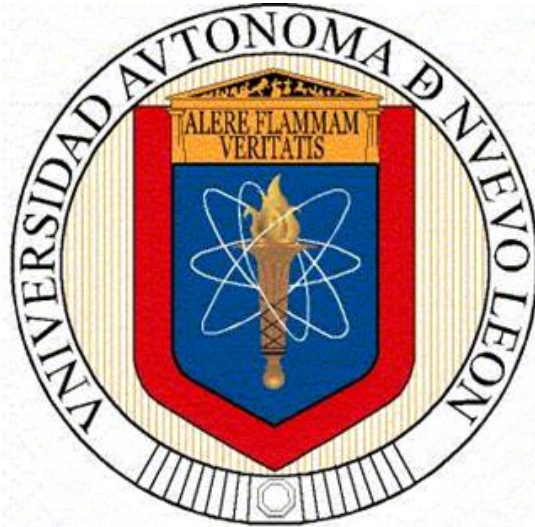


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**ANTAGONISMO DE LA MICROBIOTA INTERNA CULTIVABLE
AISLADA DE GARRAPATAS DEL GANADO BOVINO CONTRA
BACTERIAS DE IMPORTANCIA CLÍNICA**

POR

QBP. ELIUD ALONSO LUCERO VELASCO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

JUNIO, 2017

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**ANTAGONISMO DE LA MICROBIOTA INTERNA CULTIVABLE
AISLADA DE GARRAPATAS DEL GANADO BOVINO CONTRA
BACTERIAS DE IMPORTANCIA CLÍNICA**

POR

QBP. ELIUD ALONSO LUCERO VELASCO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN, MÉXICO

JUNIO, 2017

“ANTAGONISMO DE LA MICROBIOTA INTERNA CULTIVABLE AISLADA DE
GARRAPATAS DEL GANADO BOVINO CONTRA BACTERIAS DE
IMPORTANCIA CLÍNICA”

Comité de tesis

Dra. Zinnia Judith Molina Garza
Director de Tesis

Dr. Lucio Galaviz Silva
Secretario

Dra. Licet Villarreal Treviño
Vocal

Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores
Vocal

Dra. María Porfiria Barrón González
Vocal

San Nicolás de los Garza, N.L.

Junio, 2017

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento muy grande a los miembros de mi comité, Dra. Licet Villarreal, Dra. Porfiria Barrón, Dr. Ricardo Gómez, gracias por todos sus consejos y correcciones en la elaboración de esta investigación.

Agradecimiento especial a la Dra. Zinnia Molina Garza, directora de mi tesis, y al Dr. Lucio Galaviz Silva, por abrirme una vez más las puertas de su laboratorio, el apoyo que me brindaron jamás se los terminaría de agradecer. Sin duda, la mejor decisión que pude tomar fue continuar mis estudios de posgrado bajo su tutela.

Agradecimiento a CONACYT, por la beca otorgada para la realización de esta investigación de tesis de maestría.

A la Dra. Elvira Garza González y la Dra. Soraya Mendoza, por ayudarme con la identificación de mis cepas en su laboratorio.

A la cDra. Karla C. Pérez, por seguir enseñándome y discutiendo conmigo todas las dudas que surgieran, aun cuando no se trataran de su área de conocimiento.

A la MC. Fabiola Venegas García, por hacerme el grandísimo favor de verificar en las bases de datos del API web.

Al personal del Laboratorio de Patología Molecular y Experimental, que me ayudaron siempre que solicite su apoyo.

A mis compañeros de generación, Hugo, Carolina, Silvia, Gilberto, Alejandra, Mayra, Dianelys, Alejandra, Mario Iracheta y Mario Alberto, por la amistad que me brindaron durante estos dos años de maestría, fue un gran placer conocerlos a todos.

A mi familia en general, pero en especial a mi hermana menor Daniela, por siempre escucharme, aun cuando no comprendiera de lo que estaba hablando, significo mucho para mí.

A mis dos perros, Samantha y Tommi, por siempre recibirme como si fuera la mejor persona del mundo.

A todas las garrapatas que tuvieron que morir para que pudiera realizar esta investigación.

Finalmente quisiera agradecer a una persona que estuvo al pendiente de mí más que cualquier otra en el mundo y siempre estuvo ahí cuando la necesite. Yadira Flores, muchas gracias por estar una vez más en los momentos importantes de mi vida.

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mi familia, pero en especial a mis padres Celia Velasco Delgado y Sergio Lucero Delgado quienes me apoyaron regalándome su confianza y paciencia durante el tiempo que estuve desarrollándolo.

Quisiera hacer una mención especial para mi abuela querida que aun cuando ya no se encuentra con nosotros y quizá no pude disfrutar como hubiese querido, siempre la tengo en mi pensamiento y confío en que me procura desde donde esté.

CARPE DIEM

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes	
2.1 Generalidades.....	3
2.2 Enfermedades transmitidas por garrapatas.....	3
2.3 Garrapatas del ganado en México.....	5
2.3.1 Descripción general del vector <i>Rhipicephalus microplus</i>	6
2.3.2 Descripción general del vector <i>Amblyomma cajennense</i>	8
2.3.3 Descripción general del vector <i>Otobius megnini</i>	9
2.4 Estudios de microbiota interna de garrapatas.....	11
2.5 Retos de respuesta antagonista.....	14
3. Justificación.....	16
4. Hipótesis.....	17
5. Objetivos.....	18
6. Material y métodos	
6.1 Área de estudio.....	19
6.1.1 Descripción general de Nuevo León.....	19
6.1.2 Descripción general de Zacatecas.....	20
6.2 Cepas de referencia.....	20
6.3 Identificación taxonómica de los ectoparásitos colectados.....	21
6.4 Procesamiento de las muestras.....	22
6.4.1 Esterilización de la superficie externa de las garrapatas.....	22
6.4.2 Obtención de órganos internos y hemolinfa para el aislamiento.....	22
6.5 Caracterización morfológica y bioquímica de los aislamientos.....	23
6.6 Evaluación de la actividad antagonista.....	24
6.7 Identificación de las cepas aisladas.....	25
7. Resultados	
7.1 Identificación taxonómica de los artrópodos colectados.....	26
7.2 Garrapatas colectadas en las diversas localidades.....	29
7.3 Cepas bacterianas aisladas de las garrapatas de ganado bovino.....	30
7.3.1 Carga bacteriana de las diversas especies de garrapatas.....	30
7.3.2 Caracterización morfológica de los aislamientos bacterianos.....	31

7.3.3	Caracterización bioquímica de los aislamientos bacterianos.....	31
7.3.4	Evaluación de la actividad antagonista de las cepas aisladas.....	31
7.3.5	Identificación de los aislamientos por el equipo MALDI-TOF.....	32
8.	Discusión.....	40
9.	Conclusión.....	44
10.	Perspectivas.....	45
11.	Bibliografía.....	46
12.	Resumen biográfico.....	56

ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICAS

Tabla 1. Garrapatas colectadas en las diversas localidades.....	29
Tabla 2. Carga bacteriana de las tres especies de garrapatas colectadas.....	30
Tabla 3. Características morfológicas de los aislamientos.....	32
Tabla 4. Relación de actividad hemolítica y Gram por especie de garrapata.....	33
Tabla 5. Características bioquímicas de los aislamientos.....	34
Tabla 6. Evaluación de la capacidad de antagonismo de los aislamientos.....	35
Tabla 7. Identidades de las cepas según la base de datos del MALDI-TOF.....	36
Tabla 8. Bacterias aisladas de importancia clínica o veterinaria.....	37
Gráfica 1. Frecuencias bacterianas en la totalidad de las garrapatas muestreadas.....	38
Gráfica 2. Frecuencias de las especies bacterianas en <i>R. microplus</i>	38
Gráfica 3. Frecuencias de las especies bacterianas en <i>A. cajennense</i>	39
Gráfica 4. Frecuencias de las especies bacterianas en <i>O. megnini</i>	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Ciclo biológico de <i>R. microplus</i>	7
Fig. 2. Ciclo biológico de <i>A. cajennense</i>	9
Fig. 3. Ciclo biológico de <i>O. megnini</i>	10
Fig.4. Localidades de muestreos.....	21
Fig. 5. Esterilización de superficie de las garrapatas colectadas.....	22
Fig. 6. Verificación de esterilización de superficie.....	23
Fig. 7. Criterios de evaluación para los retos de antagonismo.....	24
Fig.8. Estructuras para identificación de <i>R. microplus</i>	26
Fig. 9. Estructuras para identificación de <i>A. cajennense</i>	27
Fig. 10. Estructuras para identificación de <i>O. megnini</i>	28

LISTA DE ABREVIACIONES

°C	Grados Celsius
ADH	Arginina deshidrolasa
ADI	Ácido adípico
AMY	Amigdalina
ARA	Arabinosa
ATCC	American Type Culture Collection
BCC	Burkholderia cepacia complex
CAP	Ácido cáprico
CIT	Citrato
cm	Centímetros
ESC	Esculina
GEL	Gelatina
GLU	Fermentación de Glucosa
GNT	Gluconato de potasio
h	Horas
H ₂ S	Ácido sulfhídrico
ICC	Infusión cerebro corazón
IND	Producción de Indol
INO	Fermentación de inositol
Km	Kilómetros
LDC	Lisina descarboxilasa
MAL	Asimilación de maltosa
MAN	Asimilación de manitol
MEL	Asimilación de melobiosa
min	Minutos
μL	Microlitros
mL	Mililitros
MLT	Asimilación de malato
mm	Milímetros
MNE	Asimilación de manosa
NAG	Asimilación de N-acetilglucosamina
NO ₃	Producción de nitratos
ODC	Ornitina descarboxilasa
ONPG	Ortonitrofenil-βD-Galactopiranosidasa
OX	Oxidasa
PAC	Ácido fenilacético
PBS	Buffer de fosfatos salinos

PNPG	Para-Nitro-Fenil-βD-Galactopiranosidasa
RHA	Asimilación de ramnosa
SAC	Asimilación de sacarosa
SFGR	Grupo de rickettsias de fiebres manchadas
TDA	Triptofano desaminasa
TRP	Producción de triptofano
URE	Ureasa
VP	Voges-Proskauer

RESUMEN

Las garrapatas son vectores de numerosas enfermedades, solo después de los mosquitos, son los principales vectores de importancia clínica y veterinaria. Transmiten los agentes de enfermedades como la ehrliquiosis, borreliosis, babesiosis, anaplasmosis y rickettsiosis. Debido a las enfermedades y el daño directo por la ingesta de sangre, las garrapatas del ganado causan pérdidas millonarias anuales. Sin embargo, estos ectoparásitos no solo albergan patógenos, sino que dentro de estos existe una amplia microbiota que se encuentra involucrada en el establecimiento y transmisión de las bacterias patógenas. A pesar de esto, actualmente se han realizado solamente seis estudios en el ámbito mundial sobre la microbiota cultivable de estos ectoparásitos. Durante esta investigación se colectaron 150 garrapatas; pertenecientes a las especies *Rhipicephalus microplus*, *Amblyomma cajennense* y *Otobius megnini*; de seis localidades ganaderas en los estados de Nuevo León y Zacatecas. Se aislaron 293 cepas bacterianas, las especies con mayores frecuencias fueron *Staphylococcus chromogenes*, *Bacillus cereus*, *Burkholderia cepacia*, *Cronobacter sakazakii* y *Serratia marcescens*, 83.3% de las garrapatas muestreadas presentó al menos una cepa hemolítica, lo anterior puede representar el posible rol de la microbiota en la digestión de la sangre del artrópodo. Actualmente existe una creciente resistencia a antibióticos por los microorganismos, por tal motivo es importante buscar nuevos productores de compuestos antimicrobianos en nichos no explorados. En este estudio se demostró la capacidad antagonista de *S. marcescens*, *B. cepacia* y *S. maltophilia* contra ATCC, *E. coli*, *S. enteritidis*, *L. monocytogenes*, *B. cereus* y *S. aureus*.

ABSTRACT

The ticks are vectors for numerous diseases, only after the mosquitoes, they are the main vectors of clinical and veterinary importance. They transmit diseases agents such as ehrlichiosis, borreliosis, babesiosis, anaplasmosis and rickettsiosis. Due to the diseases and direct damage from blood ingestion, cattle ticks cause millions of dollars in losses. However, these ectoparasites not only harbor pathogens, but a large microbiota variety that is involved in the establishment and transmission of pathogenic bacteria. Despite this, currently, only six studies have been carried out worldwide on the culture microbiota of these ectoparasites. During this research, 150 ticks were collected, which belonged to the species *Rhipicephalus microplus*, *Amblyomma cajennense* and *Otobius megnini*, have been collected from six livestock locations in the States of Nuevo Leon and Zacatecas. 293 bacterial strains were isolated, with the highest frequencies being *Staphylococcus chromogenes*, *Bacillus cereus*, *Burkholderia cepacia*, *Cronobacter sakazakii* y *Serratia marcescens*, 83.3% of the ticks sampled had at least one hemolytic strain, which may represent a possible role of the microbiota in the blood digestion of the arthropod. There is now increasing resistance to antibiotics by microorganisms, therefore, it is important to look for new producers of antimicrobial compounds in unexplored niches. In this study, we demonstrated the antagonist ability of *S. marcescens*, *B. cepacia* and *S. maltophilia* against the ATCC, *E. coli*, *S. enteritidis*, *L. monocytogenes*, *B. cereus* and *S. aureu*

1. INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son ectoparásitos artrópodos que se dividen en tres órdenes principales, la *Ixodidae* (garrapatas duras), la *Argasidae* (garrapatas blandas) y la *Nutalliellidae*. (Koneman & Allen, 2008). Estos ectoparásitos, después de los mosquitos, son los vectores de mayor importancia de enfermedades clínicas a nivel mundial, sin embargo, en cuanto a enfermedades de animales domésticos y salvajes, son los principales vectores (De la Fuente *et al.* 2008).

En general las garrapatas son vectores muy versátiles ya que parasitan a todos los grupos de vertebrados con excepción de los peces. Las enfermedades que transmiten son de interés para la salud humana, pero en mayor proporción a la salud animal (IICA, 2000). Las garrapatas son parásitos importantes en el ganado bovino, teniendo efectos directos como: poca ganancia de peso, acción traumática, tóxica, infecciosa y expoliadora; e indirectas causando graves daños como: deterioro de piel, muertes por enfermedades, debilidad de los animales, además del retardo en el crecimiento en los novillos y terneras, baja conversión de alimentos en carne o leche y dificultad en la aclimatación de razas especializadas (García-Vázquez, 2010).

De las 77 especies de garrapatas identificadas en México, 14 son importantes para la producción animal: *Rhipicephalus microplus*, *R. annulatus*, *R. sanguineus*, *Amblyomma cajennense*, *A. americanum*, *A. maculatum*, *A. imitator*, *Dermacentor variabilis*, *D. albipictus*, *D. nigrolineatus*, *D. occidentalis*, *Anocentor nitens*, *Otobius megnini* y *Argas persicus*, estas últimas del orden *Argasidae*. Sin embargo, las especies de mayor importancia para el ganado bovino en México son *R. microplus* y *A. cajennense* (SENASICA, 2015).

La garrapata del ganado *R. microplus* afecta gravemente la producción ganadera en las zonas donde es endémica. En Brasil este ectoparásito causa pérdidas anuales que se aproximan a los 2 mil millones de dólares (Grisi *et al.* 2002). Este artrópodo hematófa go es vector de enfermedades como la babesiosis bovina y anaplasmosis, causadas por

Babesia bovis y *Anaplasma marginale* respectivamente. Se estima que en México más de 20 millones de cabezas de ganado está expuesta a estas enfermedades (Cruz-Ceballos, 2009).

Amblyomma cajennense es la segunda garrapata de interés para el ganado bovino en el país, es una garrapata de tres hospederos, vector de anaplasmosis y rickettsias del grupo de las fiebres manchadas (De la Fuente *et al.* 2003).

Además de la transmisión de patógenos, las garrapatas sirven de hospederos a otras bacterias en una relación comensal, mutualista o parasitaria (Noda *et al.* 1997; Sacchi *et al.* 2004; Scoles, 2004). Las interacciones microbianas en el intestino de las garrapatas pueden afectar las características de las bacterias patógenas, incluidas su establecimiento y transmisión (Macaluso *et al.* 2002; De la Fuente *et al.* 2003). Sin embargo, a pesar de la importancia que presentan estos vectores, muy poco se conoce sobre la microbiota de estos artrópodos, ya que la mayoría de los estudios solamente se enfocan en la detección de bacterias patógenas, dejando de lado los llamados simbioses (Smith *et al.* 1978; Rahman & Rahman, 1980; Murrel *et al.* 2003).

El efecto que la simbiosis puede ejercer en el artrópodo puede variar, pero abarca principalmente alteraciones de desarrollo, mecanismos nutricionales que le permitan el aprovechamiento de algún sustrato, alteraciones en la reproducción, defensa contra enemigos naturales o compuestos químicos (Ishikawa, 2003).

El principal beneficio de este estudio se debe a la creciente resistencia a antibióticos por parte de las bacterias patógenas y, por consiguiente, la necesidad de encontrar nuevos compuestos provenientes de nichos no explorados, ya sea de organismos acuáticos, minas o dentro de otros organismos considerados parásitos (Gautam *et al.* 2013; Saha & Santra, 2014).

Este trabajo busca contribuir a la escasa información que se conoce sobre la microbiota de las garrapatas, además de evaluar si las bacterias dentro del ectoparásito cuentan con una capacidad antagonista contra cepas de importancia clínica.

1. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades

Las garrapatas son artrópodos ectoparásitos hematófagos del orden *Ixodida* que se divide en las familias *Ixodidae* (garrapatas duras), *Argasidae* (garrapatas blandas) y *Nuttalliellidae*, con un solo representante. Las garrapatas son vectores de gran versatilidad pues atacan a todos los grupos de vertebrados, con excepción de los peces (Koneman & Allen, 2008). Después de los mosquitos son los principales vectores de enfermedades en cuestiones de salud humana. En términos de salud animal, estos ectoparásitos son los principales transmisores de enfermedades. (De la Fuente *et al.* 2003; León-Artozqui, 2011). Los métodos de transmisión de los patógenos empleados por las garrapatas son tanto mecánicos como biológicos (Dantas-Torres, 2010).

Los vectores importantes de enfermedades humanas son las garrapatas de tres huéspedes, la duración promedio del ciclo de vida es de 1-2 años, variando según las condiciones medioambientales. Dentro del ciclo de vida la garrapata puede adquirir al patógeno de manera horizontal (medio ambiente) o de manera vertical (hereditario). *Babesia microti*, *Borrelia burgdorferi* y *Anaplasma phagocitophilum* son ejemplos de patógenos adquiridos de manera horizontal. Mientras que *R. rickettsii*, el agente causal de la fiebre de las montañas rocallosas, es adquirido de manera vertical, por las hembras de *D. variabilis* (Koneman & Allen, 2008)

De 899 especies de garrapatas conocidas, aproximadamente un 10% están implicadas en el mantenimiento y transmisión de diferentes tipos de patógenos tales como virus, bacterias, protozoos y helmintos (León-Artozqui, 2011).

2.2 Enfermedades transmitidas por garrapatas

La enfermedad de Lyme, es sin duda una de las principales enfermedades que vienen a la mente cuando se piensa en enfermedades relacionadas a garrapatas. Esta enfermedad es causada por bacterias del género *Borrelia*. La borreliosis humana es causada principalmente por *Borrelia burgdorferi*, cuyo vector de mayor importancia es *Ixodes*

scapularis. Sin embargo, estudios demuestran que otras especies de *Borrelia* pueden causar la borreliosis humana, además que el rango de vectores también es de mayor amplitud. En el oeste de los Estados Unidos, la borreliosis es causada por *B. burgdorferi*, sin embargo, es *I. pacificus* la garrapata vector en esa región. En Europa la enfermedad de Lyme, es causada por *B. garinii*, con la garrapata *I. ricinus* como vector. En Asia esta enfermedad es provocada por la bacteria *B. afzelii* y transmitida por la garrapata *I. persulcatus* (Madigan *et al.* 2011).

Las rickettsiosis son un grupo de enfermedades producidas por bacterias parásitas intracelulares. Estas bacterias son transmitidas principalmente por garrapatas ixodidas. La fiebre de las montañas (RMSF, por sus siglas en inglés) es una enfermedad causada principalmente por *Rickettsia rickettsii*, este padecimiento está asociado a la mordida de la garrapata americana del perro *D. variabilis* y la garrapata de la madera *D. andersoni* en el oeste de los Estados Unidos. En parte de Texas y Arizona es *Amblyomma cajennense* quien transmite la enfermedad (Demma *et al.* 2005). La garrapata café del perro *Rhipicephalus sanguineus* también ha sido reportada como transmisora de *R. rickettsii* en Arizona y regiones de México (Bustamante, 1947; Demma *et al.* 2005). Otros miembros del género *Rickettsia* como *R. montanensi* y *R. rhipicephali* han sido aisladas de garrapatas ixodidas, como *D. variabilis*, *D. andersoni*, *D. occidentalis*, *R. sanguineus* e *I. pacificus*, sin embargo, estas no presentan patogenicidad, al menos para el ser humano (Burgdorfer *et al.* 1975; Phillip & Casper, 1981).

Las rickettsiosis se dividen en tres grupos, el grupo tífus, el grupo exantemático o de las fiebres manchadas y el grupo de las ehrliquiosis (Madigan *et al.* 2011). Los miembros del SFGR (grupo exantemático) comprende a *R. rickettsii*, *R. parkeri* y *Rickettsia 364D*, transmitidas por *D. variabilis*, *D. andersoni* y *D. occidentalis*, en los Estados Unidos. Sin embargo, a nivel internacional, el grupo incluye a *R. africae*, *R. australis*, *R. conorii*, *R. helvética*, *R. honei*, *R. japónica*, *R. massiliae*, *R. slovacica* y *R. sibirica* (CDC, 2012).

El grupo tífus contiene a *R. prowazekii* y *R. thypi* sin embargo estas son transmitidas principalmente por piojos de la especie *Pediculus humanus corporis*. En el grupo de las ehrliquiosis se encuentran *Anaplasma marginale*, *A. phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis* y *E. ewingii*, éstas son transmitidas por diversas especies de garrapatas

como *R. microplus* y *Amblyomma cajennense* (Cruz-Ceballos, 2009; CDC, 2015). La anaplasmosis y ehrlichiosis son rickettsiosis que ocasionan grandes pérdidas económicas en la industria ganadera a nivel mundial (Grisi *et al.* 2002; Cruz-Ceballos, 2009). La anaplasmosis en los bovinos es causada por *A. marginale* e invade a los glóbulos rojos. Es una enfermedad progresiva. Los glóbulos rojos infectados y no infectados son destruidos en el bazo, resultando en un aumento de destrucción de glóbulos rojos causando anemia y aún la muerte en casos severos. La anaplasmosis se encuentra ampliamente distribuida en México donde la garrapata *R. microplus* está presente. Cualquier estadio de la garrapata es capaz de infectarse después de alimentarse en un bovino portador de *A. marginale*, la rickettsia se multiplica en la garrapata y pasa por los diferentes estadios de la garrapata (García-Vázquez, 2010).

La babesiosis es causada en México por dos organismos *Babesia bovis* y *B. bigemina*. De las dos especies *B. bovis* es la más importante, debido a que causa mayor mortalidad y muchos de los brotes en México no son correctamente diagnosticados. Las babesias se desarrollan dentro de los glóbulos rojos de los bovinos y son transmitidas por la garrapata *R. microplus* (Solorio-Rivera *et al.* 1999).

2.3 Garrapatas del ganado en México

Las garrapatas afectan considerablemente la producción ganadera y son grandes representantes como vectores de enfermedades animales. *R. microplus*, es el vector de la babesiosis bovina, la anaplasmosis bovina y la teileriosis bovina benigna. Esta garrapata se encuentra en zonas cálidas húmedas de México, Centroamérica, Sudamérica, Australia y Oriente. *R. annulatus* la garrapata del ganado además de las enfermedades antes mencionadas está asociada a espiroquetosis de borregos, bovinos, caballos y cabras. *R. appendiculatus* la garrapata café de la oreja, está ampliamente distribuida en África y regiones europeas, es vector importante de la fiebre de la costa del Este, también está implicada en la encefalomiелitis bovina, enfermedad ovina de Nairobi y la enfermedad de Kisenly (IICA, 2000).

De las 77 especies de garrapatas identificadas en México, 14 son importantes para la producción animal: *Rhipicephalus microplus*, *R. annulatus*, *R. sanguineus*, *Amblyomma cajennense*, *A. americanum*, *A. maculatum*, *A. imitator*, *Dermacentor variabilis*, *D. albipictus*, *D. nigrolineatus*, *D. occidentalis*, *Anocentor nitens*, *Otobius megnini* y *Argas persicus*, estas dos últimas del orden *Argasidae*. Sin embargo, las especies de mayor importancia para el ganado bovino en México son *R. microplus* y *A. cajennense* (SENASICA, 2015).

2.3.1 Descripción general del vector *R. microplus*

R. microplus la garrapata común de los bovinos, es la garrapata más dañina en América Latina, Australia y varias islas del Pacífico. Machos y hembras son relativamente pequeños (3-5 mm) pero las hembras repletas pueden alcanzar 1,2 cm. Cada hembra pone unos 4500 huevos. Estos tardan entre 2 y 20 semanas en eclosionar, según las condiciones climáticas: el calor y la humedad aceleran el proceso. *R. microplus* se distribuye a nivel mundial en las regiones tropicales y subtropicales. Esta garrapata es endémica en el subcontinente indio, gran parte de Asia tropical y subtropical, el nordeste de Australia, Madagascar, el sudeste de África, el Caribe, México y varios países en América Central y del Sur. Ha sido erradicada de EE.UU., pero algunas veces se la puede encontrar en Texas o California en la zona de cuarentena que sirve como área de amortiguamiento en la frontera con México. Las garrapatas en el subgénero *Boophilus* pueden completar su ciclo de vida en un plazo de 3 a 4 semanas; esta característica puede causar una gran carga de garrapatas en los animales, además cabe mencionar que es una de pocas especies con el peculiar ciclo de un solo hospedero (Fig. 1) (IICAB, 2007).

El ciclo de vida de una garrapata se divide en tres etapas, la primera denominada no parasitaria o de vida libre comprende desde que la garrapata hembra repleta (teleogina) se desprende de su hospedero, hasta la aparición de las larvas en la vegetación. En esta etapa ocurre la ovoposición de los huevos, en el caso de *R. microplus* de 4,500 como se

mencionó anteriormente, la incubación y, eclosión de estos; que puede variar por una gran cantidad de razones como condiciones ambientales, cantidad de sangre digerida y la especie. La segunda fase se conoce como fase de encuentro, en la cual las larvas pasan de la vegetación al hospedero, este es hallado gracias a quimiorreceptores que detectan diferentes gases, entre ellos el dióxido de carbono, amoníaco, ácido láctico, entre otros olores corporales. Por último, está la fase parasitaria en donde las larvas se alimentan intermitentemente de su huésped hasta ingerir una buena cantidad de sangre y fluidos de los tejidos para mudar a ninfas, que seguirán alimentándose y realizan nuevamente una transformación, esta vez en machos y hembras jóvenes que en el caso de *R. microplus* mantienen la copula sobre el hospedero para después seguir alimentándose de sangre, asegurando así el origen de otra generación de garrapatas (Walker *et al.* 2014).

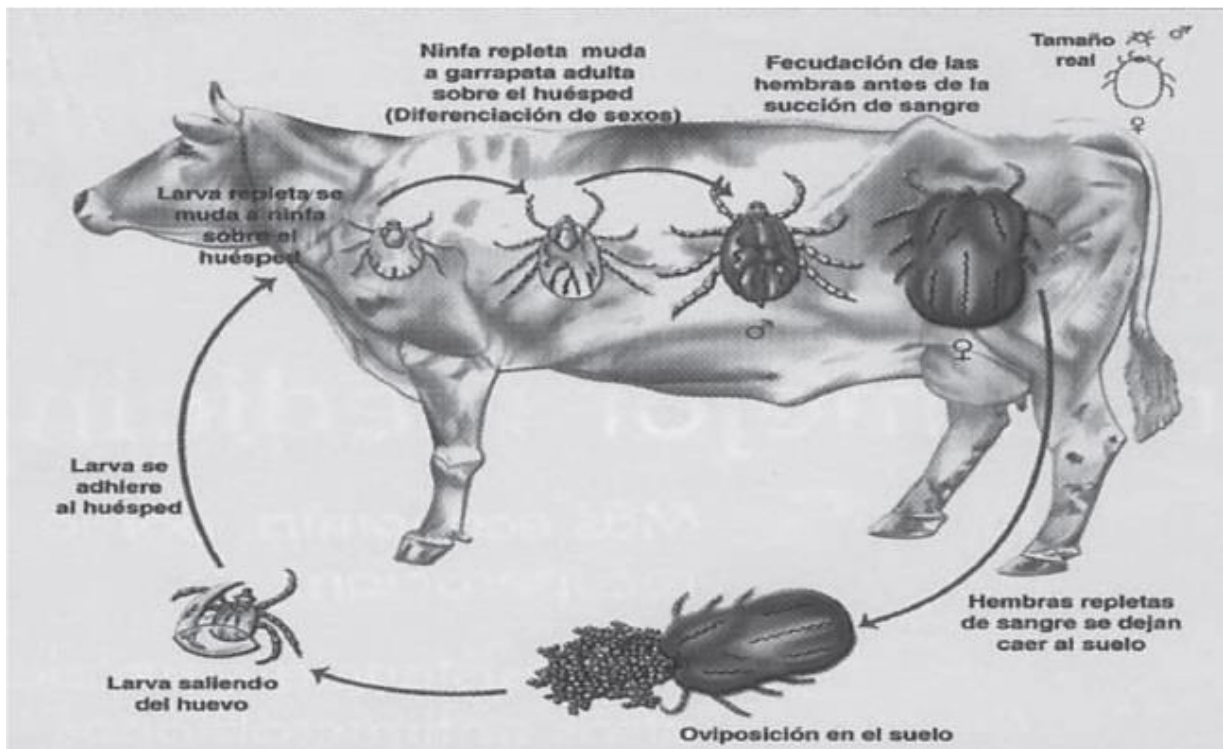


Fig. 1. Ciclo biológico de *R. microplus* (León-Clavijo & Hernández-Rojas, 2012)

Esta garrapata causa pérdidas mundiales anuales cercanas a los 7 billones de dólares. Solo en México se calculan pérdidas por la suma de 48 millones de dólares (Rodríguez-Vivas *et al.* 2011).

2.3.2 Descripción general del vector *Amblyomma cajennense*

Las garrapatas del género *Amblyomma* son bastante grandes (las hembras repletas hasta 2 cm de largo, como una aceituna), esta especie como la mayoría de las variedades de garrapatas requieren a tres animales durante su desarrollo, éstos pueden ser no sólo ganado bovino, sino fauna silvestre en general. Se caracterizan por poseer unas piezas bucales prominentes y por la presencia de un escudete con motivos específicos coloreados. La duración del ciclo vital oscila entre 4 meses para *A. americanum* y 12 meses para *A. cajennense*, pero depende fuertemente del tiempo que los estadios libres tardan en encontrar un hospedador. Las hembras repletas de *A. cajennense* liberan alrededor de 5000 huevos. Los estadios libres pueden sobrevivir más de un año sin encontrar un hospedador, aunque este tiempo puede reducirse considerablemente si el clima es húmedo y cálido (Fig. 2). De ordinario no hay más de una generación anual, tiene un área de distribución que cubre una superficie aproximada de 609, 857 Km², lo que representa el 31% del territorio nacional. *A. cajennense* es transmisor de enfermedades como la ehrliquiosis y anaplasmosis bovina, por lo tanto, se coloca como el segundo lugar de garrapatas de importancia en la ganadería mexicana (Junquera, 2015).

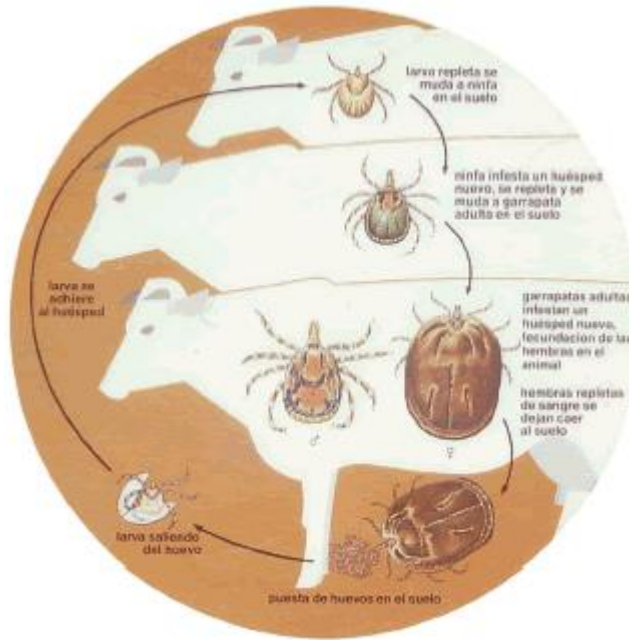


Fig. 2. Ciclo biológico de *A. cajennense* (Bayer Health-Care, 2014).

Las garrapatas del genero *Amblyomma* han sido registradas en 30 de los 32 estados de la República Mexicana, sin embargo, es la especie *A. cajennense* quien tiene la mayor distribución, además de ser una de las de mayor importancia para la industria ganadera (Pérez *et al.* 2014)

2.3.3 Descripción general del vector *O. megnini*

En México encontramos en forma importante y con amplia distribución a la garrapata del oído (*O. megnini*) representante de esta familia.

Esta garrapata se caracteriza porque su fase parásita (larva y ninfa) se lleva a cabo en el oído de los animales. Estos se infestan con pasturas contaminadas o por la presencia de larvas en las instalaciones, es por esto que incluso animales estabulados permanentemente pueden sufrir severas infestaciones. La duración de esta fase parásita puede ser de cinco a siete meses. Los adultos viven libremente, y se protegen en todo tipo de rendijas y huecos presentes en las instalaciones.

Esta argasida representa un peligro tanto para el ámbito veterinario como para el clínico, presentando una predilección por el canal auditivo, que puede resultar en una otoacariasis, con complicaciones de otitis externa, en el 90% de los casos existe dolor ótico, sin embargo, algunos casos pueden pasar asintomáticos, lo cual complica el grado de

infestación, entre otros síntomas pueden estar la parálisis facial y/o respiratoria; puede afectar a las personas con un alto contacto con animales de ganado, ya sean vacas, mulas, cabras, conejos y borregos (Cakabay *et al.* 2016) Además de ser un vector con sospecha de transmitir el agente la fiebre Q, *Coxiella burnetti* (Marrie, 1990).

La mayoría de las garrapatas argasidas son de hospederos múltiples, sin embargo, *O. megnini* prefiere tener ciclos de un solo hospedero. Los periodos de alimentación de las larvas pueden variar de 1 o varios días, cuando se encuentran repletas se liberan de su hospedero para realizar la muda, pero en algunas ocasiones las larvas pueden mudar sin haber realizado una ingesta sanguínea, existen varios estadios ninfales, y son estas etapas las comúnmente encontradas en el ganado, las ninfas de *O. megnini* pueden ser tan grandes como una garrapata ixodida adulta repleta (Fig. 3). A diferencia de muchas garrapatas ixodidas, *O. megnini*, puede tener múltiples ingestas sanguíneas y depositar lotes de huevos, lo que contrasta con la ovoposición única de muchas garrapatas (Walker *et al.* 2014)

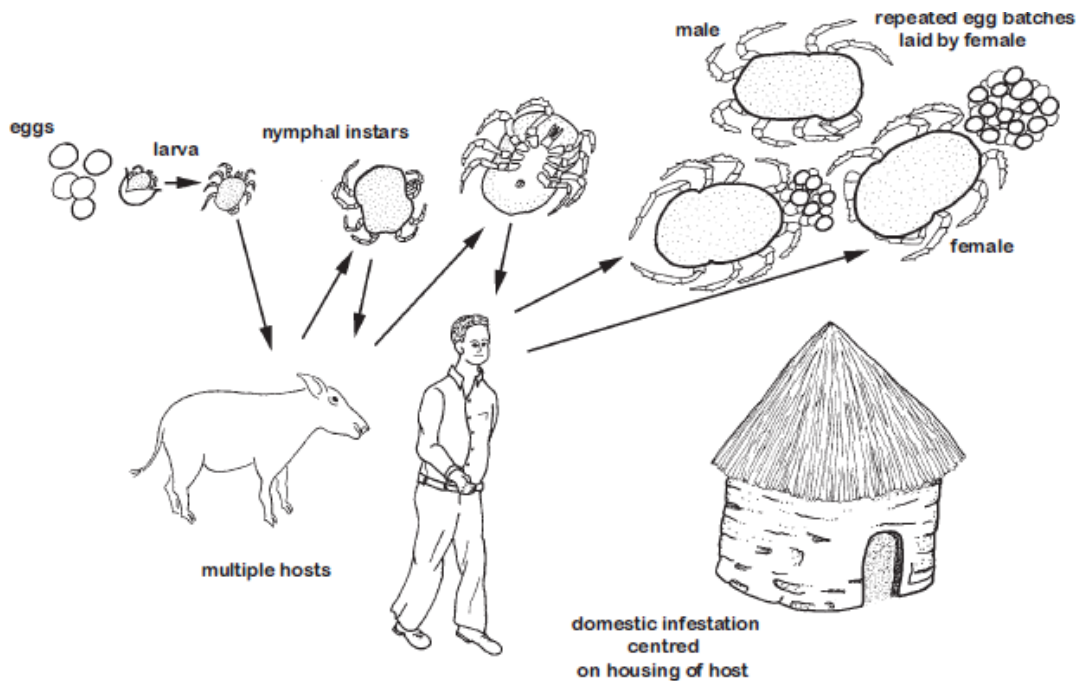


Fig. 3. Ciclo biológico de *O. megnini* (Walker *et al.* 2014)

2.4 Estudios de microbiota interna de garrapatas

Como se ha mencionado anteriormente es muy poca la información existente sobre la microbiota de las garrapatas. Hablando de los estudios realizados donde se analicen los microorganismos cultivables de estos ectoparásitos la información disminuye considerablemente.

En 1998 un estudio realizado en el Este de los Estados Unidos, demostró la presencia de diferentes cepas bacterianas en la microbiota de 43 garrapatas (16 estado ninfal y 27 adultos) de la especie *Ixodes scapularis*, en dicho estudio se obtuvo un total de 63 aislados, siendo solamente 44 de ellos los que pudieron ser identificados a nivel especie. Entre las especies encontradas se reportan 14 exclusivamente del interior de las garrapatas, *Bacillus insolitus*, *B. brevis*, *B. mascerans*, *B. megaterium*, *B. thuringiensis*, *B. pumilus*, *B. sphaericus*, *Pseudomonas diminuta* y *Stenotrophomonas maltophila* (Martin & Schmidtman, 1998).

En Australia se realizó un estudio en el 2003 para analizar la microbiota de diferentes artrópodos, como pulgas, piojos y garrapatas. Se realizaron aislamientos de cinco especies de garrapatas; *Rhipicephalus microplus* (11 adultos), *Ixodes holocyclus* (5 adultos), *Amblyomma trigutattum* (2 adultos), *Haemaphysalis longicornis* (2 adultos) y *Aponomma fimbriatum* (1 adulto). Se encontró una amplia diversidad de bacterias Gram positivas en su mayoría. Entre las bacterias reportadas para *I. holocyclus* se encontró *B. pumilus*, *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *Staphylococcus pasteurii*, *S. succinus*, *S. saprophyticus*, *S. xilosus*, *Stenotrophomas maltophila*, *Pseudomonas putida*, *Microbacterium lacticum*, *M. aurum* y *M. separdae*. En *A. trigutattum* se encontraron principalmente del genero *Bacillus*, *B. pumilus*, *B. cohnii*, *B. psychrophilus*, *B. megaterium* y *B. licheniformis*. En la garrapata *R. microplus* se encontró una amplia cantidad de bacterias entre las que resaltan *Staphylococcus chromogenes*, *S. auricularis*, *S. succinus*, *B. megaterium*, *B. halmapalus*, *B. cereus*, *M. testaceum*, *M. aborescens*, *M. oxydans*, *M. lacticum*, *Rhodococcus equi*, *Serratia proteamaculans*, *S. grimesii*,

Acinetobacter lwoffii y *A. junii* (Murrel *et al.* 2003). Encontrar diferencias en diversidad de especies bacterianas aisladas de las diferentes garrapatas nos señala una microbiota propia de cada especie de ectoparásito; contrario a esto, la similitud de especies bacterianas aisladas, dan paso a la suposición de una microbiota conservada intra e inter especies (Andreotti *et al.* 2011).

En 2004 un estudio realizado en Polonia, reportó aislados bacterianos de un total de 372 garrapatas (101 hembras, 122 machos y 149 ninfas) de la especie *I. ricinus*. Las garrapatas adultas fueron analizadas en grupos de dos ejemplares, mientras que las ninfas se analizaron en grupos de cinco individuos. Un total de 79 aislados pertenecientes a nueve géneros de bacterias Gram negativas fueron aisladas, de las cuales casi el 50% pertenece a *Pasteurella pneumotropica*, otros géneros reportados fueron *Pantoea agglomerans*, *S. marcescens*, *S. plymuthica*, *Aeromonas hydrophila*, *Burkholderia cepacia*, *Chromobacterium violaceum*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Stenotrophomonas maltophilia* (Stojek & Dutkiewicz, 2004).

En 2009 un estudio realizado en las áreas colindantes a la República Checa reportó la presencia de bacterias simbiotes aisladas de tres diferentes especies de garrapatas ixodidas, los especímenes se examinaron su estado larvario, ninfal o adulto (macho o hembra), de la especie *D. reticulatus* se analizaron una ninfa, ocho machos y diez hembras. De esta garrapata se obtuvieron 38 cepas la mayoría de ellas de los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus*, otros géneros identificados fueron *Staphylococcus* y *Kocuria*. De la garrapata *I. ricinus* se analizaron cinco larvas, diez ninfas, 14 machos y 13 hembras; se obtuvieron 67 cepas, la mayoría de ellas del género *Paenibacillus*, *Pseudomonas* y *Bacillus*, otros géneros reportados fueron *Rhodococcus* y *Dietzia*. Finalmente analizaron la especie *H. concinna*, los sujetos de estudio fueron diez ninfas, cinco machos y diez hembras, se aislaron 46 cepas bacterianas de las cuales la gran mayoría pertenecía a *Paenibacillus* y *Bacillus*, adicionalmente se reportaron *Frigoribacterium*, *Rahnella*, *Microbacterium*, *Plantibacter* y *Micrococcus*. El 87% de las cepas aisladas eran bacterias Gram positivas (Rudolf *et al.* 2009).

Un trabajo realizado en el Noreste de Hungría en el 2014 reportó el aislamiento de 116 cepas, obtenidas de 126 garrapatas de tres diferentes especies (*I. ricinus*, *D. reticulatus* y *H. concinna*) colectadas en seis diferentes sitios del país europeo. La gran mayoría de las garrapatas eran Gram positivas (89.7%), diez géneros (*Staphylococcus* 18.1%, *Micrococcus* 9.5%, *Bacillus* 7.8%, *Oceanobacillus* 6.9%, *Corynebacterium* 5.2%, *Propionibacterium* 4.3%, *Streptococcus-Pseudomonas-Sphingomonas-Streptomyces* 3.5%) comprenden el 65% de los aislados, se observó además que algunas especies pertenecientes a los géneros *Mycobacterium* y *Bacillus* son capaces de replicarse dentro del hospedero, además que la proporción de bacterias aisladas de las garrapatas aumenta en gran medida cuando los ectoparásitos se encuentran en un estado de repleción alimentaria (Egyed & Macrai, 2014).

En 2015, un trabajo realizado en Brasil, utilizó únicamente huevos de garrapatas para el aislamiento de bacterias, las garrapatas pertenecían a las especies *R. sanguineus*, *Anocentor nitens*, *I. scapularis* y *A. cajennense*. Las principales especies bacterianas encontradas fueron *S. marcescens*, *S. maltophilia*, *P. fluorescens*, *Enterobacter spp.*, *M. luteus*, *Ochrobactrum anthropi* y *B. cereus* (Machado-Ferreira *et al.* 2015).

Además de los trabajos realizados con bacterias cultivables, hay algunos trabajos que utilizan las herramientas moleculares para demostrar la presencia de microorganismos en garrapatas. Estos estudios demuestran que *Ixodes scapularis* (garrapata de patas negras) está relacionada con una gran variedad de simbiontes primarios y facultativos o secundarios como *Wolbachia*, *Ehrlichia*, *Rickettsia*, *Methylobacterium*, *Sphingomonas*, *Burkholderia* y *Bacillus* (Benson *et al.* 2004).

FLEs (Francisella-Like Endosymbionts) es un grupo de simbiontes de garrapatas que se encuentra en expansión, en la mayoría de los casos se encuentra asociada a los ovarios, pero existen reportes que sugieren su establecimiento en intestino y glándulas salivales (Ivanov *et al.* 2011). Recientes estudios respaldan la presencia de simbiontes en dichos órganos de la garrapata *R. microplus* además de una gran variedad de especies asociados a hemolinfa (*Staphylococcus aureus*, *S. chromogenes*, *Streptococcus dysgalactiae*,

Staphylococcus sciuri, *Serratia marcescens*, *Corynebacterium glutamicum* y *Finogoldia magna*) (Andreotti *et al.*, 2011).

Las interacciones simbióticas insecto-microorganismo generalmente ocurren en especies de insectos donde la ingesta de comida hace escasos algunos nutrientes esenciales. Estas asociaciones se han observado en insectos que se alimentan de madera, plumas, cabello y sangre (Cantwell, 1974). Lo anterior demuestra la importancia de la microbiota de las garrapatas por su tipo de dieta.

2.5 Retos de respuesta antagonista

Debido a la creciente resistencia a múltiples antibióticos por parte de las bacterias patógenas y el fuerte descenso de descubrimientos y desarrollo de nuevos antibióticos (Fishbach & Walsh, 2009), existe una continua necesidad de explorar nuevos nichos ecológicos en orden de encontrar moléculas capaces de combatir los microorganismos patógenos (Clardy *et al.* 2006; Singh *et al.* 2006). Se estima que del 1% de la diversidad microbiana descubierta, solamente un 10% se ha estudiado su capacidad de combatir cepas patógenas (Clardy *et al.* 2006).

Las fuentes para encontrar un posible productor de compuestos antimicrobianos son muy diversas, ya sea que provenga de fuentes marinas o materia sólida de basureros municipales (Gautam *et al.* 2013; Saha & Santra, 2014). Las bacterias en una relación de simbiosis son generalmente propuestas como fuertes candidatos para ser productores factibles de antibióticos (Proksch *et al.* 2002). Hasta el momento no se han evaluado la capacidad antagonista de los microorganismos componentes de la microbiota de garrapatas, por lo cual este nicho presenta una oportunidad más para observar las capacidades antagonistas.

Existen muchas técnicas para evaluar la actividad antimicrobiana, principalmente basados en la difusión en medios sólidos o semisólidos para inhibir el crecimiento de

microorganismos sensibles (Lertcanawanichakul & Sawangnop, 2008). La técnica de estría cruzada es un método sencillo y relativamente rápido para examinar la actividad antimicrobiana contra cualquier hongo, levadura o bacteria capaz de crecer en una placa de agar (Williston *et al.* 1947).

Varios investigadores coinciden que el método de estría cruzada revela efectos de inhibición más grandes que aquellos observados por el método de difusión en agar, sin embargo, la desventaja más evidente en el método de estría cruzada es la dificultad de obtener datos cuantitativos exactos, debido que los márgenes de inhibición son generalmente difusos o indistinguibles (Lertcanawanichakul & Sabagnop, 2008; Williston *et al.* 1947).

Sin embargo, a pesar de presentar dificultades para su cuantificación, la capacidad cualitativa que presenta para observar un potencial antimicrobiano, aunado a su rapidez y simplicidad coloca al método de estría cruzada como uno de los mejores para evaluar actividad antagonista (Lertcanawanichakul & Sabagnop, 2008; Saha & Santra, 2014).

2. JUSTIFICACIÓN

Las garrapatas son vectores de numerosas enfermedades, solo después de los mosquitos, son los principales vectores de importancia clínica y veterinaria. Transmiten los agentes de enfermedades como la ehrliquiosis, borreliosis, babesiosis, anaplasmosis y rickettsiosis, por mencionar algunas (Jongejan & Uilenberg, 2004).

Las garrapatas ocasionan pérdidas millonarias en la industria ganadera mundial (Grisi *et al.* 2002; SENASICA, 2014). Las garrapatas no solamente albergan patógenos, sino que dentro de ellas existe una amplia comunidad microbiana con algún tipo de relación simbiótica que puede afectar las características de las bacterias patógenas, incluidas su establecimiento y transmisión (Macaluso *et al.*, 2002; De la Fuente *et al.* 2003).

Sin embargo, a pesar de la importancia que presentan a nivel mundial en cuestión de salud humana y sobre todo en salud animal, los estudios realizados se enfocan principalmente en los microorganismos patógenos, dejando de lado los microorganismos simbiotes (Smith *et al.* 1978; Rahman & Rahman, 1980; Murrel *et al.* 2003). Por lo cual la importancia de este proyecto es determinar la microbiota de estos ectoparásitos y evaluar el posible efecto antagonista de estos endosimbiontes sobre bacterias patógenas de importancia clínica.

3. HIPÓTESIS

El ganado bovino es parasitado por diversas especies de garrapatas que presentan una microbiota interna; asociadas a órganos internos y hemolinfa; con la capacidad de mostrar algún grado de antagonismo contra cepas patógenas de importancia clínica.

4. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Identificar la microbiota cultivable de garrapatas de ganado bovino, además de evaluar su respuesta antagonista contra algunas cepas patógenas de importancia clínica.

5.2 Objetivos Particulares

5.2.1 Determinar la distribución de especies de garrapatas en las áreas de estudio.

5.2.2 Conocer la frecuencia de especies bacterianas cultivables dentro de las garrapatas colectadas.

5.2.3 Caracterizar macroscópica, microscópica y bioquímicamente las bacterias aisladas de los ectoparásitos.

5.2.4 Evaluar la respuesta antagonista de los aislamientos contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*.

5.2.5 Identificar las cepas aisladas por medio del equipo de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF).

5. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Área de estudio

Las garrapatas de este estudio fueron colectadas en seis localidades ganaderas, cuatro de ellas pertenecientes al estado de Nuevo León y las dos restantes al estado de Zacatecas (Fig.4). Los especímenes biológicos se mantuvieron vivos hasta el momento de la disección, se colocaron en una cámara húmeda a una temperatura de 24-26°C. Las garrapatas se procesaron en el Laboratorio de Patología Molecular, del Departamento de Zoología de Invertebrados, de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

6.1.1. Descripción general de Nuevo León

El estado de Nuevo León se encuentra localizado en la región noreste de la República Mexicana. Presenta una superficie de 64,220 Km², el 3.27% del país. El 68% del estado presenta clima seco y semiseco el 20% cálido subhúmedo se encuentra en la región perteneciente a la llanura costera del Golfo norte, el 7 % es templado subhúmedo y se localiza en las partes altas de la sierra y el restante 5% presenta clima muy seco hacia la Sierra madre Occidental. La temperatura media anual es alrededor de 20°C, la temperatura máxima promedio es de 32°C y se presenta en los meses de mayo a agosto, la temperatura mínima promedio es de 5°C y se presenta en el mes de enero. La precipitación media estatal es de 650 mm anuales, las lluvias se presentan en verano en los meses de agosto y septiembre.

El clima seco y semiseco que predomina en el estado es una limitante para la agricultura, sin embargo, se cultiva maíz, sorgo, trigo, frijol avena y cebada principalmente con riego. Se localiza en una región predominantemente semiárida, presenta condiciones geográficas que le permiten una vegetación diversa. Los matorrales ocupan más de la mitad de la superficie del estado, mientras que los bosques de coníferas y encinos se encuentran en las zonas altas. La agricultura ocupa 28% de la superficie del estado. Su fauna está compuesta de la siguiente manera; en el matorral: zorra gris, rata canguro, murciélagos, cuervo, pájaro carpintero, zopilote, águila real, víbora de cascabel, tortuga del desierto y

falso camaleón. En el bosque: gato montés, oso negro, musaraña, zorrillo, cacomixtle, ardilla, venado cola blanca, topo, ratón de campo y lechuza de campanario (INEGIa, 2015).

6.1.2. Descripción general de Zacatecas

El estado de Zacatecas se encuentra localizado en la región occidental de la República Mexicana. Cuenta con una superficie de 75,539 Km², es decir, el 3.84% de la superficie del país. El 73% de la entidad presenta clima seco y semiseco, el 17%, presenta clima templado subhúmedo y se localiza hacia el oeste del estado; el 6 % es muy seco se presenta hacia la región norte y noreste, el 4% restante presenta clima cálido subhúmedo y se encuentra hacia el sur y suroeste de la entidad. La temperatura media anual es de 17°C, la temperatura máxima promedio es alrededor de 30°C y se presenta en el mes de mayo, la temperatura mínima promedio es de 3°C y se presenta en el mes de enero. La precipitación media estatal es de 510 mm anuales, las lluvias se presentan en verano en los meses de junio a septiembre.

El clima seco y semiseco de la entidad es una limitante para la agricultura, ésta se practica de riego y temporal, siendo los principales cultivos: maíz, avena, trigo, frijol, chile, sorgo, nopal y durazno. Los matorrales abarcan la tercera parte de la superficie del estado; le siguen en extensión los pastizales y en las partes más elevadas los bosques de coníferas y encinos. Las zonas agrícolas abarcan 25% del territorio. La fauna se encuentra representada de la siguiente manera. En el desierto: coyote, pecarí, víbora de cascabel, liebre, conejo, zorra, carpintero desértico, lince, puma y rata canguro. En el bosque de pino y encino: trogón, zacatonero rayado, ardilla, musaraña y venado. En pastizal: tuza, zorra, tlalcoyote, musaraña, cascabel chilladora y lagartija de collar. Animales en peligro de extinción: berrendo y perrito de la pradera (INEGIb, 2015).

6.2 Cepas de referencia

Las cepas patógenas con las que se realizará la evaluación de la actividad antagonista; *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 13061, *Salmonella enteritidis*

ATCC 13076, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; fueron donadas por el Laboratorio de Microbiología Sanitaria y de Alimentos de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, a cargo del Dr. Arturo Espinoza Mata.

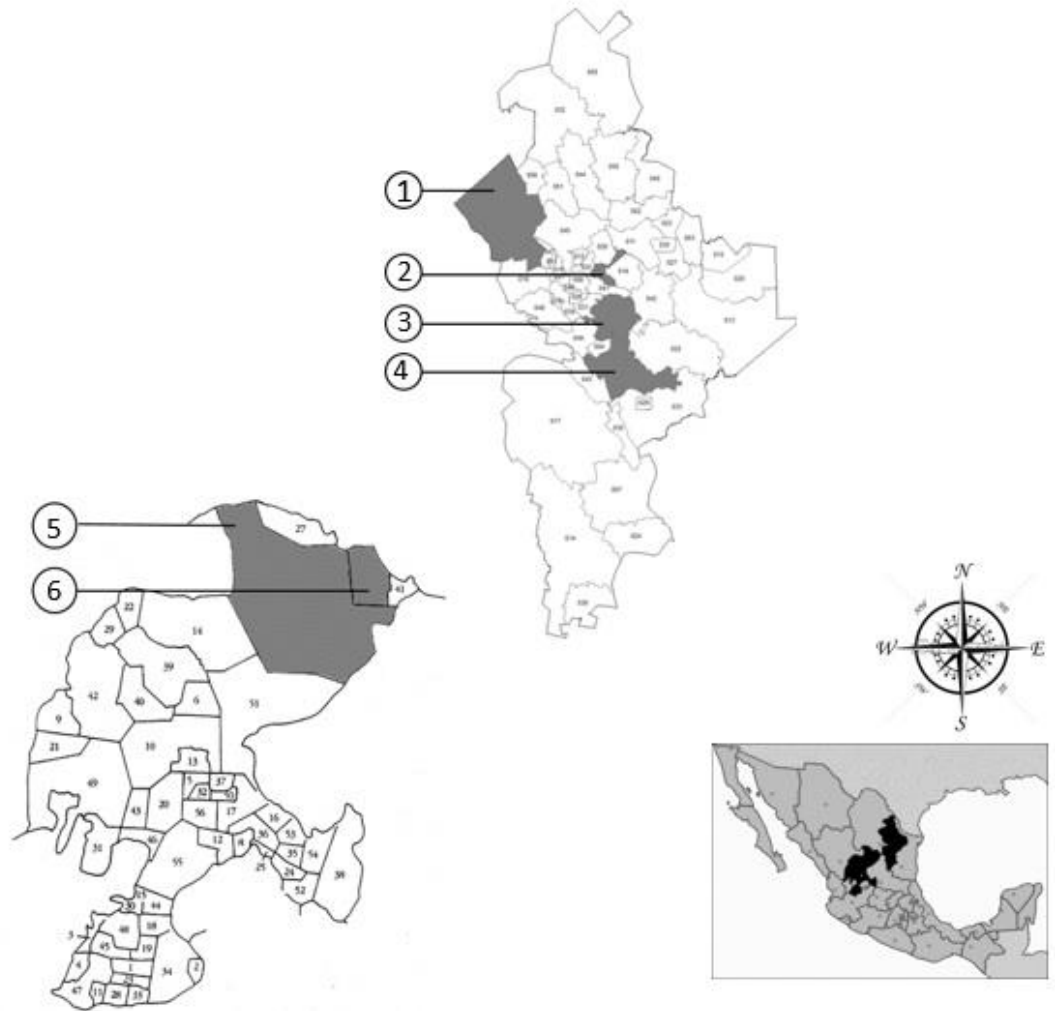


Fig. 4. Localidades de muestreos. En Nuevo León: 1) Mina, 2) Marín, 3) Cadereyta Jiménez y 4) Montemorelos; En Zacatecas: 5) Mazapil y 6) Concepción del Oro.

6.3 Identificación taxonómica de los ectoparásitos colectados

Previo al procesamiento para realizar el aislamiento de los simbiontes de las garrapatas, se realizará una identificación macroscópica basada en claves taxonómicas para diferenciar el sexo y especie de las garrapatas (Pratt & Littig, 1974).

6.4 Procesamiento de las muestras

6.4.1 Esterilización de la superficie externa de las garrapatas

Cada garrapata fue sometida a esterilización de superficie con formol 10% durante 10 minutos. Seguido de esto, se sumergieron en etanol al 70% durante 10 minutos. Finalmente, se lavaron en solución salina 0.85% por 1 minuto (Fig. 5) (Egyed & Macrai, 2014).

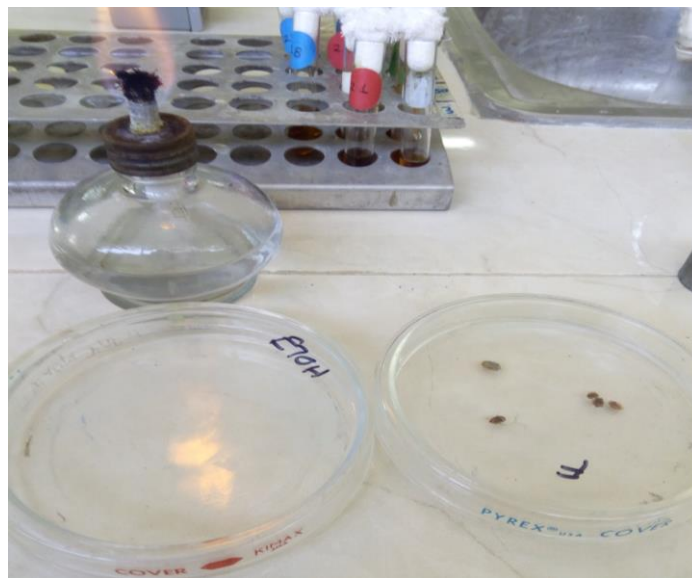


Fig. 5. Esterilización de superficie de las garrapatas colectadas

6.4.2 Obtención de órganos internos y hemolinfa para el aislamiento

Se depositó el cuerpo completo de los ectoparásitos en tubos de ensaye de 13x100 mm, conteniendo 2 mL de caldo infusión cerebro corazón (ICC), se utilizó una lanceta de disección de acero inoxidable esterilizado al fuego y etanol al 96% para realizar el corte y macerado de las garrapatas dentro del caldo ICC, con el objetivo de garantizar la mayor esterilidad posible. Para comprobar la efectividad del método de esterilización se dejó un ectoparásito sin macerar y tras 72 h de incubación se inoculó en una placa de agar sangre para verificar la inactivación de los microorganismos en la superficie (Fig. 6).

Los tubos se incubaron por 24 horas a 32°C, en orden de aumentar la cantidad de simbiontes presentes, para después ser inoculados por estría por agotamiento en placas de agar sangre 10%, se incubaron por un periodo máximo de siete días antes de ser descartadas. Una vez que las placas presenten crecimiento bacteriano se realizarán resiembras de cada colonia aislada con diferencias morfológicas en orden de obtener cultivos puros.

La inoculación y obtención de cultivos puros se realizarán dentro de campanas de flujo laminar para evitar cualquier contaminación (Anand *et al.* 2010).



Fig. 6. Verificación de esterilización de superficie. El microtubo de la izquierda muestra un artrópodo sin macerar tras el proceso de esterilización de superficie y una incubación por 72 h a 32°C, el microtubo de la derecha muestra la turbidez del medio por el crecimiento bacteriano tras 24 h a 32°C.

6.5 Caracterización morfológica y bioquímica de los aislamientos

Se documentó la morfología colonial macroscópica de las cepas aisladas, la cual incluyó datos como elevación, forma, superficie, coloración y capacidad hemolítica. Además, se realizó una tinción de Gram para observar la morfología microscópica de cada aislado. Finalmente, cada una de las cepas distintivas se sometieron a una serie de pruebas bioquímicas, para llevar a cabo su caracterización. Para esto se utilizó una suspensión

bacteriana de cultivos jóvenes (24 h) en solución salina al 0.85% con una concentración aproximada de 1.5×10^8 (0.5 en el índice de McFarland).

6.6 Evaluación de la actividad antagonista

A partir de cultivos de 24 horas en placas de agar sangre, se tomaron de 2-4 colonias discretas y se preparó una suspensión ajustada al tubo 0.5 del estándar de McFarland en PBS. En placas de agar sangre se colocó con un hisopo estéril una estría longitudinal 1 x 8 cm con la bacteria a evaluar en el centro de la placa, y se incubaron por 48 h a 35°C. Después del periodo de incubación, se realizaron con hisopos estériles canales para inocular las cepas patógenas. Se preparó del mismo modo una suspensión con la bacteria patógena y se sembró por estría simple atravesando la zona de la bacteria a evaluar por el canal previamente realizado. Después de 24 h se observaron los resultados con los criterios de inhibición marcada por un halo medido en mm, disminución de crecimiento bacteriano en la zona de contacto y la inhibición nula (Fig. 7) (Lertcanawanichakul & Sawagnop, 2008). Para cada cepa a evaluar se realizaron tres repeticiones contra las cepas patógenas.

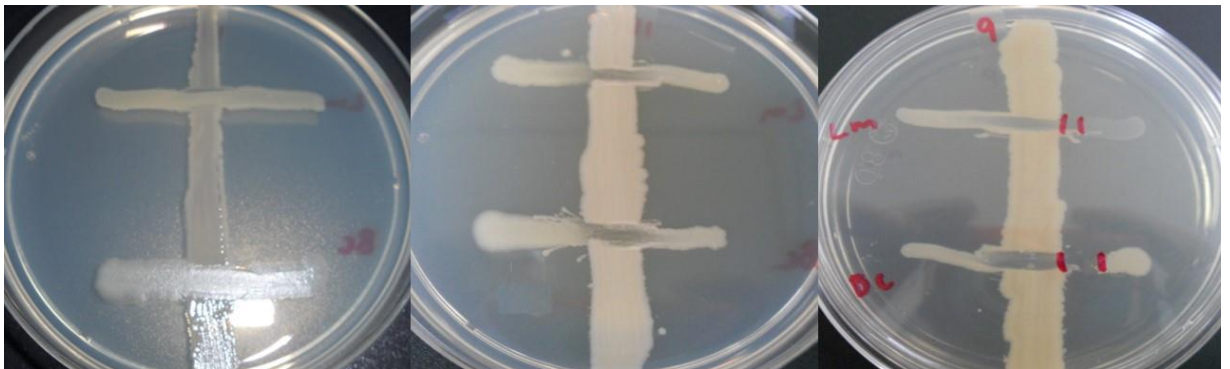


Fig. 7. Criterios de evaluación para los retos de antagonismo. Inhibición nula -, Disminución de crecimiento en la zona de contacto +, Inhibición positiva medida en mm.

6.7 Identificación de las cepas aisladas.

Las cepas distintivas fueron inoculadas en placas de agar TSA durante 24h a 32°C y posteriormente se enviaron al Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico de Alta Especialidad, dentro de los Servicios de Gastroenterología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, Monterrey, Nuevo León, México. Para su identificación por medio del equipo de Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz (MALDI-TOF) de Bruker® con el sistema Microflex LT/SH y el software MALDI-Biotyper.

6. RESULTADOS

7.1 Identificación taxonómica de los artrópodos colectados

Las garrapatas de este estudio fueron identificadas según a las características anatómicas de las siguientes estructuras y con base en diferentes claves taxonómicas (Pratt & Littig, 1974; Keirans & Litwak, 1989; Keirans & Durden, 1998; Walker *et al.* 2014).

Se identificaron tres especies, *Rhipicephalus microplus*, *Amblyomma cajennense*, pertenecientes a la familia *Ixodidae*, y *Otobius megnini*, de la familia *Argasidae*.

Rhipicephalus microplus (Canestrini, 1888)

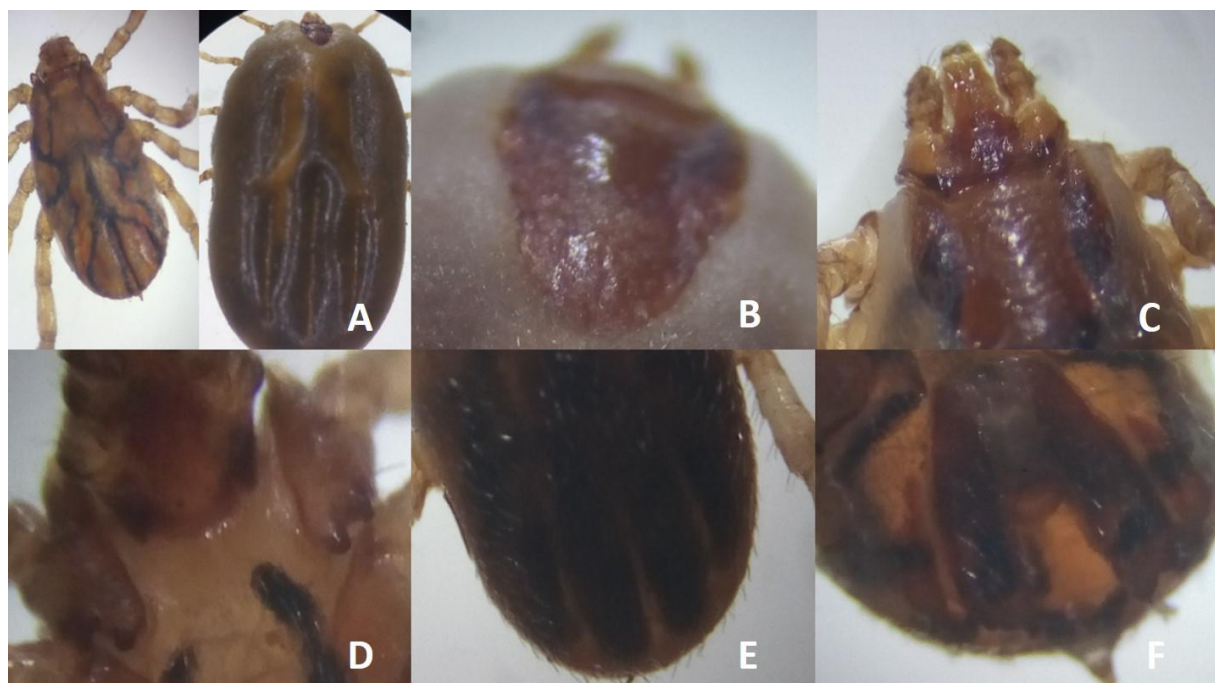


Fig. 8. Estructuras para identificación de *R. microplus*: A) Escudo cubriendo el dorsal del macho (izq) y la región dorsal anterior de la hembra (der), B) Ojos presentes, C) Base del capítulo hexagonal, D) Coxa I con espina doble, prominente y visible desde vista dorsal, E) Festones ausentes, F) Machos con placas ventrales y apéndice caudal.

Amblyomma cajennense (Fabricius, 1787)



Fig. 9. Estructuras para identificación de *A. cajennense*: A) Escudo moteado cubriendo la totalidad en el macho y la región anterior hembra, patrón de ornamentación característico, B) Surco anal posterior, C) Base del capítulo rectangular; palpos más largos que base del capítulo; ojos presentes, D) Festones presentes (11), E) Coxa I con doble espina, espina interna corta y externa media; Coxa II-IV con una sola espina.

Otobius megnini (Dugès, 1883)



Fig. 10. Estructuras para identificación de *O. megnini*. A) Sin escudo y con gnatostoma ventral Ojos ausentes, B) Hipostoma vestigial o atrofiado, C) Tegumento con espinas, D) Ambulacro ausente al final de las patas.

7.2 Garrapatas colectadas en las diversas localidades

Durante este estudio se colectaron 150 garrapatas, en seis localidades de dos estados del noreste y occidente de la República Mexicana, 25 ectoparásitos por sitio, correspondientes a tres diferentes especies; 90 de la especie *R. microplus*, 10 de *A. cajennense* y 50 *O. megnini*. Las garrapatas fueron colectadas entre los meses de julio-octubre del 2016. Los datos de las colectas se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Garrapatas colectadas en las diversas localidades

Garrapatas colectadas							
Estado	Nuevo León					Zacatecas	
Localidad	Mina	Marín	Cadereyta Jiménez	Montemorelos		Mazapil	Concepción del Oro
Especie	^a R. mic	^a R. mic	^a R. mic	^a R. mic	^b A. caj	^c O. meg	^c O. meg
Ninfas	0	0	0	0	0	25	25
Machos	0	0	2	3	3	0	0
Hembras	0	0	3	0	6	0	0
Hembras grávidas	25	25	20	12	1	0	0
Total	25	25	25	25		25	25

^a *R. microplus*

^b *A. cajennense*

^c *O. megnini*

7.3 Cepas bacterianas aisladas de las garrapatas de ganado bovino

7.3.1 Carga bacteriana de las diversas especies de garrapatas

De las 150 garrapatas muestreadas se lograron aislar 293 cepas bacterianas, aunque 160 de las cepas aisladas provienen de garrapatas de la especie *R. microplus* (54.60% de los aislamientos), es la especie *O. megnini* quien cuenta con la mayor proporción de infección bacteria/hospedero (2.34). Los datos de la carga bacteriana por especies se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Carga bacteriana de las tres especies de garrapatas colectadas.

Especie	No. de garrapatas muestreadas	No. de aislamientos	% de los aislamientos totales	Relación bacteria/hospedero
<i>R. microplus</i>	90	160	54.60%	1.77
<i>A. cajennense</i>	10	16	5.46%	1.6
<i>O. megnini</i>	50	117	39.94%	2.34
Total	150	293	100%	

7.3.2. Caracterización morfológica de los aislamientos bacterianos

De las 293 cepas aisladas se encontraron muchas similitudes entre las morfologías coloniales. De tal forma que las cepas bacterianas se clasificaron según su morfología colonial por forma, borde, textura, elevación, opacidad, tamaño, color, capacidad hemolítica, morfología microscópica y Gram. De esta forma los aislados se clasificaron en 15 morfologías. Las características de cada morfología se muestran en la Tabla 3. Se encontró que en la microbiota cultivable de las tres especies de garrapatas se encuentra una mayor diversidad de especies Gram negativas, además de una mayor incidencia de estas en los aislamientos totales. Es importante resaltar la presencia de cepas hemolíticas en la mayoría de las garrapatas muestreadas, un 83.3% de los ectoparásitos analizados mostraron al menos una cepa con hemólisis, como se muestra en la Tabla 4.

7.3.3 Caracterización bioquímica de los aislamientos bacterianos

Una vez que las cepas fueron clasificadas en diversas morfologías se tomaron algunos aislamientos para compararlas con otros con su misma morfología, pero de distintos sitios de muestreo, una vez establecida una bioquímica similar se procedió a realizar una caracterización bioquímica de las morfologías distintivas. Cabe resaltar la gran capacidad de producir proteasas de las cepas. Las pruebas bioquímicas realizadas y el comportamiento de las diversas cepas se muestran en la Tabla 5.

7.3.4 Evaluación de la actividad antagonista de las cepas aisladas

Las morfologías distintivas fueron evaluadas por el método de estría cruzada contra las cepas patógenas de *E. coli* ATCC 25922, *B. cereus* ATCC 13061, *S. enteritidis* ATCC 13076, *L. monocytogenes* ATCC 7644 y *S. aureus* ATCC 6538. Las cepas C y K son las que mostraron un mayor grado de antagonismo contra las bacterias patógenas. La primera contra las Gram negativas *E. coli* y *S. enteritidis*, mientras la última tuvo un mayor efecto contra las tres cepas Gram positivas. Los resultados de los retos de antagonismo se muestran en la Tabla 6. Los criterios de evaluación para la actividad antagonista son en base a la Fig. 7.

Tabla 3. Características morfológicas de los aislamientos

Morfologías	Forma	Borde	Textura	Elevación	Tamaño	Color	Opacidad	Hemolisis	^aM. mic.	Gram
A	Circular	Entero	Acuosa	Planas	Medio	Blanco	Brillante	No	Cocos	+
B	Irregular	Ondulado	Cerosa	Convexas	Grande	Blanco	Opaco	Si	Bacilos	+
C	Circular	Entero	Acuosas	Planoconvexas	Pequeño	Amarillo	Translucido	Si	Bacilos	-
D	Circular	Ondulado	Secas	Planas	Medio	Naranja	Opaco	No	Cocos	+
E	Circular	Entero	Acuosas	Pulvinadas	Medio	Blanco	Translucido	Si	Bacilos	-
F	Circular	Entero	Mucosas	Convexas	Medio	Blanco	Translucido	No	Bacilos	-
G	Circular	Entero	Creemosas	Convexas	Pequeño	Blanco	Brillante	No	Cocos	+
H	Circular	Ondulado	Cerosas	Umbonadas	Medio	Blanco	Opaco	No	Bacilos	-
I	Circular	Entero	Creemosas	Convexas	Pequeño	Amarillo	Brillante	No	Cocos	+
K	Circular	Entero	Creemosas	Elevadas	Medio	Rojo	Brillante	Si	Bacilos	-
L	Circular	Entero	Acuosas	Umbonadas	Medio	Blanco	Translucido	No	Bacilos	-
N	Circular	Entero	Acuosas	Planas	Medio	Blanco	Translucido	No	Bacilos	-
O	Circular	Entero	Acuosas	Planas	Pequeño	Blanco	Translucido	Si	Cocobacilos	+
R	Circular	Entero	Cerosas	Planoconvexas	Pequeño	Blanco	Opaco	No	Bacilos	-
S	Circular	Ondulado	Cerosas	Umbonadas	Pequeño	Amarillo	Opaco	No	Bacilos	-

^a Morfología microscópica

Tabla 4. Relación de actividad hemolítica y Gram por especie de garrapata

	Cantidad de cepas bacterianas		Garrapatas con cepas hemolíticas y no hemolíticas	
	G+/G-	%	^a H/ ^b NH	%
<i>R. microplus</i>	84/76	52.5/47.5	75/15	83.3/16.7
<i>A. cajennense</i>	10/6	62.5/37.5	6/4	60/40
<i>O. megnini</i>	49/68	41.9/58.1	44/6	88/12
Total	143/150	48.8/51.2	125/25	83.3/16.7

^a garrapatas con al menos una cepa hemolítica

^b garrapatas con ausencia de cepas hemolíticas

Tabla. 5. Características bioquímicas de los aislamientos

Pruebas bioquímicas																					
Cepas	NO ₃	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC	OX
A	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
B	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
C	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
D	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
E	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+
F	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
G	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
I	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-
L	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
O	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX
H	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
K	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
N	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
S	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
R	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 6. Evaluación de la capacidad de antagonismo de los aislamientos

Cepas a evaluar	Cepas patógenas				
	<i>E. coli</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>
A	-	-	+	+	-
B	+	+	-	-	2 mm
C	5 mm	8 mm	+	+	2 mm
D	-	-	-	-	-
E	-	-	-	5 mm	-
F	-	-	-	-	-
G	-	-	-	-	-
H	-	-	+	+	-
I	-	-	+	-	-
K	-	-	16 mm	18 mm	17 mm
L	-	-	-	-	-
N	+	+	-	-	-
O	-	-	-	-	-
R	-	-	-	+	+
S	-	-	-	-	-

Inhibición nula “-“, disminución en la zona de crecimiento “+”, inhibición positiva medida en mm.

*Los valores son un promedio de tres repeticiones

7.3.5. Identificación de las cepas aisladas por el equipo MALDI-TOF

La gran mayoría de las cepas fueron identificadas como microorganismos patógenos para el hombre y el ganado (Tabla 7). Aquellos con mayores apariciones dentro de los 293 aislamientos fueron *Staphylococcus chromogenes*, *Bacillus cereus*, *Burkholderia cepacia*, *Cronobacter sakazakii* y *Serratia marcescens* (Gráfico 1).

En cuanto a la relación de especies bacterianas por especie de garrapata los resultados fueron los siguientes, para *R. microplus* las especies más frecuentes fueron *S. chromogenes*, *B. cereus*, *B. cepacia* y *S. marcescens* (Gráfico 2), para *A. cajennense*, *B. cereus* y *A. pittii* (Gráfico 3), por último, para *O. megnini* fueron *B. cereus*, *B. cepacia* y *C. sakazakii* (Gráfico 4).

Tabla 7. Identidades de las cepas según la base de datos del MALDI-TOF

Cepas	Especie identificada	Score value	API ID*
A	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	1.97	NA*
B	<i>Bacillus cereus</i>	2.31	NA*
C	<i>Burkholderia cepacia</i>	2.36	<i>B. cepacia</i>
D	<i>Staphylococcus xylosus</i>	1.50	NA
E	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2.18	<i>S. maltophilia</i>
F	<i>Bacillus pumilus</i>	1.85	NA
G	<i>Staphylococcus hominis</i>	2.09	NA
H	<i>Escherichia vulneris</i>	1.73	<i>E. vulneris</i>
I	<i>Micrococcus luteus</i>	2.44	NA
K	<i>Serratia marcescens</i>	2.38	<i>S. marcescens</i>
L	<i>Acinetobacter pittii</i>	2.37	<i>A. baumannii</i>
N	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.38	<i>E. amnigenus</i>
O	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.41	NA
R	<i>Enterobacter aerogenes</i>	2.54	<i>E. aerogenes</i>
S	<i>Cronobacter sakazakii</i>	2.35	<i>Cronobacter</i> sp.

*Identificación según la base de datos del API WEB.

Tabla 8. Bacterias aisladas de importancia clínica o veterinaria

Especie	Importancia clínica o veterinaria	Referencia
<i>S. chromogenes</i>	Mastitis bovina	Thorberg <i>et al.</i> 2009
<i>B. cereus</i>	Oportunista clínico, abortos en bovinos	Bottone, 2010
<i>B. cepacia</i>	Patógeno oportunista, FQ, MDR	Mahenthiralingam <i>et al.</i> 2008
<i>S. xylosus</i>	Mastitis bovina	Bochniarz <i>et al.</i> 2014
<i>S. maltophilia</i>	Oportunista, MDR, IVU, Endocarditis, bacteriemias	Brooke, 2012
<i>B. pumilus</i>	Patógenos de plantas, Oportunista, bacteriemias	Kimouli <i>et al.</i> 2012
<i>S. hominis</i>	Patógeno oportunista, MDR	Ruiz de Gopegui <i>et al.</i> 2011
<i>E. vulneris</i>	Cateterismo, meningitis	Mohanty <i>et al.</i> 2005
<i>M. luteus</i>	Infecciones en pacientes inmunodeprimidos	Bonjar, 2004
<i>S. marcescens</i>	Patógeno oportunista, MDR	Maragakis <i>et al.</i> 2008
<i>A. pittii</i>	Patógeno oportunista, MDR	Wisplinghoff <i>et al.</i> 2012
<i>E. cloacae</i>	Emergente IVU MDR	Davin-Regli & Pagès, 2015
<i>E. faecalis</i>	Oportunista, IVU, bacteriemias	Zou & Shankar, 2016
<i>E. aerogenes</i>	Emergente IVU MDR	Davin-Regli & Pagès, 2015
<i>C. sakazakii</i>	Meningitis, septicemia en infantes	Parra <i>et al.</i> 2015

Grafico 1. Frecuencias bacterianas en la totalidad de las garrapatas muestreadas

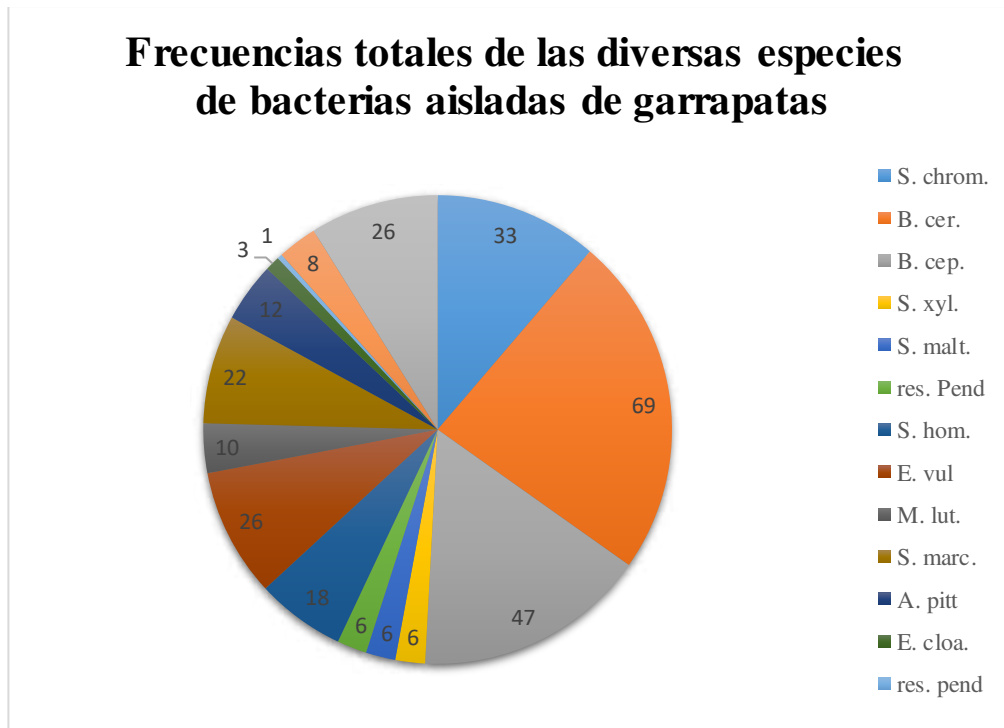


Grafico 2. Frecuencias de las especies bacterianas en *R. microplus*

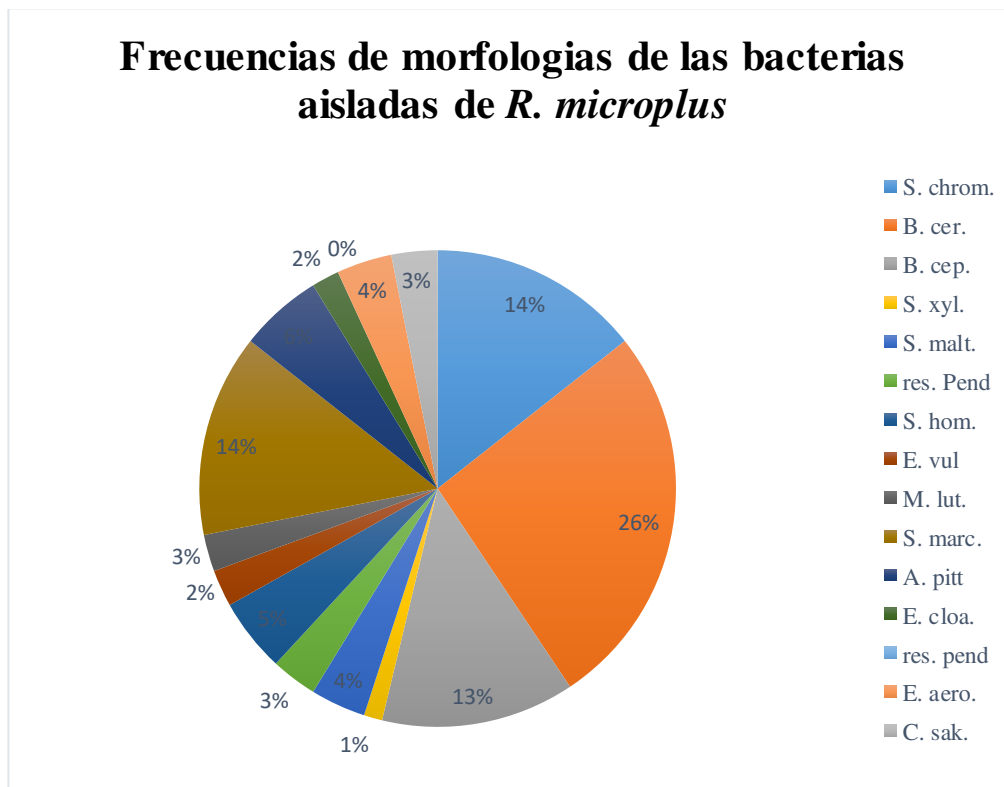


Grafico 3. Frecuencias bacterianas en *A. cajennense*

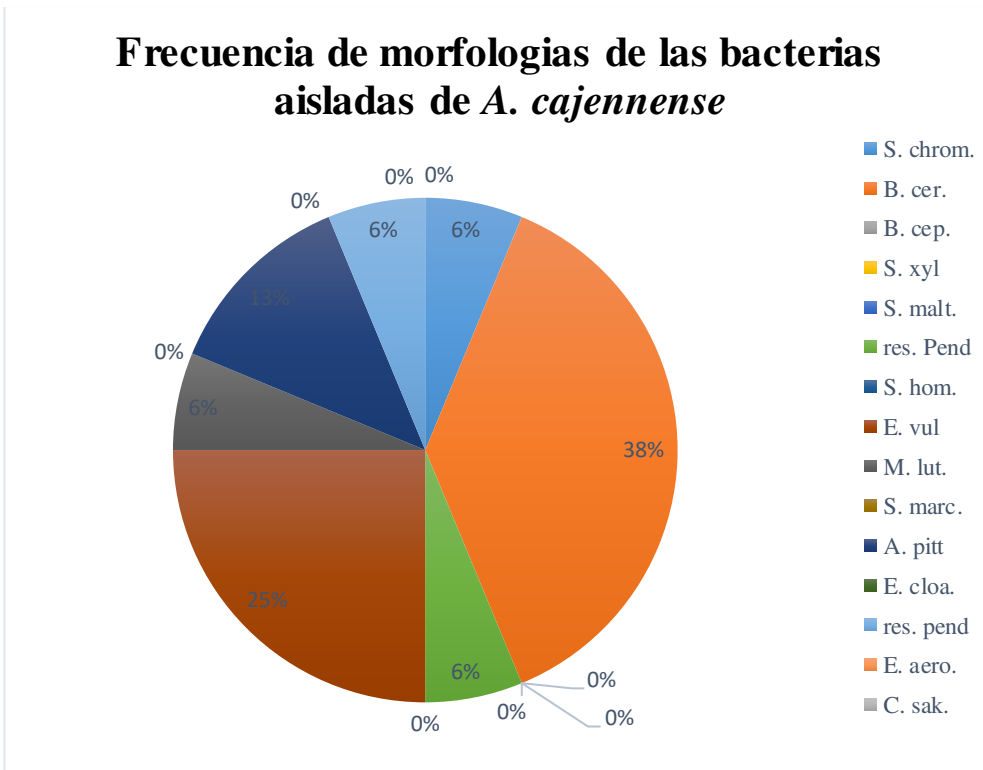
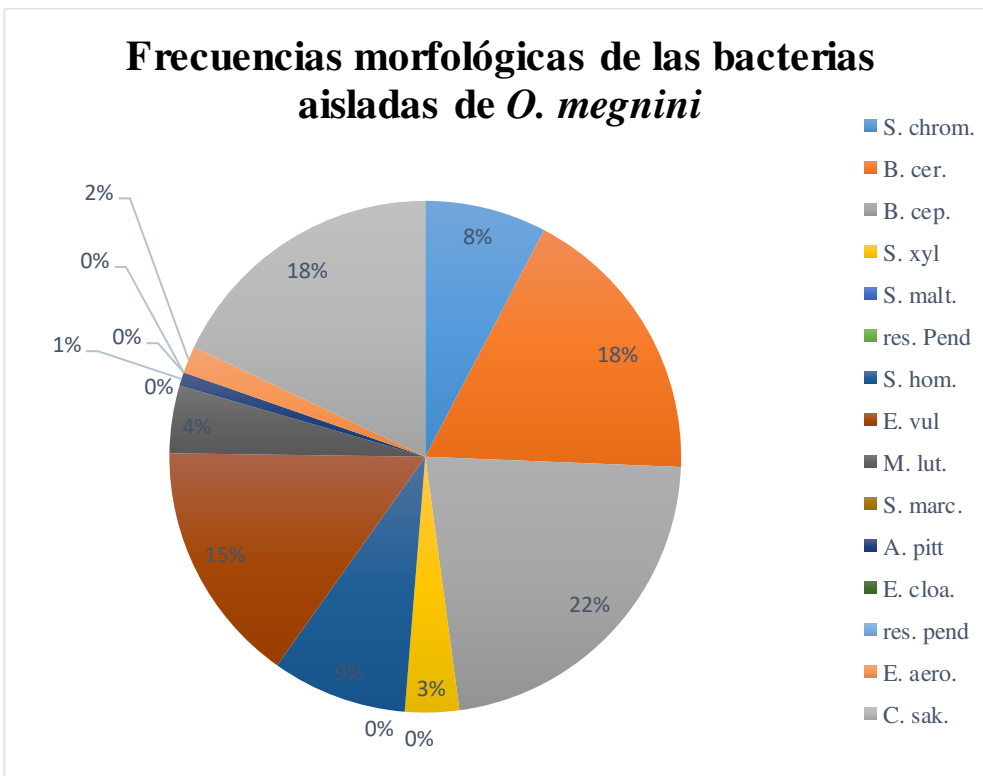


Grafico 4. Frecuencias bacterianas en *O. megnini*



7. DISCUSIÓN

En México se reportan alrededor de 88 especies de garrapatas ya sea ixodidas o argasidas. Entre las especies que más afectan el ganado bovino están *Rhipicephalus microplus*, *Amblyomma cajennense*, por parte de las ixodidas, y la garrapata espinosa de la oreja, *Otobius megnini*, por parte de las argasidas (SENASICA, 2015).

Sin duda, de estas tres especies de garrapatas, la que supone un mayor riesgo para la industria del ganado bovino es la ixodida *R. microplus*, vector de importantes agentes infecciosos para los bovinos, como *Babesia bovis*, *B. bigemina* y *Anaplasma marginale* (García-Vázquez, 2010; Merino *et al.* 2011).

Por su parte, *A. cajennense* se reporta como la especie del género *Amblyomma* con mayor distribución dentro de la República Mexicana, los estados donde existen mayores reportes para esta garrapata son aquellos de climas húmedos como Veracruz, Campeche, Yucatán y Tabasco, sin embargo, también se presenta en estados con climas más cálidos y áridos como Nuevo León y Sinaloa (Estrada-Peña *et al.* 2004).

Finalmente, *O. megnini*, es la especie de garrapatas blandas de mayor importancia para la industria ganadera en el país (Pérez *et al.* 2014), además de causar problemas de irritación, alergias, mionía, espasmos musculares y otitis severa; tiene ciclos de vida que pueden completarse en 120 días, y una alta resistencia a climas secos, además de soportar largos periodos de inanición (Diyes & Rajakaruna, 2017; Walker *et al.* 2014).

Durante este estudio se aislaron 293 cepas bacterianas, de tres especies de garrapatas, de las cuales solo una de ellas, *A. cajennense*, cuenta con reportes de microbiota bacteriana aislada de ocho garrapatas de 4 regiones de Brasil (Machado-Ferreira *et al.* 2015). El resto de las especies utilizadas en este estudio no tienen registro de su microbiota cultivable, a pesar de ser especies de gran importancia para la industria de ganado bovino, lo cual resalta la importancia de este trabajo por su originalidad e importancia a nivel nacional e internacional.

Aunque la mayoría de los aislamientos se realizaron de garrapatas de la especie *R. microplus*, fue *O. megnini* quien mostró una relación de infección mayor (2.34) según la cantidad de individuos analizados, lo anterior puede deberse principalmente a las

condiciones de localización de los ectoparásitos en los hospederos, ya que *O. megnini*, se presenta principal y de forma casi exclusiva en el canal auditivo de los bovinos (Diyes & Rajakaruna, 2017) el cual presenta un ambiente de humedad y calor, que puede beneficiar una mayor cantidad de bacterias para que sean ingeridas por la garrapata en sus múltiples ingestas, y que al ser una argasida de un solo hospedero puede propiciar un mejor establecimiento de esta microbiota, al aumentar la cantidad de exposiciones a un mismo microambiente. Sin embargo, se requieren de mayores estudios para confirmar lo anterior.

La microbiota de las tres garrapatas estudiadas, mostro una mayor diversidad de bacterias Gram negativas, además de una mayor cantidad de incidencias totales, a excepción de *A. pittii*, *C. sakazakii*, *E. vulneris* y *S. hominis*, todas las demás especies bacterianas han sido previamente reportadas para garrapatas de especies diferentes a las del estudio (Martin & Schmidtman, 1998; Murrell *et al.* 2003; Stojek & Dutkiewikz, 2004; Rudolf *et al.* 2009; Egyed & Makrai, 2014).

Todas las especies de bacterias aisladas son reportadas como patógenos de importancia clínica o veterinaria. Entre las bacterias Gram positivas se encuentran, *Staphylococcus chromogenes* y *S. xylosus*, ambos son estafilococos coagulasa negativos que junto con *S. epidermidis* y *S. simulans*, son parte de los microorganismos causantes de la mastitis bovina (Thorberg *et al.* 2009; Bochniarz *et al.* 2014). *Bacillus cereus*, un reconocido patógeno en pacientes con catéter, produce una gran cantidad de exotoxinas entre las cuales se encuentran cuatro tipos de hemolisinas, tres diferentes fosfolipasas, proteasas y toxinas eméticas (Bottone, 2010); además de estar asociado con casos de abortos en bovinos (Schuh & Weinstock, 1985). *S. hominis* se trata de un estafilococo, con capacidad de ser patógeno oportunista, con la principal característica de ser resistente a linezolid, un antibiótico de nueva generación utilizado contra Gram positivos resistentes a vancomicina y metilina (Ruiz de Gopegui *et al.* 2011). *M. luteus*, causa infecciones menores en pacientes con sistema inmune deprimido (Bonjar, 2004).

Las bacterias Gram negativas fueron, *B. cepacia*, una bacteria ambiental con la capacidad de fungir como patógeno oportunista, especialmente en personas con sistema inmune deficiente como los pacientes con fibrosis quística, en los últimos años el complejo del

cual forma parte (BCC) ha surgido como un problema en ambientes hospitalarios (Mahenthiralingam *et al.* 2008). *Stenotrophomonas maltophilia*, una bacteria Gram negativa conocida como MDR (multiple-drug resistant), en los últimos años ha tomado gran importancia por su incursión en infecciones en ambientes hospitalarios, se encuentra asociada a infecciones en vías urinarias, endocarditis, bacteriemias, meningitis, y aun cuando no es una bacteria con alta capacidad patogénica, es su capacidad de resistencia al medio ambiente y su alta resistencia a antibióticos lo que la hacen un microorganismo peligroso para la salud humana (Brooke, 2012). *Escherichia vulneris* es una enterobacteria relacionada con infecciones por cateterismo y meningitis (Mohanty *et al.* 2005). *Serratia marcescens*, una enterobacteria patógeno oportunista con la característica principal de haber adquirido resistencia múltiple a antibióticos (Maragakis *et al.* 2008). *A. pittii*, se encuentra dentro del complejo baumannii-calcoaceticus, de forma que es un patógeno MDR emergente (Wisplinghoff *et al.* 2012). *E. cloacae* y *E. aerogenes*, han sido prevalentes patógenos oportunistas MDR en las últimas tres décadas (Davin-Regli & Pagès, 2015). *C. sakazakii*, es una enterobacteria comúnmente asociada con meningitis y septicemia en infantes por su incidencia en fórmulas lácteas en polvo (Parra *et al.* 2015).

De las 293 cepas aisladas, 171 mostraron algún tipo de hemólisis, estas cepas se encontraron en el 80% de las garrapatas totales analizadas. Las cepas hemolíticas se encontraron presentes en todos los sitios de muestreo, de forma similar, con excepción de *S. marcescens* que solo se encontró en el municipio de Mina en las garrapatas *R. microplus*. Además de *B. cepacia* que fue la principal cepa hemolítica en Mazapil, en garrapatas de la especie *O. megnini*. Aunque se sabe que las garrapatas cuentan con una cascada de peptidasas que ayudan en la digestión de la hemoglobina (Horn *et al.* 2009), es posible que las bacterias hemolíticas aquí reportadas ayuden a que este proceso ocurra de forma más eficiente. Sin embargo, los únicos estudios referentes al efecto de la microbiota en la digestión de la sangre de un artrópodo hematófago son sobre mosquitos del género *Aedes* (Minard *et al.* 2013).

Pero la hemoglobina no es la única proteína presente en la sangre, el resto de las proteínas sanguíneas también podrían verse degradadas por las proteasas producidas por las tres de especies de *Staphylococcus*, *B. cereus*, *B. cepacia* y *S. marcescens*. Las cuales producen

una gran variedad de proteasas, además que estas cepas fueron las más recurrentes en todas las garrapatas muestreadas. El mecanismo de degradación de proteínas en el lumen intestinal aun no es bien conocido para las garrapatas (Hernández-Álvarez *et al.* 2000).

Actualmente existe una creciente resistencia por parte de los microorganismos patógenos hacia los antibióticos. De tal manera que es de gran importancia la búsqueda de nuevos microorganismos con actividad antagonista contra las principales cepas patógenas (Clardy *et al.* 2006; Singh *et al.* 2006 Fishbach & Walsh, 2009), Sin embargo, más importante aún, es entender el rol que juega la microbiota dentro de la garrapata, pues esta microbiota puede influir de manera significativa en el establecimiento de patógenos para el artrópodo, así como el establecimiento de los agentes infecciosos de los cuales la garrapata es vector.(Narasimhan & Fikrig, 2015). Las cepas de *S. marcescens*, *B. cepacia* y *S. maltophilia* mostraron un cierto grado de inhibición contra las cepas clínicas evaluadas. La primera de ellas presenta un metabolito secundario llamado prodigiosina con reconocida actividad antibacteriana, antifúngica, antimalárica, anticancerígena y antiprotozoaria (Kurbanoglu *et al.* 2015). *B. cepacia* es conocida por producir pirrolnitrina un compuesto antifúngico que afecta una gran variedad de hongos fitopatógenos (Schmidt *et al.* 2009), sin embargo, este compuesto podría ser capaz proteger a las garrapatas contra *Metarhizium anisopliae* el principal hongo entomopatógeno utilizado en el control biológico de estos artrópodos (Frazzon *et al.* 2000). Los resultados demuestran la amplia diversidad de la microbiota de las garrapatas, además del posible rol que esta puede tener en la fisiología de estas, de igual manera, las cepas aquí reportadas podrían servir como punto para un posible control biológico de los ectoparásitos.

8. CONCLUSIÓN

Se determinó la amplia distribución de la especie *R. microplus* dentro de las áreas de estudio, seguida de *O. megnini*. Este trabajo además amplía el escaso acervo de información referente a la microbiota bacteriana de las garrapatas al reportar por primera vez la microbiota cultivable de *R. microplus* y *O. megnini*, además de aumentar conocimientos sobre *A. cajennense*.

Las especies identificadas concuerdan con las previamente reportadas para garrapatas de especies distintas a las del estudio. Con la excepción de *A. pittii*, *C. sakazakii*, *E. vulneris* y *S. hominis*, los cuales se asocian por primera vez a garrapatas.

Se observó una alta frecuencia de cepas hemolíticas en los aislamientos, esto podría sugerir un rol nutricional dentro del artrópodo. Además, se comprobó la capacidad antagonista de cepas aisladas de garrapatas contra cepas de importancia clínica, una de ellas reconocida por sus metabolitos antifúngicos, que podrían ayudar a explicar un rol de protección en contra de hongos entomopatógenos.

9. PERSPECTIVAS

Evaluar la capacidad de antagonismo de las cepas aisladas contra *Cedecea lapagei* y *Metarhizium anisoplae*, microorganismos usado en el control biológico de garrapatas.

Evaluar la capacidad de antagonismo de las cepas aisladas contra microorganismos con resistencia múltiple a antibióticos.

Evaluar la capacidad de hemólisis de garrapatas en un estado de disbiosis de la microbiota.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Anand AAP, Vennison SJ, Sankar SG, Prabhu DG, Vasani PT, Raghuraman T, Geoffrey CJ and Vendan SE. 2010. Isolation and Characterization of Bacteria from the Gut of *Bombyx mori* that Degrade Cellulose, Xylan, Pectin and Starch and Their Impact on Digestion. *Journal of Insect Science* 10:107.
- Andreotti R, Pérez de León AA, Dowd SE, Guerrero FD, Bendele KG and Scoles G. 2011. Assessment of Bacterial Diversity in the Cattle Tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* through Tag-Encoded Pyrosequencing. *Biomed Central Microbiology*. 11:06.
- Bayer-HealthCare. 2014. Manual Bayer de la Garrapata. [Online] Disponible en: <https://www.sanidadanimal.bayer.com.mx/es/animales-productivos/bovinos/manuales-bayer/manual-bayer-de-la-garrapata.php>
- Benson M, Gawronsky J, Douglas AE and Benson D. 2004. Intracellular Symbionts and Other Bacteria Associated with Deer Ticks (*Ixodes scapularis*) From Nantucket Wellfleet, Cape Cod, Massachusetts. *Applied and Environmental Microbiology*, Jan. 2004, p. 616–620.
- Bochniarz M, Wawron W, Szczubial M, Brodzky P and Piech T. 2014. Characteristics of *Staphylococcus xylosus* Isolated from Subclinical Mastitis in Cows. *Annals of Animal Science*. 14 (4): 859–867.
- Bonjar GS. 2004. Evaluation of antibacterial properties of Iranian medicinal-plants against *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* and *Bordetella bronchiseptica*. *Asian Journal of Plant Science*. 3(1): 82-86.
- Bottone E. 2010. *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*. 23(2): 382–398.
- Brooke J. 2012. *Stenotrophomonas maltophilia*: An Emerging Global Opportunistic Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*. 25 (1): 1-41.

- Burgdorfer W, Sexton D, Gerloff RK, Anacker RL, Philip RN, and Thomas L. 1975. *Rhipicephalus sanguineus*: Vector of a New Spotted Fever Group Rickettsia in the United States. *Infection and Immunity*. 12:205–210.
- Bustamante ME and Varela G. 1947. IV. Estudios de fiebre manchada en México: papel del *Rhipicephalus sanguineus* en la transmisión de la fiebre manchada en la República Mexicana. *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales*. 8:139–141.
- Cakabay, T, Gokdogan, O and Kocyigit, M. 2016. Human otoacariasis: Demographic and clinical outcomes in patients with ear-canal ticks and a review of literature. *Journal of Otology*, 11(3), 111-117.
- Center for Disease Control and Prevention (CDC). 2012. Other Tick-borne Spotted Fever Rickettsial Infections. [Online]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/otherspottedfever>
- Center for Disease Control and Prevention (CDC). 2015. Rickettsial (Spotted & Typhus Fevers) & Related Infections (Anaplasmosis & Ehrlichiosis). [Online] Disponible en : <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2016/infectious-diseases-related-to-travel/rickettsial-spotted-typhus-fevers-related-infections-anaplasmosis-ehrlichiosis>
- Clardy J, Fishbach A and Walsh T. 2006. New antibiotics from bacterial natural products. *Nature Biotechnology*. 24:1541-1550.
- Cantwell GE. 1974. *Insect Diseases Vol 2*. Marcel Dekker Publishers. Insect Pathology Laboratory.
- Cruz-Ceballos F. 2009. *Garrapatas Clínica de los Bovinos I*. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Dantas-Torres F. 2010. Biology and Ecology of the Brown Dog Tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & Vectors*.

- Davin-Regli A and Pagès JM. 2015. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Frontiers in Microbiology*, 6; 392:1-10.
- De la Fuente J, Blouin E and Kocan K. 2003. Infection Exclusion of the Rickettsial Pathogen *Anaplasma marginale* in the Tick Vector *Dermacentor variabilis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, January, p. 182–184.
- De la Fuente J, Estrada- Peña A, Venzal J, Kocan K and Sonenshine D. 2008. Overview: Ticks as Vectors of Pathogens that Cause Disease in Humans and Animals. *Frontiers in Bioscience* 13, 6938-6946.
- Demma L, Traeger M, Nicholson W, Paddock C, Blau D, Eremeeva M E, Dasch GA, Levin, Singleton, Zaki M, Cheek J, Swerdlow D and McQuiston J. 2005. Rocky Mountain Spotted Fever from an Unexpected Tick Vector in Arizona. *New England Journal of Medicine*. 353:587–594.
- Diyes GCP and Rajakaruna RS. 2016. Life cycle of spinose ear tick, *Otobius megnini* (Acari: Ixodidae) infesting the race horses in Nuwara Eliya, Sri Lanka. *Acta Tropica*. 166: 164-176.
- Edwards K, Goddard J and Varela-Stokes S. 2009. Examination of the Internal Morphology of the Ixodid Tick, *Amblyomma maculatum*. Koch, (Acari: Ixodidae); a “How-to” Pictorial Dissection Guide. *Midsouth Entomologist* 2: 28–39. ISSN: 1936-6019.
- Egyed L, Makrai L (2014) Cultivable internal bacterial flora of ticks isolated in Hungary. *Exp Appl Acarol* 63:107-122.
- Estrada-Peña A, Guglielmone AA. and Mangold AJ. 2004. The distribution and ecological ‘preferences’ of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae), an ectoparasite of humans and other mammals in the Americas. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, Vol. 98, No. 3, 283–292.

- Fishbach A and Walsh T. 2009. Antibiotics for Emerging Pathogens. *Science* 325:1089-93.
- Frazzon APG, Junior IDSV, Masuda A, Schrank A and Vainstein MH. 2000. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary parasitology*, 94(1), 117-125.
- García-Vázquez Z. 2010. Garrapatas que afectan el ganado bovino y enfermedades que transmiten en México. Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícola y Pecuarias, (CENID-PAVET-INIFAP).
- Gautam K, Prasanna J, Mahadevan G, Mahendran S and Sahu SK. 2013. Isolation, Identification of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* gr1 from Marine Sediments and Screening of its Antibacterial Potential. *International Journal of Recent Scientific Research*. Vol. 4, Issue, 5, pp. 536- 542.
- Grisi L, Massard CL, Moya-Borja GE and Pereira JB. 2002. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *A Hora Veterinária*, 21:8-10.
- Hernández Álvarez HM, Mendiola Martínez J, Fernández-Caliènes A and Valdéz M. 2000. Identificación de una proteasa neutra en intestino de *Boophilus microplus* por electroforesis en geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 52(3), 165-169.
- Horn M, Nussbaumerová M, Šanda M, Kovářová Z, Srba J, Franta Z, Sojka D, Bogyo M, Caffrey C, Kopáček P and Mareš M. 2009. Hemoglobin digestion in blood-feeding ticks: mapping a multipeptidase pathway by functional proteomics. *Chemistry & biology*, 16(10), 1053-1063.
- INEGIa. 2015. Información por entidad. Estado de Nuevo León. [Online] Disponible en: <http://cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/nl/default.aspx?tema=me&e=19>

- INEGib. 2015. Información por entidad. Estado de Zacatecas. [Online] Disponible en: <http://cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/zac/default.aspx?tema=me&e=32>
- Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). 2000. Enfermedades Exóticas de los Animales. United States Animal Health Association. Mexico. Pp. 202-210.
- Institute for International Cooperation in Animal Biologics (IICAB). 2007. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* garrapata del ganado del sur, garrapata del ganado bovino. Iowa State University College of Veterinarian Medicine.
- Ishikawa, H. 2003. Insect Symbiosis: An Introduction. Pp. 1-22. En: Insect Symbiosis. (K. Bourtzis & T. Miller eds.) CRC Press, Boca Raton.
- Ivanov I, Mitkova N, Reye A, Hübschen J, Vatcheva-Drochevsca R, Dobрева E and Muller C. 2011. Detection of New Francisella-Like Tick Endosymbionts in *Hyalomma spp* and *Rhipicephalus spp*. (Acari: Ixodidae) from Bulgaria. Applied Environmental Microbiology. August vol. 77 no. 15 5562-5565.
- Jongejan F and Uilenberg G. 2004. The Global Importance of Ticks. Parasitology 129: S3–S14.
- Junquera P. 2015. Garrapatas *Amblyomma* en el ganado, caballos, perros y gatos: Biología Prevención y Control. [Online] Disponible en : http://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=57&Itemid=110.
- Keirans JE and Litwak TR. 1989. Pictorial key to the adults hard ticks. Family Ixodidae (Ixodida: Ixodidae), east of the Mississippi River. Journal of Medical Entomology; 26 (5): 435-448.
- Keirans JE and Durden LA. 1998. Illustrated Key to Nymphs of the Tick Genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) Found in the United States. Journal of Medical Entomology. 35(4): 489-495.

- Kimouli M, Vrioni G, Papadopoulou M, Koumaki V, Petropoulou D, Gounaris A, Friedrich A and Tsakris, A. 2012. Two cases of severe sepsis caused by *Bacillus pumilus* in neonatal infants. *Journal of medical microbiology*, 61(4): 596-599.
- Koneman E and Allen S. 2008. *Diagnóstico Microbiológico*. 6ta edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Pp. 1362-1372.
- Kurbanoglu EB, Ozdal M, Ozdal OG and Algur OF. 2015. Enhanced production of prodigiosin by *Serratia marcescens* MO-1 using ram horn peptone. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 631-637.
- León-Artozqui M. 2011. Garrapatas (Ixodidae) I: Anatomía, biología y Ecología. *Rincón Focus Technical Assistance - Focus núm. 18*.
- León-Clavijo M and Hernández-Rojas E. 2012. Descripción de la proteína Bm86, polimorfismo y su papel como inmunógeno en el ganado bovino infestado por garrapatas. *NOVA. Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*. Vol. 10:17. Revista Online. Disponible en: <http://unicolmayor.edu.co/publicaciones/index.php/nova/article/view/196/392>
- Lertcanawanichakul M and Sawangnop S. 2008. A Comparison of Two Methods Used for Measuring the Antagonistic Activity of *Bacillus* Species. *Walailak Journal of Science and Technology*. 5:161-71.
- Macaluso K, Sonenshine D, Ceraul S and Azad A. 2002. Rickettsial Infection in *Dermacentor variabilis* (Acari:Ixodidae) Inhibits Transovarial Transmission of a Second *Rickettsia*. *Journal of Medical Entomology*, 39(6):809-813.
- Machado-Ferreira E, Vizzoni VF, Piesman J, Gazeta GS and Soares CAG. 2015. Bacteria associated with *Amblyomma cajennense* tick eggs. *Genetics and Molecular Biology*, 38, 4, 477-483.
- Madigan M, Martinko J, Stahl D and Clark D. 2011. *Brock Biology of Microorganisms*. 13th edition. Pp. 989-991.

- Mahenthiralingam E, Baldwin A and Dowson CG. 2008. *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. *Journal of Applied Microbiology*. 104 (6): 1539–1551.
- Maragakis LL, Winkler A, Tucker MG, Cosgrove SE, Ross T, Lawson E, Carroll KC and Perl, T. M. 2008. Outbreak of multidrug-resistant *Serratia marcescens* infection in a neonatal intensive care unit. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 29(05), 418-423.
- Marrie T. 1990. Q Fever: The Disease Vol. 1. CRC Press. Pp.38-50.
- Martin PA and Schmidtman ET. 1998. Isolation of Aerobic Microbes from *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae), the Vector of Lyme Disease in the Eastern United States. *Journal of Economic Entomology* 91:864–868.
- Merino O, Almazán C, Canales M, Villar M, Moreno-Cid JA, Estrada-Peña A, Kocan KM and de la Fuente, J. 2011. Control of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* infestations by the combination of subolesin vaccination and tick autocidal control after subolesin gene knockdown in ticks fed on cattle. *Vaccine*, 29(12), 2248-2254.
- Minard G, Mavingui P and Moro CV. 2013. Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasites & vectors*, 6(1), 146.
- Mohanty S, Chandra SP, Dhawan B, Kapil A, Das BK. 2005. Meningitis due to *Escherichia vulneris*. *Neurology India*; 53(1):122-3.
- Murrell A, Dobson S, Yang X, Lacey E and Barker S. 2003. A Survey of Bacterial Diversity in Ticks, Lice and Fleas from Australia. *Parasitology Research* (2003) 89: 326–334.
- Narasimhan S and Fikrig E. 2015. Tick microbiome: the force within. *Trends in parasitology*, 31(7), 315-323.
- Nayak AP, Green BJ and Beezhold DH. 2013. Fungal Hemolysins. *Medical Mycology*. 2013 January; 51(1): 1–16.

- Noda H, Munderloh U and Kurtti T. 1997. Endosymbionts of Ticks and Their Relationship to *Wolbachia* spp., and Tick-Borne Pathogens of Humans and Animals. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 63 No. 10.
- Parra J, Oliveras L, Rodríguez A, Riffo F, Jackson E and Forsythe S. 2015. Riesgo de contaminación por *Cronobacter sakazakii* en leches en polvo para la nutrición de lactantes. Revista Chilena de Nutrición, 42, 83-89.
- Pérez T, Guzmán-Cornejo C, Montiel-Parra G, Paredes-León R and Rivas G. 2014. Biodiversidad de ácaros en México. Revista Mexicana de Biodiversidad, Supl. 85: S399-S407.
- Pratt H and Littig K. 1974. Ticks of Public Health Importance and Their Control. US Department of Health, Education and Welfare. Center for Disease Control. Atlanta, Georgia.
- Phillip RN and Casper E. 1981. Serotypes of Spotted Fever Group Rickettsiae Isolated from *Dermacentor andersoni* (Stiles) Ticks in Western Montana. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 30:230-238.
- Proksch, P, Edrada R, Ebel, R. 2002. Drugs from the Seacurrent Status and Microbiological Implications. Applied Microbiology and Biotechnology, 59: 125-134.
- Rahman MH and Rahman MM. 1980. Occurrence of Some Bacterial Isolates in Ticks Found in Madhupur Forest Area. Bangladesh Veterinary Journal. 1980, 14:43-47.
- Rodríguez-Vivas R, Alonso-Díaz M, Ojeda-Chi M, Rosado-Aguilar A. 2011. Control Integrado de Garrapatas. UNAM.
- Rudolf I, Mendel J, Sikutová S, Svec P, Masari'kova' J, Nova'kova' D, Bunkova' L, Sedla'cek I and Huba'lek Z. 2009. 16S rRNA Gene-Based Identification of Cultured Bacterial Flora from Host-Seeking *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* and *Haemaphysalis concinna* Ticks, Vectors of Vertebrate Pathogens. Folia Microbiológica. 54:419-428.

- Ruiz de Gopegui E, Marinescu CL, Diaz P, Socías A, Garau M, Ayestarán I, Pareja A, Gallegos MC, Pérez J and Oliver A. 2012. Nosocomial spread of linezolid-resistant *Staphylococcus hominis* in two hospitals in Majorca. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 29 (5): 339–344.
- Sacchi L, Bigliardi E, Corona S, Beninati T, Lo N and Franceschi A. 2004. A Symbiont of the Tick *Ixodes ricinus* Invades and Consumes Mitochondria in a Mode Similar to the Parasitic Bacterium *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Tissue & Cell* 36, 43–53.
- Saha A and Santra SC. 2014. Isolation and Characterization of Bacteria Isolated from Municipal Solid Waste for Production of Industrial Enzymes and Waste Degradation. *Journal of Microbiology and Experimentation*. Vol 1:1.
- Schmidt S, Blom JF, Pernthaler J, Berg G, Baldwin A, Mahenthiralingam E and Eberl L. 2009. Production of the antifungal compound pyrrolnitrin is quorum sensing-regulated in members of the *Burkholderia cepacia* complex. *Environmental microbiology*, 11(6), 1422-1437.
- Schuh J, Weinstock D. 1985. Bovine abortion caused by *Bacillus cereus*. *Journal American Veterinary Medical Association*. 187(10):1047-8.
- Scoles G. 2004. Phylogenetic Analysis of the Francisella-like Endosymbionts of *Dermacentor* Ticks. *Journal of Medical Entomology*: 41(3): 277-286.
- Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA).2015. Garrapata *Boophilus* spp. [Online] Disponible en : <http://www.senasica.gob.mx/?id=4373>
- Singh LS, Indra B and Bora TC. 2006. Actinomycetes of Loktak Habitat: Isolation and Screening for Antimicrobial Activities. *Biotechnology* 2006; 5:217-21.
- Smith RD, Brener J, Osorno M and Ristic M. 1978. Pathobiology of *Borrelia theileri* in the Tropical Cattle Tick *Boophilus microplus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 32, 182-190.

- Solorio-Rivera JL, Rodríguez-Vivas RI, Pérez-Gutierrez E y Wagner G. 1999. Management Factors Associated with *Babesia bovis* Seroprevalence in Cattle from Eastern Yucatan, México. *Preventive Veterinary Medicine*. 11, 40 (3-4): 261-9.
- Stojek NM and Dutkiewicz J. 2004. Studies on the Occurrence of Gram-Negative Bacteria in Ticks: *Ixodes ricinus* as a Potential Vector of *Pasteurella*. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 11:319–322.
- Thorberg BM, Danielsson-Tham ML, Emanuelson U, Persson Waller K. 2009. Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci. *Journal Dairy Science*. (10):4962-70.
- Walker A, Bouattour A, Camicas J, Estrada-Peña A, Horak I, Latif A, Pegram R and Preston P. 2014. Ticks of Domestic Animals in Africa: A Guide to Identification of Species. 2nd Edition. Bioscience Reports, Edinburgh Scotland, U.K.
- Williston E, Zia-Walrath P and Youmans G. 1947. Plate Methods for Testing Antibiotic Activity of Actinomycetes Against Virulent Human Type Tubercle Bacilli. *Journal of Bacteriology* 1947; 54:563–68.
- Wisplinghoff H, Paulus T, Lugenheim M, Stefanik D, Higgins PG, Edmond MB, Wenzel R and Seifert H. 2012. Nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii* and *Acinetobacter nosocomialis* in the United States. *Journal of Infection*, 64(3), 282-290.
- Zou J and Shankar N. 2016. The opportunistic pathogen *Enterococcus faecalis* resists phagosome acidification and autophagy to promote intracellular survival in macrophages. *Cellular microbiology*. 18(6): 831–843.

12. RESUMEN BIOGRÁFICO

Eliud Alonso Lucero Velasco

**Candidato para el grado de
Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología**

**Tesis: ANTAGONISMO DE LA MICROBIOTA INTERNA CULTIVABLE
AISLADA DE GARRAPATAS DEL GANADO BOVINO CONTRA
BACTERIAS DE IMPORTANCIA CLÍNICA**

Campo de estudio: Ciencias exactas

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León, el 30 de enero de 1992, hijo de Sergio Lucero Delgado y Celia Velasco Delgado.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido de Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2014.

Experiencia profesional: Breve periodo (menor a 6 meses) en un laboratorio de análisis clínicos.