



Búsqueda de *Borrelia* spp. en garrapatas del género *Amblyomma* de Argentina

Gabriel L Cicuttin^{1*} ; María N. De Salvo¹ ; Paula Díaz-Pérez¹ ; Daniela Lamattina² ; Evelina L. Tarragona³ ; Viviana M. Orcellet⁴ ; Santiago Nava³ 

¹Instituto de Zoonosis Luis Pasteur, Ministerio de Salud del Gobierno de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

²Instituto Nacional de Medicina Tropical, Ministerio de Salud de la Nación, Almaguer y Ámbar S/N, Misiones, Argentina

³Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Rafaela, Santa Fe, Argentina

⁴Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Ciencias Veterinarias, Esperanza, Santa Fe, Argentina.

*Correspondencia: gcicuttin@gmail.com

Recibido: Octubre 2020; Aceptado: Mayo 2021; Publicado: Junio 2021.

RESUMEN

Objetivo. El objetivo del presente estudio fue detectar la presencia de *Borrelia* spp. en especies de garrapatas del género *Amblyomma* en Argentina. **Materiales y métodos.** Se analizaron especímenes de garrapatas del género *Amblyomma* colectadas de distintas provincias de Argentina (Entre Ríos, Misiones, Formosa, Salta, Córdoba, San Luis y Buenos Aires) mediante una PCR anidada para un fragmento de 306 pb del gen *fla* del género *Borrelia*. **Resultados.** Se analizaron 422 ejemplares de las especies *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma brasiliense*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma sculptum*, *Amblyomma tigrinum*, *Amblyomma tonelliae* y *Amblyomma triste* de diversas regiones de Argentina. Todas las muestras estudiadas resultaron negativas mediante la PCR. **Conclusiones.** Las especies de garrapatas del género *Amblyomma* analizadas en el presente estudio son de importancia en salud pública; si bien no se detectó infección con bacterias del género *Borrelia*, considerando los escasos antecedentes previos, futuros estudios en esta temática son necesarios en este género de garrapatas.

Palabras clave: *Borrelia*; *Amblyomma*; Argentina (Fuente: CAB, TGN).

ABSTRACT

Objective. The aim of the present study was to detect *Borrelia* spp. in different species of ticks of the genus *Amblyomma* from Argentina. **Materials and methods.** *Amblyomma* tick specimens collected from various provinces of Argentina (Entre Ríos, Misiones, Formosa, Salta, Córdoba, San Luis and Buenos Aires) were analyzed by nested PCR for a 306 bp fragment of the gene *fla* of the genus *Borrelia*. **Results.** A total of 422 tick specimens (*Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma brasiliense*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma sculptum*, *Amblyomma tigrinum*, *Amblyomma tonelliae* and *Amblyomma triste*) from various regions of Argentina were studied. All samples were negative by PCR for a fragment of the gene *fla* of *Borrelia* spp. **Conclusions.** The tick species of the genus *Amblyomma* analyzed in the present study are important for public health; although infection with bacteria of the genus *Borrelia* was not detected. However, considering the few previous antecedents in the region, future studies on this genus of ticks are necessary.

Keywords: *Borrelia*; *Amblyomma*; Argentina (Source: CAB, TGN).

Como citar (Vancouver).

Cicuttin GL, De-Salvo MN, Díaz-Pérez P, Lamattina D, Tarragona EL, Orcellet VM, Nava S. Búsqueda de *Borrelia* spp. en garrapatas del género *Amblyomma* de Argentina. Rev MVZ Córdoba. 2021; 26(3):e2199. <https://doi.org/10.21897/rmvz.2199>



©El (los) autor (es), Revista MVZ Córdoba 2021. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite a otros distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de modo no comercial, siempre y cuando den crédito y licencien sus nuevas creaciones bajo las mismas condiciones.

INTRODUCCIÓN

Las garrapatas del género *Amblyomma* (Familia Ixodidae) comprenden aproximadamente 135 especies a nivel mundial, siendo el género con mayor riqueza específica en la región neotropical (1). Aunque el rango de hospedadores de las garrapatas del género *Amblyomma* incluye todas las clases de vertebrados terrestres, la mayoría de las especies presentes en el cono sur de América se alimentan sobre mamíferos, aunque las aves también son importantes hospedadores para los estadios inmaduros de muchas de ellas (1). Diferentes especies de *Amblyomma* fueron reportadas infestando humanos en el cono sur de América, como por ejemplo, *Amblyomma aureolatum* (estadios adultos), *Amblyomma brasiliense* (todos los estadios), *Amblyomma coelebs* (todos los estadios), *Amblyomma dubitatum* (todos los estadios), *Amblyomma neumanni* (todos los estadios), *Amblyomma ovale* (adultos), *Amblyomma parvum* (adultos), *Amblyomma sculptum* (todos los estadios), *Amblyomma tigrinum* (adultos), *Amblyomma tonelliae* (todos los estadios) y *Amblyomma triste* (adultos), todas ellas presentes en Argentina (1). Además, algunas de estas especies actúan como vectores de diversos microorganismos patógenos (p.e. *Rickettsia rickettsii* y *Rickettsia parkeri*) para los humanos (1).

El género *Borrelia* (Familia Spirochaetaceae) comprende más de 30 genoespecies transmitidas por artrópodos con diferente grado de patogenicidad (2,3). Las bacterias del género *Borrelia* están contenidas en tres grupos: *Borrelia burgdorferi* sensu lato (GBB), transmitido principalmente por garrapatas del género *Ixodes*; Fiebre Recurrente (GFR), transmitido por garrapatas y piojos; y un tercer grupo también transmitido por garrapatas (REP) (3,4). El GBB consiste en aproximadamente 18 genoespecies formalmente descritas, incluyendo los principales agentes de la enfermedad de Lyme: *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia afzelii* y *Borrelia garinii*, todas transmitidas por garrapatas del complejo *Ixodes ricinus* en el hemisferio norte (2,3). Dentro de las borrelias del GFR transmitidas por garrapatas (GFR-TG), existen genoespecies transmitidas por garrapatas blandas (familia Argasidae), p.e., *Borrelia hispanica*, *Borrelia turicatae* y *Borrelia anserina* y genoespecies transmitidas por garrapatas duras (familia Ixodidae), p.e. *Borrelia miyamotoi* y *Borrelia theileri* (2,3). Por último, el REP engloba *Borrelia* spp. transmitidas por garrapatas duras que se han detectado en

diferentes regiones del mundo; cabe aclarar que si bien su nombre se debe a que originalmente fue hallado en reptiles o garrapatas asociadas a reptiles, también ha sido detectado en garrapatas duras no relacionadas con reptiles, así como aves (2,3,4,5).

Comparativamente, la asociación de *Borrelia* spp. con garrapatas del género *Amblyomma* ha sido menos estudiada respecto a la asociación entre borrelias y garrapatas del género *Ixodes*. En América, se detectaron genoespecies (*Borrelia lonestari*) del GFR-TG en *Amblyomma americanum* de EEUU (6,7) y genoespecies del REP en *Amblyomma maculatum* de EEUU (4), *Amblyomma longirostre* de Brasil (5) y Guayana Francesa (8), *Amblyomma geayi* de Guayana Francesa (8), *A. aureolatum* de Argentina (3) y *Amblyomma dissimile* de México (9). Además, recientemente dos Santos y col. reportaron *Borrelia* sp. de un grupo separado a REP y GFR en *A. brasiliense* (10).

Considerando los escasos estudios sobre el potencial rol de las garrapatas del género *Amblyomma* como vectores de borrelias en Sudamérica, el objetivo de este trabajo fue analizar la presencia de *Borrelia* spp. en distintas especies de este género de garrapatas en Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras. Los especímenes de garrapatas utilizados en este estudio, colectados en fase parasitaria y de vida libre, corresponden a material ya publicado en Cicuttin et al. (11,12,13), Lamattina et al (14), Mastropaolo et al (15) y Tarragona et al (16), por lo que los datos de métodos de muestreo, características ambientales de los sitios de colecta y determinación taxonómica se encuentran detallados en los mismos. Las garrapatas colectadas en las provincias de Entre Ríos y Formosa fueron extraídas en forma manual sobre los hospedadores o por método bandera en su fase de vida libre en vegetación, e identificadas siguiendo las descripciones y claves presentadas en Nava et al (1).

Extracción de ADN. Las garrapatas fueron procesadas en forma individual. La extracción de los ácidos nucleicos se realizó mediante AxyPrep Multisource Genomic DNA MiniPrep Kit (Axygen Biosciences, USA), High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Germany) y mediante fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.

El detalle de la metodología utilizada fue publicada previamente, no se utilizaron controles endógenos (11,12,13,14,15,16).

Detección molecular de *Borrelia* spp. Se realizó mediante una PCR anidada para un fragmento de 306 pb del gen *fla* con los cebadores: Fla-LL 5'-ACATATTCAGATGCAGACAGAGGT-3', Fla-RL 5'-GCAATCATAGCCATTGCAGATTGT-3', Fla-LS 5'-AACAG-CTGAAGAGCTTGGGAATG-3' y Fla-RS 5'-CTTTGATCACTTTCATTCT-AATAGC-3' (6). Se utilizaron como controles *B. burgdorferi* s.s. (positivo) y agua libre de nucleasas (negativo).

Aspectos éticos. El presente estudio se realizó conforme a los principios emanados de la ley nacional 25.326/2000 (Protección de los datos personales), la ley de CABA 3.301/2009 (Protección de Derechos de Sujetos en Investigaciones en Salud) y la Declaración de Helsinki (1964) de la Asociación Médica Mundial y actualizaciones posteriores. También estuvo conforme a los "Principios rectores internacionales aplicables a las investigaciones biomédicas con animales" del Consejo de Organizaciones

Internacionales de las Ciencias Médicas aprobado por el Comité Consultivo de Investigaciones Médicas de la Organización Mundial de la Salud (1985), las "Normas Internacionales para la investigación biomédica con animales" de la Organización Panamericana de la Salud (1990) y el Título 7: "Bienestar de los animales" del Código Sanitario para los Animales Terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal (2011). El proyecto contó con la aprobación del Comité de Docencia e Investigación del Instituto de Zoonosis Luis Pasteur.

RESULTADOS

Se procesaron 422 ejemplares de las especies *A. aureolatum*, *A. brasiliense*, *A. ovale*, *A. sculptum*, *A. tigrinum*, *A. tonelliae* y *A. triste*. En la Tabla 1 se presenta el detalle por especie, estadio, hospedador (o vegetación en el caso de aquellas colectas en su fase de vida libre) y localidad de colecta.

Todas las muestras analizadas resultaron negativas a la PCR para el fragmento del gen *fla* del género *Borrelia*.

Tabla 1. Especie, localidad de procedencia, fuente de colecta (hospedadores/vegetación) y número de especímenes analizados de las garrapatas estudiadas

Especie	Provincia	Localidad (Coordenadas geográficas)	Hospedador/ vegetación	Estadio	n	Total
<i>Amblyomma aureolatum</i>	Entre Ríos	Colón (32°13'S, 58°08'O)	Perro	Adulto	4	37
		Feliciano (30°23'S, 58°45'O)	Perro	Adulto	2	
		La Paz (30°45'S, 59°39'O)	Perro	Adulto	8	
			Gato	Adulto	1	
		Paraná (31°43'S, 60°31'O)	Perro	Adulto	19	
			Gato	Adulto	2	
<i>Amblyomma brasiliense</i>	Misiones	Parque Nacional Iguazú (25°41'S, 54°27'O)	Vegetación	Adulto	47	92
			Vegetación	Ninfa	35	
		Parque Provincial Puerto Península (25°43'S, 54°33'O)	Vegetación	Adulto	5	
			Vegetación	Ninfa	5	
<i>Amblyomma ovale</i>	Formosa	El Bagual (25°59'S, 58°24'O)	Vegetación	Ninfa	2	8
			<i>Taraba major</i> (Chororó)	Ninfa	4	
			Larva	2		
<i>Amblyomma sculptum</i>	Salta	Parque Nacional El Rey (24°15'S, 64°40'O)	Vegetación	Adulto	80	80
<i>Amblyomma tigrinum</i>	Córdoba	Nono (31°46'S, 64°59'O)	Perro	Adulto	4	99
		Vegetación	Adulto	11		
	San Luis	Salsipuedes (31°09'S, 64°19'O)	Vegetación	Adulto	42	
		Cortaderas (32°30'S, 65°00'O)	Gato	Adulto	19	
<i>Amblyomma tonelliae</i>	Salta	Merlo (32°20'S, 65°00'O)	Perro	Adulto	23	52
		El Tunal (25°14'S, 64°25'O)	Vegetación	Adulto	52	
<i>Amblyomma triste</i>	Buenos Aires	INTA E.E.A. Delta del Paraná (34°11'S, 58°50'O)	Vegetación	Adulto	35	54
		General Lavalle (36°22'S, 56°21'O)	Vegetación	Adulto	19	
Total						422

DISCUSIÓN

Este es el primer estudio que evalúa la presencia de *Borrelia* spp. en garrapatas *A. sculptum*, *A. tigrinum* y *A. tonelliae* y el primero en Argentina para las especies estudiadas (con excepción de *A. triste* y *A. aureolatum*).

Hasta el presente en Argentina el estudio de *Borrelia* en el género *Amblyomma* se limitó a un único trabajo en el que Cicuttin et al (3) analizaron 432 garrapatas *A. aureolatum* y 65 *A. triste* colectadas en la Reserva Ecológica Costanera Sur de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, encontrando 1.7% de *A. aureolatum* positivas a una *Borrelia* sp. filogenéticamente relacionada al grupo REP. En dicho estudio, sólo ninfas de *A. aureolatum* resultaron positivas (9/52 -17.3%- en ninfas colectadas sobre vegetación y 5/11 -45.4%- en las colectadas sobre aves), destacándose el posible rol de las aves como hospedadores amplificadores de la *Borrelia* sp. REP hallada (3). Del mismo modo, los hallazgos de *Borrelia* sp. REP en Brasil se realizaron en ninfas de *A. longirostre* colectadas sobre aves (5), mientras que en Guayana Francesa se detectó en larvas de *A. longirostre* y *A. geayi* parasitando aves (8) y en México se detectó en ninfas y adultos de *A. dissimile* colectadas de sapos (9). Por otro lado, el reporte de *Borrelia* sp. del grupo REP en EEUU se obtuvo a partir de adultos de *A. maculatum* de vida libre colectados en vegetación (4). Las genoespecies de *Borrelia* del grupo REP halladas en EEUU, Brasil y Guayana Francesa están estrechamente relacionadas entre sí (posiblemente la misma especie) desde una perspectiva filogenética, pero no con la *Borrelia* sp. del grupo REP hallada en *A. aureolatum* de Argentina (8). La *Borrelia* sp. recientemente hallada en *A. brasiliense* de Brasil se relaciona con secuencias de *Borrelia* spp. reportadas en Etiopía y Costa de Marfil, formando un grupo separado de REP y GFR (10). En ese estudio se detectó *Borrelia* sp. en 1 grupo de 6 ninfas colectadas de vegetación (de 266 estudiadas) (10); en comparación en el presente estudio se analizaron sólo 40 ninfas de *A. brasiliense*.

Respecto a la asociación entre el GBB y el género *Amblyomma*, una amplia revisión realizada por Stromdahl et al (17) demuestra que los escasos hallazgos positivos (0,1% en casi 30.000 ejemplares estudiados) en *A. americanum* de EEUU corresponden a estudios en garrapatas colectadas sobre hospedadores (el ADN detectado está posiblemente relacionado a la ingesta de sangre infectada desde el hospedador) o a sospecha de contaminación en el laboratorio. Por otra parte, en una revisión sobre estudios experimentales para determinar la competencia vectorial de *A. americanum* en la transmisión de *B. burgdorferi* s.l., se concluye que esta especie contribuye mínimamente o de ninguna forma al ciclo de transmisión de la borreliosis de Lyme en dicho país (18). La presencia de péptidos antimicrobianos (defensinas) con actividad lítica frente a *B. burgdorferi* s.l. ha sido considerado como un factor importante (18).

Por último, diversos estudios en *A. americanum* de EEUU reportan 1-3% de infección por *Borrelia lonestari*, especie perteneciente al GFR (7).

En el presente estudio no se detectó ADN de bacterias del género *Borrelia* en diferentes especies de garrapatas de importancia para la salud pública pertenecientes al género *Amblyomma*. Considerando los escasos antecedentes previos, futuros estudios en esta temática son necesarios, especialmente para el caso de especies de garrapatas que parasitan frecuentemente a aves, reptiles y anfibios, dado que estos hospedadores podrían actuar como potenciales reservorios y amplificadores en el ciclo enzoótico de las borrelias asociadas a *Amblyomma* en la región.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Agradecimientos

El presente trabajo ha sido parcialmente financiado por el Subsidio para Investigación Clínica y Epidemiológica 2018 de la Fundación Alberto J. Roemmers.

REFERENCIAS

1. Nava S, Venzal JM, González Acuña D, Martins TF, Guglielmone AA. Ticks of the Southern Cone of America: Diagnosis, Distribution and Hosts with Taxonomy, Ecology and Sanitary Importance. London: Academic Press; 2017.
2. Margos G, Gofton A, Wibberg D, Dangel A, Marosevic D, Loh SM, et al. The genus *Borrelia* reloaded. PLoS One. 2018; 13(12):1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208432>
3. Cicuttin GL, De Salvo MN, Venzal JM, Nava S. *Borrelia* spp. in ticks and birds from a protected urban area in Buenos Aires city, Argentina. Ticks Tick Borne Dis. 2019; 10(6):101282. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101282>
4. Lee JK, Smith WC, McIntosh C, Ferraric FG, Moore Henderson B, Varela Stokes A. Detection of a *Borrelia* species in questing Gulf Coast ticks, *Amblyomma maculatum*. Ticks Tick Borne Dis. 2014; 5(4):449–452. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.02.004>
5. Pacheco A, Cordeiro MD, Cepeda MB, Luz HR, Cardozo SV, Berto BP, et al. Hemoparasites in ticks of wild birds of Serra dos Órgãos National Park, state of Rio de Janeiro, Brazil. Brazilian J Vet Parasitol. 2019; 28(2). <https://doi.org/10.1590/s1984-29612019017>
6. Barbour AG, Maupin GO, Teltow GJ, Carter CJ, Piesman J. Identification of an uncultivable *Borrelia* species in the hard tick *Amblyomma americanum*: possible agent of a Lyme disease-like illness. J Infect Dis. 1996; 173(2):403–409. <https://doi.org/10.1093/infdis/173.2.403>
7. James AM, Liveris D, Wormser GP, Schwartz I, Montecalvo M a, Johnson BJ. *Borrelia lonestari* infection after a bite by an *Amblyomma americanum* tick. J Infect Dis. 2001; 183 (12):1810–1814. <https://doi.org/10.1093/infdis/173.2.403>
8. Binetruy F, Garnier S, Boulanger N, Talagrand-reboul É, Loire E, Faivre B, et al. A novel *Borrelia* species, intermediate between Lyme disease and relapsing fever groups, in neotropical passerine-associated ticks. Sci Rep. 2020; 10:10596. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66828-7>
9. Colunga-Salas P, Sánchez-Montes S, Ochoa-Ochoa LM, Grostieta E, Becker I. Molecular detection of the reptile-associated *Borrelia* group in *Amblyomma dissimile*, Mexico. Medical and Veterinary Entomology. 2020; 52:1-5. <https://doi.org/10.1111/mve.12478>
10. dos Santos CA, Suzin A, Vogliotti A, Nunes PH, Barbieri ARM, Labruna MB, et al. Molecular Detection of a *Borrelia* sp. in nymphs of *Amblyomma brasiliense* ticks (Acari: Ixodidae) from Iguazu National Park, Brazil, genetically related to *Borrelia* from Ethiopia and Côte D'Ivoire. Ticks Tick Borne Dis. 2020; 11(6):101519. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101519>
11. Cicuttin G, Nava S. Molecular identification of *Rickettsia parkeri* infecting *Amblyomma triste* ticks in an area of Argentina where cases of rickettsiosis were diagnosed. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013; 108(1):123–125. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762013000100022>
12. Cicuttin GL, De Salvo MN, Nava S. Two novel *Ehrlichia* strains detected in *Amblyomma tigrinum* ticks associated to dogs in peri-urban areas of Argentina. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2017; 53:40–44. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2017.07.001>
13. Cicuttin GL, Salvo MN De, Pérez PD, Silva D, Félix L, Venzal JM, et al. A novel *Ehrlichia* strain (Rickettsiales: Anaplasmataceae) detected in *Amblyomma triste* (Acari: Ixodidae), a tick species of public health importance in the Southern Cone of America. Pathog Glob Health. 2020; 114(6):318–322. <https://doi.org/10.1080/20477724.2020.1795579>

14. Lamattina D, Tarragona EL, Nava S. Molecular detection of the human pathogen *Rickettsia parkeri* strain Atlantic rainforest in *Amblyomma ovale* ticks in Argentina. *Ticks Tick Borne Dis.* 2018; 9(5):1261-1263. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.05.007>
15. Mastropaolo M, Tarragona EL, Silaghi C, Pfister K, Thiel C, Nava S. High prevalence of "Candidatus *Rickettsia amblyommii*" in *Amblyomma* ticks from a Spotted Fever Endemic Region in North Argentina. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2016; 46:73-76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2016.05.001>
16. Tarragona EL, Cicuttin GL, Mangold AJ, Mastropaolo M, Salvo MN De, Nava S. *Rickettsia* infection in *Amblyomma tonelliae*, a tick species from the *Amblyomma cajennense* complex. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014; 6(2):173-177. <http://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.11.010>
17. Stromdahl EY, Nadolny RM, Hickling GJ, Hamer SA, Ogden NH, Casal C, et al. *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) ticks are not vectors of the Lyme Disease agent, *Borrelia burgdorferi* (Spirocheatales: Spirochaetaceae): A review of the evidence. *J Med Entomol.* 2018; 55(3):501-514. <http://doi.org/10.1093/jme/tjx250>
18. Eisen L. Vector competence studies with hard ticks and *Borrelia burgdorferi* sensu lato spirochetes: A review. *Ticks Tick Borne Dis.* 2020; 11(3):101359. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101359>