

FOTOGRAFÍAS DE LUCÍA SÁNCHEZ MARTÍN

Identificación molecular
de ixódidos en
Lince Ibérico
y estudio de la posible presencia
de *Cytauxzoon spp.*

salud pública
y medio ambiente





CRISTINA BAZO PÉREZ, JOSÉ LUIS FERNÁNDEZ GARCÍA,
JORGE PEÑA MARTÍNEZ, MIGUEL ÁNGEL HABELA MARTÍNEZ-ESTÉLLEZ
Veterinarios



El Lince Ibérico (*Lynx pardinus*) es el felino más amenazado del mundo y una de las especies endémicas españolas más representativa. A pesar de los programas implementados para su conservación, aún quedan muchos aspectos por mejorar, pues existen muchos factores de riesgo como epizootias, las cuales producen mortalidad y/o reducen la salud de los hospedadores y alteran la dispersión y movilidad de los animales infectados, sin dudas, estos se agravan al añadir los altos coeficientes de consanguinidad individuales y poblacional [1].

La convivencia con otras especies tanto silvestres como domésticas, favorece el intercambio de patógenos. Sin embargo, aún son muchos los casos donde no se dispone de conocimiento pleno de sus mecanismos de acción ni cómo afecta a la salud del lince ibérico, siendo difícil de concretar los riesgos que suponen para su conservación. Algunos datos parecen revelar una transmisión de las enfermedades reducida dentro de individuos de la misma especie, comparado con el gato doméstico, sobre todo de virus, atribuible a la severa escasez de poblaciones y el consabido comportamiento social solitario de la especie [1].

Aún menos información se dispone sobre las especies de ectoparásitos del lince, precisamente por ello nuestro trabajo se centró en el estudio de las especies de garrapatas parásitas de lince, por dos razones principales: (1) ausencia de información sobre ellas y (2) la importancia que pueden llegar a alcanzar en la transmisión de patógenos.

Las garrapatas son artrópodos hemimetábolos con gran importan-

cia médica y veterinaria, siendo determinantes para las dinámicas ecológicas y partícipes de los distintos mecanismos de amenaza a las poblaciones naturales, cuyos factores de extinción más citados son el pequeño tamaño de la población preepidémica y la presencia de reservorios [2], factores presentes en las poblaciones de lince ibérico. A nivel taxonómico, las garrapatas se encuentran divididas en dos familias, Ixodidae (garrapatas duras) y Argasidae (garrapatas blandas) trabajando en nuestro estudio únicamente con las pertenecientes a la familia Ixodidae. Estos ixódidos cumplen con el papel de vector de gran variedad de enfermedades, entre ellas la cytauxzoonosis, enfermedad producida por el piroplásmido *Cytauxzoon spp.* Este piroplásmido no provoca patogenicidad para los lince ibéricos por lo reflejado hasta la actualidad, por ello habría que profundizar en el conocimiento de este patógeno, pues un cambio de su virulencia podría llegar a producir mortalidad y ser un problema futuro, suponiendo un riesgo para la conservación de la especie.

Por ello, en este trabajo tratamos de identificar las especies de ixódidos que parasitan a los lince ibéricos usando identificación morfológica mediante claves dicotómicas y posteriormente la identificación molecular mediante PCR usando los genes mitocondriales 12SrRNA y 16SrRNA. Posteriormente estudiamos la posible implicación de estas especies de garrapatas en la transmisión de *Cytauxzoon spp.* Actualmente ya se han dado casos de lince ibéricos positivos a *Cytauxzoon spp.* [3] localizados en todos los lince de la Península ibérica, a excepción de Doñana [4] pero

aún no se ha identificado vectores ectoparásitos. Su detección en garrapatas arrojaría más luz sobre la enfermedad y esclarecería el ciclo epidemiológico de *Cytauxzoon spp.* en el lince, al igual que los mecanismos de transmisión y las especies de ectoparásitos vectores.

Dentro de este campo de investigación no encontramos suficiente información en la bibliografía consultada sobre la identificación morfológica y distribución de los ectoparásitos que afectan al lince ibérico en España, aunque podemos destacar un trabajo [5] en el cual se identifican morfológicamente las especies más frecuentes y abundantes en este felido. En el citado estudio las especies identificadas fueron *Rhipicephalus turanicus* y *Rhipicephalus pusillus*, ambas pertenecientes del grupo *R. sanguineus*, lo cual guarda similitud parcial con nuestros resultados, obtenidos mediante técnicas moleculares. En referencia al resto de especies identificadas en este estudio y de acuerdo con el trabajo antes citado [5], cabe destacar que *Hyalomma marginatum* e *Ixodes hexagonus* fueron identificadas morfológicamente, aunque posteriormente nuestros análisis moleculares no permitieron confirmarlo.

Cierto es que la identificación morfológica de las garrapatas mediante claves dicotómicas es un análisis que puede dar lugar a interpretaciones con cierto sesgo, así como se muestra en otros estudios [6] siendo las de los géneros *Rhipicephalus* e *Hyalomma* las que presentan mayor incertidumbre de identificación. Otros autores [7] también concluyeron que la combinación de los estudios morfológicos, biológicos y moleculares son, en muchos casos, necesarios para la correcta identificación de especies problemáticas.

Los análisis mediante técnicas moleculares permitieron realizar la identificación de las especies de garrapatas estudiadas con mayores garantías. En nuestro estudio, los análisis por PCR convencional y de secuenciación de las subunidades ribosómicas 12SrRNA y 16SrRNA dieron resultados diferentes a la identificación morfológica. En el caso de las secuencias de *Hyalomma*, fueron altamente compatibles con la especie *H. lusitanicum*, aunque la base de datos del NCBI también contenía secuencias cercanas a *Hyalomma marginatum*, pero con menor similitud. Respecto a *I. hexagonus*, el mal estado de los ejemplares y el hecho de resultar negativas en la PCR convencional no nos permitió avanzar más.

Nuestros resultados mostraron que existen diferencias muy radicales entre la identificación morfológica y molecular, sugiriendo que, si asumimos que lo más preciso se obtiene con los métodos moleculares, la especie con más prevalencia en el lince ibérico en Extremadura resultó ser *Rhipicephalus pusillus*, especie parásita también de lagomorfos, presa predilecta del lince [8]. Por consiguiente, la identificación morfológica se debe realizar con cautela, ya que muchos aspectos anatómicos distintivos pueden ser subjetivos y poco visibles influyendo también el estado de la muestra, lo cual dificulta una identificación precisa. Esto también fue indicado en otro trabajo [9] donde se demostraba que la nueva especie *Ixodes inopinatus* ha sido erróneamente documentada como *I. ricinus* en algunas partes de España, Portugal y norte de África. En otro estudio [10] se confirma el alto porcentaje de

similitud (98.7%) entre *R. sanguineus* y *R. turanicus*, sugiriendo que estas especies divergieron recientemente, generando dificultades en su clasificación debido a su similitud morfológica, aunque también presenta discrepancias moleculares [11] en otros estudios donde no pudieron encontrar suficientes diferencias entre ellas. A pesar de estos artículos que demuestran la clara dificultad de diferenciar estas especies, también existen otros casos [12] donde observaron un 5.7% y un 4.3% de divergencia mitocondrial en las secuencias 12SrRNA y 16SrRNA. Debido a esta variedad de resultados, todo apunta a que una buena complementación al estudio morfológico consistiría en la realización de estudios moleculares que permitan una mayor fiabilidad de los resultados de identificación, siendo los genes mitocondriales 12SrRNA y 16SrRNA muy eficaces para ello.

Respecto a los estudios realizados en nuestro país sobre la presencia de *Cytauxzoon spp.* mediante PCR en lince ibérico encontramos bibliografía de referencia [3] donde las muestras analizadas eran tejidos blandos de lince ibérico [3]. Sin embargo, nuestro trabajo se centró en el análisis de garrapatas recogidas en lince ibérico mediante métodos moleculares para tratar de detectar la presencia del material genético de *Cytauxzoon spp.* en las garrapatas y relacionar la implicación de estas en la transmisión del hemoparásito, aunque el papel vectorial quedaría por determinar, como indican varios autores [4]. En los resultados ninguna de las garrapatas resultó ser positivas, a diferencia de lo encontrado en otros estudios, aunque estos fueron efectuados sobre garrapatas del lince rojo en el sureste de Illinois, EEUU [13].

Recientes estudios [14], vienen a indicar que *C. felis* se encuentra en expansión en EEUU alcanzándose una mayor prevalencia en gatos domésticos, lince rojo y pumas, cumpliendo estos últimos el papel de reservorios. Estos hallazgos deberían motivar una investigación profunda del paralelismo de esta enfermedad en nuestro continente, como ya se ha hecho en otros estudios, determinándose la diversidad genética de *Cytauxzoon spp.* en los felinos salvajes de Europa, definiendo tres genotipos: *C. europeus*, *C. otrantorum* y *C. banethi*. [15].



Aun así, se necesita más investigación para esclarecer el papel de los vectores en su transmisión y la ecoepidemiología de este parásito.

En nuestro trabajo se ha llevado a cabo la recogida de muestras de garrapatas (67 ixódidos todos adultos) procedentes de 10 lince ibéricos, cadáveres y animales capturados principalmente de las poblaciones del norte, entre ellas las de la comunidad autónoma de Extremadura, durante los años 2017-2020. Las muestras fueron conservadas en alcohol 70% hasta el momento de su identificación morfológica y posterior procesado para la extracción de ADN.

Primero se realizó la identificación morfológica de las garrapatas mediante su observación y estudio a través de un estereomicroscopio siguiendo para ello las claves dicotómicas correspondientes [8 y 16] y se realizaron fotografías digitales de todas ellas (figura 1).

La identificación morfológica aportó los siguientes resultados: 3 individuos se identificaron como *Ixodes hexagonus* (4,47%), 47 individuos se correspondieron con la especie *Rhipicephalus sanguineus* (70,15%), 2 ejemplares con *Rhipicephalus turanicus* (2,99%) y 13 *Hyalomma marginatum* (19,40%). Hubo 2 garrapatas (2,99%) que no pudieron ser identificadas debido al mal estado de conservación. Ningún lince fue infestado simultáneamente por todas las especies y el máximo de especies identificadas sobre un mismo lince fue de dos. La carga parasitaria media (desviación típica) fue 6,70 (\pm 4,55) garrapatas por lince. Estos resultados fueron contrastados con los análisis moleculares para contrastar la identificación morfológica.

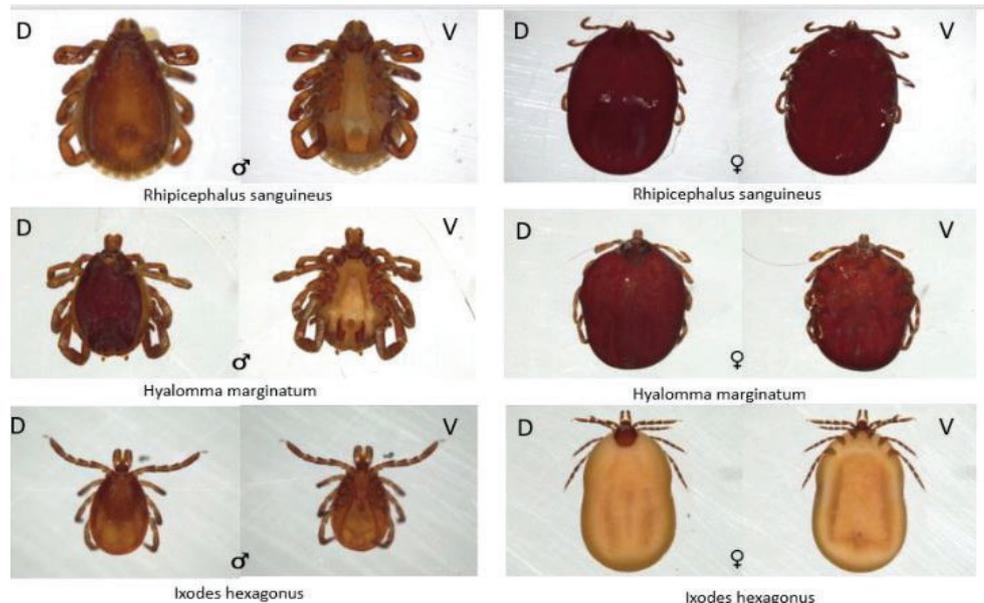


Figura 1. Micrografías (vista dorsal y ventral) de hembras y machos

Posteriormente se procedió a la identificación molecular que se realizó tras el diseño de dos parejas de cebadores de PCR del gen 12SrRNA y 16SrRNA mitocondrial, usando la secuencia consenso obtenida a partir la colección de secuencias de ambos genes disponible en GenBank (National Center of Biotechnology Information: NCBI) para la familia *Ixodidae*. La identificación molecular consistió en el análisis y comparación de las secuencias genéticas de las subunidades ribosómica 12SrRNA y 16SrRNA dada la mayor cantidad de información molecular disponible en bases de datos genéticas.

Así, una vez diseñados los cebadores se realizó la extracción de

ADN de las garrapatas mediante extracción manual de acuerdo con los protocolos de uso común en el laboratorio. A continuación, las muestras se analizaron mediante PCR convencional, técnica que amplifica el ADN mitocondrial de las garrapatas usando los cebadores diseñados específicamente de los genes citados con anterioridad. La amplificación se lleva a cabo en un Termociclador 2720 (Thermal Cycler de Applied Biosystems). La visualización de los fragmentos se realiza mediante electroforesis submarina en gel de agarosa 1,5%, observándose en un equipo de transiluminador de luz ultravioleta con el objeto de identificar si los tamaños moleculares son adecuados (Figura 2).

A continuación, se analizaron mediante PCR de secuenciación aquellas reacciones de PCR convencional positivas con suficiente producto estimado visualmente, purificando los productos usando ExoSAP-IT PCR (Thermo Fisher Scientific). Las secuencias nucleotídicas se obtuvieron mediante el Termociclador 2720 (Thermal Cycler de Applied

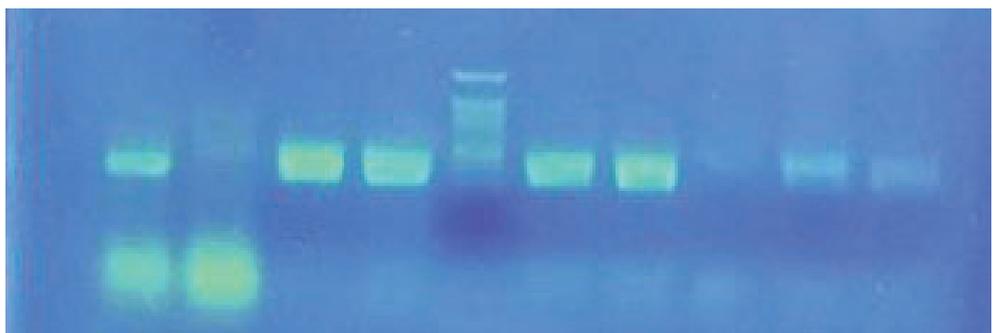


Figura 2. Visualización de electroforesis en gel agarosa con luz ultravioleta (Elaboración propia).

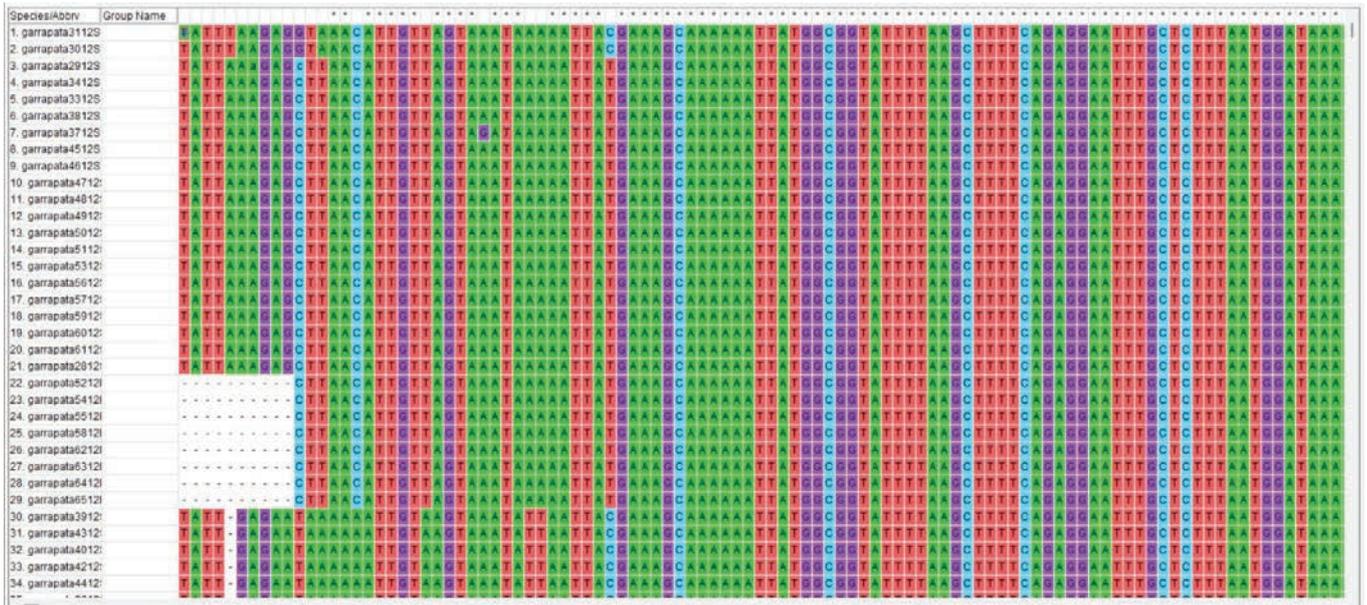


Figura 3. Comparación de las secuencias de ADN mediante el software MEGA 7 (Fuente de elaboración propia).

Biosystems) usando el kit BIG DYE Sequencing KIT Ver 3.1 (Applied Biosystems) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Además, la secuenciación se realizó bidireccionalmente para validar la variación genética mediante emparejamiento de las lecturas durante el análisis de datos. Los productos de secuenciación fueron precipitados y cargados en el analizador genético ABI 3130 (Applied Biosystems) y las lecturas de los fragmentos se codificaron a formato texto usando el programa “AB DNA Sequencing

Analysis Software v 5.2”. Finalmente se realizó el análisis de las secuencias de nucleótidos, que fueron procesadas y alineadas en el programa MEGA 7 [17] (Figura 3) para poder analizarlas y compararlas con otras disponibles en la base de datos del GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) usando la aplicación BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Para el análisis molecular se utilizaron los amplicones de ambos genes que rindieron resultados

positivos, obteniéndose 46 amplicones de garrapatas diferentes y para ambos genes (68,66% sobre el total de garrapatas identificadas morfológicamente). Posteriormente se analizaron mediante PCR de secuenciación, obteniéndose por ambas hebras 37 muestras mediante 16SrRNA y 40 por 12SrRNA, ya que algunas no tenían la calidad necesaria para su análisis y se retiraron de este estudio.

Mediante el software MEGA 7 se procesaron los datos de las lecturas obtenidas y se realizaron los alineamientos comparando los datos obtenidos con aquellos de la base de datos del GenBank (NCBI) en la aplicación BLAST y se asumió la pertenencia a grupo taxonómico específico cuando el rango de similitud molecular estuvo entre un 99-100%.



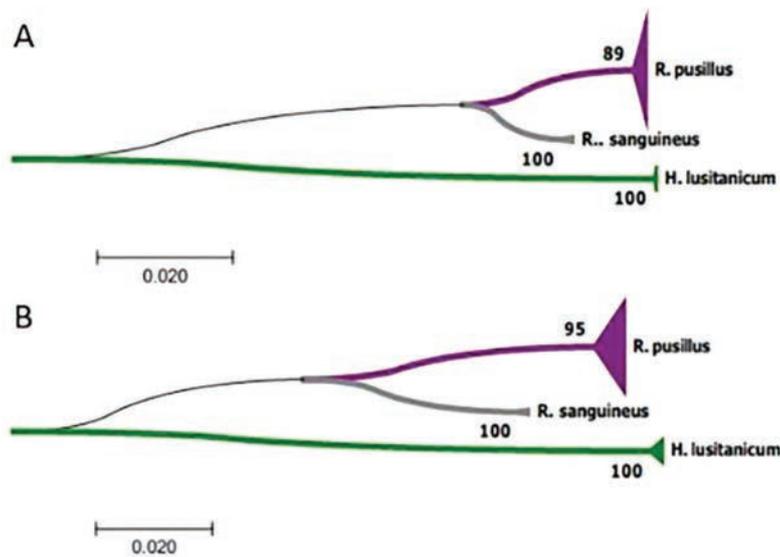


Figura 4. Topología filogenética molecular por método de máxima verosimilitud mediante MEGA 7 (A: Gen 12SrRNA; B: Gen 16S rRNA)

Nuestros resultados confirmaron que las muestras de ixódidos recogidas en lince ibérico fueron compatibles en un 5% con *Rhipicephalus sanguineus*, un 75% con *Rhipicephalus pusillus* y un 20% con *Hyalomma lusitanicum*.

También se observaron diferencias polimórficas intra-específicas que se utilizaron para el análisis filogenético. El análisis filogenético del gen 12SrRNA agrupó las secuencias en tres grupos taxonómicos. En el primer grupo, la especie fue *Rhipicephalus pusillus*, (n=24). A continuación, el segundo grupo estuvo representado por la especie *Rhipicephalus sanguineus* y, por último, el tercer grupo conformado por la especie *Hyalomma lusitanicum* (n=7). El resultado del análisis filogenético se muestra en la figura 4 (A). Respecto del gen 16SrRNA de nuevo se obtuvieron tres grupos correspondientes con las tres especies identificadas previamente. El primer grupo perteneciente a la especie *Rhipicephalus pusillus* (n=23). El segundo grupo formado por la especie *Rhipicephalus*

sanguineus (n=2) y finalmente, el último grupo está conformado por la especie *Hyalomma lusitanicum* (n=5), como se muestra en la figura 4 (B).

Los máximos de identidad se encontraron entre el 99% y el 100% con la base de datos del GenBank del NCBI, mostrando

para el gen 12SrRNA similitudes del 100% (60% de las muestras), 99.70% (30% de las muestras), 99.69% (2,5% de las muestras) y un 99,40% (7,5% de las muestras). Para el gen 16SrRNA se aprecian unas similitudes del 100% (78,4% de muestras) y 99.70% (21,6% de las muestras restantes). Por todo lo anterior, los resultados sugirieron la presencia de al menos tres especies, confirmando las especies parásitas mediante método de detección molecular, proporcionando una mejor asignación taxonómica respecto a la identificación morfológica, siendo este último un método más subjetivo que depende de la interpretación y de la experiencia del observador.

Tras la identificación de las especies de garrapatas, se realizó el estudio molecular para detectar la presencia de ADN de *Cytauxzoon spp.* en los ixódidos. Se diseñó un ensayo de PCR a tiempo real, incluyendo cebadores y sondas tipo Taqman o de hidrólisis [18]. Se incorporaron todas las secuencias de *Cytauxzoon spp.* disponibles del gen 18SrRNA, los cuales incluían especies de los géneros *Theileria*, *Babesia* y *Cytauxzoon*. Los ensayos se realizaron utilizando un equipo StepOnePlus Fast (Applied Biosystems), incluyendo en todas las placas un control positivo (ADN de *C. felis* obtenido de sangre de un gato doméstico infectado) proporcionado por Ángel Sainz [19] y un control negativo.

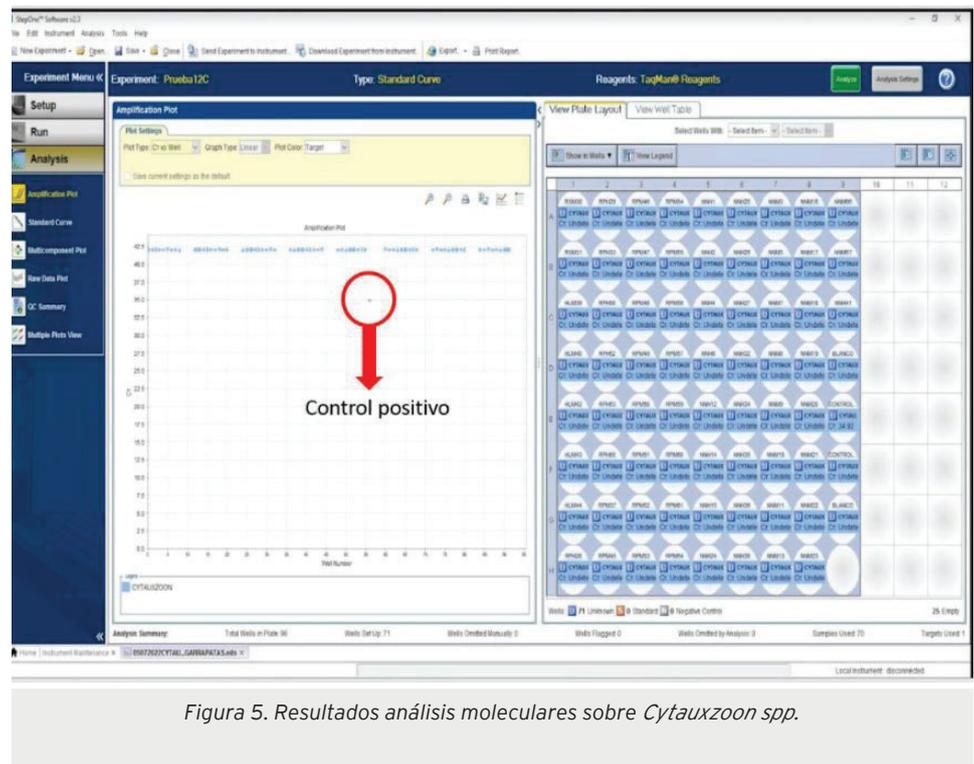


Figura 5. Resultados análisis moleculares sobre *Cytauxzoon spp.*

Las muestras de ADN se procesaron realizando el análisis completo de todas las muestras identificadas en la secuenciación. Todas las pruebas resultaron negativas mediante “real time” PCR para *Cytauxzoon spp.*, excepto el control positivo (figura 5).

En resumen, se ha conseguido una identificación molecular más precisa y objetiva realizando una comparación de las secuencias estudiadas con las descargadas de la base de datos del GenBank del NCBI, asumiéndose que la identificación especie-específica se corresponde con aquella con mayor porcentaje de identidad y considerándose más robusta cuando se obtuvo un 100%.

La relación entre los resultados de la identificación morfológica y la molecular, obtenida tras el análisis de los genes 12SrRNA y 16SrRNA muestra una clara discrepancia, obteniendo solo un 5% de coincidencia entre ambos métodos. Por ello se puede sugerir como identificación definitiva aquella que obtuvo mayor porcentaje de identidad molecular respecto a lo encontrado en la base de datos del GenBank del NCBI. Desde el punto de vista biológico estas identificaciones son bastante lógicas, al encontrarse garrapatas que también parasitan conejos, sustento alimenticio que conforma el 90% de la dieta del linco. En relación a los estudios moleculares sobre *Cytauxzoon spp.*, estos dieron resultados negativos, lo cual no excluye a estas especies como vectores potenciales de este hemoparásito, solo que para su asociación resulta necesario realizar estudios más amplios. Por ello, promover la investigación sobre ello contribuiría a la conservación de esta especie en peligro de extinción.

Para más información:

En el Colegio Oficial de Veterinarios de Badajoz, se podrá consultar la bibliografía completa correspondiente a este artículo para todos aquellos interesados.

