para la salud pública; sin embargo, su papel dentro de las dinámicas de dichos agentes aún debe ser estudiado a detalle (Sotomayor-Bonilla et al., 2014; Aréchiga-Ceballos et al., 2024).

Gran parte de la investigación en murciélagos ha sido enfocada principalmente en agentes virales; sin embargo, el estudio de parásitos y bacterias que utilizan algún vector artrópodo como mecanismo de transmisión, también ha ido cobrando cada vez mayor interés e importancia (Afonso & Goydadin, 2018).

Los quirópteros, además, poseen una amplia gama de ectoparásitos hematófagos que potencialmente pueden participar como vectores de diferentes agentes transmitidos por artrópodos con importancia para la salud pública y veterinaria (Ly et al., 2018; Fagre & Kading, 2019). Entre los principales ectoparásitos hematófagos presentes en quirópteros son hemípteros (familia Cimicidae), dípteros (familia Hippoboscoidea), garrapatas (familias Ixodidae y Argasidae) así como distintas especies de ácaros (familias Macronyssidae, Dermanyssidae y Spitulnicidae) (Fagre & Kading, 2019; Tendu et al, 2022).

Entre los grupos de patógenos con mayor importancia para la salud pública y cuya presencia ha sido demostrada en algunas especies de quirópteros, son los agentes transmitidos por artrópodos; los cuales, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, representan el 17% de las enfermedades infecciosas, causantes de alrededor de 700 mil muertes anuales, y las cuales pueden ser causadas por agentes virales, bacterianos o parasitarios (WHO, 2024).

Existen reportes en distintas partes del mundo de la presencia de material genético de agentes bacterianos y parasitarios asociados a garrapatas. Tanto en matrices biológicas de murciélagos, como en sus ectoparásitos se han identificado agentes de los géneros

Rickettsia, *Ehrlichia*, *Babesia*, *Theileria*, *Anaplasma*, *Neorickettsia*, (Sokolovschi et al., 2012; Lv et al., 2018; Mello et al., 2024), y *Borrelia* (Colunga-Salas et al., 2021).

De igual manera existen reportes de varios grupos virales transmitidos por artrópodos en quirópteros, entre los cuales se encuentran las familias: Asfaviridae, Rhabdoviridae, Orthomixoviridae, Reoviridae, Filoviridae, Paramyxoviridae y Peribunyviridae así como las familias Togaviridae a la cual pertenece el género *Alphavirus* y donde se encuentran clasificados virus como el Chikungunya y varias encefalitis equinas; y Flaviviridae, familia dentro de la cual se agrupa el género *Orthoflavivirus* en el cual se encuentran virus como el Dengue, Zika, Powassan, entre otros (Kemensi & Banayi, 2019; Tendu et al., 2022).

La subfamilia Desmodontinae (Phyllostomidae) está formada por tres especies de murciélagos hematófagos: *Diphylla eucaudata* (murciélago vampiro de patas peludas) y *Diaemus youngi* (murciélago vampiro de alas blancas) cuya dieta altamente especializada está basada en sangre de aves; y *Desmodus rotundus* (murciélago vampiro común) que se alimenta por lo general, de sangre de otros mamíferos silvestres y domésticos, aunque se conoce su capacidad para consumir sangre de otros grupos taxonómicos como reptiles, anfibios y aves, aunque no sean su fuente principal de alimento (Villa, 1976; Greenhall et al., 1983).

La relevancia de *Desmodus rotundus* radica en la proximidad que presenta con el ganado y animales de compañía, de los cuales se alimenta, lo que aumenta la probabilidad de contacto con el humano y por lo tanto la probabilidad de la transmisión de ectoparásitos y agentes infecciosos en ambos sentidos (Scheffer et al., 2022).

MATERIALES Y MÉTODOS.

El presente trabajo fue realizado bajo la autorización y siguiendo las recomendaciones y lineamientos del Comité de Bioética de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ), la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) y el Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE).

Las capturas de los ejemplares de *Desmodus rotundus* se realizaron en 3 estados de la República Mexicana: Querétaro (Jalpan de Serra), Hidalgo (Progreso de Obregón) y Tabasco (Poaná), obteniendo 10 ejemplares machos adultos de cada localidad, mediante el uso de redes de niebla de 3 a 12 metros de largo, con abertura de malla de entre 30-36 mm, las cuales fueron establecidas en potreros y en refugios cercanos a estos, mismas que fueron revisadas para corroborar la captura de los ejemplares con intervalos de 5 a 10 minutos (Kunz & Kurta, 1988; Bracamonte, 2018; Darras et al., 2021) durante un total aproximado de 7 horas (7 pm- 2 am) (Romero-Barrera et al., 2021). Posteriormente se llevó a cabo la identificación taxonómica de los individuos capturados y la subsecuente liberación inmediata y cuidadosa de ejemplares juveniles, hembras gestantes y hembras lactantes; así como de cualquier ejemplar de cualquier especie distinta a *Desmodus rotundus*.

Cada ejemplar de *Desmodus rotundus* capturado fue retirado de las redes y resguardado en sacos de tela, dispuestos en lugares oscuros y con los menores disturbios auditivos y vibratorios posibles tratando de evitar al máximo la generación de estrés en los ejemplares; hasta su turno de muestreo asignando un código de identificación único por individuo.

La eutanasia de los ejemplares se llevó a cabo con base en los protocolos de los manuales de la American Veterinary Medical Association (AVMA), Guidelines for the euthanasia of animals (2020) y de la Institutional Animal Care and Use Comitee (IACUC), Standard Operating Procedure for the Study of Bats in the Field (Ellison, 2023), usando una dosis de sedante para insensibilización, previa a una sobredosis de anestesia; atendiendo en todo momento las recomendaciones de la NOM-033-SAG/ZOO -2014 sobre los Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres.

Los tejidos y cadáveres fueron manejados conforme a los protocolos y lineamientos siguientes documentos: “Wild bat & rodent capture, handling and fieldwork” (UASLP, 2017), “Methods for trapping and sampling small mammals for virologic testing” (Mills et al, 1995) publicado por el CDC y Standard Operating Procedure for the Study of Bats in the Field (Ellison, 2023).

Para la obtención de muestras hematológicas para la realización de frotis sanguíneos y para la extracción de ácidos nucleicos, se contuvieron manualmente a los ejemplares y se realizó la venopunción en las vena braquial o mediante punción cardiaca, previa antisepsia con etanol 70%, con aguja de 25 a 30 ga de acuerdo con el tamaño del ejemplar. Una vez tomada la muestra se aplicó hemostasia mecánica en la zona para disminuir en lo posible la aparición de hematomas. Los frotis sanguíneos fueron realizados *in situ*.

Las muestras hematológicas para la extracción de ácidos nucleicos fueron almacenadas en tubos con EDTA y resguardadas temporalmente a -4°C hasta su arribo al laboratorio donde fueron almacenadas a -20°C hasta su procesamiento (Biodiversity Research Institute, 2022; Ellison et al., 2013; Eshar & Weinberg, 2010; Racey, 2011).

Posterior a la eutanasia, se realizó la necropsia para realizar la colecta de bazo, pulmones, hígado e intestino, los cuales fueron almacenadas en inhibidor de rnasas (RNAlater Invitrogen™ AM7024) a -20°C para extracción de RNA para la detección de los géneros *Orthoflavivirus* y *Alphavirus*. Un fragmento de los órganos fue almacenado inmediatamente a -70°C.

Se realizó la extracción de ADN mediante el kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN®) obteniendo ADN purificado, el cual fue cuantificado y posteriormente se realizó electroforesis con gel de agarosa al 1% para corroborar la integridad de los ácidos nucleicos purificados.

Se realizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa al DNA obtenido de la purificación de las muestras sanguíneas se utilizó el protocolo de termociclador propuesto por Casati et al (2006) así como los primers que amplifican un fragmento de 425 pb del gen 18s rRNA para el género *Babesia*: BJ1: 5'-GTC TTG TAA TTG GAA TGATGG-3' y BN2: 5'-TAG TTT ATG GTT AGG ACT ACG-3'. Se usaron los primers por Oliveira et al, (2008), que amplifica un fragmento de 231 pb del gen codificante a la proteína de membrana 17kDa presente en Rickettsias patógenas: 17kN1: 5'- CATTACTTGGTTCTCAATTCGGT-3' y 5'-GTTTTATTAGTGGTTACGTAA-3'. Para la detección de los géneros virales, se llevó a cabo la técnica de RT-PCR, se utilizaron los primers usados por el Instituto Nacional de Salud Pública que amplifican para regiones conservadas entre los miembros de los géneros

Alphavirus y *Orthoflavivirus*, respectivamente. Los resultados de las reacciones fueron visualizados por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%, mediante fotodocumentador.

RESULTADO Y DISCUSIÓN.

Se realizó la captura de 32 ejemplares originarios de Progreso de Obregón, Hidalgo; Jalpan de Serra, Querétaro y Poaná, Tabasco. De los cuales se obtuvieron 32 muestras sanguíneas de aproximadamente 500 uL a 1 mL, y 32 muestras de órganos (bazo, pulmones, hígado e intestino). Se realizaron frotis sanguíneos *in situ* obteniendo un total de 42 extendidos sin evidencia microscópica de hemoparásitos. También se realizaron extracciones de DNA de las 32 muestras sanguíneas realizando la técnica de PCR punto final para la detección del género *Babesia* obteniendo un total de 8 muestras con resultado positivo de ejemplares capturados en Hidalgo y Tabasco.

LITERATURA CITADA

Afonso, E., & Goydadin, A. (2018). Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* DNA in the lesser horseshoe bat (*Rhinolophus hipposideros*) guano. *Epidemiology & Infection*, 146(10), 1253-1258.

Aréchiga-Ceballos, N., Rendón-Franco, E., Muñoz-García, C. I., Olave-Leyva, I., & Aguilar-Setién, A. (2024). Dengue and Zika flaviviruses in bats. *Therya Notes*, 5, 112-118.

de Mello, V. V. C., de Oliveira, L. B., Coelho, T. F. S. B., Lee, D. A. B., das Neves, L. F., Franco, E. O., ... & André, M. R. (2024). Diversity of *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. and *Neorickettsia* spp. in vampire bats. *Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases*, 100182.

Fagre, A. C., & Kading, R. C. (2019). Can bats serve as reservoirs for arboviruses? *Viruses*, 11(3), 215.

Kemenesi, G., & Bányai, K. (2018). Tick-Borne Flaviviruses, with a Focus on Powassan Virus. *Clinical microbiology reviews*, 32(1), e00106-17.

Lv, J., Fernández de Marco, M. D. M., Goharriz, H., Phipps, L. P., McElhinney, L. M., Hernández-Triana, L. M., ... & Johnson, N. (2018). Detection of tick-borne bacteria and babesia with zoonotic potential in *Argas (Carios) vespertilionis* (Latreille, 1802) ticks from British bats. *Scientific Reports*, 8(1), 1865.

Scheffer, K. C., Barros, R. F. D., Keila Iamamoto, K., Mori, E., Asano, K. M., Lima, J. Y. D. O., ... & Fahl, W. D. O. (2022). *Desmodus rotundus*—biología y comportamiento (Doctoral dissertation, Instituto Pasteur).

Socolovschi, C., Kernif, T., Raoult, D., & Parola, P. (2012). *Borrelia*, *Rickettsia*, and *Ehrlichia* Species in Bat Ticks, France, 2010. *Emerging Infectious Diseases*, 18(12), 1966-1975.

Sotomayor-Bonilla, J., Chaves, A., Rico-Chávez, O., Rostal, M. K., Ojeda-Flores, R., Salas-Rojas, M., Aguilar-Setien, Á., Ibáñez-Bernal, S., Barbachano-Guerrero, A., Gutiérrez-Espeleta, G., Aguilar-Faisal, J. L., Aguirre, A. A., Daszak, P., & Suzán, G. (2014). Dengue virus in bats from southeastern Mexico. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 91(1), 129–131.

Tendu, A., Hughes, A. C., Berthet, N., & Wong, G. (2022). Viral Hyperparasitism in Bat Ectoparasites: Implications for Pathogen Maintenance and Transmission. *Microorganisms*, 10(6), 1230.

Villa Ramírez, B. (1966). Los murciélagos de México: su importancia en la economía y la salubridad: su clasificación sistemática (No. QL 737. C5. V54).

Xu, Z., Feng, Y., Chen, X., Shi, M., Fu, S., Yang, W., Liu, W. J., Gao, G. F., & Liang, G. (2022). Virome of Bat-Infesting Arthropods: Highly Divergent Viruses in Different Vectors. *Journal of virology*, 96(4), e0146421.



DISMINUCIÓN DE LA CAPACIDAD BIOLÓGICA DE GARRAPATAS AL INMUNIZAR BOVINOS CON PÉPTIDOS QUE CONTIENEN EPÍTOPOS B PREDICHOS DE BMVDAC Y α -VORAXINA DE *Rhipicephalus microplus*

DECREASING TICK FITNESS BY IMMUNIZING CATTLE WITH *Rhipicephalus microplus* BMVDAC AND α -VORAXIN PEPTIDES CONTAINING PREDICTED B-CELL EPITOPES

Daniel Gustavo López-Díaz^{a,b}, María Martina Esperanza Pérez-Soria^a, José Rodrigo Morales-García^a, Rafael Jiménez-Ocampo^c, Gabriela Aguilar-Tipacamú^d, Massaro W. Ueti^e and Juan Mosqueda^{a,d}

^aImmunology and Vaccines Laboratory, College of Natural Sciences, Autonomous University of Queretaro, Queretaro, 76140, QT, Mexico.

^bMaster's Program in Sustainable Animal Health and Production, College of Natural Sciences, Autonomous University of Queretaro, Queretaro, 76230, QT, Mexico.

^cCampo Experimental Valle del Guadiana, INIFAP, Durango, 34170, DG, Mexico.

^dCA Salud Animal y Microbiología Ambiental, College of Natural Sciences, Autonomous University of Queretaro, 76230, QT, Mexico.

^eAnimal Diseases Research Unit, Agricultural Research Service, US Department of Agriculture, Pullman, Washington, 99164, USA.

Correo electrónico: dlopez99@alumnos.uaq.mx

ABSTRACT

Rhipicephalus microplus, the cattle tick, is widely distributed across tropical and subtropical regions, including most of Mexico. Various classes of chemicals are employed for tick control; however, increasing resistance and environmental concerns make the implementation of sustainable strategies essential. Immunological control based on vaccines has shown promise in some regions, but only one type of vaccine has been commercialized. Multi-antigenic tick vaccines aim to increase vaccine efficacy and evaluating new antigens is a crucial step in their development. The objective of this study was to evaluate the vaccine potential of conserved peptides with B-cell epitopes from *R. microplus* BmVDAC and α -voraxin. First, *R. microplus* isolates were collected, and the coding sequences of *bmvdac* and *α -voraxin* were amplified and sequenced. Bioinformatic analysis was employed to determine the degree of conservation among the sequences. Subsequently, four peptides from conserved regions of each predicted protein were synthesized using the MAP-8 system. The immunogenicity test involved the inoculation of each peptide, emulsified with a commercial adjuvant, into two tick-free cattle. The antibody response was assessed by indirect ELISA and native protein detection was performed with western blot and immunohistochemistry. For BmVDAC, only the VDAC 3 peptide was immunogenic, while for α -voraxin, both Voraxin 3 and Voraxin 4 peptides were selected. The three peptides were included in an immunization and tick challenge trial. Two animals

were immunized three times and subsequently infested with 10000 larvae of the Media Joya strain. After completing their parasitic life cycle, engorged female ticks were collected, and biological parameters were assessed. The three peptides impaired tick biology at different levels, particularly affecting oviposition and hatching rates. These results suggest that VDAC 3, Voraxin 3 and Voraxin 4 are immunogenic and reduce tick viability, therefore, could be included in a multi-antigenic anti-tick vaccine.

Keywords: *Rhipicephalus microplus*, peptides, vaccine, BmVDAC, voraxin

INTRODUCCIÓN

La garrapata *R. microplus* representa un gran problema para la ganadería bovina mundial debido a que disminuyen la productividad animal. Además, estas garrapatas son vectores de babesiosis y anaplasmosis bovina (Almazán *et al.*, 2018).

El control de esta garrapata se basa en la utilización de acaricidas químicos capaces de eliminar al parásito de forma rápida y eficiente. Sin embargo, la sobreutilización de estos productos genera problemas como la aparición de garrapatas resistentes a acaricidas y efectos negativos en el ambiente (Graf *et al.*, 2004).

El desarrollo e implementación de vacunas contra garrapatas ha surgido como un método importante en los programas de control integrado. Actualmente, solo se han podido comercializar vacunas con el antígeno Bm86 recombinante, las cuales han sido efectivas en ciertas regiones del mundo. Entre los problemas descritos con relación al uso de estas vacunas destacan la eficacia variable relacionada a la variación antigénica entre cepas de garrapatas, ausencia del efecto de derribe similar al acaricida y dificultades de comercialización (Redondo *et al.*, 1999; García-García *et al.*, 2000; Willadsen, 2004).

Para incrementar la eficacia de las vacunas contra garrapatas se han explorado diferentes estrategias y tecnologías, una de las cuales es el desarrollo de vacunas multiantigénicas. Estas vacunas contienen diferentes antígenos del parásito con la intención de incrementar el daño a la garrapata. No obstante, se deben evaluar los antígenos que pueden formar parte de estas vacunas (Willadsen, 2008).

El canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) es una porina mitocondrial que participa en el tránsito de moléculas dentro de la célula. En *R. microplus*, BmVDAC se sobre expresa en el intestino en condiciones de coinfección con *Babesia bigemina*. Al ser utilizada de manera recombinante, se obtuvo una eficacia vacunal de 82% (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2015; Ortega-Sánchez *et al.*, 2020).

Voraxina se ha descrito como una proteína dimérica con función de factor de ingurgitación, determinándose que es necesaria para que la hembra adulta entre a la fase de alimentación rápida y se replete en las últimas horas de su alimentación, además de tener roles en el desarrollo de los ovarios y la degeneración de glándulas salivales (Weiss y Kaufman, 2004; Yamada *et al.*, 2009).

MATERIALES Y MÉTODOS

Para realizar el experimento, se colectaron aislados de *R. microplus* de los estados de Nayarit, Sinaloa, Querétaro, Jalisco, Guerrero, Tabasco, Chiapas y Tamaulipas.



Adicionalmente, se utilizaron las cepas mantenidas en laboratorio Media Joya (México) y La Minita-Texas (Estados Unidos). De cada aislado se extrajo material genético.

La amplificación de *bmvdac* se realizó a partir de ADN genómico utilizando los siguientes iniciadores: 5' ATGGCTCCTCCGTGCTACGC 3' (sentido) y 5' CTTGTGTCCTCCCTGGTTGAA 3' (antisentido). Como secuencia de referencia se utilizó la correspondiente a *bmvdac* de la cepa Media Joya (GU994210.1). La amplificación de α -*voraxina* se realizó a partir de ADN complementario utilizando los siguientes iniciadores: 5' TGCTCAAGTTCACCACCAAC 3' (sentido) y 5' TCTTGCGTACTGTTCGGACT 3' (antisentido). Como secuencia de referencia se utilizó la correspondiente a *voraxin alpha-like* de la cepa india IVRI-line I (JX502818.1). Los amplicones fueron purificados con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA) y se mandaron a secuenciar por la técnica de Sanger.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante herramientas bioinformáticas. La evaluación de similitudes e identidades se realizó con la herramienta SIAS (<http://imed.med.ucm.es/Tools/sias>). Adicionalmente, se realizó la predicción de las proteínas resultantes con el programa ExPasy Translate Tool (<https://web.expasy.org/translate/>). Las proteínas predichas fueron caracterizadas con los programas SignalP-5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>), TMHMM-2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) y la base de datos InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/result/InterProScan/>).

La predicción de epítomos B en las secuencias conservadas de las proteínas se realizó con las siguientes herramientas bioinformáticas: BCEPred (crdd.osdd.net/raghava/bcepred), ABCpred (crdd.osdd.net/raghava/abcpred), IEDB (www.iedb.org) y EMBOSS Antigenic (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/antigenic>). Con base en la predicción, se diseñaron cuatro péptidos, de entre 16 y 25 aminoácidos, por cada proteína. Las secuencias fueron mandadas a sintetizar en el sistema multiantigénico MAP-8 a la empresa PEPTIDE 2.0 (Chantilly, VA, USA). Los péptidos se recibieron liofilizados y se resuspendieron en buffer PBS pH 7,4.

Cada péptido se emulsificó con el adyuvante Montanide™ ISA 201 (Seppic, Francia) siguiendo las indicaciones del fabricante, formulando dosis vacunales de 100 µg del antígeno. Para la verificación de la inmunogenicidad de cada péptido, dos animales de una zona libre de garrapatas en el estado de Durango fueron inmunizados cuatro veces a intervalos de 21 días. Adicionalmente, se aplicaron dosis de control de adyuvante sin antígeno en dos bovinos. La respuesta humoral se analizó mediante pruebas de ELISA indirecta y a los resultados se les realizó la Prueba de ANOVA-post hoc Tukey ($P \leq 0.01$). Para demostrar el reconocimiento de proteína nativa por los suero inmunes, se realizaron técnicas de western blot e inmunohistoquímica.

Los péptidos con una mejor respuesta de anticuerpos fueron seleccionados para el ensayo de inmunización e infestación. Nuevamente, dos animales fueron inmunizados tres veces con cada péptido, y una vez detectada la respuesta de anticuerpos, se realizó una infestación con 10 000 larvas *R. microplus* (cepa Media Joya) de 30 días de edad.

Las hembras que se repletaron fueron colectadas, lavadas, desinfectadas y pesadas individualmente. Posteriormente, se incubaron a 28 °C y 85% de humedad durante diez días. Se midió la masa de oviposición y se cuantificó por triplicado la eclosión de larvas por gramo de huevos. Con los parámetros obtenidos, se comparó la supervivencia, peso, masa de oviposición e índice de eclosión entre las garrapatas tratadas y de control. Los resultados fueron analizados mediante Prueba de T de student ($P \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Entre los aislados mexicanos de *R. microplus* se determinó una similitud de 99.7% para la secuencia de *bmvdac*, mientras que para α -*voraxina* se determinó una similitud de 100%.

De los ocho péptidos analizados, se escogieron tres para continuar el experimento. Los péptidos VDAC 3, Voraxina 3 y Voraxina 4 indujeron una respuesta humoral con títulos de anticuerpos IgG de 1:500 y estadísticamente significativa tras la aplicación de dos dosis. Además, con las posteriores inoculaciones la respuesta inmune aumentó o se mantuvo por encima de un punto de corte en ambos bovinos inmunizados. Los péptidos que se descartaron fueron eliminados debido a que la respuesta inmune estuvo ausente o decreció tras la aplicación de las vacunas.

El western blot demostró el reconocimiento de VDAC (aproximadamente 31 kDa) en proteínas totales extraídas del intestino de *R. microplus* utilizando los sueros de animales inmunizados con el péptido VDAC 3. La técnica de inmunohistoquímica fue utilizada para evaluar el reconocimiento de proteína nativa por sueros de animales inmunizados con péptidos de voraxina, detectándose señales intensas en células intestinales y en los ovarios.

En el experimento de inmunización e infestación, tras detectar niveles significativos de anticuerpos en los animales, se procedió a la infestación con larvas. Se recolectaron hembras repletas entre los días 19 y 25 de infestación. VDAC 3 redujo la supervivencia de garrapatas en 7.7%, la masa de oviposición en 18.4% y eclosión en 21.1%. Voraxina 3 disminuyó los parámetros de supervivencia en 17.5%, oviposición en 13.8% y eclosión en 22.1%. Por su parte, Voraxina 4 afectó oviposición y eclosión en 17.7 y 18.1% respectivamente. Ningún péptido tuvo efecto sobre el peso de las garrapatas. La eficacia vacunal de los péptidos fue de 40.69% para VDAC 3, 52.33% para Voraxina 3 y 27.62% para Voraxina 4.

El alto grado de conservación molecular es una de las características esenciales que debe tener un candidato vacunal, esto debido a que variaciones alélicas de hasta 2.8% pueden reducir significativamente la eficacia vacunal (García-García *et al.*, 1999; de la Fuente y Contreras, 2015). Los péptidos son inmunógenos deficientes debido a su simplicidad y bajo peso molecular, por lo que la adición de adyuvante y la síntesis en formato multiantigénico fueron esenciales para obtener una respuesta humoral. El efecto vacunal que se encontró en los tres péptidos fue significativamente menor que los descritos al utilizar estas proteínas completas recombinantes (Weiss y Kaufman, 2004; Yamada *et al.*, 2009; Ortega-Sánchez *et al.*, 2020). La inclusión de estos péptidos como parte de una proteína quimérica

recombinante podría aumentar su inmunogenicidad al aumentar su peso molecular y modificar la estructura tridimensional, por lo tanto, la eficacia vacunal podría incrementarse.

CONCLUSIONES

Se demostró la conservación de *bmvdac* y α -*voraxina* en *R. microplus* de aislados mexicanos. Además, los péptidos VDAC 3, Voraxina 3 y Voraxina 4 son inmunogénicos y al ser utilizados como antígenos vacunales tienen un efecto biológico sobre las garrapatas.

LITERATURA CITADA

Almazan, C., Tipacamu, G.A., Rodriguez, S., Mosqueda, J. & Perez de Leon, A. (2018). Immunological control of ticks and tick-borne diseases that impact cattle health and production. *Front. Biosci.* 23:1535–1551. 10.2741/4659.

de la Fuente, J. & Contreras, M. (2015). Tick vaccines: current status and future directions. *Expert Rev. Vaccines* 14(10):1367-1376. 10.1586/14760584.2015.1076339.

García-García, J.C., Gonzalez, I.L., González, D.M., Valdés, M., Méndez, L., Lamberti, J., D'Agostino, B., Citroni, D., Fragoso, H., Ortiz, M., Rodríguez, M., & de la Fuente, J. (1999). Sequence variations in the *Boophilus microplus* Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. *Exp Appl Acarol.* 23(11):883-895. 10.1023/a:1006270615158

Graf, J.F., Gogolewski, R., Leach-Bing, N., Sabatini, G.A., Molento, M.B., Bordin, E.L. & Arantes, G.J. (2004). Tick control: an industry point of view. *Parasitology*, 129 Suppl, S427–S442. 10.1017/s0031182004006079

Ortega-Sánchez, R., Camacho-Nuez, M., Castañeda-Ortiz, E.J., Martínez-Benítez, M.B., Hernández-Silva, D.J., Aguilar-Tipacamú, G. & Mosqueda, J. (2020). Vaccine efficacy of recombinant BmVDAC on *Rhipicephalus microplus* fed on *Babesia bigemina*-infected and uninfected cattle. *Vaccine*, 38(19), 3618– 3625. 10.1016/j.vaccine.2019.12.040

Redondo, M., Fragoso, H., Ortíz, M., Montero, C., Lona, J., Medellín, J. A., Fría, R., Hernández, V., Franco, R., Machado, H., Rodríguez, M., & de la Fuente, J. (1999). Integrated control of acaricide-resistant *Boophilus microplus* populations on grazing cattle in Mexico using vaccination with Gavac and amidine treatments. *Experimental & applied acarology*, 23(10), 841–849. <https://doi.org/10.1023/a:1015925616490>

Rodríguez-Hernández, E., Mosqueda, J., León-Ávila, G., Castañeda-Ortiz, E.J., Álvarez-Sánchez, M.E., Camacho, A.D., Ramos, A. & Camacho-Nuez, M. (2015). BmVDAC upregulation in the midgut of *Rhipicephalus microplus*, during infection with *Babesia bigemina*. *Vet. Parasitol.* 212(3-4):368–374. 10.1016/j.vetpar.2015.06.016.

Weiss, B.L. & Kaufman, W.R. (2004). Two feeding-induced proteins from the male gonad trigger engorgement of the female tick *Amblyomma hebraeum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101(16):5874-5879. 10.1073/pnas.0307529101

Willadsen, P. (2004). Antitick vaccines. *Parasitology.* 29, Suppl:S367-387. 10.1017/s0031182003004657.

Willadsen, P. (2008). Antigen cocktails: valid hypothesis or unsubstantiated hope? *Trends Parasitol.* 24(4):164-167. 10.1016/j.pt.2008.01.005

Yamada, S., Konnai, S., Imamura, S., Ito, T., Onuma, M. & Ohashi, K. (2009). Cloning and characterization of *Rhipicephalus appendiculatus* voraxin alpha and its effect as anti-tick vaccine. *Vaccine*, 27(43): 5989–5997. 10.1016/j.vaccine.2009.07.072



ANÁLISIS SEROLÓGICO EVIDENCIA LA EXPOSICIÓN DE DOS VOLUNTARIOS A *BORRELIA SP.* ASOCIADA A LA FIEBRE RECURRENTE EN NAYARIT, MÉXICO

SEROLOGICAL ANALYSIS INDICATING THE EXPOSURE OF TWO VOLUNTEERS TO RELAPSING FEVER *BORRELIA SP.* IN NAYARIT, MEXICO

Sofía L. Luna-Rojas^{1*}, Edwin Vázquez-Guerrero¹, José Alberto Hernández-Martínez¹, Jeanet Serafín-López², Fernando Martínez-Hernández³, José Alejandro Martínez-Ibarra⁴, Rigoberto Hernández-Castro³, Job E. López⁵, J. Antonio Ibarra^{1**}

*lunarojas.sofia@gmail.com / **jaig19@gmail.com

¹ Laboratorio de Genética Microbiana, Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional; CDMX, Mexico.

² Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional; CDMX, Mexico.

³ Department of Ecology of Pathogens, General Hospital “Dr. Manuel Gea González”; CDMX, Mexico.

⁴ Laboratorio de Entomología Médica, Departamento de Ciencias de la Naturaleza, Centro Universitario del Sur, Universidad de Guadalajara; Guadalajara, Jalisco, Mexico.

⁵ Department of Pediatrics, National School of Tropical Medicine, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, United States.

Abstract

This study aimed to evaluate the possible exposure of 142 volunteers to *Borrelia* spirochetes associated with tick-borne relapsing fever (TBRF) in Nayarit, Mexico, by performing a retrospective serological analysis on 142 human serum samples. These samples were originally collected as part of a surveillance study of American trypanosomiasis by the Autonomous University of Guadalajara and were initially analyzed in collaboration with the General Hospital “Dr. Manuel Gea González”.

The samples were analyzed by Western Blot for the detection of specific antibodies against recombinant proteins glycerophosphodiester phosphodiesterase (rGlpQ) and three variants of the *Borrelia* immunogenic protein A (rBipA) from three different species. The analysis revealed that two volunteers, aged 23 and 61 years, tested positive for rGlpQ, indicating previous exposure to TBRF spirochetes. However, no reactivity was observed with rBipA proteins specific to *Borrelia turicatae*, *B. hermsii*, or *B. parkerii*, suggesting exposure to a different *Borrelia* species.

Both volunteers resided in the municipality of Tiburcio Grande, a rural community in which no TBRF cases or known tick vectors have been reported. Neither volunteer reported symptoms of relapsing fever or recent bites from these arthropods at the time of the sample collection.

The absence of reactivity to BipA-specific antigens suggests that the infecting *Borrelia* species may differ from those previously isolated in Mexico. This study highlights the need for further research to identify specific *Borrelia* species and their vectors in Mexico, as well as the importance of active epidemiological surveillance given the potential public health risk posed by these pathogens.

Palabras clave:

Borrelia; garrapatas; rGlpQ; fiebre recurrente; México.

INTRODUCCIÓN

La fiebre recurrente transmitida por garrapatas (TBRF, por sus siglas en inglés) es una enfermedad caracterizada por episodios febriles intermitentes, sin una causa aparente, que se alternan con periodos afebriles. Es causada por espiroquetas de los géneros *Borrelia* y *Borrelia*, en los cuales también se encuentran los patógenos asociados a la enfermedad de Lyme¹. Estas bacterias se transmiten a través de la saliva o el líquido coxal de garrapatas, tanto duras como blandas, aunque los géneros *Ornithodoros*, *Ixodes* y *Rhipicephalus* son los principales vectores de estos patógenos, y son capaces de infectar tanto a humanos como animales².

Aunque la TBRF ha sido reportada desde el año 1904 en África, actualmente su expansión ha sido registrada en todos los continentes, con excepción de Oceanía y la Antártida³. Sin embargo, es una zoonosis muy poco conocida y por lo tanto es poco reportada. No obstante, reportes recientes sugieren que en México las espiroquetas asociadas a la fiebre recurrente (FR) representan un problema de salud pública más grave de lo que se pensaba. En el país, se ha documentado una amplia presencia de argásidos, especialmente del género *Ornithodoros*⁴, especialmente del vector *Ornithodoros turicata* en los estados de Zacatecas, Aguascalientes, Guanajuato y San Luis Potosí⁵. Además, se ha logrado aislar de *Borrelia turicatae* en el norte de Sinaloa, la primera espiroqueta asociada a FR en México que ha sido cultivada en laboratorio⁶. Recientemente también hemos logrado aislar a *Borrelia puertoricensis* de garrapatas capturadas en Yucatán (en revisión).

Estos hallazgos han aumentado nuestro interés por definir mejor la exposición humana que puede estar ocurriendo a las espiroquetas de la FR en la República Mexicana. Con este fin, se realizó un estudio serológico retrospectivo para evaluar la exposición a espiroquetas de FR en 142 muestras de suero humano provenientes de la comunidad de Compostela, Nayarit, México. Estas muestras inicialmente formaban parte del programa de Vigilancia Epidemiológica de Tripanosomiasis Americana en la región occidental de México, coordinado por la Universidad Autónoma de Guadalajara (UAG) y el Hospital “Dr. Manuel Gea González”. Ninguno de los voluntarios que participaron en este estudio presentaba síntomas al momento de la recolección de las muestras; sin embargo, fueron seleccionados debido a la presencia de triatominos, vectores de la enfermedad de Chagas, en esta región. Las muestras se analizaron inicialmente mediante ELISA para detectar antígenos de tripanosoma, pero todas resultaron negativas y fueron almacenadas. Posteriormente, la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (IPN) solicitó

estas muestras para realizar un análisis retrospectivo en busca de anticuerpos específicos contra espiroquetas asociadas a la FR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para poder evaluar la exposición a la FR en los sueros se usó la técnica de Western Blot (WB) para la detección de anticuerpos específicos contra las proteínas glicerofosfodiéster fosfodiesterasa (GlpQ) y tres variantes de la proteína inmunogénica A de *Borrelia* (BipA). GlpQ se encuentra ampliamente conservada entre las especies asociadas a la FR, incluyendo *Borrelia recurrentis* (espiroqueta asociada a la FR transmitida por piojos) pero ausente las espiroquetas causantes de la enfermedad de Lyme⁷. Por otro lado, se ha demostrado que la proteína BipA varía entre especies de *Borrelia* asociadas a la FR, por lo cual ayuda a discernir entre ellas⁸.

La técnica empleada fue estandarizada anteriormente para evaluar la exposición a estas espiroquetas tanto para sueros humanos como de animales⁶. Para el presente trabajo se empleó un extracto del aislado bacteriano de la cepa *B. turicatae* 91E135 para las inmunotransferencias⁵, y se produjeron rGlpQ y rBipA del mismo aislado como proteínas de fusión a histidina. De igual manera, se purificaron rBipA de las especies norteamericanas *Borrelia hermsii* (DAH) y *Borrelia parkeri* (HR1)⁸. Los pesos moleculares de las proteínas correspondieron a 48 kDa para rGlpQ y entre 55 y 70 kDa para las BipA's. Las proteínas se sometieron a electroforesis y se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) utilizando el sistema de transferencia Amersham WB (GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, MA, EE. UU.). Los inmunoblots se analizaron con las muestras de suero a una dilución de 1:200 utilizando el reactivo de bloqueo basado en proteínas I-Block (ThermoFischer) y se revelaron con HRP-rec-Protein G (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) diluido 1:4000⁹. La reactividad se visualizó utilizando un kit de quimioluminiscencia Novex (Invitrogen) y un dispositivo Chemidoc Touch (Bio Rad).

Cada muestra de suero se analizó inicialmente para detectar la presencia de anticuerpos específicos contra las proteínas rGlpQ, empleando la metodología estandarizada anteriormente mencionada^{5,6,10}. Las muestras que resultaron positivas a anti-rGlpQ se analizaron nuevamente para un extracto de *B. turicatae* 91E135 y para las diferentes versiones recombinantes de BipA^{8,9}.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la primera etapa del análisis serológico, de los 142 sueros analizados, se identificaron dos voluntarias aparentemente sanas que mostraron reactividad a rGlpQ, lo que sugiere un contacto previo con espiroquetas asociadas a la fiebre recurrente (FR). Las voluntarias, de 23 (voluntaria A) y 61 (voluntaria B) años, residían en la comunidad de Tiburcio Grande, en Compostela, Nayarit, México, al momento de la recolección de las muestras. Ambas eran vecinas y vivían en casas de ladrillo; la primera en una vivienda recién construida, con solo 4 meses de antigüedad (voluntaria A), y la segunda en una casa con 28 años de antigüedad (voluntaria B). La voluntaria A convivía con tres personas en su hogar, mientras que la voluntaria B vivía sola. Ninguna de las voluntarias tuvo contacto con animales, ya

sean domésticos o salvajes, no reportaron haber sido picadas por garrapatas ni realizar actividades al aire libre, aparte de desplazarse.

En la segunda etapa se demostró la reactividad de los sueros de estas dos voluntarias al extracto de *B. turicatae*, mostrando bandas correspondientes a las proteínas Vmp, corroborando la exposición a *Borrelia* sp. No obstante, en ambos casos no se observó reactividad contra las rBipA de *B. turicatae*, *B. hermsii* ni de *B. parkeri*. El resultado con las últimas dos era esperado, ya que hasta el momento no se ha reportado la circulación de estas dos especies en México, aunque se ha demostrado que están presentes en California, Arizona y Nuevo México, por lo que el transporte o desplazamiento de los vectores hacia México mediante diversos animales (principalmente silvestres) e incluso humanos (viajeros) es altamente probable¹¹. Es probable que ambas voluntarias hayan sido expuestas a una especie de *Borrelia* diferente a las probadas. Para determinar cuál es hemos planeado asistir a la localidad para capturar garrapatas y realizar cuestionarios a los vecinos del área. Es posible que ambas personas ya habían eliminado la infección recientemente y que los anticuerpos observados fueran parte de la defensa humoral que montaron contra ella.

Aunque hasta el momento no se ha logrado identificar a la especie de *Borrelia* circulante en esta comunidad, los resultados obtenidos resultan relevantes, ya que anteriormente no se habían reportado casos de TBRF ni avistamientos de garrapatas vectoras en el estado de Nayarit. Hacemos énfasis en que, dadas las características climáticas y geográficas de México, existe un alto riesgo de transmisión de estos patógenos. Esto se ve exacerbado por la demografía, las condiciones socioeconómicas y la ausencia de vigilancia activa tanto en la salud pública como veterinaria^{2,7,12}.

CONCLUSIONES

Los hallazgos de este estudio sugieren la presencia de espiroquetas asociadas a la fiebre recurrente distintas de *B. turicatae*, *B. parkerii* y *B. hermsii* en la comunidad de Tiburcio Grande, Nayarit, México. Esto subraya la importancia de establecer una vigilancia epidemiológica activa, dado el alto riesgo de transmisión de patógenos en la zona. Además, es crucial considerar que en México se han documentado aproximadamente 25 especies diferentes de *Ornithodoros*, el principal vector de estos patógenos, entre ellas *O. turicata*, *O. talaje*, *O. dugesi*, *O. parkeri* y *O. puertoricensis*⁴. Esta diversidad de vectores potencia el riesgo de dispersión y emergencia de enfermedades, lo que hace aún más urgente la implementación de estrategias de monitoreo y control.

LITERATURA CITADA

Talagrand-Reboul, E., Boyer, P. H., Bergström, S., Vial, L., & Boulanger, N. (2018). Relapsing Fevers: Neglected Tick-Borne Diseases. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 98. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00098>

Elelu N. (2018). Tick-borne relapsing fever as a potential veterinary medical problem. *Veterinary medicine and science*, 4(4), 271–279. <https://doi.org/10.1002/vms3.108>

Jakab, Á., Kahlig, P., Kuenzli, E., & Neumayr, A. (2022). Tick borne relapsing fever - a systematic review and analysis of the literature. *PLoS neglected tropical diseases*, 16(2), e0010212. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010212>

Guzmán-Cornejo, C., Herrera-Mares, A., Robbins, R. G., & Rebollo-Hernández, A. (2019). The soft ticks (Parasitiformes: Ixodida: Argasidae) of Mexico: species, hosts, and geographical distribution. *Zootaxa*, 4623(3), zootaxa.4623.3.3. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4623.3.3>

Vázquez-Guerrero, E., Adan-Bante, N. P., Mercado-Uribe, M. C., Hernández-Rodríguez, C., Villa-Tanaca, L., Lopez, J. E., & Ibarra, J. A. (2019). Case report: A retrospective serological analysis indicating human exposure to tick-borne relapsing fever spirochetes in Sonora, Mexico. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(4), e0007215. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007215>

Vázquez-Guerrero, E., González-Quiroz, J. L., Domínguez-López, M. L., Kneubehl, A. R., Krishnavajhala, A., Curtis, M. W., Ponce-Mendoza, A., Estrada-de Los Santos, P., Lopez, J. E., & Ibarra, J. A. (2023). New records of *Ornithodoros turicata* (Ixodida: Argasidae) in rural and urban sites in the Mexican states of Aguascalientes and Zacatecas indicate the potential for tick-borne relapsing fever. *Experimental & applied acarology*, 91(1), 99–110. <https://doi.org/10.1007/s10493-023-00830-2>

Dworkin, M. S., Schwan, T. G., Anderson, D. E., Jr, & Borchardt, S. M. (2008). Tick-borne relapsing fever. *Infectious disease clinics of North America*, 22(3), 449–viii. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2008.03.006>

Curtis, M. W., Krishnavajhala, A., Kneubehl, A. R., Embers, M. E., Gettings, J. R., Yabsley, M. J., & Lopez, J. E. (2022). Characterization of Immunological Responses to *Borrelia* Immunogenic Protein A (BipA), a Species-Specific Antigen for North American Tick-Borne Relapsing Fever. *Microbiology spectrum*, 10(3), e0172221. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01722-21>

Lopez, J. E., Wilder, H. K., Boyle, W., Drumheller, L. B., Thornton, J. A., Willeford, B., Morgan, T. W., & Varela-Stokes, A. (2013). Sequence analysis and serological responses against *Borrelia turicatae* BipA, a putative species-specific antigen. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(9), e2454. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002454>

Vázquez-Guerrero, E., Gordillo-Pérez, G., Ríos-Sarabia, N., Lopez, J. E., & Ibarra, J. A. (2023). Case Report: Exposure to Relapsing Fever Group *Borreliae* in Patients with Undifferentiated Febrile Illness in Mexico. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 108(3), 510–512. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.22-0386>

Schwan, T. G., Raffel, S. J., Schrupf, M. E., & Porcella, S. F. (2007). Diversity and distribution of *Borrelia hermsii*. *Emerging infectious diseases*, 13(3), 436–442. <https://doi.org/10.3201/eid1303.060958>

Faccini-Martínez, Á. A., Silva-Ramos, C. R., Santodomingo, A. M., Ramírez-Hernández, A., Costa, F. B., Labruna, M. B., & Muñoz-Leal, S. (2022). Historical overview and update on



relapsing fever group *Borrelia* in Latin America. *Parasites & vectors*, 15(1), 196.
<https://doi.org/10.1186/s13071-022-05289-5>



Caracterización de la proteína TCTP de *Babesia bigemina* y su expresión diferencial en las fases infectantes del parásito

Characterization of the TCTP protein of *Babesia bigemina* and its differential expression in the infective phases of the parasite

Mario Gahel Montiel González¹, Minerva Camacho Nuez¹, Juan Mosqueda², María Elizabeth Alvarez Sánchez¹, Claudia Selene Zárate Guerra¹. Laboratorio 1, Posgrado en Ciencias Genómicas, UACM, Ciudad de México¹. Laboratorio de Inmunología y Vacunas, Facultad de Ciencias Naturales, UAQ. Querétaro²

Presenta: gahel.montiel@estudiantxs.uacm.edu.mx

Abstract

The Translational Controlled Tumour Protein (TCTP) is a conserved protein in eukaryotes, and in Apicomplexan parasites such as *Plasmodium falciparum*, where the role of this protein on the modulation of the host's immune response has been studied. Previously the expression of *tctp* gene has been reported in asexual phases of *Babesia bigemina*. We are interested in studying the function of this protein, therefore we amplified *tctp* from infected erythrocytes with *B. bigemina* through RT-PCR to cloned in pColdII and obtain the recombinant BbiTCTP (rBbiTCTP). To analyze rBbiTCTP, we performed a solubility assay and subsequently purified it by affinity chromatography (IMAC) using HisTrap FF columns. The purified protein was recognized by anti-His Tag antibody by Western Blotting and showed an apparent molecular weight of 25 kDa. In addition, *in-silico analysis* of BbiTCTP was carried out. Our *in-silico* analyzes showed the structural characteristics of BbiTCTP such as the disposition of three alpha helix, seven beta sheet, with a functional domain similar to Mss4-like superfamily. Further research using the rBbiTCTP could help to determinate the possible functions of this protein in *B. bigemina* that was analyzed by restriction and sequencing to do the expression and purification of the recombinant protein rTCTP.

Keywords: TCTP, *B. bigemina*, *Apicomplexa*, recombinant protein.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones parasitarias representan un riesgo para la industria de la producción del ganado, debido a las pérdidas económicas asociadas a las enfermedades causadas por patógenos como *Babesia bigemina* (Wodaje *et al.*, 2019). Este parásito intracelular obligado se transmite por vectores como las garrapatas del género *Rhipicephalus*. El ciclo de vida de *B. bigemina* requiere de dos hospedadores: los bovinos y las garrapatas, esta última trasmite los esporozoítos que penetran a los eritrocitos de los bovinos, transformándose a trofozoítos, y posteriormente a merozoítos, cabe destacar que los esporozoítos y merozoítos son considerados como las fases infectantes de este patógeno. Los merozoítos son ingeridos por las garrapatas, en cuyos intestinos se liberan las fases sexuales de *Babesia* desarrollándose los gametocitos para formar los cigotos, ooquistos y esporoquistos, los cuales se diseminan en los tejidos de las garrapatas infectando

células embrionarias en los ovarios, posteriormente los esporoquinetos migran a las glándulas salivales, desarrollándose en esporozoítos, que son transmitidos a los bovinos cuando la garrapata se alimenta de su sangre (Mosqueda *et al.*, 2012).

Los métodos de control de la babesiosis bovina se basan en la interrupción del ciclo de vida del parásito. Entre estos métodos se encuentran el control del vector, el control químico y el control inmunológico. Este último se compone de vacunas vivas atenuadas y vacunas recombinantes. Si bien estas vacunas estimulan una respuesta inmune protectora en los bovinos, todavía no existe una vacuna altamente eficaz. Por lo tanto, se necesitan estudiar más candidatos vacunales para controlar esta enfermedad de manera efectiva (Ferreira *et al.*, 2022; De Waal & Combrink., 2006).

La Proteína Tumoral Controlada Traduccionalmente (TCTP) es una proteína conservada en eucariontes con funciones tanto intracelulares como extracelulares (MacDonald, S. M. 2012). Los ortólogos de TCTP en parásitos intracelulares como *T. gondii*, *T. brucei* y *P. falciparum* tienen funciones importantes en la supervivencia, capacidad de invasión, morfología y patogenicidad (MacDonald *et al.*, 2001; Jovic *et al.*, 2018). Por ejemplo, en *P. falciparum*, TCTP regula la secreción de histamina e IL-8 en eosinófilos y basófilos, respectivamente. Asimismo, se ha reportado que esta proteína se incorpora a las células B de ratón y funciona como un regulador negativo en estas células (Calderón-Pérez *et al.*, 2014).

La proteína TCTP se ha identificado recientemente en *B. bovis*. La secuencia de aminoácidos de TCTP de *B. bovis* tiene un 81% de similitud con la de *B. bigemina* y un 58% con la de *P. falciparum*. Esto sugiere que TCTP de *B. bigemina* y *B. bovis* podría tener una función similar a la de *P. falciparum* como un factor de virulencia (Almeida 2021). La estructura de TCTP en parásitos Apicomplexa se diferencia de otras proteínas por tener una hélice alfa extra cerca del extremo amino terminal. Se hipotetiza que esta diferencia estructural podría permitir que TCTP interactúe con proteínas G y regule la proliferación celular (Xoconostle-Cázares & Ruiz-Medrano 2017). Se requieren más estudios para determinar la función específica de TCTP en *B. bigemina* y su papel en la evasión del sistema inmune del huésped.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANÁLISIS IN SILICO DE TCTP DE B. BIGEMINA

El análisis *in silico* se realizó a partir de la secuencia codificante de ARNm de TCTP, con la cual se obtuvo la secuencia de aminoácidos mediante “Expasy Translate Tool” (<https://web.expasy.org/translate/>), posteriormente se realizó el diseño de la estructura tridimensional mediante AlphaFold2 usando MMseqs2 tomando como referencia para el modelado de la estructura de TCTP de *P. falciparum* (PDB:3P3K).

OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE RTCTP DE B. BIGEMINA

Para el análisis de la abundancia de la proteína TCTP de *B. bigemina*, utilizaremos anticuerpos específicos contra TCTP que se obtendrán inmunizando bovinos con la

proteína recombinante. Por lo que a continuación se describe el cómo se realizó la construcción, clonación, expresión y purificación de la proteína rTCTP.

La secuencia codificante de *tctp* se clonó a partir de cDNA obtenido de eritrocitos infectados de *B. bigemina*, se diseñaron los primers para amplificar la secuencia codificante con los sitios de restricción *Bam*HI y *Hind*III, que se localizan en el sitio múltiple de clonación del vector de expresión pColdII, las condiciones de alineamiento se determinaron mediante un gradiente de temperatura. El vector y los productos de amplificación se observaron en un gel de agarosa, se extrajeron del gel, se cuantificaron, después se cortaron con las enzimas de restricción (*Bam*HI y *Hind*III), el vector se cortó con las mismas enzimas, y fue purificado a partir de un gel de agarosa y tratado con fosfatasa alcalina de camarón. Por último, se realizó la reacción de ligación con T4 ligasa en una relación 3 :1 (vector: inserto), posteriormente se transformaron células competentes *E. coli* Rosetta-gami, las clonas obtenidas se analizaron mediante restricción y secuenciación.

EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RTCTP

De las clonas que tuvieron el inserto, se tomaron y diluyeron en 20 ml medio LB ampicilina 100 mg/ml, se incubaron overnight a 37°C, al día siguiente se mezclaron en una dilución 1:10 en LB ampicilina y se incubaron a 37°C hasta obtener una densidad óptica de 0.4-0.6, posteriormente se indujo la expresión de la proteína añadiendo 1 M de IPTG y se incubaron overnight a 16°C a 180 rpm, posteriormente se procedió a determinar si la proteína está en la fracción soluble o insoluble. Adicionalmente la recombinante contenida se analizó por Western Blot utilizando anticuerpos anti-tag de histidinas, posteriormente se purificó mediante cromatografía de afinidad usando columnas de Níquel Hitrap™ en un FPLC AKTA prime plus. Una vez purificada la proteína, se dializó y cuantificó por Bradford.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La estructura tridimensional generada en AlphaFold2 de la proteína TCTP de *B. bigemina*, se obtuvo tomando como molde la estructura tridimensional del cristal de *P. falciparum* (PDB: 3P3K), el modelo obtenido refleja las características estructurales como los posibles dominios funcionales o regiones conservadas, también este modelo permitió observar la disposición de hélices alfa, láminas beta, Mostrando patrones de regiones conservadas, las cuales pueden estar relacionadas con la función de esta proteína en los parásitos. Las predicciones sobre su estructura y función, que podrían ser útiles para estudios comparativos y de desarrollo de terapias antiparasitarias.

Las clonas obtenidas de *E. coli* Rosetta-gami con el constructo recombinante (vector pColdII + *tctp*). Fueron analizadas por restricción y secuenciación, mostrando que los insertos se encuentran en marco de lectura. En el ensayo de solubilidad se determinó que la proteína recombinante se encontraba en la fase soluble, lo que facilitó su purificación. La proteína recombinante rTCTP se encuentra fusionada con el His-tag del vector, por lo cual se llevó a cabo la detección de estas proteínas mediante Western Blot, las bandas obtenidas fueron de 22 KDa, el peso correspondiente a rTCTP, esto confirma la correcta expresión de ambas proteínas, el análisis de secuenciación mostró que la proteína

recombinante estaba en marco de lectura.

CONCLUSIONES

La proteína TCTP, conservada en eucariontes y con funciones clave en la patogenicidad de otros parásitos intracelulares como *P. falciparum*, ha sido identificada en *B. bigemina* y podría desempeñar un papel importante en la evasión del sistema inmunológico del huésped. La similitud de TCTP entre *B. bigemina* y otros parásitos sugiere que esta proteína podría ser un factor de virulencia, pero se necesitan más estudios para entender su función específica y su potencial como candidato vacunal.

LITERATURA CITADA

Almeida, C. Q. P. (2021). Identificación de la proteína tumoral controlada traduccionalmente (TCTP) en *Babesia bovis* y evaluación de su participación en el establecimiento de la infección.

Alarcón, G. J. C., Martínez, J. A. Á., Ramírez, E. E. R., Aragón, J. A. R., Gualito, J. J. M., Vega, C. A., & Millán, J. V. F. (2003). Protección contra babesiosis bovina con una vacuna mixta de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* derivada de cultivo in vitro bajo una confrontación de campo... *Veterinaria México*, 34(4), 323-332.

Bishop, L. J., Stutzer, C., & Maritz-Olivier, C. (2023). More than Three Decades of Bm86: What We Know and Where to Go. *Pathogens*, 12(9), 1071.

Calderón-Pérez, B., Xoconostle-Cázares, B., Lira-Carmona, R., Hernández Rivas, R., Ortega-López, J., & Ruiz-Medrano, R. (2014). The *Plasmodium falciparum* translationally controlled tumor protein (TCTP) is incorporated more efficiently into B cells than its human homologue. *PLoS One*, 9(1), e85514.

De Waal, D. T., & Combrink, M. P. (2006). Live vaccines against bovine babesiosis. *Veterinary parasitology*, 138(1-2), 88-96.

Ferreira, G. C. M., Canozzi, M. E. A., Peripolli, V., de Paula Moura, G., Sánchez, J., & Martins, C. E. N. (2022). Prevalence of bovine *Babesia* spp., *Anaplasma marginale*, and their co-infections in Latin America: Systematic review-meta analysis. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 13(4), 101967.

Jojic, B., Amodeo, S., & Ochsenreiter, T. (2018). The translationally controlled tumor protein TCTP is involved in cell cycle progression and heat stress response in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *Microbial cell*, 5(10), 460.

MacDonald, S. M. (2012). Potential role of histamine releasing factor (HRF) as a therapeutic target for treating asthma and allergy. *Journal of asthma and allergy*, 51-59.

MacDonald, S. M., Bhisutthibhan, J., Shapiro, T. A., Rogerson, S. J., Taylor, T. E., Tembo, M., ... & Meshnick, S. R. (2001). Immune mimicry in malaria: *Plasmodium falciparum* secretes a functional histamine-releasing factor homolog in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(19), 10829-10832.

Mosqueda, J., Olvera-Ramírez, A., Aguilar-Tipacamu, G., & J Canto, G. (2012). Current

advances in detection and treatment of babesiosis. *Current medicinal chemistry*, 19(10), 1504-1518.

Rodríguez-Vivas, R. I., Alonso-Díaz, M. A., Rodríguez-Arevalo, F., Fragoso-Sanchez, H., Santamaria, V. M., & Rosario-Cruz, R. (2006). Prevalence and potential risk factors for organophosphate and pyrethroid resistance in *Boophilus microplus* ticks on cattle ranches from the State of Yucatan, Mexico. *Veterinary Parasitology*, 136(3-4), 335-342.

Taylor, K. J., Van, T. T. H., MacDonald, S. M., Meshnick, S. R., Fernley, R. T., Macreadie, I. G., & Smooker, P. M. (2015). Immunization of mice with *Plasmodium* TCTP delays establishment of *Plasmodium* infection. *Parasite immunology*, 37(1), 23-31.

Wodaje, A., Adudna, B., & Hamid, M. (2019). A review on bovine babesiosis. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci*, 6(1), 63-70.

Xoconostle-Cázares, B., & Ruiz-Medrano, R. (2017). Structure-function relationship of TCTP. *TCTP/tpt1-Remodeling Signaling from Stem Cell to Disease*, 47-68.



INMUNOGENICIDAD DE EPITOPOS B CONSERVADOS DE ANTÍGENOS PRESENTES EN EL INTESTINO Y OVARIO DE LA GARRAPATA *R. microplus* (Bm86, Bm95 y Vitelogenina).

IMMUNOGENICITY OF CONSERVED B EPITOPES OF ANTIGENS PRESENT IN THE INTESTINE AND OVARY OF THE TICK *R. microplus* (Bm86, Bm95 and Vitellogenin).

**Morales-García JR*^{1,2}, *Pérez-Soria MME*¹, *Almazán-García C*¹, *Muñoz-Guzmán MA*³, *Hernández-Silva DJ*¹, *Cedillo-Peláez C*⁵, *Castillo-Heredia L*⁴, *Millan-Orozco J*⁶, Mosqueda Juan¹.

¹Laboratorio de Investigación en Inmunología y Vacunas, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro. ²Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, ³Depto. de Ciencias Biológicas, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, ⁴Laboratorio de Biogeografía e Integridad Biótica, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro. ⁵Laboratorio de inmunología, Instituto Nacional de Pediatría, CDMX. ⁶Depto de Ciencias Médico Veterinarias, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. jose.rodrigo.morales@uaq.mx

ABSTRACT

Background. *Rhipicephalus microplus* is a tick that affects cattle, causing significant economic losses to the livestock industry. Vaccines as a control method use the intestinal protein Bm86 as an antigen, where it has been reported that allelic variations in the gene, as low as 3.4%, are sufficient to prevent a protective immune response. This gives way to studying the presence of conserved B epitopes of different antigens. **Objectives.** To evaluate the immunogenicity of B epitopes of antigens present in the intestine and ovary (Bm86, Bm95 and Vitellogenin) conserved in strains from different regions of Mexico. **Methods.** Each peptide was evaluated individually by immunizing two Holstein cattle with 100 µg of peptide plus commercial adjuvant. Cattle were immunized at an interval of 21 days by applying four to five immunizations. Sera from each immunization were obtained and evaluated by indirect ELISA to determine the generation of antibodies and by immunohistochemistry to verify that the antibodies detect the target organ. **Results.** three peptides from Bm86 and Bm95 generated antibodies with an increase in the second immunization and maintaining it in the fourth. The three peptides managed to present a positive immunoreaction in the intestinal tissue in the immunohistochemical test. Two Vitellogenin peptides generated antibodies from the second immunization and maintaining it in the third. In both peptides, a positive response was observed in immunohistochemistry in ovarian tissues. **Conclusion.** The five selected peptides, with predicted B epitopes of

Bm86, Bm95 and Vitellogenin, are immunogenic and the antibodies produced detect the target antigen. These peptides should be evaluated in efficacy trials to determine whether they are vaccine candidates against *R. microplus* infestations.

Keywords: tick, immunohistochemistry, vaccine

INTRODUCCIÓN

Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Ixodida: Ixodidae) es un ectoparásito del ganado bovino en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Rodríguez-Vivas et al., 2012). Se le conoce como “garrapata común del ganado” y se considera el género más importante en la ganadería debido a su impacto en la salud bovina, ya que actúa como vector de hemoparásitos como *Babesia bigemina*, *B. bovis* y *Anaplasma marginale* (Jonsson, 2006). El ciclo de vida de este parásito dura de 20 a 23 días, dependiendo de la temperatura y la humedad ambiental, pudiendo extenderse por más tiempo. Las hembras, una vez repletas, pueden poner entre 3,000 y 4,000 huevos; el pico máximo de ovoposición se alcanza a los 5 días, y posteriormente disminuye progresivamente, alcanzando el 90% de la ovoposición total al día 13. La incubación y eclosión de estos huevos pueden durar de 30 a 33 días (Quiroz et al., 2011; León-Clavijo y Hernández-Rojas, 2012).

Una alternativa de control contra la garrapata es la aplicación de vacunas, que presentan ventajas al no contaminar el medio ambiente ni los subproductos animales, además de ser más seguras para el operador durante la aplicación (Frisch, 1999). El uso de vacunas para el control de *R. microplus* puede implementarse como un método de control integrado que prolonga la vida útil de los acaricidas existentes, retrasa la aparición de resistencia y disminuye la incidencia de las enfermedades transmitidas por este ectoparásito (de La Fuente et al., 2007). Sin embargo, se ha reportado que mínimas variaciones alélicas en el gen que codifica la proteína Bm86, con porcentajes tan bajos como el 3.4%, son suficientes para que no se produzca una respuesta inmune adecuada (de la Fuente et al., 2006; Almazán et al., 2018). Por esta razón, se ha hipotetizado que la eficacia de las vacunas puede mejorar al combinar múltiples antígenos que tengan un efecto biológico en el desarrollo de la garrapata (de la Fuente et al., 2015).

El control inmunológico de la garrapata mediante el uso de vacunas elaboradas con dos o más antígenos puede mejorar los resultados de la vacunación. Es posible identificar antígenos conservados de diferentes órganos de la garrapata, como el intestino, los ovarios y las glándulas salivales, y a partir de estos, identificar epítomos B conservados para desarrollar una vacuna multiantigénica contra la garrapata (Pérez-Soria, 2020). Pérez-Soria (2020) caracterizó la variabilidad alélica de cepas de *R. microplus* de diferentes regiones de México en relación con distintos genes para los antígenos Bm86, Bm95 y vitelogenina. Los resultados demostraron que estos son péptidos conservados y, al no presentar alta variabilidad, pueden considerarse secuencias conservadas en las diferentes cepas de las diversas regiones de México.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se evaluaron epítomos B conservados: tres epítomos de los antígenos Bm86 y Bm95, y dos epítomos de vitelogenina, aislados en diferentes cepas de *R. microplus* de México. Se inmunizaron bovinos (*Bos taurus*), hembras de la raza Holstein, con un peso de 400 a 500 kg. Se utilizaron dos bovinos por cada péptido y dos para el control. Cada dosis consistió en 100 µg del péptido de interés, mezclado con el adyuvante Montanide ISA 201 VG y PBS 1x pH 7.4 en una proporción de 50:50, en un volumen final de 1.5 ml; el grupo control recibió solo el adyuvante. Se utilizaron sueros pre-inmunes e inmunes de los diferentes grupos de bovinos para comprobar la producción de anticuerpos contra cada péptido.

Posteriormente, se utilizaron hembras adultas de *R. microplus* con 18 a 20 días post-alimentación. A cada hembra se le realizó un corte sagital y se fijó en formaldehído tamponado al 10% durante 24 horas. Luego, cada muestra fue incluida en parafina para la obtención de bloques. Cada bloque fue cortado mediante un microtomo, realizando cortes histológicos de 3 a 5 micras en láminas electro cargadas. Se procesaron las muestras mediante la técnica de inmunohistoquímica de la siguiente manera: las láminas se desparafinaron en xilol y se rehidrataron en diferentes concentraciones descendentes de alcohol. Se realizaron dos bloqueos: uno para la peroxidasa endógena y otro con albúmina al 1%. Se llevó a cabo la reactivación antigénica con proteinasa K al 0.01%. Se incubó el anticuerpo primario a 4 grados durante toda la noche, seguido de la incubación con el

anticuerpo secundario anti-IgG bovino en PBS. Para la revelación, se utilizó el kit de sustrato DAB.

RESULTADOS

Tres péptidos de Bm86 y Bm95 generaron anticuerpos que mostraron un aumento en la segunda inmunización y se mantuvieron en la cuarta. Los tres péptidos presentaron inmunorreatividad positiva en el tejido intestinal en la prueba de inmunohistoquímica. Dos péptidos de vitelogenina generaron anticuerpos a partir de la segunda inmunización, manteniéndose en la tercera, y ambos mostraron una respuesta positiva en inmunohistoquímica en tejidos de ovario.

CONCLUSIÓN

Los cinco péptidos seleccionados, con epítomos B predichos de Bm86, Bm95 y vitelogenina, son inmunogénicos y los anticuerpos producidos detectan el antígeno blanco. Estos péptidos deberán ser evaluados en ensayos de eficacia para determinar si son candidatos vacunales contra las infestaciones por *R. microplus*.

LITERATURA CITADA

Almazan, C., Tipacamu, G. A., Rodriguez, S., Mosqueda, J. & Perez de Leon, A. (2018). Immunological control of ticks and tick-borne diseases that impact cattle health and production. *Front. Biosci.* 23:1535–1551. 10.2741/4659.

de la Fuente, J, & Contreras, M. (2015). Tick vaccines: current status and future directions. *Expert Rev. Vaccines* 14(10):1367-1376. 10.1586/14760584.2015.1076339.

de la Fuente, J., & Kocan, K. M. (2006). Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. *Parasite immunology*, 28(7), 275–283. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00828.x>

de la Fuente, J., Almazan, C., Canales, M., Perez de la Lastra, J.M., Kocan, K.M., Willadsen, P. (2007). A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Anim. Health Res. Rev.* 8, 23e28.

Frisch J. E. (1999). Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. *International journal for parasitology*, 29(1), 57–75. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(98\)00177-5](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(98)00177-5)

Jonsson, N.N., 2006. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Vet. Parasitol.* 137, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.010>

León-Clavijo, M. A., Edith C Hernandez-Rojas, E. C. (2012). Descripción de la proteína bm86, su polimorfismo y su papel como inmunógeno en el ganado bovino infestado por garrapatas. *ISSN: 1794-2470* ed: Imprenta Nacional de Colombia vol. 10, 17: 113-115

Pérez-Soria, M. (2020). Desarrollo y evaluación de una vacuna multiantigénica y multiepitópica contra garrapatas *Rhipicephalus microplus*. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.

Quiroz, H., Figueroa, J. A., Ibarra, C. F., López, M. E. (2011). Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos. 1ª ed. 477-495.

Rodríguez-Vivas, R.I., Hodgkinson, J. E., J.Trees, A. (2012). Acaricide resistance in *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*: Current status and mechanisms of resistance. *Rev mex de cien pecu.* 3: 9-24



DETECCIÓN DE BACTERIAS DE LOS GÉNEROS *BARTONELLA* Y *RICKETTSIA* EN GARRAPATAS DE VERTEBRADOS EN MÉXICO

DETECTION OF BACTERIA OF THE GENERA *BARTONELLA* AND *RICKETTSIA* IN VERTEBRATE TICKS IN MEXICO.

Alejandra Ortega Salgado¹, Carmen Guzmán Cornejo², Alejandro Ocegüera Figueroa²

¹Colección Nacional de Helmintos, Departamento de Zoología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México. ²Laboratorio de Acarología, Departamento de Biología Comparada, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México. alee_ortega@ciencias.unam.mx

ABSTRACT

Ticks of the order Ixodida are well-recognized as vectors of different microorganisms causing diseases in many animals, including humans. In the present work, bacteria of the genus *Bartonella* and *Rickettsia* were detected and identified in ticks through PCR and comparison of selected molecular markers (DNA sequences) with sequences available in GenBank. Tick samples were collected from domestic and wild vertebrates in the states of Veracruz, Oaxaca and Morelos, Mexico between August 2022 and January 2024. In total, 273 tick specimens were obtained from dogs, cats, opossums (*Didelphis* sp.), mice (*Heteromys* sp., *Peromyscus* sp.), toads (*Rhinella marina*) and one cat-eyed snake (*Leptodeira* sp.). Total DNA was extracted from each ectoparasite and then PCR was performed in pulls and individual samples of ectoparasites to amplify a fragment of ~800 bp of the gene *gltA*, with specific primers for both, *Rickettsia* and *Bartonella*. In total, 13 positive samples were obtained for *Rickettsia*, of which some samples are related to three species of *Rickettsia*: *R. parkeri*, *R. belli* and *R. monacensis*. In the case of *Bartonella*, 13 samples resulted positive and their more similar sequences in GenBank are *B. vinsonii*, *B. clarridgeiae* and *Bartonella* sp. Our results represent an improvement on the knowledge of the distribution and the identification of bacterial species with zoonotic potential in Mexico and contribute to a better identification of potential risks for humans.

Palabras clave: garrapatas, zoonosis, bacterias, vectores.

INTRODUCCIÓN

Las garrapatas duras pertenecen a la familia Ixodidae dentro del orden Ixodida. Reciben este nombre porque poseen un escudo que recubre el cuerpo o idiosoma; en las hembras, se presenta en la región anterodorsal y en los machos recubre todo el dorso. El gnatosoma incluye las partes bucales, es decir, los quelíceros y pedipalpos, además de una estructura que sirve para la fijación al hospedero llamada hipostoma. Estos artrópodos son considerados como parásitos hematófagos intermitentes que requieren de la sangre de sus hospederos vertebrados durante cada estadio de su ciclo de vida (Gallardo, 1999). Son consideradas de importancia médica y veterinaria, ya que pueden ser vectores de microorganismos (e.g., bacterias de los géneros *Borrelia* y *Rickettsia*), causantes de enfermedades (Gordillo, 2016). En México la distribución de garrapatas duras incluye los



32 estados de la República, sin embargo, las zonas de mayor prevalencia son la noreste y norte del país comprendiendo los estados de Nuevo León, Tamaulipas, Baja California Norte y Sur, Coahuila, Chihuahua y Sonora (Rodríguez--Vivas 2019).

Los primeros casos referidos de enfermedades causadas por estas bacterias en humanos en México se registraron en 1930 y fueron atribuidas a especies del género *Rickettsia* (López, 2010). A finales del siglo XX, en 1996 se registró *Ehrlichia canis*; en 1997 *Ehrlichia chaffeensis*, que provoca la Ehrlichiosis Monocítica Humana (Gongora, 1999) y en 2007, *Borrelia burgdorferi* causante de la enfermedad de Lyme (Gordillo, 2016). La forma de alimentación de las garrapatas es el mecanismo para la transmisión de las bacterias causantes de enfermedades, debido a que durante la ingesta de sangre, algunas bacterias son transportadas a los tejidos del hospedero. Aunque depende mucho del estadio de desarrollo en el que se encuentre y de la especie, una hembra adulta puede alimentarse durante 7 a 12 días, mientras que los machos pueden permanecer meses adheridos a su hospedador y alimentarse de manera intermitente. Para cada estadio, dependiendo de la especie, la garrapata puede tener de 1 a 3 hospederos de diferentes especies, como es el caso de *Dermacentor variabilis* que en su etapa adulta se puede alimentar de ganado, perros o del hombre, mientras que en su etapa ninfal se alimenta de mamíferos más pequeños como los roedores (Oliver, 1989). Por el contrario, *Rhipicephalus microplus* sólo requiere de un hospedador bovino para su alimentación durante la totalidad de su ciclo de vida (Gallardo, 1999).

Uno de los grupos de bacterias causantes de enfermedades en humanos más importante pertenece al género *Rickettsia*, en el que se incluyen cerca de 35 especies a nivel mundial de las cuales 14 han sido registradas en México (Sánchez-Montes, 2020). Las especies del género son cocobacilos intracelulares Gram negativas que pueden infectar a una amplia gama de vertebrados tanto silvestres como domésticos y al humano. Estas bacterias causan enfermedades en los humanos como la Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas (FMMR) o el tifus murino. La garrapata del perro *Rhipicephalus sanguineus*, ha sido considerada como el vector principal de la FMMR en humanos, sin embargo, especies de garrapatas de otros géneros, como *Amblyomma* también son vectores (Sánchez-Montes, 2020). Por otra parte, las bacterias del género *Bartonella* son formas Gram negativas que están incluidas en la familia Bartonellaceae, conformada hasta el momento por 37 especies, ocho de las cuales se han registrado en humanos (Walker, 1996).

Actualmente, las enfermedades causadas por *Rickettsia* y *Bartonella* son consideradas zoonosis reemergentes de difícil detección, control y prevención. Por otro lado, son pocos los datos sobre la identidad y distribución geográfica de estas bacterias en nuestro país, por lo que el objetivo del presente trabajo es detectar la presencia de estos géneros de bacterias en garrapatas asociadas con vertebrados, tanto domésticos como de vida libre, mediante métodos de detección molecular (Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR), en los estados de Veracruz, Oaxaca y Morelos, México.



MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron seis muestreos de garrapatas de animales domésticos y silvestres entre agosto de 2022 y enero de 2024, en los estados de Veracruz, Oaxaca y Morelos, México. Las garrapatas fueron recolectadas directamente de sus hospederos mediante el uso de pinzas y peines para piojos. Los ejemplares recolectados fueron fijados en alcohol al 96% y se mantuvieron en refrigeración (4°C) hasta su procesamiento.

La extracción de DNA total se realizó de manera individual para cada ectoparásito con ayuda del kit PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. La detección de las bacterias se realizó mediante PCR punto final empleando los siguientes protocolos y juegos de primers o iniciadores:

DETECCIÓN DE BACTERIAS DEL GÉNERO *RICKETTSIA*

El DNA total extraído de las garrapatas fue utilizado para la detección de bacterias del género *Rickettsia* mediante la amplificación del gen citrato sintasa (*gltA*) utilizando los primers propuestos por De Sousa et al. (2006): RpCS415 GCTATTATGCTTGCGGCTGT y RpCS1120 TGCATTTCTTTCCATTGTGC, los cuales amplifican secuencias de entre 800 y 1200 pb. La reacción de PCR se realizó individualmente llegando a un volumen final de 15 µl, que incluye: 13 µl de master mix (0.5 µl de 50 mM MgCl₂, 3 µl de 5X buffer, 0.2 µl de cada primer a 10 mM, 0.1 µl de Taq DNA polimerasa [MyTaq™] y 9 µl de agua bi-distilada) y 2 µl de DNA. En un termociclador Applied Biosystems™ Veriti™, se siguió el perfil térmico propuesto por De Sousa et al. (2006): 94°C durante 2 minutos, 35 ciclos conformados por tres procesos: desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 58°C por 30 segundos y una extensión a 72°C por 90 segundos, al final una última extensión a 72°C durante 7 minutos.

DETECCIÓN DE BACTERIAS DEL GÉNERO *BARTONELLA*

Para la detección del género *Bartonella* se utilizaron los primers propuestos por Norman et al. (1995): BhCS_781p GGGGACCAGCTCATGGTGG y BhCS_1137 AATGCAAAAAGAACAGTAAACA, que amplifican ~380pb del gen *gltA*. Las reacciones se llevaron a cabo a un volumen final de 15 µl con las cantidades de reactivos previamente descritas. Se utilizaron las siguientes condiciones propuestas por Singer et al. (2020): un ciclo inicial a 95°C por 10 minutos, seguido 40 ciclos a 94°C por 30 segundos de desnaturalización, 57°C por 1 minuto de alineamiento, 72°C por 1 minuto de extensión y una extensión final a 72°C por 5 minutos.

Para cada ensayo de PCR se incluyó un control negativo (agua) y un control positivo. Tanto las muestras control junto con los productos de la PCR se tiñeron con Red Gel y se observaron en un gel de agarosa al 1.5%.

Todos los productos de PCR que resultaron positivos se purificaron con el método Sephadex y se secuenciaron en el Laboratorio Nacional de Biodiversidad (LANABIO) en el Laboratorio de Secuenciación Genómica del Instituto de Biología de la UNAM. Las secuencias de DNA obtenidas fueron reconciliadas y editadas en los programas Geneious y Mesquite 3.81, para un posterior análisis de BLAST en GenBank, en el que se compararon con secuencias ya publicadas y disponibles en la plataforma.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En total, se recolectaron 273 ejemplares de garrapatas pertenecientes a cuatro géneros: *Amblyomma* (192), *Rhipicephalus* (73), *Ixodes* (2) y *Dermacentor* (7), de 4 especies de mamíferos (*Canis lupus domesticus* (41), *Didelphis* sp. (1), *Peromyscus* sp. (3) y *Heteromys* sp. (4), 1 especie de anfibio (*Rhinella marina* (23)) y una especie de reptil (*Leptodeira polysticta* (1)).

Para el caso de *Rickettsia*, el 4.76% (13/273) resultaron positivas, incluyendo a **5** machos de *A. ovale* asociadas a *C. lupus familiaris*, **2** hembras de *Ixodes* sp. asociadas a *C. lupus familiaris*, **1** larva de *Dermacentor* sp. asociada a *Peromyscus* sp., **4** larvas de *Amblyomma* sp. asociadas a *Leptodeira polysticta* y **1** macho de *A. dissimile* asociado a *Rhinella horribilis*, todas en el estado de Veracruz.

Para el caso de *Bartonella* el 4.76% (13/273) resultaron positivas incluyendo **1** larva de *Dermacentor* sp. asociada a *Peromyscus* sp. en Veracruz; **1** larva de *Amblyomma* sp. asociada a *R. horribilis* en Veracruz; **2** ejemplares macho de *Rhipicephalus sanguineus* s.l. parasitando a *C. lupus familiaris* en Oaxaca; **2** larvas de *R. sanguineus* s.l. asociadas a *C. lupus familiaris* en Oaxaca; **2** ejemplares macho de *Amblyomma* sp. parasitando a *Rhinella horribilis* en Oaxaca; **4** ninfas de *R. sanguineus* s.l. asociadas a *C. lupus familiaris* en Oaxaca y **1** ejemplar hembra de *R. sanguineus* s.l. parasitando a *C. lupus familiaris* en Oaxaca.

Con base en las secuencias obtenidas y su comparación con la base de datos GenBank mediante la herramienta Blast, se obtuvieron las siguientes especies como las más similares para *Rickettsia* y *Bartonella* respectivamente:

Rickettsia parkeri (1 muestra)

Rickettsia bellii (7 muestras)

Rickettsia monacensis (5 muestras)

Bartonella vinsonii (4 muestras)

Bartonella clarridgeiae (8 muestras)

Bartonella sp. (1 muestra)

El género *Rickettsia* en México se ha registrado a lo largo del país, siendo las zonas de mayor prevalencia los estados del norte. Del total de muestras analizadas, sólo 13 de Veracruz resultaron positivas. El género *Rickettsia* se ha dividido en cuatro grupos: Un grupo "Basal" (*R. bellii* y *R. canadensis*) que incluye especies no patógenas; el grupo Tifus (*R. prowazekii* y *R. typhi*); el grupo de las Fiebres Manchadas (*R. rickettsii*, *R. parkeri*) y un grupo Transicional (*R. akari*, *R. felis*) (Rodríguez, 2019)

Las especies encontradas en el presente estudio corresponden en su mayoría a *R. bellii* (grupo "basal"), agente no patógeno. Por otro lado, también registramos garrapatas positivas para *R. parkeri* y *R. monacensis*, las cuales pertenecen al grupo de las fiebres manchadas y que causan enfermedades febriles. *Rickettsia monacensis* representa un

nuevo registro para México en *Ixodes* sp. parasitando a *C. lupus familiaris*; mientras que *R. monacensis* ya había sido registrada previamente en *Ixodes boliviensis* e *Ixodes ricinus* en Costa Rica, Nicaragua y Europa (Springer, 2018) (Jado, 2007). Por otro lado, *R.parkeri* la encontramos en *A. ovale*, parasitando *C. lupus familiaris*, esta incidencia ya se había reportado en el estado de Veracruz. (Sánchez-Montes, 2020)

El género *Bartonella* incluye algunas especies como *B. henselae* o *B. quintana* que tienen distribución cosmopolita, otras como *B. bacilliformis* se concentran únicamente en América del Sur y América Central (Ferrés, 2005). En México se ha referido a *B. elizabethae*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *B. vinsonii* entre al menos otras cuatro especies más de *Bartonella* patógenas (Sánchez-Montes 2019).

Bartonella es un género que incluye especies que se encuentran principalmente en pulgas y piojos, aunque también se ha comprobado su transmisión por garrapatas (Reis, 2011). En el presente trabajo obtuvimos 13 registros positivos pertenecientes a tres especies del género *Bartonella* en garrapatas de los géneros *Amblyomma*, *Dermacentor* y *Rhipicephalus* que se encontraban parasitando *C. lupus familiaris*, *Peromyscus* sp. y *Rhinella marina*, en Oaxaca se encontraron 13 registros positivos y ninguno para los estados de Morelos y Veracruz.

Las especies de bacterias referidas en el presente estudio (*B. vinsonii* y *Bartonella* sp.) pueden ocasionar endocarditis en humanos y aunque no son responsables de causar la Enfermedad de Arañazo de Gato, *B. clarridgeiae* si lo es, aunque en menor medida que *B. henselae* (Lopardo,2021).

CONCLUSIONES

Es importante conocer la identidad y distribución de bacterias causantes de enfermedades zoonóticas dentro del país y establecer el tipo de vectores que están en contacto con el humano y animales domésticos; asimismo, es necesario seguir realizando este tipo de trabajos ya que el conocimiento de la biología básica de estos organismos resultará datos de gran importancia para la mejor toma de decisiones para la prevención y control de estas zoonosis.

En el presente trabajo, se registró la presencia de *Rickettsia* y *Bartonella* en los estados de Veracruz y Oaxaca respectivamente, en garrapatas que se encontraban parasitando animales domésticos y algunos silvestres.

Este trabajo resalta la importancia de realizar investigaciones en estos estados de la República con la finalidad de implementar vigilancia epidemiológica. Además de dar a conocer nuevos vectores y reservorios de estas bacterias no reportados con anterioridad.

LITERATURA CITADA

Ferrés G, M., Abarca V, Katia, Godoy M, Paula, García C, Patricia, Palavecino R, Elizabeth, Méndez R, Gabriela, Valdés O, Alicia, Ernst M, Santiago, Thibaut L, Julio, Koberg, Jurgen, Chanqueo C, Leonardo, & Vial C, Pablo A. (2005). Presence of *Bartonella henselae* in cats, in Chile. *Revista médica de Chile*, 133(12), 1465-1471. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872005001200008>

Gallardo J. S. (1999). *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae): preoviposición, oviposición, incubación de los huevos y geotropismo. En: Bioagro. 11(3):77-87

Gongora B., Zavala-Jorge, Castro-Carlos, González-Pedro (1999) Primer caso de ehrlichiosis en México. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Yucatán, Enfermedades Infecciosas y Microbiología, 19, 139

Gordillo, P. (2016). Seminario “Enfermedad de Lyme y otras zoonosis emergentes transmitidas por garrapatas”, Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias. Recuperado el 12 de junio, 2022 de: <https://www.insp.mx/avisos/4055-enfermedad-lyme.html>

Jado, I., Oteo, J. A., Aldámiz, M., Gil, H., Escudero, R., Ibarra, V. Anda, P. (2007). *Rickettsia monacensis* and Human Disease, Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 13(9), 1405. <https://doi.org/10.3201/eid1309.060186>.

Lopardo, H. (2021) “Manual de microbiología clínica de la Asociación Argentina de Microbiología: Bacterias de importancia clínica” 1a ed. - Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología, 2021.

López, H. (2010) Rickettsiosis, una enfermedad presente pero olvidada. Secretaría de Salud, 27, 1-28.

Norman AF, Regnery R, Jameson P, Greene C, Krause DC. (1995). Differentiation of Bartonella-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. *Journal of Clinical Microbiology* Vol. 33 N°7: <https://doi.org/10.1128/jcm.33.7.1797-1803.1995>

Oliver JH. 1989. Biology and systematics of ticks (Acari: Ixodida). *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* .20:397-430 <https://doi.org/10.1146/annurev.es.20.110189.002145>

De Sousa, R. C. Barata, L. Vitorino, M. Santos-Silva, C. Carrapato, J. Torgal, D. Walker, F. Bacellar “*Rickettsia sibirica* isolation from a patient and detection in ticks” Portugal. *Emerg Infect Dis.*, 12 (2006), pp. 1103-1108, [10.3201/eid1207.051494](https://doi.org/10.3201/eid1207.051494)

Reis C., Cote M, Le Rhun D, Lecuelle B, Levin ML, Vayssier-Taussat M, et al. (2011) Vector Competence of the Tick *Ixodes ricinus* for Transmission of *Bartonella birtlesii*. *Plos Neglected Tropical Diseases* 5(5): e1186. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001186>

Rodríguez Vivas, R., Ojeda Chi, M., Bolio González, M., Rosado Aguilar, J. (2019). Las garrapatas como vectores de enfermedades zoonóticas en México. *Bioagrociencias*, 12(1). doi: <http://dx.doi.org/10.56369/BAC.2993>

Sánchez-Montes, S., Cabrera-Garrido, M., Ríos-Muñoz, C. A., Lira-Olguín, A. Z., Acosta-Gutiérrez, R., Mata-Galindo, M., Hernández-Vilchis, K., Navarrete-Sotelo, D. M., Colunga-Salas, P., León-Paniagua, L. & Becker, Ingeborg. (2019). Detection of *Bartonella* and *Rickettsia* in small mammals and their ectoparasites in México. *Therya*, 10(2), 69-79. <https://doi.org/10.12933/therya-19-722>

Sánchez-Montes, S., Colunga-Salas, P., Lozano-Sardaneta, Y. N., Zazueta-Islas, H. M., Ballados-González, G. G., Salceda-Sánchez, B., Huerta-Jiménez, H., Torres-Castro, M., Panti-May, J. A., Peniche-Lara, G., Muñoz-García, C. I., Rendón-Franco, E., Ojeda-Chi, M. M., Rodríguez-Vivas, R. I., Zavala-Castro, J., Dzul-Rosado, K., Lugo-Caballero, C., Alcántara-Rodríguez, V. E., Delgado-de la Mora, J., Licona-Enríquez, J. D., Becker, I. (2021). The genus *Rickettsia* in Mexico: Current knowledge and perspectives. *Ticks and tick-borne diseases*, 12(2), 101633. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101633>

Springer A., V., M. Montenegro, S. Schicht, S. Wölfel, S. R. Schaper, L. Chitimia-Dobler, S. Siebert, C. Strube, (2018) Detection of *Rickettsia monacensis* and *Rickettsia amblyommatis* in ticks collected from dogs in Costa Rica and Nicaragua. *Ticks and Tick-borne Disease* <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.08.002>.

Walker DH (1996). Rickettsiae. In: Barron's Medical Microbiology (Barron S. et al, eds.) (4th ed. edición). Universidad of Texas Medical Branch. ISBN 0-9631172-1-1



LA INMUNIZACIÓN DE CONEJOS CON PÉPTIDOS DE RI-86 Y VDAC AFECTAN NEGATIVAMENTE LOS PARÁMETROS BIOLÓGICOS DE *Rhipicephalus linnaei* ADULTAS

IMMUNIZATION OF RABBITS WITH RI-86 AND VDAC PEPTIDES NEGATIVELY AFFECTS BIOLOGICAL FITNESS OF ADULT *Rhipicephalus linnaei* ticks.

Pavón-Rocha, Aldo J^{1,2}, Reyes-de Luna, Gilberto¹, Almazán, Consuelo¹, Camacho-Nuez, Minerva³, Gómez-Soto, José G⁴, Cedillo-Peláez, Carlos⁵, Mosqueda, Juan¹

¹Laboratorio de Inmunología y Vacunas, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro. ²Doctorado en Ciencias de la Producción y la Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. ³Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México. ⁴Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro. ⁵Laboratorio de Inmunología Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, Ciudad de México. Correspondencia: joel.mosqueda@uaq.mx

Abstract

The tick *Rhipicephalus sanguineus* s.l. now renamed *Rhipicephalus linnaei*, is distributed worldwide due to its ability to adapt to urban and non-urban environments. *R. linnaei* is a vector of multiple pathogens such as *Babesia vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Anaplasma platys*, and *Rickettsia rickettsii*, among others. It infests multiple hosts, mainly dogs and occasionally human beings, therefore the development of immunological control methods against this tick species is relevant to human and animal health. In this study, we identified peptides containing predicted B-cell epitopes in the voltage-dependent anion channel (RI-VDAC) and RI-86 (a homolog of Bm-86), from *R. linnaei* followed by an evaluation of their immunogenicity and their ability to reduce the biological fitness of ticks. For this, 3 conserved peptides in the RI-VDAC (Rs-VDAC 1, 2 and 3) and Rs-86 (RI-86 1, 2 and 3) antigens were selected by bioinformatics analysis tools (ABCpred, BcePred and BepiPred). The peptides were commercially synthesized and used in an immunization assay wherein doses were prepared for each peptide at a concentration of 100 µg in a final volume of 1 ml, combined with a commercial adjuvant (Montanide™ ISA 71 vg). Then, 2 8-weeks old, New Zealand rabbits, were immunized subcutaneously with each peptide four times, every three weeks. The generation of specific antibodies against each peptide was assessed by indirect ELISA, and the capacity of these antibodies to recognize the native protein was performed by immunohistochemistry. Finally, immunogenic peptides were evaluated in a tick infestation challenge using 10 female and 10 male *R. linnaei* ticks placed on cloth patches on immunized rabbits. The efficacy of each peptide was 23.59%, 32.02% and 28.06% for peptides RI-86 1 and 2, and peptide VDAC 2, respectively. We conclude that peptides in the *R. linnaei* RI-86 and VDAC antigens, that reduce ticks' biological fitness, were identified in this work, which will allow the future development of multi-epitope molecules.

Key words: B-cell epitope, Immunization, *Rhipicephalus linnaei*

INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos del filo Arthropoda; estos organismos parasitan a todos los grupos de vertebrados y son considerados el segundo vector más importante de patógenos en humanos y el primero en animales domésticos y silvestres (De la Fuente *et al.*, 2008). Las garrapatas, además de transmitir enfermedades, causan diversos problemas clínicos al hospedero que parasitan, como inflamación de piel, irritación, dermatitis, prurito, estrés, respuestas alérgicas y anemia.

El término garrapata marrón del perro ha sido referido desde hace más de 100 años a la especie *Rhipicephalus sanguineus*, sin embargo, la investigación que se ha realizado en torno a la identificación taxonómica de esta especie, ha resultado en la clasificación de un grupo de garrapatas que comparten ciertas características morfológicas, y al cual se le denominó complejo o grupo de *R. sanguineus*. El complejo *R. sanguineus* está conformado hasta el momento por 12 especies de garrapatas pertenecientes al género *Rhipicephalus*, las cuales han sido identificadas y diferenciadas por claves taxonómicas con base en su morfología, sin embargo, el uso y evaluación del genoma mitocondrial ha permitido clasificar más apropiadamente a estas especies de garrapatas (Šlapeta *et al.*, 2021). En México se ha identificado taxonómicamente la presencia de la garrapata marrón del perro en distintas regiones geográficas, sin embargo, se desconocía las especies presentes de este complejo en el país. En estudios recientes se ha demostrado mediante técnicas moleculares que la principal especie del complejo *R. sanguineus* mayormente distribuida en México es, *R. sanguineus* sensu lato linaje tropical (Almazán *et al.*, 2023). Šlapeta *et al.* (2022) secuenciaron el genoma mitocondrial de garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* s.l. linaje tropical de distintas regiones geográficas, incluyendo México, demostrando que estas se agrupan y diferencian en otra especie dentro del complejo, a la cual se le denominó *Rhipicephalus linnaei* (Audouin, 1826).

El método tradicional mediante el cual se hace frente a las infestaciones por garrapatas es el uso de acaricidas químicos. Estos productos han sido muy exitosos a lo largo del tiempo, sin embargo, la generación de resistencia por parte de las garrapatas y todos los problemas ambientales que ocasionan su uso (Martínez-Ibañez *et al.*, 2023), ha propiciado la búsqueda de nuevos métodos de control sustentables contra las garrapatas, como las vacunas. El fundamento básico por el cual funcionan las vacunas contra garrapatas, es que los anticuerpos generados por el sistema inmunitario del hospedero contra el antígeno utilizado, puedan acceder en suficientes cantidades a la garrapata durante la alimentación, para unirse a la proteína de interés y bloquear su función, viéndose afectado negativamente algún parámetro biológico durante el ciclo de vida del parásito (De la Fuente y Contreras, 2015). En la actualidad, las únicas vacunas comerciales contra garrapata que han logrado salir al mercado son las que utilizan el antígeno Bm86 de *Rhipicephalus microplus* (TickGARD®, Gavac® e Ixovac®).

Las proteínas que evaluaremos en este trabajo, son, el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) y el homólogo de Bm86 en *Rhipicephalus linnaei*, RI-86. VDAC es una porina mitocondrial conservada en todos los organismos eucariontes. Tiene funciones biológicas

involucradas en el transporte de metabolitos al interior y exterior de la mitocondria; también es un componente central de la maquinaria apoptótica de la célula, por lo que, es de suma importancia para mantener un equilibrio en la fisiología de los organismos. En garrapatas, se ha identificado VDAC en *Rhipicephalus microplus* y se ha utilizado la proteína recombinante para evaluar su capacidad como antígeno vacunal, obteniendo una eficacia del 80% (Ortega- Sánchez *et al.*, 2020). Hasta el momento, no hay reportes de la caracterización y la evaluación del antígeno VDAC en *R. linnaei*. Por otro lado, RI-86 es el homólogo del antígeno Bm86 de *R. microplus*, el cual fue aislado del intestino de esta garrapata. Debido a esto, se ha propuesto su uso como candidato vacunal contra la garrapata *R. sanguineus* s.l con el fin de obtener eficacias similares a las observadas con las vacunas que utilizan Bm86 recombinante, como Gavac® e Ixovac® (M. Rodríguez *et al.*, 1995). Hasta el momento no hay estudios que hayan evaluado el efecto vacunal de esta proteína en la garrapata marrón del perro, *R. linnaei*.

El objetivo de este trabajo fue identificar y evaluar la inmunogenicidad de péptidos que contienen epítomos de células B en las proteínas RI-86 y VDAC, así como evaluar el efecto protector de los anticuerpos contra estas proteínas en adultas de *R. linnaei*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de péptidos

Con secuencias obtenidas previamente de manera experimental de la proteína VDAC de *R. linnaei*, y utilizando 3 secuencias de RI-86 obtenidas de la base de datos del NCBI, se seleccionaron 3 péptidos con epítomos B predichos en cada una de las proteínas.

Para la selección de péptidos se utilizó la metodología descrita por Perez-Soria *et al.* (2024). Primero, se identificaron regiones conservadas entre los distintos aislados analizados, posteriormente, se descartaron las regiones de la proteína correspondientes al péptido señal, hélices transmembranales y regiones hidrofóbicas. Después, utilizando los programas bioinformáticos BcePRED, ABCpred y BepiPred 2.0 se identificaron péptidos con probabilidad de contener epítomos de células B y, por último, se analizaron con la herramienta BLAST del NCBI para determinar si la secuencia del péptido no coincidiera en un alto porcentaje con proteínas del hospedero.

Inmunizaciones

Los péptidos seleccionados se enviaron a sintetizar comercialmente en un sistema de dendrímeros de 8 brazos (MAP8). Posteriormente se formularon dosis vacunales utilizando 100 µg de péptido en un volumen final de 1 ml, mezclado con un adyuvante comercial de tipo Montanide® ISA 71VG. Las inmunizaciones se realizaron utilizando dos conejos de

raza nueva zelanda de 2 meses de edad por cada péptido a evaluar, administrando un total de 4 inmunizaciones con intervalos de 21 días entre cada una (Perez-Soria et al., 2024).

Evaluación de la inmunogenicidad

Se obtuvieron muestras de suero previo a la primera inmunización de cada conejo, y después de cada inmunización al día 21, 42, 63 y 84. Para evaluar la generación de anticuerpos se realizó una prueba de ELISA indirecta; para esto, se sensibilizaron placas de 96 pozos (Corning®) con 2 µg por ml de cada péptido. Se incluyó un triplicado de cada suero a una dilución 1:500 y, se utilizó un anticuerpo secundario anti IgG de conejo (H+L) conjugado con HRP (peróxidasa de rábano). La reacción se reveló de acuerdo a lo establecido por el fabricante y se leyó a los 20 minutos, utilizando un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 450 nm.

Por último, con el fin de demostrar que los anticuerpos reconocen la proteína nativa en el tejido de la garrapata, se llevó a cabo una inmunohistoquímica. Para esto se utilizaron cortes histológicos de garrapatas *R. linnaei* adultas semi repletas, embebidas en parafina; los cortes fueron hechos de de 3 µm de grosor y fueron colocados en porta objetos electrocargados. Posteriormente, siguiendo un protocolo estándar de inmunohistoquímica (Ramos-Vara, 2005), se incubaron los sueros pre inmunización y post cuarta inmunización a una dilución de 1:200 y, se utilizó un anticuerpo secundario anti IgG de conejo (H+L) conjugado con HRP a una dilución 1:300. La reacción se reveló con un kit comercial utilizando el cromógeno DAB, y se observó a los 5 minutos en un microscopio óptico con un objetivo de 40x.

Evaluación del efecto protector de los péptidos

Con el fin de evaluar el efecto protector de cada péptido inmunogénico, se inmunizaron dos nuevos conejos con la misma dosis mencionada anteriormente, y se utilizaron dos conejos control inmunizados únicamente con adyuvante y PBS. Se administraron dos inmunizaciones (día 0 y día 21) y, 21 días posteriores a la última inmunización (día 42), se infestó cada conejo con 10 garrapatas hembras y 10 garrapatas machos, utilizando un parche de tela adherido a la piel. El cálculo de la eficacia de cada péptido se obtuvo con la siguiente formula $E = 100 \times [1 - (E_W \times E_O \times E_H)]$, donde E_W representa el ratio del peso de repleción, E_O es el ratio entre la ovoposición y E_H es el ratio de la eclosión entre las garrapatas de ambos tratamientos (inmunizados/control) (Galay et al., 2014). Los datos obtenidos se analizaron adicionalmente con la prueba *t* de Student para determinar diferencias estadísticas entre tratamientos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se seleccionaron 3 péptidos de cada proteína. Estos péptidos fueron denominados VDAC 1, 2 y 3, y RI-86 1, 2 y 3. Los resultados mostraron que solo el péptido VDAC 2 y, RI-86 1 y 2 fueron inmunogénicos mostrando densidades ópticas con diferencia estadística significativa al compararse con los sueros de los conejos control en el ensayo de ELISA indirecta. Los péptidos que no generaron anticuerpos se descartaron. Posteriormente, se demostró que los anticuerpos contra los péptidos reconocen la proteína nativa en el tejido

de la garrapata, observando inmunomarcaje positivo en células del epitelio intestinal y ovocitos en el ensayo de inmunohistoquímica.

En el ensayo de evaluación de eficacia, una vez se terminaron de repletar las garrapatas hembras en los conejos inmunizados, se pesaron y se colocaron en una incubadora a 28 °C y una humedad de 80% para permitir su ovoposición. Los resultados mostraron una media del peso de repleción de 147.873 mg para el péptido RI-86 1, de 133.439 mg para el péptido RI-86 2 y de 143.19 mg para el péptido VDAC 2, que al compararlos con la media de las garrapatas del tratamiento control de 150.117 mg, se observó una reducción, pero no fue estadísticamente significativa. En el caso del peso de la masa de ovoposición para el péptido RI-86 1 y 2 se observaron medias de 91.5 mg y 82.5 mg y, de 91.11 mg para VDAC 2, que al compararlos con la media del peso de la ovoposición de las garrapatas control, de 97.82 mg, se observaron diferencias pero sin significancia estadística. Por último, el porcentaje de eclosión mostró en los tratamientos inmunizados con RI-86 1 y 2 un resultado de 63.62% y de 69.56%, y para VDAC 2, un 62.12%, que al compararlos con el porcentaje de eclosión de las garrapatas control de 76.72%, se observó una disminución sin significancia estadística. En todos los tratamientos se aplicó la fórmula para calcular la eficacia de cada péptido, mostrando un 23.59%, 32.02% y 28.06% para los péptidos RI-86 1 y 2, y VDAC 2 respectivamente.

Los resultados observados en este experimento corroboran que el uso de péptidos sintéticos puede estimular una respuesta inmune contra una proteína, y que por consecuente es posible alterar negativamente los parámetros biológicos de las garrapatas en un experimento de inmunización como se ha observado en otros estudios (Pérez-Soria et al., 2024). En un trabajo previo, en donde se utilizó un péptido de VDAC de *R. microplus* (VDAC 3) se observó una eficacia del 40.69%, teniendo su mayor efecto negativo sobre los parámetros de ovoposición y eclosión, similar a este trabajo (López-Díaz, 2019). Para el caso de RI-86, este es el primer estudio donde se evaluó el uso de péptidos de esta proteína como inmunógeno. Sin embargo, en un estudio donde se utilizó la proteína recombinante Bm86 en un desafío vacunal contra la garrapata *R. sanguineus* se observó una disminución estadísticamente significativa del peso de repleción y de la ovoposición, pero no en el porcentaje de eclosión. En este estudio no reportaron porcentaje de eficacia (Perez-Perez et al., 2010).

CONCLUSIONES

Puesto que solo se utilizaron péptidos de las proteínas VDAC y RI-86, los resultados de eficacia muestran porcentajes por debajo del 35%, sin embargo, la identificación de péptidos inmunogénicos permitirá establecer las bases para el desarrollo de una molécula que pueda contener múltiples epítomos de diferentes proteínas, que en conjunto puedan aumentar la eficacia contra esta especie de garrapata.

Se concluye que las proteínas RI-86 y VDAC de *R. linnaei*, contienen péptidos con epítomos de células B capaces de generar una respuesta inmunológica protectora contra esta garrapata.

LITERATURA CITADA.

De la Fuente, J., Estrada-Peña, A., Venzal, J. M., Kocan, K. M., & Sonenshine, D. E. (2008). Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Frontiers in Bioscience*, 13, 6938-6946.

Šlapeta J, Chandra S, Halliday B. The "tropical lineage" of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato identified as *Rhipicephalus linnaei* (Audouin, 1826). *Int J Parasitol.* (2021): 51(6):431-436. doi: 10.1016/j.ijpara.2021.02.001

Almazán C, Reyes de Luna G, Tinoco-Gracia L, González-Álvarez VH, Zając Z, Kulisz J, Woźniak A, Cabezas-Cruz A, Mosqueda J. Morphological and molecular identification of the brown dog tick in Mexico. *Vet Parasitol Reg Stud Reports.* (2023); 44:100908. doi: 10.1016/j.vprsr.2023.100908.

Šlapeta J, Halliday B, Chandra S, Alanazi AD, Abdel-Shafy S. *Rhipicephalus linnaei* (Audouin, 1826) recognised as the "tropical lineage" of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato: Neotype designation, redescription, and establishment of morphological and molecular reference. *Ticks Tick Borne Dis.* (2022): 13(6):102024. doi: 10.1016/j.ttbdis.2022.102024.

Martínez-Ibañez F, Cruz-Vázquez C, Osorio-Miranda J, Vitela-Mendoza I, Medina-Esparza L, Lagunes-Quintanilla R, Chávez-Rodríguez A. Determination of a Discriminant Dose to Identify Resistance to Amitraz in *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (Acari: Ixodidae) from Mexico. *Insects.* (2023): 14(7):662. doi: 10.3390/insects14070662.

De la Fuente, J., & Contreras, M. (2015). Tick vaccines: current status and future directions. *Expert Reviews of Vaccines*, 1-10.

Ortega-Sánchez, R., Camacho-Nuez, M., Castañeda-Ortíz, J. E., Martínez-Benítez, M. B., Hernández-Silva, D. J., Aguilar-Tipacamú, G., & Mosqueda, J. (2020). Vaccine efficacy of recombinant BmVDAC on *Rhipicephalus microplus* fed on *Babesia bigemina*-infected and uninfected cattle. *Vaccine*, 38, 3618-3625.

Rodríguez, M., Penichet, M. L., Mouris, A. E., Labarta, V., Luaces, L. L., Rubiera, R., Cordovés, C., Sánchez, P. A., Ramos, E., & Soto, A. (1995). Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. *Veterinary parasitology*, 57(4), 339–349.

Perez-Soria MME, López-Díaz DG, Jiménez-Ocampo R, Aguilar-Tipacamú G, Ueti MW, Mosqueda J. Immunization of cattle with a *Rhipicephalus microplus* chitinase peptide containing predicted B-cell epitopes reduces tick biological fitness. *Parasitology.* (2024): 5:1-10. doi: 10.1017/S0031182024000143.

Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol.* (2005): 42(4):405-26. doi: 10.1354/vp.42-4-405. PMID: 16006601.

Galay, R.L., Miyata, T., Umemiya-Shirafuji, R., Maeda, H., Kusakisako, K., Tsuji, N., Mochizuki, M., Fujisaki, K., Tanaka, T., 2014. Evaluation and comparison of the potential of two ferritins as anti-tick vaccines against *Haemaphysalis longicornis*. *Parasite. Vector.* 7, 482.

López-Díaz D.G. Evaluación de la eficacia vacunal de péptidos de VDAC, voraxina y chitinasa contra *Rhipicephalus microplus*. Tesis de Maestría publicada (2019). Universidad Autónoma de Querétaro.

Perez-Perez, D., Bechara, G., Machado, R., Andrade, G., Vecchio, R. d., Pedroso, M., . . . Farnós, O. (2010). Efficacy of the Bm86 antigen against immature instars and adults of the dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 167, 321-326.



CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA TUMORAL TRADUCCIONALMENTE CONTROLADA (TCTP) EN *BABESIA BOVIS* Y EVALUACIÓN DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTABLECIMIENTO DE LA INFECCIÓN
CHARACTERIZATION OF THE TRANSLATIONALLY CONTROLLED TUMOR PROTEIN (TCTP) IN *BABESIA BOVIS* AND EVALUATION OF ITS PARTICIPATION IN THE ESTABLISHMENT OF INFECTION.

Chyntia Pérez-Almeida^{1,2}, *Diego Hernández-Silva*¹, *Edwin Hernández-Arvizu*¹, *Carlos Vega y Murgia*³, *Urso Dávila-Montero*³, *Masahiro Asada*⁴, *Shin-Ichiro Kawazu*⁴, *Juan Mosqueda*¹.

1. Laboratorio de Inmunología y Vacunas, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro. 2. Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de México 3. Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de México. 4. Centro Nacional de Investigación de Enfermedades Protozoarias, Universidad de Agricultura y Medicina Veterinaria de Obihiro, Inada, Obihiro, Japón. joel.mosqueda@uaq.mx

ABSTRACT

Babesia bovis is a protozoan parasite that causes bovine babesiosis. It has been postulated that the translationally controlled tumor protein (TCTP) of Apicomplexa parasites interferes with the immune response by blocking the interaction of host TCTP with its receptor, thereby preventing the activation and proliferation of B-cell lymphocytes. The aim of this work was to characterize *B. bovis* TCTP activity as an immunogen against acute *B. bovis* infection. In the present project, the complete *tctp* gene was amplified and sequenced in *B. bovis* isolates; the gene and predicted protein sequences were highly conserved. Transcription was confirmed by RT-PCR and expression by WB and confocal microscopy. Using bioinformatics tools, the predicted three-dimensional structure was obtained, showing the characteristic alpha-helix. Peptides containing the predicted B cell epitopes were designed, synthesized, and used in immunization assays to demonstrate their immunogenicity by inducing specific antibodies. Cattle were immunized with a mixture of TCTP peptides and then challenged with a virulent strain of *B. bovis*. Clinical signs and parasitemia were monitored for 15 days. Less severe clinical signs were observed in immunized animals compared to controls. A lower level of total antibodies ($p > 0.5$) was observed in the serum of animals in the control group after challenge, indicating interference of *B. bovis* TCTP with the bovine immune response. A neutralization assay was performed using in vitro cultured *B. bovis*, and a percentage inhibition of 32-34% was observed using sera from immunized cattle. These results indicate that *B. bovis* has a *tctp* gene that is transcribed and expressed in intraerythrocytic stages. The protein contains peptides with conserved B cell epitopes that induce neutralizing antibodies in immunized animals. Anti-TCTP antibodies help reduce clinical signs and improve the humoral immune response in infected cattle. Funded by UAQ-FONDEC (FNV-2020-06), USDA-ARS (59-2090-1-001-F), OUAVM and The Japan Society for the Promotion of Science

Key words: TCTP, *B. bovis*, Translationally Controlled Tumor Protein, bovine babesiosis.

INTRODUCCIÓN

La Proteína Tumoral Traduccionamente Controlada (Translationally Controlled Tumor Protein, TCTP) es una proteína altamente conservada en eucariontes (Gachet et al., 1999). Esta proteína participa en una amplia gama de interacciones con diferentes moléculas



(Telerman & Amson, 2017). Se ha identificado que la TCTP puede interactuar tanto de manera intracelular como extracelular. Sin embargo, la mayoría de sus funciones conocidas están relacionadas con el crecimiento celular, la división celular y el sistema inmunológico, estimulando la proliferación celular, lo que sugiere un rol citoprotector (Amzallag et al., 2004; Hinojosa-Moya et al., 2008).

La TCTP ha sido estudiada en diversas especies de *Plasmodium* (organismos del filo Apicomplexa). Se ha destacado que esta proteína es secretada en el suero del hospedador, sugiriendo su implicación en el establecimiento de la parasitemia, ya que interfiere en la respuesta inmune al inhibir la proliferación de las células B del hospedador. Aunque esta proteína es estructuralmente similar entre las especies del filo Apicomplexa, presenta diferencias significativas cuando se compara con la de otras especies. Una característica clave es que, en las especies Apicomplexa, la TCTP posee una hélice alfa adicional en lugar de una hoja β , presente en la estructura de la TCTP de mamíferos (Calderón-Pérez et al., 2014). Estas diferencias estructurales pueden bloquear la interacción de la TCTP del huésped con su receptor, inhibiendo la activación de las células B y, por tanto, la respuesta inmune (Hinojosa-Moya et al., 2008; Calderón-Pérez et al., 2014; Xoconostle-Cázares & Ruiz-Medrano, 2017).

La babesiosis bovina es una enfermedad causada por parásitos del género *Babesia*, que se encuentra distribuida a nivel mundial y es transmitida por varias especies de garrapatas, dependiendo de las condiciones geográficas y climáticas. El cambio climático ha alterado las áreas de distribución de estas garrapatas (de Waal & Combrink, 2006). En México, la babesiosis bovina es causada por *Babesia bovis* y *B. bigemina*, transmitidas principalmente por la garrapata *R. microplus*. De estas, *B. bovis* es la especie más patógena, debido a su alta virulencia y elevada tasa de mortalidad, lo que genera importantes pérdidas económicas en la ganadería (Jongejan & Uilenberg, 2004; Brown & Palmer, 1999).

Para controlar esta enfermedad de manera eficiente y en relación costo-beneficio, se sugiere un protocolo integral que incluya el uso de vacunas, el manejo de garrapatas, la quimioprofilaxis y la rotación de praderas durante el pastoreo (Suarez & Noh, 2011; de Waal & Combrink, 2006). Las vacunas más utilizadas han sido aquellas basadas en parásitos vivos atenuados, las cuales han demostrado grados variables de protección, aunque se consideran inseguras debido al riesgo de reversión de la virulencia (Suarez & Noh, 2011; Fish et al., 2008; Bock, Jackson, Vos & Jorgesen, 2004; Edelhofer et al., 1998). El objetivo de este trabajo es caracterizar la TCTP y analizar su potencial como inmunógeno en la protección contra la infección por *Babesia bovis*.

MATERIAL Y MÉTODO

CARACTERIZACIÓN DEL GEN TCTP DE *B. BOVIS*.

Se identificó el gen *tctp* en el genoma de *B. bovis* por homología en la secuencia de aminoácidos, utilizando la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). El gen completo de *tctp* se amplificó mediante PCR a partir del ADN de diferentes aislados de *B. bovis*. Posteriormente, el gen se clonó y se envió para su secuenciación. Las secuencias obtenidas fueron comparadas, generándose una secuencia consenso. Se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de la TCTP de *B. bovis* con las de *Bos taurus* y *Bos indicus*.

Para predecir la estructura tridimensional de la TCTP, se utilizó una herramienta de modelado por homología de proteínas, tomando como referencia la estructura tridimensional descrita para la TCTP de *P. falciparum* (Eichhorn et al., 2013), partiendo de la secuencia obtenida de las cepas secuenciadas.

Para verificar la transcripción y expresión del gen *tctp*, se realizó una retrotranscripción a partir de ARN, utilizando oligonucleótidos específicos para amplificar la secuencia codificante. Además, se llevó a cabo un Western Blot con proteínas de *B. bovis* y suero de bovinos inmunizados con TCTP, extrayendo las muestras de eritrocitos infectados. También se utilizó microscopía confocal para corroborar la expresión de la proteína mediante frotis de eritrocitos infectados con *B. bovis*.

Con el objetivo de evaluar si los anticuerpos generados contra la TCTP tenían un efecto inhibitorio sobre el proceso de invasión eritrocitaria, se realizó un ensayo de neutralización utilizando un cultivo in vitro de *B. bovis*, durante 72 horas. Para el análisis estadístico se aplicó un ANOVA, seguido de la prueba de Tukey, con un valor de significación de $p < 0.05$.

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS ANTICUERPOS CONTRA LA TCTP DE B. BOVIS EN EL ESTABLECIMIENTO DE LA INFECCIÓN.

Se emplearon programas de bioinformática para predecir las regiones de la proteína con alta probabilidad de ser epítomos B. A partir de estas predicciones, se diseñaron péptidos correspondientes a las regiones seleccionadas. Los inmunógenos se prepararon en una suspensión que contenía los péptidos (60 $\mu\text{g/ml}$ de cada uno) y un adyuvante. Se formaron dos grupos de cuatro bovinos: un grupo control, inmunizado únicamente con el adyuvante, y un grupo experimental, inmunizado con la mezcla de péptidos y adyuvante. Cada grupo fue inmunizado en tres ocasiones, con un intervalo de 21 días entre cada inmunización. Se extrajo sangre de los bovinos antes de cada inmunización mediante punción en la yugular, para obtener suero. Ambos grupos fueron desafiados 24 días después de la tercera inmunización, utilizando eritrocitos infectados con *B. bovis* (1×10^8).

Tras la infección, se realizó un examen físico diario a los bovinos. Para determinar la muerte experimental, se tomaron en cuenta los siguientes criterios: presencia de parásitos en frotis sanguíneo, temperatura corporal superior a 40.5°C durante más de tres días, descenso en el volumen celular aglomerado ($>40\%$), y signos clínicos como anorexia, depresión y letargia. Estos signos fueron verificados por un MVZ a ciegas. Cuando se determinó la muerte experimental, los animales fueron tratados. La diferencia estadística significativa entre los dos grupos se analizó utilizando una prueba T de Student para muestras independientes. El manejo de los animales se realizó posterior a la aprobación del protocolo por el comité de bioética de la FCN, UAQ (15FCN2019).

Se utilizó una ELISA indirecta para cuantificar la cantidad de anticuerpos y determinar el tiempo de generación de los mismos. Para detectar la presencia de anticuerpos, se analizaron los sueros correspondientes a los días 0, 21, 42 y 63 post inmunización. Para la titulación, se utilizaron los sueros pre inmunización y los del día 63 post inmunización. La diferencia estadística significativa se calculó mediante un análisis T de Student para muestras pareadas ($p \leq 0.05$). Dado que los anticuerpos generados por la inmunización con los péptidos podrían interferir con la unión de la TCTP de *B. bovis* a las células B de los bovinos, se analizó si existía una diferencia en la cantidad de anticuerpos totales entre el grupo control y el grupo inmunizado. Se realizó una titulación de anticuerpos totales en el suero mediante ELISA indirecta, utilizando sueros obtenidos pre inmunización, post tercera inmunización (antes del desafío) y 20 días después del desafío. Los sueros se

diluyeron en serie en base 10 hasta alcanzar una dilución de 1:100,000,000,000. La diferencia estadística significativa entre los sueros por animal se calculó utilizando un análisis T de Student para muestras pareadas ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN DEL GEN TCTP DE *B. BOVIS*

Se identificó la secuencia de nucleótidos del gen *tctp* en el genoma de *B. bovis*, ubicado en el cromosoma 4, con una longitud de 889 pb, compuesto por 3 exones y 2 intrones. Esta secuencia está registrada en la base de datos del NCBI con el Gene ID: 5478636. Mediante PCR, se amplificó el gen *tctp* en aislados de *B. bovis* provenientes de diversas regiones, incluyendo Michoacán, T2Bo, Zacatecas, Trinidad & Tobago, Tepic, Puebla y Jalisco. En las secuencias obtenidas se observó una identidad de nucleótidos superior al 99%, lo que permitió generar una secuencia consenso. Se encontró un 100% de identidad entre las secuencias de la TCTP de *Bos taurus* y *Bos indicus*, mientras que la identidad entre estas y la TCTP de *B. bovis* fue del 31.76% en la secuencia de aminoácidos. A partir de la secuencia obtenida de las cepas secuenciadas, se predijo una estructura tridimensional muy similar a la descrita para *P. falciparum*, con una hélice alfa característica de las TCTP de organismos del filo Apicomplexa, localizada entre los aminoácidos 23 y 31. Esto sugiere que la función de la TCTP de *B. bovis* podría ser comparable a la de *P. falciparum*.

La transcripción del gen *tctp* se verificó mediante RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos para amplificar la secuencia codificante. La expresión de la proteína se confirmó mediante Western Blot (WB) utilizando suero de bovinos inmunizados con TCTP. Adicionalmente, se comprobó la expresión a nivel celular por microscopía confocal, utilizando suero de conejos inmunizados con péptidos de TCTP, observando una distribución citoplasmática de la proteína. En el ensayo de neutralización, se observó un porcentaje de inhibición del 32-34%.

EVALUACIÓN EL EFECTO DE LOS ANTICUERPOS CONTRA LA TCTP DE *B. BOVIS* EN EL ESTABLECIMIENTO DE LA INFECCIÓN.

Basándose en las predicciones de programas bioinformáticos, se identificaron las regiones con mayor probabilidad de actuar como epítopos a células B. Se seleccionaron 4 péptidos, de entre 18 y 24 aminoácidos, que potencialmente estimulan una mayor respuesta inmune y facilitan el cambio de isotipo de IgM a IgG. Estos péptidos se sintetizaron químicamente, utilizando un formato MAPS 8.

Se realizó un examen físico diario a los bovinos, destacando el monitoreo de su comportamiento. En el grupo control, los animales mostraron signos de letargo y depresión a partir del día 9 post infección, hasta que se determinó la muerte experimental. De los cuatro animales del grupo control, tres fueron determinados en muerte experimental, mientras que, en el grupo vacunado, ninguno presentó dicha condición. En los bovinos del grupo vacunado, se midió el título de anticuerpos en el suero posterior a la tercera inmunización, obteniéndose títulos que oscilaron entre 1:2000 y 1:32000. Se observó un aumento significativo de anticuerpos a partir de la segunda inmunización. Por otro lado, en los animales del grupo control, la cantidad de anticuerpos totales en el suero post desafío fue similar a la del suero pre inmunización y pre desafío, sin indicios de incremento. En contraste, los animales del grupo inmunizado presentaron una mayor cantidad de anticuerpos totales en el suero post inmunización en comparación con los sueros pre inmunización y pre desafío. Esta diferencia podría estar correlacionada con el título de



anticuerpos específicos contra la TCTP de *B. bovis*, ya que los animales que mostraron una mayor diferencia entre los sueros también presentaron títulos más elevados de anticuerpos contra la TCTP. No obstante, es crucial investigar más a fondo la interacción de esta proteína en *B. bovis* con las células de los bovinos para comprender mejor su papel en la respuesta inmune.

CONCLUSIONES

Babesia bovis posee el gen de **tctp**, que es transcrito y expresado durante sus estadios intraeritrocíticos. La proteína TCTP contiene epítomos que son reconocidos por las células B, lo que induce la producción de anticuerpos. Estos anticuerpos contribuyen a reducir los signos clínicos de la infección y neutralizan la invasión en cultivos *in vitro*. Además, la inmunización con TCTP de *B. bovis* impide que el parásito interfiera en la respuesta inmunitaria del hospedero, mejorando así la protección frente a la infección.

LITERATURA CITADA

Bock, R., Jackson, L., Vos, A. D., & Jorgesen, W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology* (129), S247-S269.

Boomer, & Thiele, B. (2004). The translationally controlled tumour protein (TCTP). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36, 379-385.

Boomer, U.-A. (2017). The Translational Controlled Tumour Protein TCTP: Biological Functions and Regulation. En A. Telerman, & R. Amson, *TCTP/tpt1- Remodeling Signaling from Stem Cell to Disease* (Vol. 64, págs. 69-126). Springer.

Brown, W., & Palmer, G. (1999). Designing Blood-stage Vaccines against *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Parasitology today*, 15(7), 275-281.

Calderón-Pérez, B., Xoconostle-Cázares, B., Lira-Carmona, R., Hernández-Rivas, R., Ortega-López, J., & Ruiz-Medrano, R. (2014). The *Plasmodium falciparum* translationally controlled tumor protein (TCTP) is incorporated more efficiently into B cells than its human homologue. *PLoS One* (9), e85514.

de Waal, D., & Combrink, M. (2006). Live vaccines against bovine babesiosis. *Veterinary Parasitology*, 138, 88-96.

Edelhofer, R., Kanout, A., Schuh, M., & Kutzer, E. (1998). Improved disease resistance after *Babesia divergens* vaccination. *Parasitology Research*, 84, 181-187.

Eichhorn, T., Winter, D., Büchele, B., & al, e. (2013). Molecular interaction of artemisinin with translationally controlled tumor protein (TCTP) of *Plasmodium falciparum*. *Biochemical Pharmacology*, 85, 38-45.

Fish, L., Leibovich, B., Krigel, Y., McElwain, T., & Shkap, V. (2008). Vaccination of cattle against *B. bovis* infection with live attenuated parasites and non-viable immunogens. *Vaccine*, 265, G29-G33.

Gachet, Y., Tournier, S., Lee, M., Lazaris-Karatzas, A., Poulton, T., & Boomer, U. (1999). The growth-related, translationally controlled protein P23 has properties of a tubulin binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle. *J Cell Sci*, 112(8), 1257-1271.

Hinojosa-Moya, J., Xoconostle-Cázares, B., Piedra-Ibarra, E., Méndez-Tenorio, A., Lucas, W., & Ruiz-Medrano, R. (2008). Phylogenetic and Structural Analysis of Translationally Controlled Tumor Proteins. *J Mol Evol*, 66, 472-483.

Jongejan, F., & Uilenberg, G. (2004). The global importance of ticks. *Parasitology*(129), S3-S14.

Suarez, C., & Noh, S. (2011). Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. *Veterinary Parasitology*, 180, 109-125.

Telerman, A., & Amson, R. (2017). *TCTP/tpt1- Remodeling signaling from stem cell to disease* (Vol. 64). Switzerland: Springer.

Xoconostle-Cazáres, B., & Ruiz-Medrano, R. (2017). Structure-function relationship of TCTP. En A. Telerman, & R. Amson, *TCTP/ tpt1-remodeling signaling from stem cell to disease* (Vol. 64, pág. 309). Switzerland: Springer.

Expresión y purificación de TCTP recombinante de *Babesia bovis* y de *Bos taurus*

Expression and purification of recombinant TCTP from *Babesia bovis* and *Bos taurus*

Chyntia Pérez-Almeida^{1,2}, Diego Hernández-Silva¹, Andrés Velasco-Elizondo, Roberto Ruiz-Medrano³, Juan Mosqueda¹.

1. Laboratorio de Inmunología y Vacunas, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro. 2. Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. 3. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional. chyntiaq@comunidad.unam.mx

ABSTRACT

Translationally controlled tumour protein (TCTP), a highly conserved and multifunctional protein that plays critical roles both inside and outside cells. TCTP has been shown to be involved in processes such as cell growth and division and plays a role in regulating the immune response. In B cells, it has been suggested that it is involved in the activation of the immune system. However, in organisms of the Apicomplexa phylum, such as *Plasmodium* and *Babesia*, TCTP appears to interfere with the host immune response, affecting B cell proliferation and reducing antibody production. Previous studies concluded that TCTP from *B. bovis* may be related to the inhibition of the humoral immune response in cattle. In this study, the optimal conditions for the expression and soluble purification of two recombinant proteins, *Babesia bovis* TCTP (rBboTCTP) and *Bos taurus* TCTP (rBtTCTP), were established using competent *E. coli* BL21 cells. The coding sequences of both proteins were optimized and inserted into the pEt-30a (+) vector. Protein expression was assessed under different conditions of temperature, time and using different concentrations of IPTG to induce protein expression. Soluble, insoluble fractions and culture medium were analyzed using SDS-PAGE and Western blot (WB) techniques to confirm the presence of the recombinant proteins. For rBboTCTP, pilot assays indicated that the best expression conditions were at 30°C with 1 mM IPTG for 24 hours. Larger scale expression in a bioreactor resulted in a biomass of 16.3 g and the protein was secreted into the culture medium. For rBtTCTP, better results were obtained at 30°C with 0.5 mM IPTG, the soluble fraction being richer in recombinant protein. In both cases, the proteins were purified by affinity chromatography on nickel columns. Purification was verified by SDS-PAGE and WB with anti-histidine antibodies. The study confirms the correct expression and purification of both proteins and suggests that optimal induction conditions and temperature play a key role in the efficient production of recombinant proteins in *E. coli*. Although previous studies suggest that *B. bovis* TCTP interferes with B-cell activation, further studies are required to confirm this hypothesis and to better understand its impact on bovine babesiosis; having these recombinant proteins in a soluble, purified form will allow experiments to be carried out to evaluate the function of *B. bovis* TCTP.

Key words: TCTP, Translationally Controlled Tumour Protein, recombinant proteins



INTRODUCCIÓN

La proteína tumoral traduccionalmente controlada (TCTP) es una proteína altamente conservada, que ha sido identificada en numerosos tejidos y es expresada por diversos tipos celulares (Boomer & Thiele, 2004; Amzallag et al., 2004). La TCTP interactúa con diferentes moléculas y, se ha propuesto que la TCTP puede interactuar simultáneamente de dos formas distintas las proteínas; pero con las que interactúa no están conservadas, a pesar de su alta conservación estructural. Estas diversas interacciones le da múltiples funciones a la proteína (Boomer & Thiele, 2004, Telerman & Amson, 2017; Gachet et al., 1999). Esta proteína actúa tanto intracelular como extracelularmente, y la mayoría de sus funciones están relacionadas con el crecimiento celular, la división celular y el sistema inmunológico, promoviendo la proliferación celular (Amzallag et al., 2004; Hinojosa-Moya et al., 2008). Entre sus funciones extracelulares destaca la regulación de la respuesta inmunitaria. En las células B, la TCTP estimula la proliferación, induce la expresión de moléculas del MHC clase II, favorece el crecimiento y la diferenciación de las células B, y estimula la producción de citocinas e inmunoglobulinas, lo que sugiere un papel en la activación de la respuesta inmune.

Esta proteína ha sido estudiada en organismos protozoarios del filo Apicomplexa, principalmente en *Plasmodium*, y recientemente ha sido identificada en *Babesia bovis*. Se ha observado que es secretada por *Plasmodium falciparum* en el suero del huésped, posiblemente mediante vesículas, lo que sugiere que podría jugar un papel en el establecimiento de la parasitemia al interferir con la respuesta inmune del hospedador, disminuyendo la proliferación de células B (Tayloe et al., 2015; Mathieu et al., 2015; Dermata-Gatsi et al., 2019). La principal similitud de esta proteína entre los organismos del filo Apicomplexa radica en su estructura tridimensional, que incluye una hélice alfa adicional, lo que le otorga una mayor afinidad por el receptor en comparación con la proteína homóloga en mamíferos (Xoconostle-Cazáres & Ruiz-Medrano, 2017; Calderón-Pérez et al., 2014; Pérez-Almeida, 2021). Estas diferencias estructurales podrían permitir que la TCTP bloquee la interacción de la TCTP del huésped con su receptor en los linfocitos B, interfiriendo en la activación y proliferación de estas células, y, en consecuencia, inhibiendo la activación de la respuesta inmune. Esto podría estar relacionado con la disminución de células B de memoria observada en casos de malaria (Hinojosa-Moya et al., 2008; Calderón-Pérez et al., 2014; Xoconostle-Cazáres & Ruiz-Medrano, 2017). Se ha evaluado el título de anticuerpos totales en suero de animales antes y después de un desafío con *B. bovis*. En el grupo control, el título de anticuerpos en el suero posterior al desafío fue menor o similar al nivel presente antes de la inmunización. En cambio, en el grupo inmunizado con TCTP, el título de anticuerpos aumentó tras el desafío, lo que sugiere que la TCTP de *B. bovis* podría estar interfiriendo con la respuesta inmune humoral de los bovinos (Pérez-Almeida, 2021). No obstante, son necesarios estudios más detallados para corroborar esta hipótesis.

La babesiosis bovina es una enfermedad de distribución mundial causada por parásitos del género *Babesia*, que infectan a una amplia gama de animales domésticos, salvajes e incluso a los humanos. La transmisión ocurre a través de varias especies de garrapatas, dependiendo de la región geográfica y las condiciones climáticas (de Waal & Combrink, 2006). En México, la babesiosis bovina es provocada principalmente por *Babesia bovis* y *B. bigemina*, y es transmitida por las garrapatas *Rhipicephalus microplus* y *R. annulatus*. De estas dos, *B. bovis* es la especie que más afecta al ganado debido a su alta virulencia y mayor tasa de mortalidad en comparación con otras especies de *Babesia*. La búsqueda

de medidas para reducir los signos clínicos en animales infectados es esencial. Aunque la babesiosis es una enfermedad tratable, su diagnóstico puede ser complicado debido a la falta de signos clínicos específicos, lo que ocasiona un fuerte impacto económico en las zonas endémicas (Suarez & Noh, 2011; de Waal & Combrink, 2006).

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la expresión de las proteínas recombinantes se optimizaron las secuencias codificantes de ambas TCTP para su expresión en *E. coli* y se insertaron en el vector de expresión pEt-30a (+). Estas secuencias fueron sintetizadas.

Expresión de la TCTP recombinante de *Babesia bovis* (rBboTCTP)

El plásmido sintético fue transformado en células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) plys, cultivadas en medio LB con kanamicina (10 µg/ml). La expresión se indujo con IPTG (isopropil-β-galactosidasa, Ultrapure™ IPTG, Invitrogen). Se realizaron diversos ensayos de inducción variando las concentraciones de IPTG, la temperatura y el tiempo de expresión. En cada ensayo, se obtuvieron fracciones de la fase soluble, insoluble y del medio de cultivo, evaluando la expresión de rBboTCTP mediante SDS-PAGE y Western Blot (WB). Una vez establecidas las condiciones óptimas de expresión, se escaló la producción en un biorreactor con 2 litros de medio LB con kanamicina (10 µg/ml), manteniendo condiciones controladas de temperatura, pH y oxigenación. Se incubó durante 24 horas, se recolectó la fracción soluble, insoluble y el medio de cultivo.

Expresión de la TCTP recombinante de *Bos taurus* (rBtTCTP)

El plásmido sintético fue transformado en células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) plys, *E. coli* BL21 (DE3), Mach T1 y Rosetta 2, incubadas en medio LB con kanamicina (10 µg/ml) y, cloranfenicol (34 µg/ml) para las células Rosetta. La expresión se indujo con IPTG y se realizaron ensayos variando las concentraciones de IPTG, la temperatura y el tiempo de inducción. En cada ensayo, se recolectaron las fracciones soluble, insoluble y el medio de cultivo, evaluando la expresión de rBtTCTP por SDS-PAGE y WB. Tras establecer las condiciones óptimas de expresión, se escaló la producción en un biorreactor con 4 litros de medio LB, manteniendo condiciones controladas de temperatura, pH y oxigenación. Se incubó durante 24 horas, se recolectaron las fracciones de interés de manera similar.

Purificación de las proteínas rBboTCTP y rBtTCTP

Ambas proteínas recombinantes se purificaron mediante cromatografía de afinidad en columnas de níquel (His-Tag FF, Cytiva), utilizando soluciones de elución con imidazol (500 mM) y recolectando fracciones de 1 ml. Para rBboTCTP, primero se utilizó el sobrenadante obtenido de la expresión a 37°C, posteriormente purificación con 50 ml del medio de cultivo tras la expresión en el biorreactor a 30°C. Para rBtTCTP, se purificó la fracción soluble tanto a 30°C como a 37°C. En todos los casos, la purificación fue verificada mediante SDS-PAGE y WB con anticuerpos de ratón IgG monoclonales anti-histidina (Invitrogen), y las proteínas fueron cuantificadas utilizando el método de Bradford.

RESULTADOS

Expresión de la TCTP recombinante de *Babesia bovis* (rBboTCTP)

De cada ensayo piloto de expresión, se obtuvieron tres tipos de muestras: fase soluble, fase insoluble y medio de cultivo, tanto de las clonas inducidas como no inducidas. En el ensayo a 37°C, con 1 mM de IPTG (para inducción), la proteína recombinante fue

detectada en la fracción soluble a las 16 y 24 horas. En el ensayo a 30°C, la proteína se encontró en las tres fracciones (soluble, insoluble y medio de cultivo) a las 21 y 24 horas. La correcta expresión de la proteína se comprobó mediante Western Blot (WB) con la fracción soluble a las 24 horas, utilizando suero de conejos inmunizados con péptidos individuales de BboTCTP, suero de bovinos inmunizados con una mezcla de péptidos de BboTCTP y anticuerpos monoclonales anti-histidina como control. Las mejores condiciones para expresar rBboTCTP se consideraron a 30°C induciendo con 1 mM de IPTG, por 24 horas. En la expresión a mayor escala en un biorreactor se obtuvo una biomasa de 16.30 g a partir de 2 litros de medio de cultivo, observándose que la expresión de rBboTCTP fue secretada a medio de cultivo.

Expresión de la TCTP recombinante de *Bos taurus* (rBtTCTP)

De cada ensayo piloto de expresión, se obtuvieron tres tipos de muestras: fase soluble, fase insoluble y medio de cultivo, tanto de las clonas inducidas como de las no inducidas. En el ensayo utilizando células competentes BL21 (DE3) a 37°C, con 0.5 mM de IPTG, se detectó la proteína recombinante en la fracción soluble e insoluble a las 22 horas postinducción. En el ensayo a 30°C, también con 0.5 mM de IPTG, se observó la proteína recombinante en ambas fracciones (soluble e insoluble) a las 24 horas postinducción. Comparando los ensayos, la temperatura de 30°C favoreció una mayor cantidad de proteína en la fase soluble, lo cual fue confirmado por WB. En células Rosetta 2, la inducción con IPTG a 37°C mostró que la proteína se encontraba principalmente en la fracción insoluble, y en menor cantidad en la fase soluble, sin detectarse en el medio de cultivo. Las mejores condiciones para expresar rBtTCTP se establecieron en células *E. coli* BL21 (DE3) a 30°C, con 0.5 mM de IPTG durante 24 horas. La correcta expresión de la proteína se confirmó por WB en la fracción soluble a las 24 horas, utilizando suero monoclonal anti-histidina. La expresión a mayor escala se realizó en un biorreactor con 4 litros de medio LB, a 30°C y 0.5 mM de IPTG. Se tomaron muestras antes de la inducción, a las 20 y 24 horas postinducción, y se analizaron las fracciones soluble, insoluble y el medio de cultivo mediante SDS-PAGE al 15%. La expresión en el biorreactor se confirmó por WB, detectándose la proteína en ambas fracciones (soluble e insoluble).

Purificación de las proteínas rBboTCTP y rBtTCTP

En la purificación de rBboTCTP de la fracción soluble obtenida a 37°C, se detectó la proteína purificada en 5 fracciones, con concentraciones de 0.08 mg/ml a 1.78 mg/ml, dependiendo de la fracción, considerando un total de 3.59 mg por los 6 ml de fracción soluble purificada. Al purificar desde el medio de cultivo obtenido de la expresión en biorreactor a 30°C, se obtuvo la proteína rBboTCTP en concentraciones de 0.016 mg/ml a 2.35 mg/ml, dependiendo de la fracción evaluada. Obteniendo un total de 6.32 mg de los 6 ml de medio de cultivo purificado; estimando una expresión total de 250 mg en los 2 litros de medio de cultivo obtenido en la expresión en biorreactor. Se confirmó la correcta purificación de ambos casos por SDS-Page en geles de poliacrilamida al 15% y por WB con suero de bovino inmunizado con péptidos, suero de conejo inmunizado con péptidos y anticuerpos monoclonales anti-histidina.

La proteína recombinante rBtTCTP se purificó de la fracción soluble obtenida en los ensayos a 37°C y a 30°C, observándose una mayor concentración de proteína al purificar la fracción soluble de la expresión a 30°C. La purificación se verificó mediante SDS-page con geles de poliacrilamida al 15% y WB utilizando anticuerpos monoclonales anti-histidina.

CONCLUSIONES

Se determinó las condiciones óptimas para la expresión de las proteínas recombinantes de forma soluble. Para rBboTCTP se concluyó que las mejores condiciones de expresión son a 30°C con 1 mM de IPTG y, para rBtTCTP, se encontraron las mejores condiciones a 30°C con 0.5 mM de IPTG. Ambas proteínas fueron purificadas eficientemente utilizando cromatografía de afinidad y validadas mediante SDS-PAGE y Western Blot. El obtener ambas proteínas de forma soluble permitirán la realización de futuros estudios sobre el papel de estas proteínas en la respuesta inmune y su potencial en el control de la babesiosis bovina.

LITERATURA CITADA

Boomer, U.-A., & Thiele, B.-J. (2004). The translationally controlled tumor protein (TCTP). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36, 379-385.

Calderón-Pérez, B., Xoconostle-Cázares, B., Lira-Carmona, R., Hernández-Rivas, R., Ortega-López, J., & Ruiz-Medrano, R. (2014). The Plasmodium falciparum Translationally controlled Tumor Protein (TCTP) Is Incorporated More Efficiently into B Cells than Its Human Homologue. *Plos One*, 9(Issue 1), e85514.

de Waal, D., & Combrink, M. (2006). Live vaccines against babesiosis. *Veterinary Parasitology*, 138, 88-96.

Dermata-Gatsi, C., Rivkin, A., Di Bartolo, V., Peronet, R., Ding, S., Commere, P.-H., . . . Mécheri, S. (2019). Histamine releasing factor and elongation factor 1 alpha secreted via malaria parasites extracellular vesicles promote immune evasion by inhibiting specific T cell response. *Cellular microbiology*, 21, e13021.

Gachet, Y., Tournier, S., Lee, M., Lazaris-Karatzas, A., Poulton, T., & Boomer, U. (1999). The growth-related, translationally controlled protein P23 has properties of a tubulin binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle. *J Cell Sci*, 112(8), 1257-1271.

Hinojosa-Moya, J., Xoconostle-Cázares, B., Piedra-Ibarra, E., Méndez-Tenorio, A., Lucas, W., & Ruiz-Medrano, R. (2008). Phylogenetic and Structural Analysis of Translationally Controlled Tumor Proteins. *J Mol Evol*, 66, 472-483.

MacDonald, S. M., Bhisutthibhan, J., Shapiro, T., Rogerson, S. J., Taylor, T. E., Tembo, M., . . . Meshnick, S. R. (2001). Immune mimicry in malaria: Plasmodium falciparum secretes a functional histamine-releasing factor homolog in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), 10829-10832.

Mathieu, C., Dermata-Gatsi, C., Porcherie, A., Brega, S., Thiberge, S., Ronce, K., . . . Mécheri, S. (2015). Plasmodium berguei histamine-releasing factor favours liver-stage development via inhibition of IL-6 production and associates with a severe outcome of disease. *Cellular Microbiology*, 17(4), 542-558.

Pérez-Almeida, C. (2021). *Identificación de la proteína tumoral controlado traduccionalmente (TCTP) en Babesia bovis y la evaluación de su participación en el establecimiento de la infección.* (U. A. Querétaro, Ed.) Tesis de maestría.

Suarez, C., & Noh, S. (2011). Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. *Veterinary Parasitology*, 180, 109-125.

Taylor, K., Van, T., Macdonald, S., Meshnick, S., Fernley, R., Macreadie, I., & Smooker, P. (2015). Immunization of mice with Plasmodium TCTP delays establishment of Plasmodium infection. *Parasite Immunology*, 37, 23-31.

Telerman , A., & Amson, R. (2017). *TCTP/tpt1- Remodeling signaling from stem cell to disease* (Vol. 64). Swizerland: Springer.

Xoconostle-Cazáres, B., & Ruiz-Medrano, R. (2017). Structure-function relationship of TCTP. En A. Telerman, & R. Amson, *TCTP/tpt1-remodeling signaling from stem cell to disease* (Vol. 64, pág. 309). Swizerland: Springer.



PATÓGENOS ZONÓTICOS EN GARRAPATAS Y ROEDORES DE LA SELVA LACANDONA

ZOONOTIC PATHOGENS IN TICKS AND RODENTS OF LACANDON JUNGLE

Michel Ramírez-González¹, Margarita Vargas-Sandoval^{1*}, Carolina G. Sosa-Gutierrez² y Ma. Lourdes Barriga-Carvajal³.

¹Laboratorio de Entomología "Biol. Sócrates Cisneros Paz", Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) Gral. Francisco J. Múgica S/N A-1, Felicitas de Río, 58030. Morelia, Michoacán.

* Autor para correspondencia: margarita.vargas@umich.mx

²Área académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Instituto de Ciencias Agropecuarias Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH). Rancho Universitario, Av. Universidad Km. 1, Ex-Hda. de Aquetzalpa AP 32, 43600, Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México.

³Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) Av. San Juanito Itzicuaró s/n, 58337, Morelia, Michoacán México.

Abstract

Ticks, a significant group of mites, play a crucial role in biology and public health as these blood-feeding ectoparasites serve as vectors for various pathogenic microorganisms, including protozoa, bacteria, and viruses. Additionally, they inoculate toxic substances into their hosts. This study aims to determine the presence of bacterial pathogens in reservoirs and vectors in Marqués de Comillas, Chiapas, Mexico. Sampling was conducted at six sites with varying percentages of vegetation cover, ranging from 0.7% in cultivated and abandoned pasture areas to 95.84% in mature or secondary forests. Ticks were collected both from the field and from hosts, including humans and rodents identified as *Heteromys desmarestianus*, *Sigmodon toltecus*, *Oryzomys couesi*, and *Peromyscus mexicanus*. The tick species collected were *Amblyomma mixtum* and *Amblyomma americanum*, which underwent molecular testing to identify the pathogens present. The presence of *Ehrlichia chaffensis*, the causative agent of Rocky Mountain spotted fever and typhus, as well as *Ehrlichia canis*, was confirmed.

The results showed that in disturbed sites, rodent abundance decreased while tick abundance increased. In contrast, tick diversity was higher in conserved sites, although the search for hosts was complicated by the terrain's heterogeneity and the dispersal of hosts. It is crucial to raise public awareness about the increase in tick populations in disturbed areas due to the associated risks of disease transmission.

a. Introducción

Las enfermedades zoonóticas poseen la cualidad de establecerse en algunos mamíferos y aves con la ayuda de vectores hematófagos los cuales influyen en su diseminación geográfica, debido a las condiciones climáticas y el establecimiento de factores como fauna que interviene en el ciclo biológico de las enfermedades al ser parasitados por las fases larvianas de estos vectores (Tamez, 2015). Las garrapatas se consideran los vectores más relevantes de patógenos causantes de enfermedades en animales domésticos y salvajes (Vargas-Sandoval, et al.2014). Las garrapatas son ácaros hematófagos obligados pertenecientes a la clase Arachnida, subclase Acari, que aparecieron durante el período Cretácico. Hace 100 millones de años predominaron dos géneros (*Compluriscutula* y *Cornupalpatum*) antecesores de la familia Ixodidae, mientras que los argásidos aparecieron seis millones de años después. Actualmente los Argásidos e Ixódidos contienen especies de distribución cosmopolita, se distribuyen desde las selvas tropicales hasta los desiertos, islas, en el Ártico y Antártico.

Las especies del género *Amblyomma* han sido registradas en 30 de los 32 estados de la República Mexicana, siendo *A. cajennense* (ahora llamada *A. mixtum*) la especie de mayor distribución (Guzmán-Cornejo et al., 2011). El complejo *A. cajennense* (s.l.) por ejemplo está asociado como principal transmisor de la fiebre de las Montañas Rocosas, se ha incrementado su incidencia en Sudamérica en los últimos años. Sin embargo y pese a los reportes presentados, hay varios casos de enfermedades rickettsiales que no son diagnosticadas adecuadamente, principalmente por la similitud de signos clínicos con los diagnósticos diferenciales: dengue, malaria, fiebre amarilla, hepatitis viral, hantavirus y leptospirosis, además, no es posible llegar a un diagnóstico definitivo debido a la falta de pruebas inmunológicas específicas (Robayo Ortiz, et al, 2020). Los mamíferos son los principales hospederos seguidos por reptiles, aves y anfibios. Los roedores son un grupo de mamíferos que responden de diversas maneras a la perturbación, las especies de roedores generalistas e invasoras pueden aumentar sus poblaciones; mientras que las especies con hábitos especialistas pueden experimentar poblaciones fuertemente reducidas (Barriga Carbajal, 2021).

Las enfermedades rickettsiales transmitidas por garrapatas (TBRD, por sus siglas en inglés) son enfermedades zoonóticas emergentes y un problema de salud humana y de medicamentos veterinarios. La distribución de estas enfermedades está relacionada con la distribución del vector. La presencia de patógenos en el huésped es un indicador de riesgo de exposición de la población a estas áreas (Sosa-Gutiérrez et al. 2014).

El estudio se realizó en los meses de agosto-septiembre del 2020 en el municipio de Márquez de Comillas, Chiapas, México que se encuentra localizado geográficamente en la latitud a 16°20' al Norte y longitud 92°46' al Oeste. La Región de Marqués de Comillas se ubica en lo profundo de la Selva Lacandona, es

fronterizo con Guatemala, pertenece al Estado de Chiapas, México. Se localiza principalmente entre los 100 y los 200 msnm, en la región climática de las tierras bajas cálidas, en clima cálido-húmedo, con temperaturas medias anuales de 22°C, y precipitaciones entre 1 890 y 3 000 mm anuales. Colinda al noroeste con el municipio de Ocosingo, al noreste con el de Benemérito de las Américas y al Sur con la República de Guatemala. Paralelo al Río Lacantun, frente a la Reserva de la Biosfera de Montes Azules con una vegetación original: selva alta y media, perennifolia (Muenh y Martínez, 2016).

b. Materiales y métodos

La colecta de organismos se trabajó en seis sitios dentro del municipio de Márquez de Comillas, Chiapas en un gradiente de cobertura vegetal que variaban desde un mínimo del 0.7% en áreas de pastizales y cultivos abandonados, hasta un máximo del 95.84% en bosques maduros o secundarios. En cada sitio se trabajó por 4 días consecutivos: utilizando diferentes tipos de colecta para aumentar la probabilidad de encontrar garrapatas en sitios tan grandes. Se realizaron 2 cuadrantes al azar en el sitio con una medida aproximada de 25 pasos por lado donde se hizo un recorrido con red de golpeo y bandera de arrastre sobre la vegetación y al finalizar el sitio se revisaba cada compañero. Las garrapatas se colocaron en tubos Eppendorf de 2ml con alcohol al 70% para su conservación. Se colocaron 90 trampas Sherman a lo largo de dos líneas paralelas, con una distancia de 20m de separación y entre trampas consecutivas en una línea de 10 m. Las trampas se cebaron diariamente con una mezcla de copos de avena y vainilla, se revisaban al día siguiente por la madrugada, al atrapar un roedor se colectaba bajo los estándares sugeridos, después eran llevados a congelación para su conservación.

En las instalaciones del Laboratorio de Entomología Biól. Sócrates Cisneros Paz (Facultad de Biología) de la U.M.S.N.H. Se revisaron las muestras. Los roedores fueron descongelados, identificados a especie, cada uno de ellos fue cepillado sobre una superficie blanca para la colecta de los ectoparásitos, se revisaron bajo un microscopio estereoscópico para verificar que se retiraron todos los organismos. Se procedió a diseccionar por el vientre del roedor, retirando órganos (pulmón, corazón, vaso, hígado) cada órgano se colocó en un tubo Eppendorf rotulado con la información correspondiente de cada roedor y se llevó a congelación.

De los ectoparásitos se seleccionaron las garrapatas al igual que las garrapatas colectadas de manera directa, fueron identificadas mediante los estándares y parámetros necesarios para estos artrópodos con ayuda de la clave de identificación: Hoffmann H. clave para identificar los géneros de garrapatas mexicanas adultas.

En las instalaciones del Laboratorio Clínico BioGeneTicks - Diagnóstico de Enfermedad de Lyme y Coinfecciones (Tulancingo, Hgo.) se apoyó con los aparatos

necesarios para determinar los patógenos con PCR. Se realizó la extracción y purificación de ADN de tejido utilizando los órganos de cada roedor, procediendo a la extracción y lectura con NANODROP ONE. Las muestras se llevaron a cabo en una electroforesis para determinar si existe presencia de bacterias patógenas.

c. Resultados y discusión

Se identificaron las especies de roedores: *Heteromys desmorestianus*, *Sigmodon toltecus*, *Oryzomys cuoesi* y *Peromyscus mexicanus* donde se obtuvieron 142 garrapatas en estado larval del género *Amblyomma*. En la colecta directa y con red de golpeo se obtuvieron un total de 40 muestras con un aproximado de 210 garrapatas, con ayuda de claves se identificaron 2 especies de garrapatas: *Amblyomma mixtum* y *Amblyomma americanum*.

De las garrapatas colectadas de forma directa y mediante redes se obtuvo una abundancia del 8.09% en Playón 2, 1.90% en Playón Reserva, 0% en Chajul panteón, 9.04% en Loma bonita "Gilberto", 77.61% López Mateos y un 3.33% en Chajul Agropecuario. Observando que en López Mateos hay 37.8% de vegetación con una mayor abundancia de garrapatas ya que es un sitio de potreros y de los 6 sitios es el que mayor cantidad de ratones y rumiantes tenía.

Los resultados señalan que al menos en algunos organismos existe un patógeno transmitido por garrapatas. Son positivos a *Ehrlichia chaffeensis* y *Ehrlichia canis*.

d. Conclusiones

Hasta ahora se ha encontrado que hay una mayor abundancia de garrapatas en las zonas con vegetación potrero-pastizal, ya que es más factible la concentración de los organismos como la presencia de los huéspedes: humanos, roedores y rumiantes. Una de las limitaciones de los ambientes conservados es el gran espacio de heterogeneidad y los huéspedes tienden a distribuirse más. Es importante alertar a las poblaciones del aumento en abundancia de las garrapatas por los riesgos que corren en la transmisión de enfermedades.

e. Literatura citada

Barriga Carbajal ML. (2021). **Diversidad y abundancia ectoparásita en roedores silvestres en zonas de cobertura vegetal contrastante de Marqués de Comillas, Chiapas.** Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales (UMSNH). México. 1-56p.

Guzmán-Cornejo et al., (2012). **Molecular identification and description of the female of *Nothoaspis reddelli* (Ixodida: Argasidae) from a cave in southeastern Mexico.** Journal of Parasitology, 98 (2012), pp. 918-923.

Muench C, Martínez RM (2016). **¿Can community-protected areas conserve biodiversity in human-modified tropical landscapes? The case of terrestrial mammals in southern Mexico.** Tropical Conservation Science. Vol. 9 (1): 178-202. <https://doi.org/10.1177/194008291600900110>

Robayo Ortiz, CA., Ríos MA y Soler-Tovar D (2020). **Conocimiento de la distribución geográfica y ciclo de vida del género *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) en Colombia.** En línea. Consultado 16 diciembre 2023. Disponible en: [duvan,+Enfermedades+Rickettsiales+en+Latinoamérica-124-151 \(1\).pdf](#)

Sosa-Gutiérrez, C., Vargas, M., Torres, J. and Gordillo-Pérez, G. (2014) **Tick-Borne Rickettsial Pathogens in Rodents from Mexico.** Revista de Ciencias Biomédicas e Ingeniería, 7, 884-889. doi: 10.4236/jbise.2014.711087.

Vargas-Sandoval, M., Priego-Santander, A., Larrazábal, A., Sosa-Gutiérrez, C., Lara-Chávez, B. and Avila-Val, T. (2014) **Distribución potencial de especies y riqueza de garrapatas Ixodidae Asociado con Vertebrados Silvestres de Michoacán, México.** *Diario del Sistema de Información Geográfica*, 6, 467-477. doi: [10.4236/jgis.2014.65040](https://doi.org/10.4236/jgis.2014.65040)



DESARROLLO Y APLICACIÓN DE UN PROTOCOLO DE REPRODUCCIÓN BASADO EN CÁPSULA PARA GARRAPATAS MULTI HOSPEDERAS (*Amblyomma mixtum*)

DEVELOPMENT AND APPLICATION OF A CAPSULE-BASED REPRODUCTION PROTOCOL FOR MULTI-HOSTED TICKS (*Amblyomma mixtum*)

Perla G. Rodriguez Guerrero, Roberto I. Guerrero Solorio, Juan J. Mosqueda Gualito

Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro

perla.rodriguez@uaq.mx

ABSTRACT

Ticks of the family Ixodidae are hematophagous ectoparasites that feed for long periods of time. This characteristic makes them potential vectors of a great variety of pathogens, representing a health risk.

The implementation of tick feeding and reproduction systems under controlled conditions is key to their study. In cattle it is complicated to use free infestations in two- or three-host tick species, since the small size of the immature stages complicates their handling, collection and counting.

The objective of this work was to develop a capsule-based incubation and collection protocol as a containment method for the multi-host tick *Amblyomma mixtum*, in a bovine model, and its maintenance under laboratory conditions. For this, capsules were developed using plastic jars that were perforated and covered with netting, allowing transpiration.

The capsule and the health conditions of the animal were checked daily. Once the collection was completed, the capsule was removed, and the bovine was evaluated. The collected ticks were taken to the incubator with conditions of 27°C and a relative humidity of 70%, for molting and oviposition. As part of the results, we were able to collect and maintain each of the developmental stages of the tick in a period of 20 weeks. We had an egg hatching percentage of 15% Regarding the subsequent molting: from larva to nymphal stage, 70.7% of specimens were collected and finally a recovery of 87.7% from the nymphal stage to the adult stage. The animals did not have skin affectation, nor did they show health complications, and the entire development cycle of *Amblyomma mixtum* was maintained on a single host.

Keywords: Ticks, *Amblyomma mixtum*, reproduction system, bovine.

INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son consideradas como uno de los factores sanitarios más importantes que limita la ganadería en el trópico y que afectan el 80% de la población bovina del



mundo (Polanco-Echeverry & Ríos Osorio, 2016). Las cifras de prevalencia, incidencia y mortalidad son muy variables, y dependen del agente etiológico implicado, el vector y las condiciones sociales que pueden facilitar o impedir su transmisión (Estrada-Peña, 2015).

Estos parásitos causan graves pérdidas económicas dentro de la ganadería, además de ser fuentes de enfermedades zoonóticas importantes (Dantas-Torres et al. 2012), por lo que su vigilancia epidemiológica es importante para establecer medidas de prevención y contención (Polanco-Echeverry & Ríos Osorio, 2016).

Amblyomma mixtum es la segunda garrapata en importancia en bovinos del trópico en México y se distribuye desde el sur de Texas (EUA) hasta Ecuador. Parasita principalmente a los bovinos y equinos de las zonas tropicales de México, pero también se ha reportado parasitando a humanos. Esta especie es de importancia económica y sanitaria; por un lado traumatiza las pieles de los animales debido a sus grandes piezas bucales y puede causar anemia cuando se presentan grandes infestaciones, debido a la gran cantidad de sangre que pueden ingerir los adultos; y por otro lado se ha encontrado como vector de diversos parásitos (Almazán et al., 2016), sin embargo, el papel de *A. mixtum* como vector de enfermedades y su erradicación no ha sido estudiado debidamente, ya que la mayoría de las investigaciones y medidas de control se centran en *R. microplus* (“Acuerdo por el que se establece la Campaña Nacional para el control de la garrapata *Boophilus spp.*” (SAGARPA, 2012)).

Para el estudio de ectoparásitos, el establecimiento de colonias de garrapatas en el laboratorio es fundamental, es gracias a ello que podemos tener una correcta identificación de la especie y su ciclo evolutivo, poder comparar entre el comportamiento en campo y en laboratorio e identificar a través del aislamiento, la transmisión de microorganismos; además de ser una herramienta indispensable para conservar líneas susceptibles a diferentes acaricidas con fines experimentales (López V G, s.f.).

Por lo que es una metodología eficiente para aislar y mantener colonias de garrapatas facilita las investigaciones concurrentes sobre estos ectoparásitos.

En este trabajo presentamos el desarrollo de un protocolo de incubación y recolección de garrapatas basado en una cápsula como método de contención para completar el ciclo de vida de la garrapata multi hospedera *Amblyomma mixtum*, en un modelo bovino, y el posterior mantenimiento de estos parásitos en condiciones de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con dos bovinos de raza *Bos taurus taurus* de 6 meses, los cuales se colocaron en una jaula limitando el movimiento de la cabeza a su cuarto caudal, para evitar que el animal separará la cápsula.

Para la preparación de los parches de plástico se cortaron botes de plástico a una altura de 4 cm considerando la tapa para posteriormente formar tubos de tela de algodón del tamaño de la circunferencia del bote.

A continuación, se pegó de al menos 2 cm evitando dejar espacios sin pegamento, para evitar la salida de las garrapatas. Fue necesario dejar libres con una circunferencia de al menos 5 cm de tela de algodón libre para adherirse al cuerpo del bovino. NOTA: Para permitir la transpiración y que las garrapatas no se vean afectadas por el exceso de humedad, se perforó la tapa dejando la circunferencia, y se cubrió el agujero pegando tela de red. Sin embargo, en la estación seca en un clima con poca humedad, puede ser deseable la humedad que acumule formando un microclima con condiciones favorables. NOTA 2: Se colocaron 2 cápsulas en cada uno de los bovinos.

Para la preparación del bovino para la infestación se rasuró el área donde se colocó la cápsula utilizando una navaja de 1.5 mm. Se rasuró la circunferencia donde se pegó la tela de la cápsula utilizando una navaja de 2 mm, con el fin de asegurar que a adherencia de la tela directamente a la piel. Posteriormente colocamos una capa de pegamento de látex no tóxico en la circunferencia de la tela de la cápsula y en la circunferencia de la piel que se rasuró en el paso anterior y se dejó secar de 45 a 60 segundos.

Se adhirió la cápsula a la piel haciendo presión uniforme durante 180 s y evitando que se formaran pliegues o espacios sin adherirse. Posteriormente se agregó una capa extra de pegamento de látex no tóxico para formar un recubrimiento adicional y sellar de manera efectiva el borde de la cápsula. Por cada bovino utilizado en el proyecto se identificó el área donde fueron colocadas las cápsulas.

Para la infestación las garrapatas se colocaron en una jeringa sin punta cubierta por un algodón. El tamaño de la jeringa se definió según el estadio, si se trató de larvas, ninfas (3 ml) o adultos (10 ml). Se colocaron 0.5 g de larvas de *A. mixtum* por jeringa, colocando un total de 2 g por parche en cada bovino.

Se pesaron 0.5 g de huevos en cada jeringa lo que permitió la eclosión al estado larval para posteriormente inocularse 4 de estas dosis por parche en cada bovino. En total se colocaron 4 g de larvas por animal (2 g por parche) durante la infestación. Teniendo como referencia que en 1g de huevos de *Amblyomma cajennense* hay 16.000 huevos (Meléndez et al., 2014), entonces se colocaron un estimado de 32,000 huevos por animal y un total de 64,000 fueron usados para el experimento.

Posteriormente se empujó el émbolo al interior de la cápsula asegurándose que ninguna garrapata quede en la jeringa. El empuje se realizó de manera lenta y gentil para no

lesionar a las garrapatas, se colocaron de arriba hacia abajo, esparciéndolas por toda la superficie. Finalmente cerramos la cápsula asegurándose que quedara completamente sellada.

Para el monitoreo y la recolección de garrapatas se verificó diariamente que la cápsula estuviese completamente pegada. Enseguida se mantuvo el monitoreo diariamente las condiciones del área de contención, así como las condiciones físicas, conductuales y neurológicas del animal con el propósito de detectar cualquier indicio de estrés o anomalía para garantizar las condiciones óptimas de seguridad y bienestar animal.

Finalmente destapamos cápsula y se colectaron las garrapatas que se lograron repletar, cuidando siempre que las garrapatas que no se adhirieron no se saliesen de la cápsula. Las garrapatas semi repletas pueden tomarse de manera gentil con pinzas o desprendiéndolas suavemente para evitar lesionar las piezas bucales.

Para la recuperación del bovino, aplicamos en días consecutivos, dos baños garrapaticidas para asegurar que ninguna garrapata permaneciera en el bovino. Posterior a ello se tomó la cápsula por las esquinas y se desprendió de manera gentil.

Una vez que se despegó la cápsula y no hubo evidencia de garrapatas en el bovino, se retiró del aislamiento y fue regresado a los corrales comunes luego de un último baño garrapaticida. Se observó la piel del bovino en busca de lesiones o reacciones anormales al adhesivo o a la infestación.

Para el mantenimiento de las garrapatas en condiciones de laboratorio, las garrapatas recolectadas fueron sometidas a un lavado donde se colocaron en un recipiente con cloruro de benzalconio al 10% durante 180 s para retirar la suciedad del bovino y evitar el crecimiento de hongos que puedan afectar su viabilidad durante la incubación y mantenimiento en laboratorio.

Posteriormente, fueron secadas con toallas de papel para evitar que se acumule humedad durante la incubación. Los ejemplares fueron esparcidos en una toalla de papel y presionadas gentilmente hasta eliminar el exceso de agua. Finalmente, las garrapatas se colocaron en jeringas (el tamaño de estas dependió del estadio de desarrollo) y fueron llevadas a la incubadora, que mantuvo en 28 °C y con una humedad relativa de 80%, con periodos de 12 h de luz.

Las garrapatas permanecieron en incubación durante el periodo de muda o en su defecto hasta la siguiente infestación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se logró completar todas las fases del ciclo de *A. mixtum* en un solo hospedero.

Primera colecta: De los 64,000 huevos que fueron incubados hasta su eclosión, se recolectaron 9612 larvas repletas. Es decir, obtuvimos una recuperación del 15%. Durante la fase de eclosión ambos parches mostraron resultados similares en la recuperación de larvas repletas.

Segunda colecta: Luego de la colecta de larvas repletas estas fueron llevadas a incubación durante 30 días hasta finalizar su muda a ninfas. Las ninfas que completaron su muda y resultaron viables fueron 9443, que fueron colocadas en jeringas y fueron repartidas en los 4 parches. Al iniciar la colecta de ninfas repletas. Nos dimos cuenta de que en la vaca número 2 muy pocas garrapatas se lograron pegar al hospedante y dentro del parche se formó una costra.

Se observó una muy pequeña cantidad de ninfas adheridas al animal, la mayoría estas no completaron su repleción al finalizar la colecta en la segunda vaca. El número de ninfas repletas colectadas de esta vaca fue de 300 ejemplares. Por las razones anteriores fueron descartados los datos de la vaca 2 y solamente se consideraron los datos de la vaca 1 para el análisis de resultados del ciclo completo.

El número de ninfas repletas obtenido de la vaca 1 fue de: 3187 de las 4508 ninfas colocadas, representando un porcentaje de recuperación del 70.7 %, considerando el 100% al número de ninfas colocadas.

Tercera colecta: Posterior a la colecta de ninfas repletas, estas fueron llevadas a incubación durante 28 días hasta finalizar su muda al estadio adulto. Los animales no tuvieron afectación en la piel, ni mostraron complicaciones de salud al finalizar el ciclo de infestaciones. Al finalizar la muda se obtuvieron 2795 ejemplares adultos de *Amblyomma mixtum*, los cuales lograron completar todas sus fases de desarrollo en un solo hospedante en un periodo de 20 semanas, de estos 1485 eran hembras y 1310 fueron machos. Esto representa un porcentaje de recuperación del 87.7% durante esta fase, considerando a los ejemplares colocados al inicio de la tercera infestación como nuestro 100%.

CONCLUSIONES

La utilización de este método de colecta depende del objetivo de estudio que se requiera, ya que existen metodologías estandarizadas para la vigilancia epidemiológica y las pruebas de ixodidas (NOM-006-ZOO-1993), las cuales requieren condiciones apegadas a los comportamientos de infestaciones naturales para probar su eficacia, además de requerir específicamente una mayor cantidad de hospedantes.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un protocolo de incubación y recolección de garrapatas basado en una cápsula como método de contención para completar el ciclo de vida de la garrapata multi hospedera *Amblyomma mixtum*, en un modelo bovino, con el fin de aumentar la eficiencia de recolección de garrapatas y el posterior

mantenimiento de estos parásitos en condiciones de laboratorio. Se demostró que este método de recolección por cápsula es funcional, se logró completar el ciclo de vida de *A. mixtum* en un solo hospedante, en un periodo de 20 semanas, se acepta la hipótesis y se mostró la eficacia de la metodología al obtener una recuperación de 2,797 ejemplares adultos. Es importante resaltar que los animales sometidos a este estudio no mostraron afectaciones o daños en la piel, ni ninguna secuela durante ni después de las infestaciones. Como se indicó anteriormente, el uso de este protocolo depende en gran medida del propósito del proyecto para el que se requiera utilizar, sin embargo, los trabajos para *Amblyomma mixtum* provenientes de bovinos y sus tasas de eclosión y recuperación no han sido reportados en la literatura, por esto, estos resultados son los primeros en reportar estos datos sobre el ciclo de vida y tasa de recuperación de *A. mixtum* en bovinos bajo condiciones controladas.

Es necesario realizar más réplicas para poder obtener un análisis estadístico significativo que permita estandarizar los resultados de colecta, sin embargo, los resultados aquí presentados cumplieron con el propósito de la investigación y aportaron nuevos datos que pueden ser utilizados en estudios consecuentes sobre *A. mixtum*.

LITERATURA CITADA

Almazán, C., Torres- Torres, A., Torres-Rodríguez, L., Soberanes- Céspedes, N., & Ortiz-Estrada, M. 2016. Aspectos biológicos de *Amblyomma mixtum* (Koch, 1844) en el noreste de México. *Quehacer Científico En Chiapas*, 11(2).

Dantas-Torres F, Chomel BB, Otranto D. 2012. Ticks and tick-borne diseases: a one health perspective. *Trends Parasitol.* 28(10):437-446 .
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.07.003>

Estrada-Peña, A. 2015. CLASE ARACHNIDA Orden Ixodida: Las garrapatas. *Revista IDE@-SEA*, Dept. de Parasitología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza, 13, 1–15. www.sea-entomologia.org/IDE@

Meléndez R D, Meléndez A C, Marín S, Torres A, Fortis M, Granda F, Mujica F. 2014. Larval and Nymphal Stages of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in Esplenectomized and Intact Rats (*Rattus norvegicus*): Case Studies. *Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XXIV, N° 5*, 421 - 427, 2014.

Polanco-Echeverry, D. N., & Ríos-Osorio, L. A. 2016. Aspectos biológicos y ecológicos de las garrapatas duras. *Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria*, 17(1), 81–95.

[SAGARPA] Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Acuerdo por el que se establece la Campaña Nacional para el control de la garrapata *Boophilus* spp. DOF: 10-09-2012.

López VG. (s.f.). Técnicas de investigación de garrapatas en el laboratorio y en el campo. Programa de parasitología y entomología veterinarias



GARRAPATAS Y OTROS ECTOPARÁSITOS EN MURCIÉLAGOS CAVERNÍCOLAS DE UN REFUGIO EN EL NEOTROPICO, LAS ESPECIES OLVIDADAS

TICKS AND OTHER ECTOPARASITES IN CAVE-DWELLING BATS OF REFUGE IN THE NEOTROPICS: THE FORGOTTEN SPECIES

Alma Dory Santiago Morga⁵, Margarita García-Luis^{1,3,4}, María de los Ángeles Carrizosa Bustamante² y Gisela Fuentes-Mascorro^{1,5}

1. Cuerpo Académico Ciencias Veterinarias Aplicadas al Desarrollo Regional. Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca.
 2. Centro Interdisciplinario para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) IPN, Unidad Oaxaca.
 3. Laboratorio de Investigación en Salud Ecosistémica (LINsE), Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca.
 4. Laboratorio de Geografía de la Biodiversidad, Depto. Zoología, Pabellón Nacional de la Biodiversidad, Instituto de Biología, UNAM.
 5. Laboratorio de Investigación en Reproducción Animal (LIRA), Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca.
- Alma Dory Santiago Morga (almananaxhi@gmail.com).

RESUMEN

Los murciélagos, el segundo grupo de mamíferos más diverso, desempeñan funciones vitales en los ecosistemas. Sin embargo, también son hospedadores de ectoparásitos como garrapatas, pulgas, ácaros y dípteros, que pueden influir negativamente en su salud al transmitir patógenos. En ambientes cavernícolas de la Mixteca Oaxaqueña, los estudios sobre ectoparásitos asociados a murciélagos son escasos. Por ello, el objetivo de esta investigación fue listar las especies de ectoparásitos en murciélagos de una cueva de esta región, con el fin de contribuir al conocimiento de su fauna parasitaria y las interacciones ecológicas entre hospedadores y parásitos. El estudio se llevó a cabo en Santiago Apoala, Oaxaca, donde se utilizaron redes de niebla para capturar murciélagos durante cuatro noches. Los ectoparásitos se recolectaron con pinzas y fueron almacenados en alcohol al 70% para su posterior identificación bajo un microscopio estereoscópico. Los ectoparásitos fueron comparados con publicaciones científicas para su identificación. Se capturaron 99 murciélagos, con *Dermanura azteca* como la especie más abundante. En total, se recolectaron 332 ectoparásitos, siendo las garrapatas del género *Ornithodoros* las menos comunes (4.2%). Se identificaron 184 moscas de la familia Streblidae y 127 ácaros, siendo *Periglischrus* spp. el género más prevalente. Las hembras presentaron una mayor infestación de ectoparásitos que los machos. Estos resultados coinciden con investigaciones previas que sugieren que las hembras invierten menos tiempo en el acicalamiento debido a la reproducción. Los hallazgos confirman la necesidad de estudios continuos sobre ectoparásitos en murciélagos de Oaxaca, dado el riesgo potencial de transmisión de enfermedades zoonóticas a humanos y ganado. Este trabajo

resalta la importancia de conocer mejor las dinámicas parasitarias en ambientes cavernícolas para mejorar las estrategias de salud pública y conservación.

Palabras claves: ácaros, pulgas, moscas, Chiroptera, Oaxaca.

ABSTRACT

Bats, the second most diverse group of mammals, play vital roles in ecosystems. However, they also host ectoparasites such as ticks, fleas, mites, and dipterans, which can negatively impact their health by transmitting pathogens. In the cave environments of the Mixteca region of Oaxaca, studies on ectoparasites associated with bats are scarce. Therefore, the objective of this research was to list the species of ectoparasites found in bats from a cave in this region, aiming to contribute to the knowledge of parasitic fauna and the ecological interactions between hosts and parasites. The study was conducted in Santiago Apoala, Oaxaca, where mist nets were used to capture bats over four nights. Ectoparasites were collected with tweezers and stored in 70% alcohol for later identification under a stereoscopic microscope. The ectoparasites were compared to scientific publications for identification. A total of 99 bats were captured, with *Dermanura azteca* being the most abundant species. In total, 332 ectoparasites were collected, with ticks of the genus *Ornithodoros* being the least common (4.2%). A total of 184 flies from the Streblidae family and 127 mites were identified, with *Periglischrus* spp. being the most prevalent genus. Females exhibited a higher infestation rate of ectoparasites than males. These results are consistent with previous studies suggesting that females invest less time in grooming due to reproduction. The findings confirm the need for ongoing studies on bat ectoparasites in Oaxaca, given the potential risk of zoonotic disease transmission to humans and livestock. This work highlights the importance of better understanding parasitic dynamics in cave environments to improve public health and conservation strategies. Keywords: Mites, fleas, flies, Chiroptera, Oaxaca.

INTRODUCCIÓN

Los murciélagos, son el segundo orden de mamíferos más biodiverso después de los roedores, lo que se refleja en las funciones vitales que desempeñan en los ecosistemas donde viven (control de insectos, polinización, dispersión de semillas, entre otras; Kunz *et al.*, 2011). Sin embargo, también pueden albergar una gran variedad de ectoparásitos que pueden influir en su biología, comportamiento y salud. Por ejemplo, las garrapatas, pulgas, ácaros y dípteros, son parásitos externos que dependen de los murciélagos para completar su ciclo de vida, alimentándose de su sangre, piel o fluidos corporales. Esta relación parasitaria puede generar impactos significativos, como la transmisión de patógenos, la reducción del éxito reproductivo y el aumento de la mortalidad. Además, algunos ectoparásitos presentan una alta especialización hacia sus hospedadores, lo que refleja una coevolución estrecha entre el parásito y el murciélago (Dick & Patterson, 2007).

En México, los estudios sobre los ectoparásitos de murciélagos se han incrementado en las últimas décadas. Sin embargo, persisten vacíos de conocimiento en cuanto a su diversidad y ecología, especialmente en ambientes cavernícolas. Las cuevas ofrecen refugio a una gran cantidad de especies de

murciélagos, lo que genera condiciones favorables para el desarrollo y persistencia de comunidades de parásitos (Ramírez-Martínez & Tlapaya-Romero, 2023). Además, se ha identificado a los murciélagos como importantes reservorios de ectoparásitos que pueden ser transmisores de enfermedades de importancia en salud pública (SSA, 2023). Por lo anterior, el público en general tiene una percepción negativa sobre estos mamíferos. A lo que se suma la errónea suposición que la epidemia de COVID-19, guardaba relación con los murciélagos, lo que ha propiciado que en el estado sean perseguidos y exterminados.

En Oaxaca, se han reportado 94 especies de murciélagos pertenecientes a 54 géneros y seis familias, por lo que se considera uno de los estados más biodiversos de México (García-Grajales *et al.*, 2012). En la región Mixteca de Oaxaca, existen numerosas cuevas que sirven como hábitat para diversas especies de murciélagos, pero pocos estudios han documentado las especies de garrapatas y otros ectoparásitos asociadas a ellos. Estudios previos en otras regiones, han revelado una alta diversidad de ectoparásitos en murciélagos asociados a cuevas, lo que destaca la importancia de explorar estos ecosistemas para comprender mejor las dinámicas parasitarias (Guerrero Arenas *et al.*, 2017).

Por todo lo anterior, la presente investigación tiene como objetivo listar las especies de garrapatas y otros ectoparásitos obtenidos de especies de murciélagos asociados a una cueva de la Mixteca Oaxaqueña. Con esto, se busca contribuir al conocimiento de la fauna parasitaria en esta región y a su relación con los murciélagos cavernícolas, con el fin de mejorar el entendimiento de las interacciones ecológicas entre hospedadores y parásitos en ambientes subterráneos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras se obtuvieron de una cueva del municipio de Santiago Apoala, ubicada al noroeste de la Mixteca alta de Oaxaca. El periodo de trabajo fue de febrero a abril del 2023. Se colocaron dos redes de niebla de 3x12m abiertas durante 8 horas (18:00h a 2:00h), cerca de la entrada de la cueva durante cuatro noches. Esto dio como resultado 864 m/red de esfuerzo de muestreo. La revisión de las redes se realizó cada 20 minutos. Una vez capturados los individuos se procedió a la identificación de la especie del murciélago, se tomaron datos morfométricos de cada ejemplar y se le asignó un número progresivo de acuerdo al orden de captura. Posteriormente, se procedió a la obtención de ectoparásitos con una pinza de punta fina, a partir de la revisión de las alas, cabeza, orejas y cuerpo. Los ectoparásitos fueron depositados en alcohol al 70% en tubos eppendorf numerados (con lápiz y una etiqueta de papel albanene) con el número de murciélago del que se obtuvo la muestra (uno por cada murciélago revisado). Las muestras se depositaron y fueron mantenidas en congelación hasta su procesamiento, en un congelador de la marca Torrey, modelo CHTC9, a -20° C. El procesamiento de los ectoparásitos para su identificación se realizó con la ayuda de un microscopio estereoscópico de la marca Leica, modelo EZ4. Se utilizaron lentes de 8x y 35x, para obtener imágenes de alta resolución y poder observar

características diagnósticas en la identificación de géneros y especies de ectoparásitos. La identificación se realizó por comparación con publicaciones en revistas científicas existentes en bases de datos como Redalyc® Red (<https://www.redalyc.org/>), Research Gate (<https://www.researchgate.net/>), SciELO.org (<https://scielo.org/es/>), Oxford Academic (<https://academic.oup.com/>), BioOne (<https://bioone.org/>), Revista Mexicana de Biodiversidad (<https://revista.ib.unam.mx/>), Elsevier (<https://www.elsevier.es>). C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se capturaron un total de 99 murciélagos, 61 hembras y 38 machos. La especie *Dermanura azteca* fue la más abundante con el 55.5 % del total, le siguió *Anoura geoffroyi* con 19.2 %. Las especies con menos capturas fueron *Eptesicus fuscus* y *Myotis occultus* con 3.0% y 1.0%, respectivamente. En cuanto a ectoparásitos, se encontró que del total colectado (332), las garrapatas solo representaron el 4.2% (14 individuos) del total, todas pertenecientes a *Ornithodoros* spp., y fueron localizadas en el cuerpo de cuatro especies de murciélagos (*Dermanura azteca*, un ejemplar; *Desmodus rotundus*, dos; *Eptesicus fuscus*, cinco y *Tadarida brasiliensis*, seis). En muchas regiones de México, (especialmente áreas rurales) los murciélagos y el ganado coexisten en ambientes compartidos, debido a que estos pueden habitar en cuevas, establos o estructuras cercanas al ganado. Lo anterior puede permitir que las garrapatas pasen de un hospedador a otro y aumentar así el riesgo de transmisión de enfermedades. Las garrapatas son conocidas por su capacidad de actuar como vectores de diversas enfermedades zoonóticas, tanto virales como bacterianas. *Ornithodoros* spp. por su alimentación hematófaga y su movilidad entre diferentes hospedadores (murciélagos, ganado y aves) plantea un riesgo potencial. Por ejemplo, puede actuar como vector de bacterias del género *Rickettsia* y *Borrelia* o virus que afectan tanto a los murciélagos como a los animales domésticos, y en algunos casos, incluso a los humanos (Hassan et al., 2019).

Para el resto de ectoparásitos, se registraron 184 moscas (Familia Streblidae) en total (156 de *Trichobius* spp. y 28 de *Strebla wiedemanni*) en los murciélagos *Anoura geoffroyi* (23 *Trichobius* spp. y 18 *S. wiedemanni*), *Dermanura azteca* (56 *Trichobius* spp. y seis *S. wiedemanni*), *Desmodus rotundus* (59 *Trichobius* spp. y cuatro *S. wiedemanni*) y *Pteronotus parnellii* (18 *Trichobius* spp.). En el caso de los ácaros (Supraorden Acariformes), se observaron 127 individuos, 100 *Periglyphus* spp., 12 *Macronyssoides* spp., ocho *Trombiculidae* spp. y siete *Ornithonyssus* spp., en dos especies de murciélagos, *Eptesicus fuscus* (tres Spinturnicidae y siete *Trombiculidae* spp.) y *Tadarida brasiliensis*. Por otro lado, se encontraron seis individuos de pulgas, que se presumen pueden pertenecer a *Hectopsylla* spp. y que se obtuvieron del cuerpo de *Dermanura azteca* (dos) y *Pteronotus parnellii* (cuatro). En el caso de *Myotis occultus*, se observó la presencia de una mosca, *Nycteribiidae* sp. Se tuvo una mayor presencia de ectoparásitos con respecto al sexo del hospedero en las hembras, que representaron un 66.6% (221) del total. Esto significó en promedio, 3.62 ectoparásitos por hembra y para los machos un promedio de 2.9. Aunque la diferencia entre ambos promedios es menor a un individuo de ectoparásito por murciélago, este hallazgo es consistente con lo

obtenido por otras investigaciones. Czenze & Broders (2011) mencionan que, las hembras invierten menor tiempo y energía para el acicalamiento y aseo individual que los machos, debido a que ellas dedican más tiempo al cuidado de las crías y obtención de alimento para la gestación. Por especie de murciélago, se obtuvo que *Dermanura azteca* presentó el mayor número de ectoparásitos con el 57.1% (172) del total, lo que corresponde a un promedio por individuo de 9 ectoparásitos, por lo que es la especie con mayor número promedio de ectoparásitos por individuo. Los ectoparásitos antes descritos, están ampliamente distribuidos en regiones de México y del mundo. En los estudios de Vargas (1984), se identificó la presencia de garrapatas del género *Ornithodoros spp.*, en murciélagos de Costa Rica, sin embargo, no eran los únicos ectoparásitos que afectaba a los individuos. y Cuxim-Koyoc (2018) evidenciaron la presencia de moscas de los géneros *Trichobius spp.* y *Streblidae spp.* en murciélagos de México. Por su parte, Xicoténcatl (2019), determinó una parasitosis mixta en individuos de las costas de Oaxaca. En este último caso, además de la identificación de moscas Spinturnicidae, se observaron ácaros del género *Periglischrus spp.* que afectaron a los murciélagos. Más recientemente, Leiva *et al.* (2021) describieron ácaros hematófagos obligados de la familia *Macronyssidae*, los cuales afectan individuos en Brasil.

CONCLUSIONES

Los hallazgos de los ectoparásitos presentes en este estudio, coinciden con los publicados en la literatura existente. Sin embargo, es necesario continuar con los trabajos al respecto, debido a que el estado carece de listados precisos sobre las especies de garrapatas y otros ectoparásitos que se asocian a murciélagos. Esto puede significar un riesgo de transmisión de patógenos a humanos y especies domésticas de interés comercial.

LITERATURA CITADA

Cuxim-Koyoc, A., Reyes-Novelo, E., Macswiney, M. C., & Aguilar-Rodríguez, P. A. (2016). Nuevos registros de *Streblidae* (Diptera: Hippoboscoidea) para México. *Revista Colombiana de Entomología*, 42(2), 192-196.

Czenze, Z. J., & Broders, H. G. (2011). Ectoparasite community structure of two bats (*Myotis lucifugus* and *M. septentrionalis*) from the Maritimes of Canada. *Journal of Parasitology Research*, 2011, Article ID 341535, 9 pages. <https://doi.org/10.1155/2011/341535>.

Dick, C. W., & Patterson, B. D. (2007). Against all odds: Explaining high host specificity in dispersal-prone parasites. *International Journal for Parasitology*, 37(8-9), 871-876.

García-Grajales, Jesús, & Buenrostro Silva, Alejandra. (2012). Revisión al conocimiento de los murciélagos del estado de Oaxaca. *Therya*, 3(3), 277-293. <https://doi.org/10.12933/therya-12-83>.

Guerrero Arenas, R., Villarruel Ordaz, J. L., Colín Martínez, H., & Rosas Alquicira, E. F. (2017). La importancia de los estudios sistemáticos en Oaxaca, un Estado megadiverso. *REPOSITORIO NACIONAL CONACYT*.

Hassan, M. I., Iqbal, A., & Ashraf, M. (2019). Role of soft ticks (*Ornithodoros* spp.) as vectors of zoonotic pathogens. *Journal of Parasitology Research*, 2019, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2019/2060972>.

Kunz, T. H., de Torrez, E. B., Bauer, D., Lobova, T., & Fleming, T. H. (2011). Ecosystem services provided by bats. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1223(1), 1-38. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06004.x>.

Leiva, Y., Hasbún-Acuña, P., & Cruz-Choapa, R. (2021). *Ornithonyssus* spp. *Revista Chilena de Infectología*, 38(4), 555-556. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182021000400555>.

Ramírez-Martínez, M. M., & Tlapaya-Romero, L. (2023). Association of bat flies (Diptera: Streblidae) and bats: Richness and host specificity in Western Mexico. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 21, 160-167. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2023.05.001>.

Secretaría de Salud. (2023, 2 de enero). Comunicado 001: Positivo a rabia, enfermedad en niñas y niño mordidos por murciélago en Oaxaca. *Gobierno de México*. <https://www.gob.mx/salud/prensa/001-positivo-a-rabia-enfermedad-en-ninas-y-nino-mordidos-por-murcielago-en-oaxaca>.

Vargas, M. (1984). Occurrence of the bat tick *Ornithodoros* (*Alectorobius*) *kelleyi* Cooley & Kohls (Acari: Argasidae) in Costa Rica and its relation to human bites. *Revista de Biología Tropical*, 32(1), 103-107.

Xicoténcatl, G. N. V. (2019). Diversidad de ectosimbiontes en el murciélago *Desmodus rotundus* (Chiroptera: Phyllostomidae) en localidades con diferente grado de perturbación en la costa de Oaxaca, México.

DISPONIBILIDAD DE REGISTROS DE PRESENCIA DE GARRAPATAS Y PATÓGENOS QUE TRANSMITEN PARA DESARROLLAR MODELOS DE NICHO ECOLÓGICO Y DE DISTRIBUCIÓN

AVAILABILITY OF OCCURRENCES OF TICKS AND TICK-BORNE PATHOGENS TO DEVELOP ECOLOGICAL NICHE AND DISTRIBUTION MODELS

Uriel Mauricio Valdez-Espinoza ^{1,2}, Diego Santiago-Alarcon ³, Fabricio Villalobos ⁴, Roberta Marques ⁵, Rodolfo Lagunes-Quintanilla ², Andrés Lira-Noriega ^{6*}

¹ Red de Estudios Moleculares Avanzados, Instituto de Ecología, A.C., Xalapa, Veracruz, México

² Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Morelos, México

³ Department of Integrative Biology, University of South Florida 2037. USF Beard Drive, SCA 110, Tampa, FL, USA

⁴ Red de Biología Evolutiva, Instituto de Ecología, A.C., Xalapa, Veracruz, México

⁵ Instituto de Ciencias-Centro de Agroecología y Ambiente, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México

⁶ CONAHCyT Research Fellow, Red de Estudios Moleculares Avanzados, Instituto de Ecología, A.C., Xalapa, Veracruz, México

Correo electrónico: umvaldez@gmail.com

ABSTRACT

Ticks are ectoparasites with a broad vectorial capacity for transmitting pathogens that affect humans, domestic animals, and wildlife. Ecological niche models (ENM) and species distribution models (SDM) have been implemented to study their epidemiology and geographic distribution. These methodologies have gained relevance in the field of study; however, given that it is an area of growing progress, it is necessary to review methodological details in published studies to identify improvements. The objective of this work is to identify the sources and amount of information about the number of presence records that have been used in the development of ENM and SDM to study tick species and TBPs. We conducted a bibliographic search in the Web of Science database using keywords related to ENM and SDM in ticks and tick-borne pathogens (TBPs) and applied a methodology for filtering. The final selection included a total of 158 publications from the period from 1997 to May 2024. Scientific literature, field surveys and pathogen identification, free online databases, and institutional databases are the primary sources of geographic occurrences for tick species and TBPs. More attention is needed to indicate whether the presence records are retrieved from the parasitic or non-parasitic stage of ticks. VectorMap is the leading online database specialized in vectors, including ticks. There is no database similar to VectorMap that focuses on TBPs. Pathogen

presence data must be applied with adequate biological knowledge. Although there are various sources for obtaining geographic occurrences, it is necessary to generate the compilation and to provide access to already existing georeferenced data, as well as to contribute additional information to complement existing databases to ensure the quality of geographic presence occurrences. Data for TBPs are limited, making it essential to promote efforts in pathogen identification and the creation of global record databases.

Keywords: missing data, models, presence records, spatial bias, ticks

INTRODUCCIÓN

Los modelos de nicho ecológico (MNE) y de distribución de especies (MDE) son metodologías que han sido empleadas para abordar preguntas y problemas primordialmente desde la biogeografía, conservación y ecología. Estos modelos han sido aplicados en el campo de la epidemiología espacial para el estudio de enfermedades para determinar las condiciones ambientales asociadas a su presencia e identificar las regiones geográficas susceptibles de su establecimiento, respectivamente (Peterson, 2014). Los MNE modelan espacios abstractos que representan las condiciones ambientales necesarias para la viabilidad de las poblaciones de una especie, mientras que los MDE son proyecciones de los MNE en el espacio geográfico y usualmente son interpretados como la distribución potencial de una especie o el taxón de estudio (Peterson y Soberón, 2012). Una mejor interpretación de estos modelos correlativos se basa en la interpretación del diagrama BAM propuesto por Soberón y Peterson (2005), que consiste en evaluar la forma en que las condiciones bióticas (B), abióticas (A) y de dispersión o accesibilidad (M) afectan la distribución de las especies. Usualmente, estos son modelos correlativos que carecen de hipótesis explícitas o mecanismos subyacentes a las distribuciones de las especies, ya que se basan en la relación entre los registros geográficos de presencia de las especies con datos de factores abióticos de variables relacionadas con las condiciones ambientales como el clima y la topografía, entre otras (Soberón y Peterson, 2005). No obstante, la utilidad de dichos modelos para la toma de decisión y manejo en campo en el área de la eco-epidemiología, su calidad en términos generales de desempeño estadístico, así como la que conlleva a su utilidad para responder preguntas y problemas zoonosarios, recae en la información de la cantidad y precisión de los registros de presencias con que se calibran y evalúan (Cobos y Peterson *et al.*, 2022).

Las garrapatas son parásitos poiquiloterms, lo que implica que sus procesos biológicos y periodos de incubación de los patógenos que transmiten (TBPs, por sus siglas en inglés) dependen directamente de las condiciones climáticas (Randolph, 2004). En este sentido, su ecología se asocia a las condiciones climáticas, las características del hábitat (vegetación) y la presencia de hospederos (Pfäffle *et al.*, 2013). Debido a esta interdependencia entre los factores de los registros de presencia y las características del ambiente, la eco-epidemiología de garrapatas y los patógenos que transmiten presentan un amplio potencial en aprovechar el uso y desarrollado de modelos predictivos que faciliten mapear los sitios de idoneidad ambiental que permitan su potencial expansión geográfica (Estrada-Peña, 2008; Lippi *et al.*, 2021). A pesar de su creciente uso, es necesario hacer una síntesis de los estudios que hasta la fecha han incursionado en el uso de MNE y de MDE para

revisar los detalles metodológicos que se han empleado, y con ello poder evidenciar la calidad de la información geográfica y ambiental que se utiliza en su desarrollo.

El objetivo de este trabajo es identificar las fuentes de los registros de presencia geográfica que se han empleado en el desarrollo de MNE y MDE para estudiar las especies de garrapatas y TBPs. Con ello pretendemos clasificar las fuentes que se emplean, y en dónde existe una mayor cantidad de información, así como también conocer áreas de oportunidad para mejorar la disponibilidad y la calidad de los registros disponibles en el desarrollo de los futuros trabajos en este campo de estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para identificar y recuperar los estudios que han utilizado MNE y MDE en garrapatas y TBPs, se realizó una consulta bibliográfica en la base de datos Web of Science® con las palabras clave y operadores booleanos: ((“tick”) AND (“ticks” OR “tick-borne disease*” OR “tick-borne disease spread*” OR “ticks prediction*” OR “tick-borne disease prediction”) AND (“Model distribution”) AND (“ecolog* niche model*” OR “niche model*” OR “distribution model*” OR “specie* distribution model*” OR “potential distribution model*” OR “envelope model*” OR “predicti* model*” OR “bioclim* model*” OR “geographic prediction” OR “habitat suitab* model*” OR “climat* niche model*” OR “clim* distribution model*” OR “climat* suitab* model*” OR “ecolo* suitab*” OR “dynamic* distribution” OR “map* risk model*” OR “map* distribution*” OR “geograph* distribution” OR “spatial distribution model*” OR “*spatial analysis” OR “current distribution model*” OR “future distribution model*”).

La consulta incluyó estudios reportados hasta mayo de 2024. Se seleccionaron las publicaciones que hicieran referencia a especies de garrapatas y/o patógenos que transmiten, y las enfermedades que causan. Se descartaron revisiones, y solo se incluyeron artículos de investigación. Se revisó el resumen y la metodología, y se descartaron las publicaciones que no describieran una metodología clara y que no incluyeran algún análisis de modelaje de nicho y distribución geográfica.

Para recuperar la información de interés de este campo de estudio utilizamos un cuestionario de preguntas diseñado en Google forms® en donde se depositó la información de las diferentes fuentes que se emplean para obtener los registros geográficos de presencia de garrapatas y TBPs.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Utilizando los criterios de elegibilidad establecidos, se identificaron un total de 158 publicaciones que van desde el año 1997 a 2024, donde el mayor número de estudios se publicó durante el periodo 2022-2024. Esto indica un aumento en la utilización de registros geográficos de presencias de garrapatas y TBPs para el desarrollo de MNE y MDE, los cual se debe principalmente al esfuerzo por estudiar estos sistemas bajo escenarios de cambio climático (Weber *et al.*, 2023)

Las principales fuentes de registros de presencia geográfica de las especies de garrapatas en orden de magnitud de número de registros, se encuentran la literatura científica, muestreos de campo, bases de datos libres en la web, y bases de datos locales institucionales.

Los estudios integran registros geográficos de diferentes fuentes en el desarrollo de los MNE y MDE. De los registros que se obtienen mediante muestreo o colecta *in situ* del área geográfica de interés a estudiar no se realizan con la misma frecuencia para todas las especies de garrapatas. Es importante destacar que en estos trabajos detallan el uso de registros de un muestreo activo (fase no parasítica), y un muestreo pasivo (fase parasítica), lo cual tanto teórica como empíricamente permite distinguir mejor la fase del ciclo de vida en que se detecta el vector y sus agentes patogénicos asociados (Cobos y Peterson, 2022). Se observa que una importante deficiencia en la información de los registros de presencia que se obtienen a partir de las bases de datos es la carencia de este tipo de información, por lo que debe estimularse a los autores y grupos de trabajo o consorcios que trabajen en estas cuestiones zoonosológicas a que aporten dicha información cuando se cuente con ella, o bien se haga un esfuerzo mayor para conseguirla.

Las principales bases de datos de acceso libre en la Internet son la Global Biodiversity Information Facility (GBIF, <https://www.gbif.org/>), VectorMap (<https://vectormap.si.edu/>), Bison (<https://www.gbif.us/#api>), Geoparasite (<https://www.geo-parasite.org/>), y Species Link (<https://specieslink.net/>). De este grupo, VectorMap es la única base de datos global especializada en vectores de patógenos y contiene alrededor de un millón de registros geográficos de presencia en los que incluyen especies de garrapatas de interés médico y veterinario (Lippi *et al.*, 2023).

Son pocos los estudios que utilizan registros de bases de datos locales institucionales, lo cual puede deberse a que no son de fácil acceso o bien su grado y nivel de curación es aún demeritorio. Es posible que esto limite el enriquecer la cantidad de registros geográficos disponibles, sobre todo en las especies que se han monitoreado geográficamente de manera histórica. Permitir el acceso a esta información representa una necesidad urgente para procurar un avance importante en el desarrollo de las predicciones y pruebas de hipótesis que se deriven a partir de la implementación de MNE y MDE.

En relación con los TBP, se utilizan tres fuentes de información, en orden de magnitud son; muestreos de campo para la colecta de garrapatas y la identificación posterior de los patógenos mediante métodos moleculares, la búsqueda de registros en la literatura científica y datos que se obtienen a partir de bases de datos de instituciones de salud provenientes de pacientes diagnosticados positivos a las enfermedades. Identificamos que no existe a la fecha una base de datos de libre consulta similar a GBIF o VectorMap en la que se puedan descargar registros de presencia de patógenos transmitidos por garrapatas, a diferencia de las que se disponen para los vectores (Lippi *et al.*, 2023). Esta debe ser una de las razones por

las que el desarrollo de MNE y MDE en donde se consideré la interacción de las garrapatas y los patógenos que transmite este limitado.

Desde el punto de vista epidemiológico la inclusión de registros de presencia provenientes a partir del diagnóstico en el hospedero no debe utilizarse sin antes conocer bien la historia clínica. Registros que se obtienen a partir del diagnóstico en DNA o serología nos pueden dar información diferente (Martínez-García *et al.*, 2021), ya que no se tiene la certeza de que los hospederos diagnosticados positivos hayan sido infectados en el sitio donde se colectó la muestra. Esto podría proporcionar sesgos geográficos en la estimación del nicho ecológico y la distribución geográfica.

CONCLUSIONES

Los registros geográficos de presencia son un elemento fundamental para el desarrollo de MNE y MDE; sin embargo, la colecta geográfica, el procesamiento de los datos y su utilización debe ser muy cuidadosa, para procurar utilizar registros geográficos de presencia con una buena calidad tanto en su precisión espacial y temporal como en la taxonómica (Ribeiro *et al.*, 2019). Se identificaron diferentes fuentes de registros geográficos de garrapatas y TBPs; sin embargo, hace falta un mayor esfuerzo de compilación de información y muestreo para los registros de los TBPs identificadas en las especies de garrapatas vectores. Es necesario que las instituciones de salud o de vigilancia epidemiológica de los diferentes países pongan a disposición de la comunidad científica los registros de presencia geográfico para fines de investigación, y de esta manera poder abordar más preguntas bajo las metodologías como el MNE y MDE a manera de facilitar las estimaciones de las afinidades ecológicas y ambientales de estas especies de alta importancia para el manejo y cuidado del ganado y la salud humana. Se debe promover la generación de una base de datos de TBPs en la Internet con características similares a VectorMap, así como también generar bases de datos locales detalladas con fines de uso multidisciplinario. Asimismo, es necesario que los estudios reporten los registros que han utilizado y que se promueva la inclusión de nuevos registros de presencia para complementar el estudio biogeográfico y ecológico de las garrapatas y TBPs.

LITERATURA CITADA

Cobos, ME, Peterson, AT. 2022. Detecting Signals of Species' Ecological Niches in Results of Studies with Defined Sampling Protocols: Example Application to Pathogen Niches. *Biodiversity Informatics*, 17, 50-58.

Estrada-Peña A. 2008. Climate, niche, ticks, and models: what they are and how we should interpret them. *Parasitol Res. Dec*;103 Suppl 1: S87-95.

Lippi CA, Rund SSC, Ryan SJ. 2023. Characterizing the Vector Data Ecosystem. *J Med Entomol. Mar* 6;60(2):247-254.

Lippi CA, Ryan SJ, White AL, Gaff HD, Carlson CJ. 2021. Trends and Opportunities in Tick-Borne Disease Geography. *J Med Entomol. Nov* 9;58(6):2021-2029.

Martínez-García G, Santamaría-Espinosa RM, Lira-Amaya JJ, Figueroa JV. Challenges in Tick-Borne Pathogen Detection: The Case for *Babesia* spp. Identification in the Tick Vector. *Pathogens*. 2021 Jan 20;10(2):92. doi: 10.3390/pathogens10020092. PMID: 33498304; PMCID: PMC7909277.

Peterson AT, Soberón J. 2012. Species Distribution Modeling and Ecological Niche Modeling: Getting the Concepts Right. *Natureza a Conservacao*, 10, 102-107.

Peterson AT. 2014. *Mapping Disease Transmission Risk*. Baltimore: Johns Hopkins University Press.

Pfäffle M, Littwin N, Muders SV, Petney TN. 2013. The ecology of tick-borne diseases. *Int J Parasitol*. Nov;43(12-13):1059-77.

Randolph SE. 2004. Tick ecology: processes and patterns behind the epidemiological risk posed by ixodid ticks as vectors. *Parasitology*. 129 Suppl: S37-65.

Ribeiro R, Eze JI, Gilbert L, Wint GRW, Gunn G, Macrae A, Medlock JM, Auty H. 2019. Using imperfect data in predictive mapping of vectors: a regional example of *Ixodes ricinus* distribution. *Parasit Vectors*. Nov 14;12(1):536.

Soberón J, Peterson AT. 2005. Interpretation of Models of Fundamental Ecological Niches and Species' Distributional Areas. *Biodiversity Informatics*, 2.

Weber E, Downward GS, Ebi KL, Lucas PL, van Vuuren D. 2023. The use of environmental scenarios to project future health effects: a scoping review. *Lancet Planet Health*. Jul;7(7):e611-e621.