

**EQUINOS COMO CENTINELAS DE LA CIRCULACION DE RICKETTSIAS EN
ZONAS DE POTENCIAL TRANSMISION HUMANA.**

Estudiante: Sara Gallego Roldán

Tutor:

Rene Ramírez García. MV MSc.

Grupo de Investigación INCA-CES

Auxiliar de Investigación:

Jonathan Medina Pérez.

Universidad CES
Facultad de medicina veterinaria y zootecnia
Medellín, Colombia

2015

RESUMEN

La Rickettsiosis es considerada una zoonosis emergente en Colombia con ciclos de vida aún no caracterizados. Los equinos si bien, no representan un reservorio apropiado para el mantenimiento de la infección en zonas endémicas, pueden considerarse como excelentes centinelas de la circulación del agente en zonas de potencial transmisión humana. La planta de sacrificio de equinos “La Rinconada”, está ubicada en el Municipio de Rionegro, Antioquia (vereda “La Mosca”), y en ella se sacrifican aproximadamente 500 animales/semana, provenientes principalmente de la costa norte del país, de la región antioqueña y en menor proporción de la sabana de Bogotá. Dicho centro representa un punto de acopio estratégico para la búsqueda de animales seroreactores y de vectores (principalmente garrapatas de los géneros *Amblyoma* y *Dermacentor*), potencialmente capaces de transmitir la infección por *Rickettsia* en nuestro medio.

El objetivo principal de ésta propuesta es, examinar serológicamente algunos de los equinos que llegan a la planta de sacrificio La Rinconada como centinelas de la circulación de *Rickettsias* en diferentes zonas del país y molecularmente a sus garrapatas como potenciales vectores de la infección con agentes del género *Rickettsia*. De manera más específica, pretendemos realizar una encuesta serológica a una muestra representativa de los equinos que lleguen a la planta de sacrificio por un periodo de doce (12) meses, coleccionar e identificar taxonómicamente a los ectoparásitos de los equinos que entren al estudio, buscar por PCR secuencias genéticas de *Rickettsia* en los ectoparásitos coleccionados, e intentar aislamientos de *Rickettsias* a partir de los ectoparásitos positivos.

Palabras clave: Rickettsiosis, reservorio, centinelas, *Rickettsia*.

ABSTRACT

The Rickettsiosis is considered an emerging zoonosis in Colombia with lifecycles yet uncharacterized. Equines although not represent an appropriate reservoir for maintenance of infection in endemic areas, they can be considered as excellent sentinels Circulation potential agent in human transmission areas. The equine slaughterhouse "La Rinconada", is located in the municipality of Rionegro, Antioquia (sidewalk "The Fly"), and in it about 500 animals / week, mainly from the northern coast of the sacrifice Antioquia region and to a lesser proportion of the savannah of Bogota. The center represents a strategic point of collection to search for seroreactors animals and vectors (mainly ticks of the genera Dermacentor and Amblyoma), potentially capable of transmitting infection Rickettsia in our midst.

The main objective of this proposal is serologically examine some of the horses arriving at the slaughterhouse La Rinconada as sentinels Rickettsias circulation in different parts of the country and their ticks molecularly as potential vectors of infection with agents genre Rickettsia. More specifically, we intend to make a serological survey of a representative sample of the horses they reach the slaughterhouse for a period of twelve (12) months, collect and taxonomically identify ectoparasites of horses entering the study, search gene sequences by PCR in the collected ectoparasite Rickettsia, Rickettsia and try isolates from positive ectoparasites.

Keywords: Rickettsiosis, reservoir, sentries, Rickettsia.

INTRODUCCION

El género *Rickettsia* pertenece al orden Rickettsiales y a la familia Rickettsiaceae. Dentro de ésta familia solo encontramos dos géneros, el ya mencionado *Rickettsia* y el género *Orientia*. Las *Rickettsias* pertenecen a las alfa-proteobacterias y están compuestas por los grupos *Rickettsia* Tifo (TG), el grupo *Rickettsia* Fiebre Manchada (SFG), el grupo transicional (TRG) y el grupo ancestral (AG). TG solo tiene 2 miembros, *R. prowazekii* y *R. typhi*, ambas patógenas para los seres humanos (1). Así mismo en el SFG existen 13 especies (potencialmente patógenas todas ellas), de las cuales la *R. rickettsii* es la más virulenta para el hombre. Todas las especies de *Rickettsia*, están estrechamente relacionadas con artrópodos como pulgas, ácaros, garrapatas y piojos, los cuales actúan en la mayoría de los casos como vectores, pero también como reservorios de algunas de las especies patógenas para los humanos (1).

Rickettsiosis en Colombia

Poco se conoce sobre la situación actual de la rickettsiosis en Colombia. Desde su descripción inicial en 1937, cuando el doctor Luis Patiño Camargo publicó el informe de una epidemia causada por *R. rickettsii* y fue llamada desde entonces "Fiebre de Tobia" (2), transcurrieron más de 50 años hasta su reaparición en nuestra literatura.

En el 2005 se realizó un estudio de seroprevalencia, para *R. rickettsii* en una población general en Villeta, Cundinamarca. A partir de este trabajo, se estableció una tasa de seroprevalencia de 40,3% (3). En el 2007 se publica un estudio retrospectivo donde se vinculó por inmunohistoquímica y PCR la bacteria *R. rickettsii* como agente causal de la muerte de dos pacientes que inicialmente se consideraban casos de dengue (4).

Posteriormente, en el departamento de Antioquia en el año 2006 se notificó la ocurrencia de tres casos fatales de síndrome febril hemorrágico con compromiso pulmonar agudo en un batallón de 38 soldados campesinos que patrullaban el municipio de Necoclí, Antioquia. Posteriormente, se estableció el diagnóstico por el laboratorio del CDC de Atlanta en 7 de los 14 casos estudiados para *R. rickettsii*. Durante el 2007, esta vez en el municipio de Los Córdoba, departamento de Córdoba, se notificaron casos similares. En este brote se confirmó *Rickettsia* por inmunohistoquímica y seroconversión, y *R. rickettsii* por PCR (2).

Luego, a finales del 2007 y a principios del 2008, se presentaron en el Corregimiento Alto de mulatos, Turbo, 15 pacientes con sintomatología compatible con rickettsiosis. En esta ocasión, 15 casos fueron confirmados con rickettsiosis. En total, se presentó una letalidad de 26,6% durante este brote (5, 6). Últimamente, en Caldas Colombia se diagnosticó *R. typhi* en 14 pacientes con síndrome febril. Dicho diagnóstico se llevó a cabo por IFI y fue precedida de la reacción de Weil-Felix, la cual se realizó en 120 pacientes. Así pues, vemos como el incremento en la notificación de casos de la enfermedad por *Rickettsia* en Colombia, resulta a partir de la vigilancia epidemiológica y gracias a la colaboración de organizaciones internacionales.

Ecología

La transmisión transovárica en garrapatas, es el mecanismo de mantenimiento natural para todas las rickettsias del SFG, para *R. typhi* (GT), y para *R. akari* y *R. felis* (TRG) (7). *R. rickettsii*, ejerce un efecto patológico en la garrapata pudiendo eventualmente matarla, lo que conduciría a su propia extinción. Se especula entonces que dicho efecto es compensado, por su habilidad de invadir y crecer en

hospederos vertebrados tales como roedores silvestres, creando así niveles suficientes y duraderos de rickettsemia para infectar estados larvales de los ectoparásitos (2). De acuerdo con lo anterior, no solo la infección de nuevas líneas de garrapatas sino también la regulación de la transmisión transovárica, lograrían favorecer el mantenimiento de un equilibrio a pesar de la muerte de muchas de las garrapatas infectadas (7,8). En el estado de Sao Paulo (Brasil), donde se han incrementado los casos de rickettsiosis en los últimos 30 años, el estudio de las condiciones eco-epidemiológicas de la región ha permitido identificar varios reservorios "amplificadores" para *R. rickettsii* tales como los capibaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*), los roedores silvestres (*Euryzomatomys spinosus*) y algunos marsupiales (*Didelphis aurita*), los cuales, al ser picados por la garrapata *A. cajennense*, especie vectora de *R. rickettsii* en Sur América, ayudarían a mantener y explicar zonas de alta endemicidad para ésta infección en población humana (8).

A. cajennense importante vector de R. rickettsii

Esta garrapata es reconocida por parasitar un amplio rango de hospederos que incluye humanos, animales domésticos (equinos, caninos, bovinos, porcinos, felinos, entre otros) y silvestres (7). En la actualidad *A. cajennense* se ha clasificado como un complejo de especies el cual agrupa a las garrapatas consideradas como los principales vectores de *R. rickettsii* en América. Actualmente se reconoce que este taxón agrupa al menos 6 especies con diferencias biológicas, morfológicas y de distribución geográfica en el continente americano, estas son: *A. mixtum*, *A. patinoi*, *A. cajennense* s.s., *A. interandinum*, *A. sculptum* y *A. tonelliae* (9, 10). El mencionado complejo de especies pudo ser disuelto gracias a análisis genéticos de las regiones mitocondriales D-Loop, COXII, 12S y secuencias nucleares de la región ITS2. A partir de este conocimiento, se plantea la existencia de diferentes grados de competencia vectorial de estas especies dada la distribución de los focos conocidos de *R. rickettsii* respecto a la distribución conocida de las garrapatas del complejo *A. cajennense* en el continente (9, 11).

OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel de los equinos que son llevados a la Planta de sacrificio La Rinconada, como centinelas de la circulación de especies de Rickettsias en diferentes zonas del país.

OBJETIVO ESPECIFICOS

- Detectar la infección por agentes del género Rickettsia spp por métodos serológicos a partir de muestras de sangre obtenidas de equinos incluidos en el estudio.
- Determinar la infección por Rickettsia spp por métodos moleculares en las especies de garrapatas colectadas en los equinos.
- Establecer zonas de riesgo de potencial transmisión zoonótica de estos agentes a través del uso de Sistemas de Información Geográfico.
- Identificar las especies de garrapatas del complejo Amblyomma cajennense que se encuentren parasitando los equinos utilizando métodos moleculares.

OBJETIVOS ESPECIFICOS DEL PROYECTO DE PARTICIPACION DEL AUXILIAR DE INVESTIGACION

- Detectar la infección por agentes del género Rickettsia spp por métodos serológicos a partir de muestras de sangre obtenidas de equinos incluidos en el estudio.
- Determinar la infección por Rickettsia spp por métodos moleculares en las especies de garrapatas colectadas en los equinos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS AUXILIAR DE INVESTIGACION

- Identificar los animales provenientes de las zonas con alta prevalencia de infección por agentes del genero rickettsia spp.

- Tomar muestras sanguíneas asegurando una adecuada realización del procedimiento.
- Realizar la extracción de las garrapatas presentes en los animales, preservando su integridad física.
- Realizar una correcta reseña de los animales, asegurando la confiabilidad de los datos

METODOLOGÍA

Tipo de Estudio: Descriptivo de corte transversal

En este estudio se seleccionarán equinos en un lapso de tiempo de 12 meses, con un promedio de 15 equinos por semana en una sola salida. Las salidas se llevarán a cabo de manera consistente los días miércoles, y se tomarán muestras de sangre de los equinos seleccionados, datos acerca de su procedencia, e igualmente se colectarán las garrapatas que se encuentren sobre ellos. Para su introducción en el estudio, los caballos se escogerán por conveniencia, tomando como criterios únicos de inclusión, la posibilidad de obtener información fidedigna acerca de su origen y la presencia de ectoparásitos sobre el animal, una vez éstos se cumplan, se arrojará una moneda para decidir de manera aleatoria los 15 equinos que salgan cara, hasta completar el número requerido de muestras en el día. Debido a la imposibilidad de conocer el número de caballos procedentes de cada zona, la frecuencia de infección estimada en éstas zonas, y a la incapacidad de dar igual probabilidad de ser muestreados a todos los animales sacrificados a través del estudio, no pretendemos determinar una prevalencia de infección, y solo aproximarnos a la presencia de rickettsia en las zonas de procedencia de los equinos muestreados y la identificación y determinación de la infección de las garrapatas colectadas a partir de los mismos, las garrapatas colectadas serán almacenadas en frascos, rotulados con la identificación del individuo del cual fueron colectados y transportadas vivas al laboratorio, donde se clasificarán taxonómicamente a través de claves de identificación.

Población: En la planta de sacrificio de equinos "La Rinconada", se sacrifican alrededor de 500 equinos semanales, provenientes principalmente del norte del país, de la región antioqueña y de la sabana de Bogotá.

Para realizar un muestreo aleatorio sistemático, se tendrá en cuenta que el ingreso de animales al matadero se da los días lunes, martes y miércoles; y los sacrificios son los días miércoles, jueves y viernes. Se muestreará el día miércoles por ser el día con mayor número de animales.

Se realizará un registro completo de la procedencia de cada uno de los animales muestreados y se coleccionarán ectoparásitos de cada uno de los individuos que ingresen al estudio.

Pruebas Serológicas: se hará una punción venosa para obtener sangre entera. Las muestras de sangre serán sometidas a separación del suero. Los sueros de los equinos, será utilizados para determinar la presencia de anticuerpos contra Rickettsias.

Colección y manipulación de ectoparásitos: La obtención de los ectoparásitos se realizará mediante colección con pinzas de las garrapatas adheridas a la piel conservando las partes bucales.

INFORME DE ACTIVIDADES

Las actividades que se mencionaran a continuación fueron realizadas con el objetivo de ayudar al desarrollo del trabajo de investigación mencionado en el título y cumplir con el requisito de grado para optar al título de médico veterinario y zootecnista.

Entre el mes de mayo y agosto del 2015 fueron realizadas las actividades el trabajo en calidad de auxiliar de investigación, se realizaron 2 reuniones de información y conocimiento de actividades en el proyecto con el tutor de investigación, además se realizaron las visitas de manera periódica a la planta de sacrificio de equinos LA RINCONADA ubicada en la vereda La mosca del municipio de Rionegro en el departamento de ANTIOQUIA para la toma de muestras biológicas para el

desarrollo de los diferentes objetivos específicos aprobados para su apoyo como auxiliar de investigación.

A continuación se relacionan las fechas de la toma de muestras de biológicos para el proyecto, estas visitas se realizaron en compañía del tutor del proyecto de investigación y los investigadores del grupo centauro de la Universidad de Antioquia:

- 10 de junio de 2015
- 24 de junio de 2015
- 2 de julio de 2015
- 8 de julio de 2015
- 15 de julio de 2015
- 22 de julio de 2015
- 29 de julio de 2015
- 4 de agosto de 2015

En cada una de las visitas realizadas se solicita las licencias de los animales que se encuentran aún en los patios de espera para el sacrificio, luego se seleccionan los animales provenientes de los departamentos de Córdoba, Sucre y algunas zonas del departamento de Antioquia.

A continuación, del total del grupo se seleccionan aleatoriamente 15 animales aproximadamente para ser muestreados a los cuales se le toman los siguientes datos:

- Especie
- Edad
- Sexo
- Raza
- Condición corporal.

Posteriormente, con una aguja calibre 21 se realiza una toma de muestra de sangre de aproximadamente 10 ml puncionando la vena yugular, los 10 ml de sangre

obtenidos se depositan 5 ml en un tubo para muestras con anticoagulante EDTA y los 5 ml restantes en un tubo para muestras de sangre sin anticoagulante.

Por último, se procede al retiro manual de las garrapatas encontradas, trabajo que para las regiones de orejas, crin y base de la cola tiene un tiempo de exploración y extracción de 1 minuto y para las regiones de abdomen, pecho y miembros anteriores y posteriores tiene un tiempo de exploración y extracción de 5 minutos, luego se determina la cantidad de garrapatas observadas, y se agrupan en rangos que van desde 0, de 1 a 20, de 21 a 50 y más de 50, las garrapatas extraídas se almacenan y se conservan en frascos normalmente utilizados para muestras de orina a los cuales se les realiza pequeños orificios.

Las muestras de sangre y las garrapatas son transportadas al laboratorio 233 del Centro de Investigaciones Universitarias SIU de la Universidad de Antioquia, para allí realizar los respectivos análisis.

RESUMEN DE RESULTADOS DE MUESTREOS REALIZADOS

Cantidad total de animales muestreados: 126 equinos.

Cantidad de animales por especie.

Especie	cantidad de animales	%
Caballo	98	77.77
burro	21	16.66
Mular	7	5.55
Total	126	100

Cantidad de animales según el grado de infestación.

Grado de infestación	Cantidad de animales	%
0 garrapatas	45	35.71
1-20 garrapatas	2	1.58
21-50 garrapatas	42	33.33
Más de 50 garrapatas	37	29.36
Total	126	

Cantidad de animales según el departamento correspondiente.

Departamento	Cantidad de animales	%
Antioquia	25	19.84
Córdoba	87	69.04
Sucre	14	11.11
Total	126	100

Total de garrapatas obtenidas. Vs total de garrapatas vivas.

Garrapatas	Cantidad de garrapatas
Obtenidas	1071
Vivas	655
Muertas	416

Total de garrapatas vivas por especie.

Especie de garrapatas	Cantidad por especie	%
<i>Dermacentor nitens (Dn)</i>	370	56.48
<i>Rhipicephalus microplus (Rm)</i>	44	6.71
<i>amblyomma cajennense (Ac)</i>	241	36.71
Total de garrapatas vivas	655	100

Estadios de las garrapatas vivas

Estadio de garrapatas vivas	Cantidad por estadio	%
Larva	0	0
Ninfa	109	16.64
Hembra	372	56.79
Macho	174	26.56
Total	655	100

Total Aislamientos

Garrapatas vivas	Cantidad
Aisladas	650
No aisladas	5
Total	655

DISCUSIÓN

Las garrapatas encontradas en los caballos, tenidos en cuenta para el estudio, se clasificaron en 3 especies diferentes, siendo la mayoría de la especie *dermacentor nitens* (Dn) representado el 56.48% del total de garrapatas vivas, mientras que la especie de interés *amblyomma cajennense* (Ac) representa un 36.71%, pero se debe tener en cuenta que de estas 241 garrapatas de la especie *amblyomma cajennense* (Ac) totales, 181 garrapatas que representan el 75.1 % fueron colectadas el mismo día (7/22/2015) de 3 animales diferentes, 2 caballos y un mular con los códigos 91, 92 y 93 respectivamente, provenientes del municipio de Puerto Berrio del departamento de Antioquia, como se puede observar en la tabla anexa en formato Excel.

De los 126 animales muestreados entre las fechas 10/06/2015 y 04/08/2015, tan solo 24 animales portaban garrapatas de la especie *amblyomma cajennense* (Ac), provenientes de los 3 departamentos tenidos en cuenta para los muestreos, repartidos de la siguiente manera: 6 animales provenientes de Antioquia (24%), 15 animales provenientes de Córdoba (62.5%) y 3 animales provenientes del departamento de Sucre (12.5%).

Aunque el departamento de Córdoba aportó más animales con infestación de garrapatas de la especie *amblyomma cajennense* (Ac), es el departamento de Antioquia el que más aporta garrapatas de la especie *amblyomma cajennense* (Ac), pues de los 15 animales de Córdoba solo se obtienen un total de 49 garrapatas vivas, mientras que de los 6 animales de Antioquia se obtienen 180 garrapatas vivas.

De las 180 garrapatas del departamento de Antioquia, 165 son del municipio de Puerto Berrio, 14 del municipio de Mutatá y 1 de Cauca.

CONCLUSIONES

- La mayoría de los animales muestreados son provenientes de la costa norte del país, con mayor presencia en el departamento de Córdoba.

- Los animales muestreados cuentan con la información del lugar de origen requerida para el estudio, lo que permite un análisis más preciso sobre las zonas del país que requieren el uso de equinos como centinelas para la rickettsiosis.
- Aparentemente el departamento de Córdoba, podría ser la zona donde puede haber un foco de *Amblyomma cajennense* (Ac), ya que aporta mayor cantidad de animales con infestación con dicha especie pero el departamento de Antioquia es el mayor aportador de garrapatas aun teniendo menor cantidad de animales muestreados infestados con la especie *Amblyomma cajennense* (Ac).
- Las garrapatas de la especie *Amblyomma cajennense* (Ac), no se encuentran con facilidad en los equinos, ya que no son su principal hospedero y además no son de fácil detección en el animal.

BIBLIOGRAFÍA

1. Labruna MB, Soares JF, Martins TF, Soares HS, Cabrera RR. Cross-mating experiments with geographically different populations of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol*. 2011;54(1):41-9.
2. Nava S, Beati L, Labruna MB, Cáceres AG, Mangold AJ, Guglielmone AA. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* () with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum*, and *Amblyomma sculptum* (Ixodida: Ixodidae). *Ticks Tick Borne Dis*. 2014;5(3):252-76.
3. Gillespie JJ, Williams K, Shukla M, Snyder EE, Nordberg EK, Ceraul SM, et al. Rickettsia phylogenomics: unwinding the intricacies of obligate intracellular life. *PloS one*. 2008;3.
4. Patino L, Afanador A, Paul JH. A spotted fever in Tobia, Colombia. 1937. *Am J Trop Med*. 1937;17:639-53.
5. Hidalgo M, Orejuela L, Fuya P, Carrillo P, Hernandez J, Parra E, et al. Rocky Mountain spotted fever, Colombia. *Emerg Infect Dis*. 2007;13(7):1058-60.

6. Hidalgo M, Lizarazo DS, Ovalle MV, Castañeda E, Heredia D, Zambrano P, et al. Brote de rickettsiosis en Los Córdoba, departamento de Córdoba, febrero-marzo 2007. *Inf Quinc Epidemiol Nac.* 2007;12:371.
Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Bergey's. *Manual of Systematic Bacteriology* second edition; Athens, GA. 2005, 96 pp.
7. Perlman SJ, Hunter MS, Zchori-Fein E. The emerging diversity of Rickettsia. *Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences* 2006; 273(1598):2097-2106.
8. Labruna MB. Ecology of rickettsia in South America. *Annals of the New York Academy of Science* 2009; 1166:156-166.
9. Szabó MP, Pinter A, Labruna MB. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013;3:27.
10. Acevedo-Gutierrez LY, Barbarán AFL, Parra-Henao G, Rodas JD. Distribución geográfica de *Amblyomma cajennense* y *Amblyomma ovale* en Colombia basada en modelos de nicho ecológico. *Acta Médica costarricense.* 2013;55:69.
11. Beati L, Nava S, Burkman EJ, Barros-Battesti DM, Labruna MB, Guglielmo AA, et al. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. *BMC Evol Biol.* 2013;13:267.