



DETECCIÓN MOLECULAR DE *Rickettsia bellii* EN *Amblyomma rotundatum* Koch 1884 (IXODIDA: IXODIDAE) RECOLECTADA DE *Rhinella marina* L., 1758 (ANURA: BUFONIDAE) EN PANAMÁ

¹Maria Ogrzewalska & ²Sergio Bermúdez C.

¹Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

E-Mail: maria.ogrzewalska@ioc.fiocruz.br

²Departamento de Investigación en Entomología Médica, Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, Ciudad de Panamá.

E-mail: sbermudez@gorgas.gob.pa

RESUMEN

Se presenta el hallazgo de la bacteria *Rickettsia bellii* en la garrapata *Amblyomma rotundatum* en Panamá.

PALABRAS CLAVES

Amblyomma rotundatum, *Rickettsia* no patogénica, sapo, Panamá.

MOLECULAR DETECTION OF *Rickettsia bellii* IN *Amblyomma rotundatum* Koch 1884 (IXODIDA: IXODIDAE) IN PANAMÁ

ABSTRACT

The finding of the bacterium *Rickettsia bellii* in the tick *Amblyomma rotundatum* is presented to Panama.

KEYWORDS

Amblyomma rotundatum, non-pathogenic *Rickettsia*, toad, Panama.

INTRODUCCIÓN

El género *Rickettsia* comprende alrededor de 27 especies de bacterias Gram negativas pleomórficas y que dependen de células eucariotas para su metabolismo (Parola *et al.*, 2013; Fang *et al.*, 2017). Estas bacterias están estrechamente relacionadas con invertebrados, en especial con insectos y ácaros (Azad *et al.*, 1998; Weinert *et al.*, 2009). Tradicionalmente este género se separa en cuatro grupos: un grupo basal (GB), los que causan las fiebres manchadas (GFM), los agentes de los tifus (GT) y especies intermedias (Walker, 2007; Fang *et al.*, 2017).

Dentro del GB, *Rickettsia bellii* se aisló por primera vez en *Dermacentor variabilis* (Say, 1821) en EU y fue designada como la cepa C369-C (Philip *et al.*, 1983). Desde entonces se ha detectado en ≈28 especies de garrapatas en el Nuevo Mundo, tanto en especies Neárticas como del Neotrópico (Philip *et al.*, 1983; Costa *et al.*, 2017; Ogrzewalska *et al.*, 2018). Desde el punto de vista de la salud pública, existe evidencia serológica sobre exposición en mamíferos (Pacheco *et al.*, 2007); no obstante, es considerada como un agente de patogenicidad desconocida para humanos (Parola *et al.*, 2013).

Con el propósito de incrementar el conocimiento de los miembros del género *Rickettsia* en Panamá y su relación con garrapatas en ese país, en este trabajo se presenta el hallazgo de *R. bellii* en una garrapata recolectada de un sapo común.

MATERIALES Y MÉTODOS

El 22 de abril del 2018 se colectaron garrapatas de un sapo, *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758) (Anura: Bufonidae), y de una *Boa constrictor* L. 1758 (Squamata: Boidae) en la carretera El Llano-Cartí, Chepo (9^o17'23.47" N, 78^o59'48.66" O). De estas garrapatas se extrajo ADN utilizando el kit comercial QIAamp[®] DNA Mini Kit y siguiendo los

protocolos del fabricante. Para la identificación de las especies de garrapatas, en especial las fases inmaduras, se analizó un fragmento de aproximadamente 460 pb del gen mitocondrial 16S ARNr, previamente descrito por Mangold *et al.* (1998). Los amplicones con tamaño de banda esperada fueron purificados y secuenciados por DNA Analyzer®, según los protocolos del fabricante y siguiendo métodos anteriormente descritos por Otto *et al.* (2008). Las secuencias parciales obtenidas se compararon con el análisis de Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y se alinearon con secuencias disponibles para este gen en GenBank.

En el caso de la detección de ADN de *Rickettsia*, se utilizaron los iniciadores CS-78 5'-GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT-3' y CS-323 5'-GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT-3', que amplifican una porción de 401 pb del gen citrato sintetasa, (*gltA*) mediante protocolos descritos anteriormente (Labruna *et al.* 2004). Para la identificación se siguieron los procedimientos arriba descritos para la purificación y secuenciación

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del *R. marinus* se identificó una larva de *Amblyomma rotundatum* Koch, 1844, por secuenciación del gen 16S rDNA, con una similitud de 100% con secuencias depositadas en GenBank para esta especie. De la *B. constrictor* fueron colectadas una larva, nueve ninfas, tres hembras y nueve machos, que fueron identificados como *Amblyomma dissimile* Koch, 1844. De una larva, una ninfa y dos machos de *A. dissimile* fue extraído ADN para confirmar la identificación taxonómica. Las secuencias obtenidas eran iguales entre ellas y 100% idénticas con secuencias de *A. dissimile* depositadas en GenBank. Las secuencias de los fragmentos de 16S rDNA fueron depositadas en GenBank con los números MH990349 y MK026013 para *A. rotundatum* y *A. dissimile* respectivamente.

Para el gen *gltA* se obtuvo una similitud del 99.5% (375/377) con el fragmento correspondiente en el genoma completo de *R. bellii* (CP015010). Esta secuencia fue depositada en GenBank con el número

MH990350. No se obtuvieron amplicones de *Rickettsia* en *A. dissimile*.

Amblyomma rotundatum y *A. dissimile* son parásitos de vertebrados terrestres de sangre fría, con escasos reportes en aves y mamíferos (Gugliemone y Nava 2010; Gugliemone *et al.*, 2014). En forma general ambas especies mantienen una amplia distribución, desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina, incluyendo algunas islas de las Antillas, y Hawái para *A. rotundatum* (Gugliemone *et al.*, 2014; Kelehear *et al.*, 2017, Ogrzewalska *et al.* 2018). *Amblyomma rotundatum* es partenogenética, por lo cual los reportes de machos son escasos (Keirans y Oliver 1993; Labruna *et al.*, 2005). Debido a que ambas especies son parecidas, algunos autores han señalado dificultades de identificarlas correctamente (Jones *et al.*, 1972; Gugliemone y Nava, 2010). Aun así, los adultos se pueden reconocer por diferencias en las espuelas de la coxa 1 y del escudo (Labruna *et al.*, 2005; Luz *et al.* 2018).

En Panamá la presencia de *A. dissimile* se conoce desde inicios del siglo XX (Darling, 1910) y desde entonces ha sido constantemente reportada en anfibios, reptiles y en menor grado en aves y mamíferos (Dunn, 1918; Fairchild *et al.*, 1966; Bermúdez *et al.*, 2012; Domínguez En Prensa). En contraste, hasta el momento solo hay dos registros de *A. rotundatum* en Panamá y ambos presentan poca información de colecta. Jones *et al.* (1972) hacen referencia a registros verificados de esta especie en Panamá a partir de hembras de la colección de garrapatas del Laboratorio de las Montañas Rocosas; no obstante, no se confirma el sitio de colecta. Recientemente Andoh *et al.* (2015) mencionan que una hembra de esta especie fue extraída de un *R. marina* en Japón y cuya procedencia era Panamá, además de reportarla infectada con *R. bellii*. A pesar de lo anterior, en Panamá no hay registros de la cría y comercialización legal de este anfibio para exportación, por lo que dicho registro puede ser considerado en duda.

Por su parte, el primer reporte de *R. bellii* en Panamá se da a través de un estudio serológico en animales domésticos en El Valle de Antón y que menciona reacción en suero de caballo (Bermúdez *et al.*, 2012). En el caso de garrapatas infectadas, hasta el momento el único reporte en

Panamá es en *Amblyomma sabanerae* Stoll, 1894 (Bermúdez y Troyo, 2018). Cabe destacar que, aunque no se detalla en ese trabajo el origen de la garrapata, la misma fue colectada de una tortuga del género *Kinosternum* en Tortí, provincia de Panamá. Consecuentemente, este sería el primer reporte con confirmación de sitio de *A. rotundatum* infectado con *R. bellii* en Panamá.

CONCLUSIONES

Este trabajo señala un nuevo registro de *A. rotundatum* para Panamá, lo cual no solo añade un reporte detallado de localidad y hospedero, sino que presenta un dato adicional de *R. bellii* en el país. Estos hallazgos ameritarán posteriores estudios que permitan delimitar la distribución de *A. rotundatum* en Panamá y el grado de infestación de *R. bellii* en el país.

AGRADECIMIENTOS

Al Ministerio del Medio Ambiente por los permisos de capturas (SE/A-73-16). A Roberto Miranda por la revisión del manuscrito.

REFERENCIAS

Andoh M, Sakata A, Takano A, Kawabata H, Fujita H, Une Y, et al. 2015. Detection of *Rickettsia* and *Ehrlichia* spp. in Ticks Associated with Exotic Reptiles and Amphibians Imported into Japan. PLoS ONE 10(7): e0133700.

Azad AF, Beard CB. 1998. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. Emerging Infectious Diseases. 4: 179-186

Bermúdez S, A. Castro, H. Esser, Y. Liefting, G García & Miranda R. 2012. Ticks (Ixodida) on humans from central Panama, Panama (2010-2011). Experimental and Applied Acarol. 58: 81-88.

Bermúdez S, Troyo A. 2018. 2018. A review of the genus *Rickettsia* in Central America. Research and Reports in Tropical Medicine 9: 103-112.

Costa, F.B., Barbieri, A.R.M., Szabó, M.P.J., Ramos, V.N., Piovezan, U., Labruna, M.B. 2017. Novos relatos de carrapatos infectados por *Rickettsia bellii* no Brasil. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, 4: 92-95.

Darling S. 1910. On Panama Ticks. Journal of Economic Entomology 3: 222.

Domínguez L, Miranda R, Torres S, Moreno R, Bermúdez S. Hard ticks survey of Oleoducto trail, Soberania National Park, Panama. En Prensa Tick and Ticks-Borne Diseases.

Dunn L. 1918. Studies on the iguana tick, *Amblyomma dissimile*, in Panama. Journal of Parasitology 5: 1-10.

Fairchild G, G. Kohls & V. Tipton. 1966. The ticks of Panama (Acarina: Ixodoidea). Ectoparasites of Panama. Wenzel, R., Tipton V. (edits). Field Museum of Natural History, Chicago. Illinois. 167-207.

Fang R, Blanton LS, Walker DH. 2017. Rickettsiae as emerging infectious agents. Clinics and Laboratory Medicine 37: 383–400.

Guglielmone A, Nava S. 2010. Hosts of *Amblyomma dissimile* Koch, 1844 and *Amblyomma rotundatum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). Zootoxa. 2541: 27-49.

Guglielmone, A.A., Robbins, R.G., Apanaskevich, D.A., Petney, T.N., Estrada-Peña, A., Horak, I.G. 2014. The hard ticks of the world (Acari: Ixodida: Ixodidae), Springer.

Jones EK, Clifford CM, Keirans JE, Kohls GM. 1972. The ticks of Venezuela (Acarina: Ixodoidea) with a key to the species of *Amblyomma* in the Western hemisphere. Brigham Young Univ Sci Bull Biol Ser. 17: 1-40.

Keirans JE, Oliver JH, Jr. 1993. First description of the male and redescription of the immature stages of *Amblyomma rotundatum*

(Acari: Ixodidae), a recently discovered tick in the U.S.A. *Journal of Parasitology* 79: 860-865.

Kelehear C, Hudson C, Mertins J, Shine R. 2017. First report of exotic ticks (*Amblyomma rotundatum*) parasitizing invasive cane toads (*Rhinella marina*) on the Island of Hawaii. *Ticks Tick-borne Diseases*. 8: 330-333.

Labruna, M.B., Whitworth, T., Horta, M.C., Bouyer, D.H., McBride, J.W., Pinter, A., Popov, V., Gennari, S.M., Walker, D.H. 2004. *Rickettsia* Species Infecting *Amblyomma cooperi* Ticks from an Area in the State of São Paulo, Brazil, Where Brazilian Spotted Fever Is Endemic. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 90–98

Labruna MB, Terrassini FA, Camargo LMA 2005. First report of the male of *Amblyomma rotundatum* (Acari: Ixodidae) from a field-collected host. *Journal of Medical Entomology*. 42: 945-947.

Luz H, Silva-Santos, E, Costa-Campos C, Acosta I, Martins T, Muñoz-Leal S, et al. 2018. Detection of *Rickettsia* spp. in ticks parasitizing toads (*Rhinella marina*) in the northern Brazilian Amazon. *Experimental and Applied Acarology* 75: 309-318.

Mangold A, Bargues M, Mas-Coma S. 1998. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among *Metastrata* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research* 84: 478-84.

Ogrzewalska, M, Machado MC, Rozental T, Forneas D, Cunha LE, de Lemos ERS. 2018. Microorganisms in ticks *Amblyomma dissimile* Koch 1844 and *Amblyomma rotundatum* Koch 1844 (Acari: Ixodidae) collected on snakes (Reptilia: Squamata: Serpentes) in Brazil. *Medical and Veterinary Entomology* (in press)

Otto, T.D., Vasconcellos, E.A., Gomes, L.H.F., Moreira, A.S., Degraeve, W.M., Mendonça-Lima, L., Alves-Ferreira, M. 2008. ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA

sequencing facility. *Genetic Molecular Research* 7: 861-871.

Pacheco, R; Horta, M. C.; Moraes-Filho, J.; Ataliba, A. C.; Pinter, A.; Labruna, M. B. 2007. Rickettsial infection in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from São Paulo, Brazil: serological evidence for infection by *Rickettsia bellii* and *Rickettsia parkeri*. *Biomédica* 27: 364-371.

Parola, P.; Paddock, C. D.; Socolovschi, C.; Labruna, M. B.; Mediannikov, O.; Kernif, T. et al. D. 2013. Update on tick-borne rickettsioses around the world: A geographic approach. *Clinical Microbiology Reviews* 26: 657-702.

Philip R, Casper E, Anacker R, Cory J, Hayes J, Burgdorfer W. 1983. *Rickettsia bellii* sp. nov.: a Tick-Borne *Rickettsia*, widely distributed in the United States, that is distinct from the Spotted Fever and Typhus Biogroups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 33: 94-106.

Walker D. 2007. Rickettsiae and Rickettsial Infections: The Current State of Knowledge. *Clinical Infectious Diseases*. 45: 39–S44

Weinert L, Werren J, Aebi A, Stone G, Jiggins G. 2009. Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria,” *BMC Biology*, 7: 6.

Recibido 19 de octubre de 2018, aceptado 11 de noviembre de 2018.