



CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

Artículo original de investigación

Interacción de la microbiota de la garrapata *Rhipicephalus microplus* con el patógeno *Anaplasma marginale*

Lianet Abuin Denis ¹ <https://orcid.org/0009-0008-1305-3650>
Elianne Piloto Sardiñas ² <https://orcid.org/0000-0002-6926-2194>
Belkis Corona González ² <https://orcid.org/0000-0002-2302-5361>
Alina Rodríguez Mallon ¹ <https://orcid.org/0000-0002-6950-6793>
Alejandro Cabezas Cruz ³ <https://orcid.org/0000-0002-8660-730X>
Lourdes Mateos-Hernández ³ <https://orcid.org/0000-0001-9566-7710>
Alejandra Wu-Chuang ³ <https://orcid.org/0000-0002-6020-2128>
Dasiel Obregón ⁴ <https://orcid.org/0000-0002-5786-1114>
Apolline Maitre ³ <https://orcid.org/0000-0002-5586-9569>
Angélique Foucault-Simonin ³ <https://orcid.org/0000-0002-3712-9946>
Roxana Marrero-Perera ² <https://orcid.org/0000-0002-0864-8034>
Lisset Roblejo Arias ² <https://orcid.org/0000-0002-3246-1026>
Cristian Díaz-Corona ² <https://orcid.org/0000-0002-2035-1663>
Mario Pablo Estrada García ¹ <https://orcid.org/0000-0002-9776-719X>
Luis Méndez Mellor ⁵ <https://orcid.org/0000-0003-3121-598X>
Karolína Svobodová ⁶ <https://orcid.org/0000-0003-3058-4070>
Alier Fuentes Castillo ⁵ <https://orcid.org/0000-0001-9761-3601>
Rafmary Rodríguez Fernández ⁵ <https://orcid.org/0000-0003-2102-2391>
Frank Luis Ledesma ¹ <https://orcid.org/0000-0002-1419-8148>
Patrícia Gonzaga Paulino ⁷ <https://orcid.org/0000-0001-9326-7609>
Yamil Bello Soto ¹ <https://orcid.org/0000-0003-0394-8561>
Anays Álvarez Gutierrez ¹ <https://orcid.org/0009-0001-1141-8352>

¹ Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. La Habana, Cuba

² Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. Mayabeque, Cuba

³ Agencia Nacional de Seguridad Sanitaria, Instituto Nacional de Investigaciones para la Agricultura, la Alimentación y Medio Ambiente, Unidad Mixta de Investigación de Biología Molecular y de Inmunología Parasitaria, Paris, Francia

⁴ Escuela de Ciencias Ambientales, Universidad de Guelph. Ontario, Canadá

⁵ Laboratorio Nacional de Parasitología. Artemisa, Cuba

⁶ Facultad de Ciencias, Universidad de Bohemia Sur, České Budějovice, República Checa

⁷ Departamento de Epidemiología y Salud Pública, Universidad Federal Rural de Rio de Janeiro. Río de Janeiro, Brasil

* Autor para la correspondencia: alina.rodriguez@cigb.edu.cu

RESUMEN

Introducción: Las garrapatas transmiten patógenos a sus hospederos. La manipulación de su microbiota puede usarse para modificar su fisiología y afectar su capacidad de transmitir patógenos. Esto constituye una alternativa al control por químicos que generan contaminación y garrapatas resistentes. **Objetivos:** Estudiar la comunidad microbiana de las garrapatas *Rhipicephalus microplus* en el tiempo y durante su ontogenia y su interacción con la bacteria patógena *Anaplasma marginale*. **Métodos:** La presencia de *A. marginale* se estudió mediante PCR a tiempo final o de microfluidos de alto rendimiento, en tiempo real. Usando ADN de garrapatas, se obtuvieron secuencias de la región variable V4 del gen 16S de ARN riboso-

Editor

Lisset González Navarro
Academia de Ciencias de Cuba.
La Habana, Cuba

Traductor

Darwin A. Arduengo García
Academia de Ciencias de Cuba.
La Habana, Cuba

mal que se clasificaron taxonómicamente para generar las filogenias de las comunidades microbianas. La topología de estas comunidades, sus asociaciones, y los taxones claves se determinaron mediante el análisis de redes de co-ocurrencia. **Resultados:** El aumento de *A. marginale* en las comunidades microbianas de *R. microplus* correlacionó con una reducción de su diversidad y como taxón clave indujo una disbiosis de la comunidad. Fue más abundante en las ninfas con conectividad e interacciones bien estructuradas. *Pseudoalteromonas* fue un taxón clave que correlacionó positivamente con *A. marginale* mientras el endosimbionte *Coxiella* correlacionó negativamente. **Conclusiones:** *A. marginale* modifica la comunidad microbiana de *R. microplus* para facilitar su colonización. Su mayor abundancia en las ninfas, sugiere este estadio como el más importante en la transmisión de este patógeno. Los taxones clave que interaccionan con *A. marginale*, pueden ser dianas manipuladas para disminuir la capacidad vectorial de *R. microplus*.

Palabras clave: garrapatas; microbiota de garrapatas; *Rhipicephalus microplus*; *Anaplasma marginale*; vacunas antimicrobiota

Interaction of the *Rhipicephalus microplus* tick microbiota with the pathogen *Anaplasma marginale*

ABSTRACT

Introduction: Ticks transmit pathogens to their hosts. Manipulating their microbiota can be used to modify their physiology and affect their ability to transmit pathogens. This constitutes an alternative to chemical control that generates contamination and resistant ticks. **Objectives:** To study the microbial community resident in *Rhipicephalus microplus* ticks over time and during their ontogeny and their interaction with the pathogenic bacterium *Anaplasma marginale*. **Methods:** The presence of *A. marginale* was studied using end-point PCR or high-throughput real-time microfluidics. Using tick DNA, sequences of the 16S ribosomal RNA gene V4 variable region were obtained and taxonomically classified to generate microbial community phylogenies. The topology of these communities, their associations, and key taxa were determined through co-occurrence network analysis. **Results:** The increase of *A. marginale* in *R. microplus* microbial communities correlated with a reduction in their diversity and, as a keystone taxon, induced community dysbiosis. It was most abundant in nymphs with well-structured connectivity and interactions. *Pseudoalteromonas* was a keystone taxon that correlated positively with *A. marginale*, while the endosymbiont *Coxiella* correlated negatively. **Conclusions:** *A. marginale* modifies the microbial community of *R. microplus* to facilitate its colonization. Its greater abundance in nymphs suggests the more important role of this stage in the transmission of this pathogen. Key taxa that interact with *A. marginale* can be manipulated targets to decrease the vector capacity of *R. microplus*.

Keywords: ticks; tick microbiota; *Rhipicephalus microplus*; *Anaplasma marginale*; anti-microbiota vaccines

INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son ectoparásitos que ingieren sangre de un huésped para reproducirse. Ellas constituyen en sí mismas causas de enfermedades, pero son más importantes como vectores de patógenos a los vertebrados que parasitan.^(1,2) Su control se basa fundamentalmente en el uso

intensivo de químicos, que conduce al establecimiento de cepas de garrapatas resistentes.^(3,4,5,6)

En este contexto, el estudio de la microbiota de las garrapatas pudiera constituir una herramienta para modificar su fisiología en detrimento de su éxito reproductivo, ya que la microbiota está formada por simbioses, comensales y otros

microorganismos que pueden aportar o no ventajas metabólicas imprescindibles para garantizar la eficiencia del ciclo de vida de las garrapatas. La manipulación de esta microbiota también pudiera afectar su capacidad vectorial, ya que los microorganismos patógenos para transmitirse exitosamente de las garrapatas a un nuevo hospedero deben establecerse y multiplicarse dentro del artrópodo, superando barreras como la inmunidad de las garrapatas y la resistencia a la colonización que ofrece dicha microbiota. ^(7,8,9)

Estudios recientes han intentado dilucidar cómo la microbiota modula los patrones de infección de los patógenos y la dinámica de sus interacciones, corroborando que su resistencia actúa como una barrera natural contra el establecimiento y la colonización por estos patógenos. ^(10,11) Probablemente los patógenos actualmente transmitidos por diferentes especies de garrapatas (TBPs, del inglés Tick-borne pathogens) desarrollaron mecanismos para superar esta resistencia. Por tanto, dilucidar estos mecanismos permitiría diseñar una manipulación del microbioma del vector como estrategia novedosa y eficaz para controlar la propagación y el desarrollo de enfermedades causadas por TBPs. ^(12,13)

En este trabajo se caracterizan, por primera vez, las comunidades microbianas asociadas a la garrapata del ganado *Rhipicephalus microplus* presente en Cuba y sus interacciones con *Anaplasma marginale*, que constituye uno de los hemoparásitos más importantes transmitidos a los bovinos por esta especie de garrapatas. Tomando como base los resultados del análisis de la interacción de otro patógeno del género *Anaplasma* con la microbiota de garrapatas *Ixodes scapularis*, diseñamos nuestro estudio para caracterizar la comunidad microbiana residente en las garrapatas *R. microplus* en diferentes épocas del año y durante su ontogenia, así como la identificación de taxones claves y su interacción con la bacteria patógena *Anaplasma marginale*.

MÉTODOS

Análisis del microbioma de ninfas de *Ixodes scapularis* infectadas o no con *Anaplasma phagocytophilum*

Usando datos públicos del repositorio SRA: PRJ-NA353730 de secuencias de ARN ribosomal (ARNr) 16S obtenidas utilizando cebadores universales de garrapatas con códigos de barras 515F/806R para amplificar las regiones hipervariables V4 de este gen, seguido de la secuenciación con el sistema Illumina MiSeq a partir de ADN de intestino de ninfas de *I. scapularis* alimentadas en ratones C3H/SCID infectados experimentalmente o no, con la cepa NCH-1 de *A. phagocytophilum* realizamos el perfil taxonómico de cada

conjunto de datos de secuencias usando la versión 2 de una plataforma bioinformática, desarrollada originalmente para el análisis de secuenciación de amplicones de genes marcadores de microbiomas de alto rendimiento conocida como QIIME (del inglés Quantitative Insights into Microbial Ecology, QIIME 2, versión 2021.4). ^(14,15) Las variantes de secuencias de los amplicones (ASVs) obtenidas en el mencionado estudio se alinearon utilizando la herramienta MAFFT de la interfase q2 de esta plataforma. ⁽¹⁶⁾ Luego se generó un árbol filogenético utilizando FastTree a través del complemento de filogenia de q2. ⁽¹⁷⁾ La anotación taxonómica de las ASVs se realizó utilizando el clasificador Bayes del complemento de q2 con referencia a la base de datos SILVA de ARNr 16S (versión 132). ⁽¹⁸⁾ A partir de estos datos, se calcularon métricas de diversidad, basadas en una tabla de abundancias de los ASVs utilizando el complemento de diversidad de q2.

Para el cálculo de la diversidad alfa, utilizamos las métricas de “especies observadas” y el índice de diversidad filogenética de Faith. ^(19,20) La primera se refiere al número de taxones únicos presentes en una muestra y la segunda evalúa la historia evolutiva representada en la comunidad. La uniformidad se analizó utilizando el índice de Pielou que evalúa la distribución de los individuos entre las especies dentro de una comunidad, indicando su equilibrio en relación con las especies presentes. ⁽²¹⁾ Valores altos en el número de especies indican una comunidad diversa y valores altos de equidad de Pielou indican una distribución equitativa de los individuos entre los taxones. Valores altos de diversidad filogenética indican que los taxones presentes en la comunidad están distantes evolutivamente. Por otro lado, la diversidad beta examina la similitud en la composición entre las comunidades analizadas utilizando un análisis de coordenadas principales (PCoA), basado en el índice de disimilitud de Bray-Curtis. ⁽²²⁾ Los taxones únicos y compartidos entre las condiciones experimentales se visualizaron mediante diagramas de Venn creados con una herramienta en línea (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) y el paquete Upset implementado en R Core Team (R v.4.3.1, 2023) utilizando el entorno de desarrollo integrado (IDE) en RStudio (v.2023.03.0-daily+82.pro2, RStudio Team, 2020).

La representación gráfica del ensamblaje de las comunidades microbianas de las garrapatas se realizó utilizando redes de coocurrencia, para analizar las asociaciones que se establecen entre los taxones que las componen y su naturaleza. En estas redes, los nodos representan los taxones, mientras que los bordes representan las asociaciones entre ellos. Los análisis de correlaciones entre los nodos se realizaron, positivas significativas (peso > 0,75) o negativas (peso < -0,75), utilizando el método SparCC (del inglés Sparse Correlations for Compositional data) implementado en RStudio (RStudio Team,

2020).⁽²³⁾ La robustez de la red se analizó mediante estudios de la pérdida de conectividad a partir de la eliminación de nodos.

Presencia de *Anaplasma marginale* en bovinos y garrapatas *Rhipicephalus microplus* en el tiempo

Diseñamos un estudio en una finca de la provincia Mayabeque en Cuba, desde marzo del 2020 hasta marzo del 2021 usando 8 bovinos hembras mayores de 2 años de edad, de la raza Siboney seleccionados al azar que eran criados extensivamente sin tratamientos acaricidas, a los que se le tomaron muestras de sangre y de garrapatas hembras repletas en 3 momentos durante los períodos climáticos secos y húmedos. El estado de salud de los animales se monitoreó mediante la observación de signos clínicos de enfermedades, y la determinación de parámetros hematológicos como el hematocrito, el recuento total de leucocitos y la proteína total. Las garrapatas colectadas parasitando a los animales fueron identificadas morfológicamente utilizando un estereomicroscopio (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemania) y las claves taxonómicas estandarizadas descritas por Estrada-Peña *et al.*⁽²⁴⁾

La presencia de *A. marginale* se estudió usando la PCR de microfluidos en tiempo real de alto rendimiento a partir del ADN purificado de 32 muestras de sangre total de los bovinos, tomadas en 3 momentos diferentes y en una muestra de 24 garrapatas *R. microplus* colectadas en los diferentes tiempos. Evaluamos además la presencia simultánea de 3 taxones de parásitos (*Apicomplexa*, *Theileria* y *Hepatozoon*) donde se incluyeron 7 especies y 5 géneros de bacterias (*Borrelia*, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Rickettsia* y *Mycoplasma*) que incluyeron 27 especies.⁽²⁵⁾

Las comunidades microbianas de las garrapatas *R. microplus* colectadas, con un bajo nivel de engorde y con una infección simple con *A. marginale* se caracterizaron usando la secuenciación de próxima generación (NGS) de los 251 pares de bases (pb) de la región variable V4 del gen codificante de ARNr 16S ya descrito a partir del ADN purificado. Estas secuencias se analizaron utilizando QIIME 2 (v. 2021.4). Las diferencias en las métricas de diversidad alfa y beta entre los grupos se evaluaron con la prueba de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$) y con el índice de disimilitud de Bray-Curtis con la prueba PERMANOVA ($p \leq 0,01$) en QIIME 2, respectivamente.

⁽²²⁾ La abundancia relativa de cada taxón se calculó usando una transformación de la razón logarítmica centrada (clr, del inglés centred log ratio). Los taxones identificados con abundancia diferencial se utilizaron para crear un mapa de calor utilizando el paquete "Heatplus" en RStudio (RStudio Team, 2020). Con un enfoque de red y utilizando los perfiles taxonómicos a nivel de familia y género que se obtuvieron se crearon redes de coocurrencia para cada conjunto de datos. Los taxones clave dentro de la comunidad para cada uno de los

tiempos estudiados se identificaron usando 3 criterios: a) ubicuidad referida a los taxones presentes en todas las muestras del grupo experimental, b) centralidad superior a 0,75 que se refiere al grado de asociación de los nodos. En términos biológicos, los nodos centrales representan especies altamente conectadas que determinan la estructura y función de la comunidad y cuya eliminación puede causar el colapso del sistema y c) abundancia relativa media alta que se refiere a un taxón cuya abundancia es superior a la abundancia relativa media de todos los taxones del grupo experimental.⁽²⁶⁾ El rol de *Anaplasma* dentro de la comunidad, se determinó construyendo subredes donde se visualizaron sus asociaciones directas positivas y negativas usando Gephi v0.10.

Interacción de *A. marginale* con la comunidad microbiana de *R. microplus* durante su ontogenia

Durante la ontogenia de las garrapatas *R. microplus* infectadas con *A. marginale*, estudiamos comparativamente la interacción de este patógeno adquirido con la microbiota y la interacción de *Coxiella* (CLE), que es un miembro de dicha comunidad descrito como endosimbionte.^(27,28) Para este estudio, se utilizaron garrapatas *R. microplus* de la colonia establecida en el Laboratorio Nacional de Parasitología de Cuba, alimentadas en un bovino infectado con *A. marginale* diagnosticado por técnicas moleculares.⁽²⁹⁾ Se recolectaron 13 larvas, 15 ninfas y 15 machos adultos mientras permanecían desarrollando su ciclo de vida sobre el animal. El ADN de las garrapatas individuales se purificó utilizando el juego de reactivos "DNA Tissue and Blood" (QIAGEN, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Se detectaron *Anaplasma marginale* y *Coxiella* en cada muestra mediante una PCR cualitativa a tiempo final específica para cada microorganismo. Para *A. marginale* se diseñaron cebadores específicos amplificando secuencias codificantes de msp1a y msp5 según las secuencias reportadas para estos genes en la base de datos Genbank y para CLE se usó una PCR anidada (en inglés nested PCR) utilizando cebadores específicos previamente descritos.⁽³⁰⁾ Esta PCR anidada es una variante de la PCR convencional que comprende 2 rondas de amplificación con distintos pares de iniciadores, con el fin de incrementar la sensibilidad de detección. Una primera reacción amplifica una región de ADN más grande que contiene el segmento diana y la segunda PCR amplifica la región específica con los iniciadores internos.

El ADN (900ng) de las garrapatas se usó para generar las lecturas de la región variable V4 del gen codificante de ARNr 16S. Estas secuencias crudas, en archivos fastq, fueron procesadas a través de la plataforma QIIME2. La diversidad microbiana de las muestras se evaluó mediante el cálculo de las métricas de alfa y beta diversidad y la significación estadística

se probó utilizando el paquete Past 4 versión 4.08.⁽³¹⁾ Los taxones únicos y compartidos entre las condiciones se visualizaron utilizando los diagramas de Venn. La abundancia relativa de los taxones entre los diferentes conjuntos de datos se calculó mediante la razón logarítmica centrada (clr) y los datos resultantes se utilizaron para crear un mapa de calor usando sólo los taxones con diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

La representación gráfica del ensamblaje de las comunidades microbianas y la determinación de los taxones clave se realizó utilizando redes de coocurrencia. La robustez de estas redes se evaluó mediante el estudio de su comportamiento frente a perturbaciones. Para ello se analizó el impacto de la eliminación de nodos sobre la conectividad de la red que incluyó ataques aleatorios o dirigidos a eliminar nodos con los valores más altos de centralidad de intermediación o eliminando nodos con los valores más altos de centralidad de grado o eliminando nodos en cascada que significa eliminar los nodos con los valores más altos de centralidad de intermediación y recalculando dicha centralidad antes de proceder a la siguiente eliminación. Este análisis utiliza el método de remuestreo (bootstrapping) para calcular los intervalos de confianza y se realiza utilizando el paquete Network Strengths and Weaknesses Analysis (NetSwan) (Lhomme, 2015) en R R Core Team (R v.4.3.1, 2023) en el entorno de RStudio (RStudio Team, 2020).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Anaplasma phagocytophilum modifica la red microbiana de *I. scapularis*

La infección con *A. phagocytophilum* no alteró significativamente la diversidad microbiana general en ninfas de *I. scapularis* porque no hubo significación estadística de la diversidad alfa y la beta entre las condiciones experimentales ($p > 0,05$; Kruskal-Wallis y $p > 0,05$; PERMANOVA, respectivamente). Sin embargo, el análisis de las características topológicas de las redes de coocurrencia, revelaron una reducción del 30 % (265 de 377) en el número de taxones o nodos y del 82 % (826 de 4605) en el número de conexiones o aristas en la red microbiana de *I. scapularis* infectadas con *A. phagocytophilum* comparadas a la de las no infectadas. Es decir, que la infección con *A. phagocytophilum*, reorganizó el ensamblaje microbiano de *I. scapularis* disminuyendo su modularidad, aumentando el número de comunidades distintas y afectando taxones específicos. Esto demuestra que la resistencia a la colonización no depende de una sola especie, sino de las asociaciones de múltiples bacterias que viven de manera cohesiva en una comunidad.⁽³²⁾ Los resultados mostraron 243 taxones compartidos entre las redes de *I. scapularis* infectadas y las no infectadas con *A. phagocytophilum* (61 % del total de 399), mientras que 134 (33,6 %) y 22 (5,4 %) fueron únicos para

esas redes, respectivamente. Además, en la red infectada con *A. phagocytophilum*, eliminando sólo 0,05 fracciones de nodos o taxones se logró una pérdida de conectividad de la red del 80 % mientras que en la red de las no infectadas, para lograr alcanzar el mismo nivel de pérdida de conectividad se debieron eliminar 0,38 fracciones de los nodos. Esto demuestra que la infección con esta bacteria Gramnegativa reduce la robustez de la red microbiana mediante la reducción de los taxones y sus conexiones, y consecuentemente reduce su resistencia a la colonización por otros microbios. Este podría constituir un mecanismo general para facilitar la coinfección de diferentes patógenos en poblaciones naturales de garrapatas.

A. marginale* disminuye la conectividad entre taxones dentro y entre los módulos de la red microbiana de *R. microplus

Los bovinos en este estudio permanecieron asintomáticos y exhibieron valores de hematocrito y proteína total dentro del rango fisiológico normal para la especie. Encontramos infestación de garrapatas en todos los animales y un total de 350 garrapatas adultas (153 hembras y 197 machos) de las colectadas fueron morfológicamente identificadas como *R. microplus*. Los resultados de la PCR de microfluidos revelaron la presencia de *A. marginale* en 31 de las 32 muestras de sangre de los bovinos (96,9 %; IC 95 %: 90,9-100), seguida de *Rickettsia felis* en 4 muestras (12,5 %; IC del 95 %: 1,10-23,9), bacterias no caracterizadas del género *Rickettsia* en 2 muestras (6,25 %; IC del 95 %: 0-7,09) y *Anaplasma* spp. en una muestra (3,12 %; IC 95%: 0-9,19). *A. marginale* fue detectada como infección única en 26 muestras (81,3 %; IC 95 %: 67,8-94,8). Las infecciones mixtas se encontraron en 6 muestras, 3 coinfecciones de *A. marginale* con *R. felis* (3/32, 9,38 %; IC 95 %: 0-19,5) y 2 con *Rickettsia* spp. (2/32, 6,25 %; IC 95 %: 0-7,09), y la sexta de *R. felis* con *Anaplasma* spp. (1/32; 3,13%; IC 95%: 0-0,11). En las garrapatas, se detectó ADN de *A. marginale* en 11 de las 24 muestras analizadas (45,8 %; IC del 95 %: 25,9-65,7-64,4), *R. felis* en 4 garrapatas (16,7 %; IC 95 %: 1,81-31,5), *Ehrlichia* spp. en 2 garrapatas (8,33 %; IC 95 %: 2,69-13,9), y *Rickettsia* spp. en 1 garrapata (4,17 %; IC 95 %: 0,1-8,24). En términos de infecciones simples, *A. marginale* fue el TBP más común detectado en 8 garrapatas (33,3 %; IC del 95 %: 14,2-51,8), *R. felis* en 3 garrapatas (12,5 %; IC del 95 %: 5,75-19,3) y *Ehrlichia* spp. en 1 garrapata (4,17 %; IC 95 %: 0,1-8,24). Se detectó *A. marginale* en doble infección con *R. felis* y *Rickettsia* spp. y en triple infección por *Ehrlichia* spp. y *B. canis*. Estos resultados mostraron un predominio de la infección con *A. marginale* tanto en bovinos como en garrapatas y las coinfecciones con otros patógenos no fueron persistentes en el tiempo. A pesar de la detección de

infecciones mixtas en algunos animales, todos permanecieron asintomáticos durante el estudio, lo cual nos permite hipotetizar interacciones negativas entre estos microorganismos, donde la presencia de uno suprime la virulencia del otro, o la ocurrencia del fenómeno de inmunidad heteróloga donde las especies menos patógenas dentro de las infecciones mixtas pueden estimular el sistema inmunológico del huésped, para desarrollar inmunidad contra las otras especies con patogenicidad variable.⁽³³⁾ A pesar de la infección persistente por *A. marginale* en los bovinos estudiados, este patógeno no se detectó en todas las garrapatas *R. microplus* analizadas. Esto pudiera atribuirse a una baja carga microbiana presente en los animales presumible porque permanecieron asintomáticos durante todo el experimento, lo que reduce la probabilidad de transmisión exitosa del hospedero a las garrapatas.⁽³⁴⁾ Otro factor a considerar son las interacciones negativas que pudieran existir entre *A. marginale* y otros microorganismos que coexisten en el sitio de alimentación de la garrapata que podrían dificultar el proceso de adquisición de este patógeno.⁽³⁵⁾ Y, por último, la inmunidad de las garrapatas a la infección por *A. marginale*.

Las redes de coocurrencia mostraron diferencias significativas en la diversidad alfa de la comunidad microbiana de las garrapatas *R. microplus* colectadas en julio del 2020 (J-20) en comparación con las de marzo del 2021 (M-21). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las colectadas en J-20 y las de septiembre del 2020 (S-20). El análisis del índice de Bray-Curtis no reveló diferencias significativas en la composición del microbioma de las garrapatas entre J-20 y S-20 pero si ambos diferían del microbioma en M-21. Este análisis identificó 437 taxones, de los cuales el 67,7 % era compartido entre las comunidades a diferentes tiempos. Se encontraron 1,60 % de taxones únicos en M-21; 0,92 % en J-20 y ninguno en S-20 (figura 1a). Estos cambios significativos entre las 3 comunidades fueron en 20 taxones. Los géneros *Murdochella*, *Neisseria* y *Rickettsiales* fueron los más abundantes en las comunidades de J-20 y S-20, mientras que *Anaplasma*, *Cloacibacterium*, *Delftia* y *Frigoribacterium* fueron los más abundantes en M-21. La abundancia relativa media de *Anaplasma* mostró ser significativamente mayor en M-21 comparada con J-20 y S-20 (figura 1b). El aumento de la presencia de este patógeno en las garrapatas correlacionó con una reducción de la diversidad de la comunidad microbiana lo cual reduce su resistencia a la colonización de patógenos, reduciendo las interacciones tróficas entre los taxones que impiden el dominio de un solo patógeno.⁽³⁶⁾ Por consiguiente, la presencia de *Anaplasma* crea un ambiente favorable en la comunidad microbiana para su propia colonización y la coinfección de otros patógenos lo que concuerda con el resultado obtenido del análisis de la comunidad microbiana de *I. scapularis* infectada con *A. phagocytophilum*.

Los patrones de coocurrencia revelaron también el impacto de *Anaplasma* en la estabilidad de la red, por una notable disminución de las asociaciones entre los miembros de la comunidad en el tiempo (figura 1c). La red microbiana en J-20 mostró la mayor cantidad de taxones totales y conectados, mientras que la de M-21 tuvo la menor cantidad, mostrando variaciones topológicas de la red por una drástica disminución de la conectividad entre taxones dentro y entre los módulos. Observamos también una disminución de la presencia de módulos en las redes en S-20 y M-21 respecto a la red en J-20 que implica una pérdida de la estructura de la comunidad que unida a la pérdida de conectividad pudiera sugerir una pérdida de funciones o de vías metabólicas y el reforzamiento de otras que pueden facilitar la colonización de las especies patógenas que invaden dicha comunidad.

La conectividad local de *Anaplasma* en las redes microbianas de los 3 puntos temporales reveló relaciones dinámicas ya que en J-20, mostró numerosas asociaciones directas con nodos que exhibían altos valores de centralidad pero su abundancia fue inferior a la abundancia relativa media de todos los taxones descalificándolo como taxón clave. En la red de S-20, *Anaplasma* mostró principalmente asociaciones positivas, a excepción de una asociación negativa con *Rickettsiella* y mostró una centralidad mayor en comparación con la red de J-20, aunque todavía con un valor de abundancia relativa media por debajo de la abundancia relativa promedio de todos los taxones. Notablemente, en la red de M-21, ya *Anaplasma* emergió como un taxón clave, formando un grupo o módulo independiente anidado en la red con una asociación positiva con otros 7 nodos o taxones y *Rickettsiella* ya no se encontraba formando parte de la red, posiblemente debido a una coexclusión causada por la interacción negativa observada en la red de S-20. Este resultado apunta a la posibilidad de manipular *Rickettsiella* para obstaculizar la colonización de *Anaplasma*.

A. marginale es más abundante en el estadio de ninfas de R. microplus y muestra una correlación negativa con el simbiote Coxiella

Según el resultado de las PCR a tiempo final a partir del ADN genómico de los diferentes estadios del ciclo de vida de *R. microplus*, CLE estuvo presente en el 100 % (43/43) de las muestras, mientras que *A. marginale* sólo estuvo en el 44 % (19/43). Este resultado es similar al del estudio usando la PCR de microfluidos en tiempo real, corroborando que no existe linealidad entre la infección de este patógeno en bovinos y garrapatas. La frecuencia de aparición de *A. marginale* varió entre las diferentes etapas del ciclo de vida de esta especie de garrapatas, siendo del 31 % (4/13) en las larvas, del 80 % (12/15) en las ninfas y del 20 % (3/15) en los adultos.

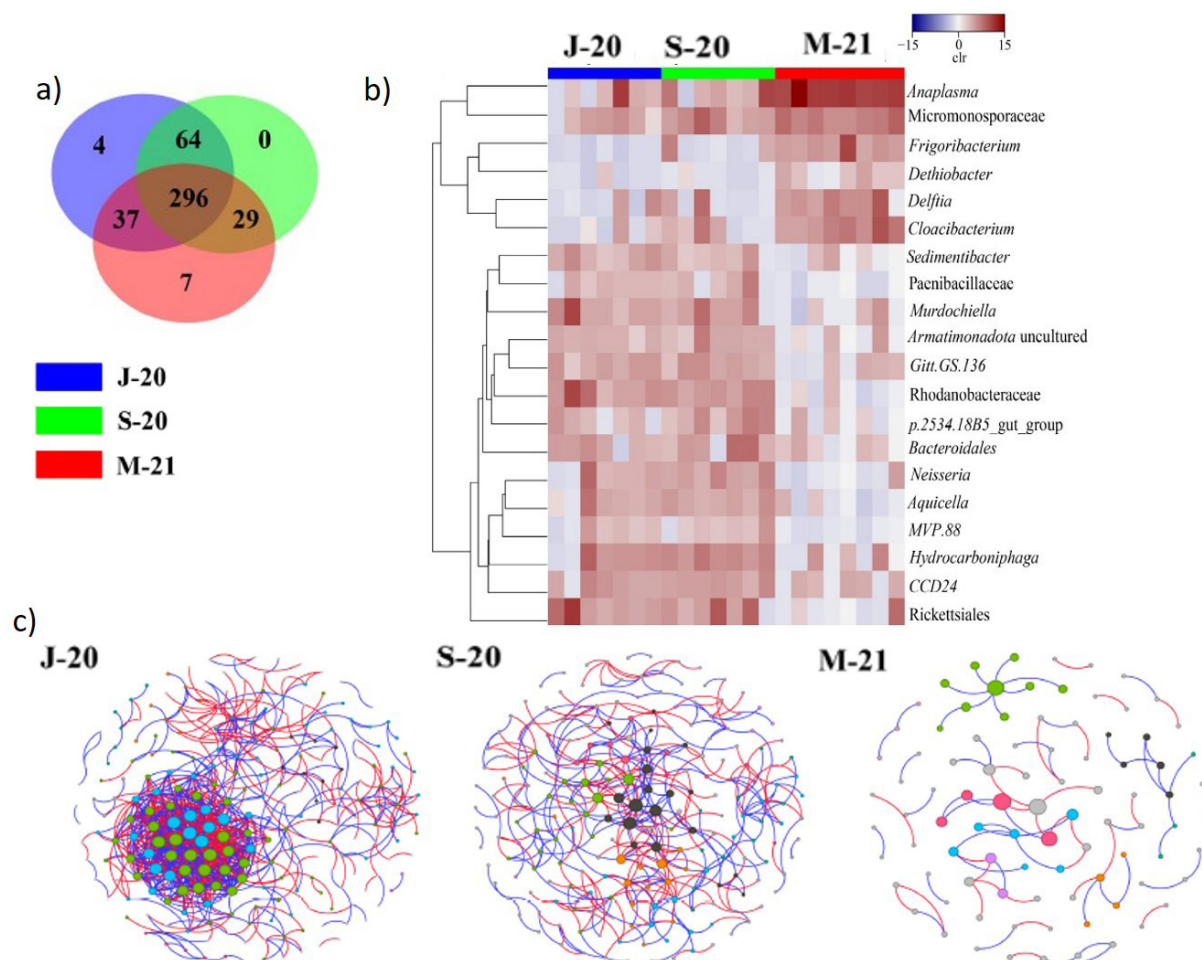


Fig. 1. A) diagrama de Venn comparando la composición de taxones en garrapatas recolectadas en los 3 momentos de muestreo. B) comparación de la abundancia relativa de comunidades microbianas complejas dentro de *R. microplus* en el tiempo. Los taxones se agruparon en función de la abundancia relativa (calculada como valores transformados de clr). Cada columna representa los valores de clr para taxones bacterianos por muestra y por grupo. Cada línea representa taxones bacterianos con cambios significativos entre los conjuntos de datos. El color representa el valor de clr (rango de -15 a 15). C) redes de coocurrencia de J-20, S-20 y M-21. Los colores de los nodos se basan en la métrica de clase de modularidad y un color igual significa módulos de taxones coocurrentes. El tamaño de los nodos es proporcional a la centralidad del vector propio de cada taxón. Los colores en los bordes representan correlaciones fuertes positivas (azul) o negativas (rojo) (SparCC > 0,75 o < -0,75).

Las secuencias crudas de ARNr 16S obtenidas fueron depositadas en el repositorio SRA, en el Bioproyecto PR-JNA1034019. Las redes microbianas en la ontogenia de *R. microplus* mostraron que las ninfas tuvieron los niveles más altos en el número de especies en comparación con las larvas y los adultos (prueba de Kruskal-Wallis, $p = 0,001$ y $p < 0,018$, respectivamente) así como también en el índice de diversidad filogenética de Faith (prueba de Kruskal-Wallis, $p = 0,0018$ y $p = 0,0029$, respectivamente). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las comunidades microbianas de las larvas y los adultos (prueba de Kruskal-Wallis, $p > 0,05$). Las comparaciones de la diversidad beta indicaron diferencias significativas en la composición

bacteriana de las comunidades entre larvas y adultos, ninfas y adultos y larvas y ninfas (PERMANOVA, $p = 0,001$, $p = 0,001$, y $p = 0,002$, respectivamente). También se encontraron diferencias significativas en la dispersión beta (ANOVA, $p = 0,001$), lo que sugiere una alta variabilidad dentro de los grupos. En general, la diversidad del microbioma bacteriano fue notablemente diferente entre las ninfas y las otras etapas del ciclo de vida de *R. microplus*.

La composición de las redes microbianas en cada estadio de vida reveló un total de 1038 taxones en las 3 etapas, de los cuales 726 taxones (69,8 %) fueron compartidos en todas las etapas. Se identificaron 1,4 % de taxones únicos en las larvas (15/1038 taxones); 5,2 % en ninfas (55/1038) y

4,0 % en adultos (41/1038) (figura 2). CLE y *A. marginale* fueron taxones compartidos por todas las etapas, estando presentes en al menos una muestra de cada grupo. El análisis de abundancia relativa diferencial reveló cambios significativos en 60 taxones. *Coxiella* mostró una mayor abundancia que otros taxones en todas las etapas, mientras que *Anaplasma* fue muy abundante sólo en las ninfas lo que sugiere que las ninfas podrían jugar el papel más significativo en la transmisión de este patógeno a hospederos no infectados.

Las redes microbianas de cada estadio de *R. microplus* mostraron cambios topológicos (figura 3). Hubo una reducción en el número de comunidades o módulos a medida que las garrapatas progresaban en su desarrollo. Paralelamente, hubo un aumento en la complejidad de la red, demostrado por el incremento en el número de bordes, el diámetro de la red y el grado promedio y ponderado de bordes por nodo a lo largo de las etapas consecutivas desde larva hasta adultos. En general, la complejidad de la red microbiana aumentó conforme

avanzaban las etapas de desarrollo, con un salto particular en la complejidad en la etapa de ninfa. Es notable que en todas las redes CLE y *A. marginale* se ubicaron en módulos distintos. En la red de larvas, *A. marginale* estuvo presente en la tercera comunidad más grande (L3), mientras que CLE estuvo asociado con una comunidad más pequeña. En la red de ninfas, CLE se encontró en la comunidad más grande (N1), mientras que *A. marginale* se ubicó en la segunda comunidad más grande (N2). En la red de adultos, CLE fue prominente en la comunidad A1, mientras que *A. marginale* se identificó en comunidades más pequeñas.

En la red de ninfas *A. marginale* mostró una fuerte correlación con *Pseudoalteromonas*, identificada como taxón clave. Interesantemente ningún taxón estuvo consistentemente conectado con *A. marginale* en todas las etapas de la vida de *R. microplus*, mientras que CLE estuvo consistentemente conectado con *Bacillus*. En la red de la etapa de larvas, *A. marginale* mostró menos conexiones en comparación con

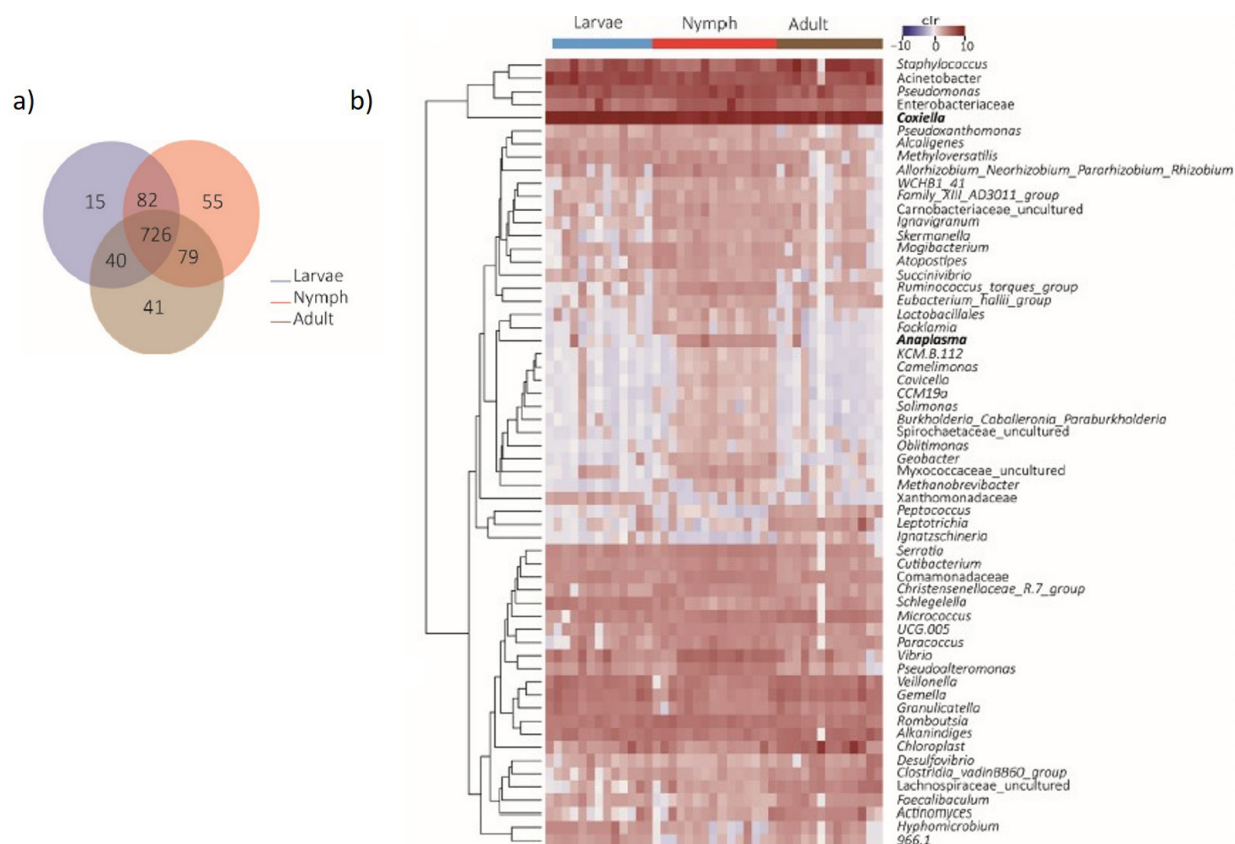


Fig. 2. a) Diagrama de Venn que muestra la composición de taxones para cada estadio del ciclo vital de garrapatas *R. microplus*. Los números representan los taxones encontrados en cada conjunto de datos y los compartidos entre los grupos. b) Comparación de la abundancia relativa de comunidades microbianas complejas dentro de las etapas del ciclo vital de *R. microplus*. Cada columna representa los valores clr para los taxones bacterianos por muestra y por grupo. Cada línea representa los taxones bacterianos con cambios significativos entre los conjuntos de datos. Los colores representan el rango de valores clr desde -10 (azul) hasta 10 (rojo)

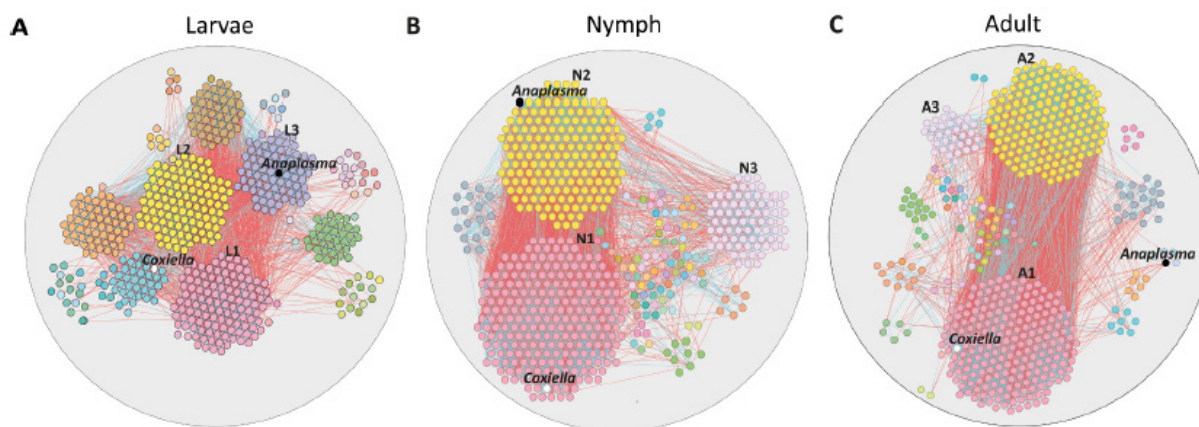


Fig. 3. Dinámica de las comunidades microbianas de *R. microplus* a lo largo de las etapas de su ciclo vital. Red de co-ocurrencia de las etapas de larva (A), ninfa (B) y adultos (C). Los colores de los nodos se basan en la métrica de clase de modularidad, y el mismo color indica módulos de taxa que co-ocurren. Los colores en los bordes representan correlaciones fuertes positivas (azul) o negativas (rojo) ($\text{SparCC} > 0.50$ o < -0.50 ; respectivamente). Los puntos negros representan el taxón *Anaplasma* y los puntos blancos el taxón *Coxiella*. (L1–3), (N1–3) y (A1–3) indican los 3 módulos principales en la red de las larvas, las ninfas y los adultos, respectivamente

CLE. En la red de ninfas, tanto *A. marginale* como CLE mostraron un aumento en las asociaciones en comparación con la etapa de larvas y en la red de adultos, las conexiones de *A. marginale* disminuyeron, mientras que CLE mantuvo un alto nivel de conectividad. Curiosamente en las ninfas, *A. marginale* y CLE mostraron una asociación negativa directa entre ellos sugiriendo una relación de competencia. Tales interacciones competitivas podrían impactar significativamente la dinámica de transmisión de otros patógenos. Por otra parte, tanto *A. marginale* como CLE aparecieron conectados directamente a taxones clave en la red de las ninfas. Específicamente, *A. marginale* interactuó positivamente con 7 taxones clave, mientras que CLE interactuó negativamente con 6 de ellos. A pesar de esta presencia variable de *A. marginale* en las etapas de desarrollo de las garrapatas *R. microplus*, se observó su notable influencia en la complejidad de la red, especialmente en la etapa de ninfas, donde apareció involucrada en interacciones microbianas estructuradas, desafiando la hipótesis inicial de un patrón no anidado y puramente dinámico que se esperaría de una bacteria patógena adquirida, cuya presencia debería estar fuertemente influenciada por factores como la variable de exposición de las garrapatas al patógeno, la resistencia a la colonización y la respuesta inmune del vector.

Por otro lado, nuestros resultados confirman la presencia ubicua de CLE en todas las etapas de desarrollo de *R. microplus* con una organización estructurada en sus interacciones formando un grupo central de taxones y un pa-

trón anidado en el microbioma como reflejo de una relación estable y coevolutiva respaldando una relación mutualista en correspondencia a su condición de endosimbionte.⁽³⁷⁾ De hecho, se ha descrito que CLE proporciona vitaminas B esenciales y cofactores críticos para el desarrollo, la fecundidad y el metabolismo de las garrapatas.⁽³⁸⁾

La detección de CLE en el 100 % de las muestras estudiadas, su asociación negativa con *A. marginale* en la red de ninfas y la relativa baja tasa de infección por *A. marginale* observada en las garrapatas estudiadas, sugieren que CLE podría inhibir la infección por *A. marginale* en *R. microplus*, bajo la influencia de determinados factores bióticos o abióticos. Más allá de la provisión de nutrientes, los simbiontes mutualistas también pudieran conferir protección contra patógenos mediante mecanismos que pueden involucrar la inmunomodulación, donde los simbiontes protectores preparan al sistema inmune del artrópodo para producir continuamente bajas cantidades de péptidos antimicrobianos, inhibiendo así la multiplicación de otros microbios^(8, 39). Otros mecanismos involucrados pudieran ser la competencia por recursos, la interferencia directa o los efectos de prioridad.⁽³⁷⁾

La eliminación del nodo de CLE en las comunidades microbianas de cada estadio de *R. microplus* causó una mayor reducción en el número de nodos conectados que la eliminación de *A. marginale* lo que demuestra que CLE tiene un rol crítico en el mantenimiento de la integridad y conectividad de la red y es un conector central dentro del microbioma de estas garrapatas y los nodos o taxones que estaban conectados a

él, probablemente sean dependientes, ya sea directa o indirectamente por simbiosis nutricionales.⁽⁴⁰⁾ Esta simbiosis mutualista, por tanto, es crucial para la supervivencia tanto del microbio como de la garrapata, y por consiguiente ocurre una anidación estable en la comunidad microbiana, lo cual fue validado por nuestros resultados que mostraron una relación recíproca entre CLE y *A. marginale*, en la que la eliminación de un taxón influye en la posición del otro dentro de la estructura modular de las redes microbianas.

La resiliencia de las redes ante perturbaciones mostró que los ataques dirigidos llevaron a una pérdida de conectividad más rápida que los ataques aleatorios, siendo la eliminación en cascada la que tuvo el impacto más significativo. La proporción de nodos que se necesitan eliminar para inducir una pérdida del 80 % de la conectividad aumenta a medida que avanzan las etapas de vida de *R. microplus*, lo que indica que las redes son más robustas a medida que *R. microplus* se desarrolla. En la red de larvas, se requirió la eliminación de una fracción menor de nodos para alcanzar una pérdida del 80 % de la conectividad luego de eliminar los nodos correspondientes a *A. marginale* o CLE. Para la red de las ninfas, la eliminación de nodos tuvo menor impacto sobre la conectividad de la comunidad cuando CLE estaba presente. En la red de adultos, la eliminación de *A. marginale* resultó en una menor fracción de nodos necesarios para alcanzar una pérdida del 80 % de conectividad en comparación a cuando *A. marginale* estaba presente lo que indica que en esta condición la presencia del patógeno le confiere robustez a la comunidad. Estos resultados sugieren que *A. marginale* puede jugar roles variados en los diferentes estadios del ciclo de vida de esta especie de garrapatas.

Conclusiones

Nuestro estudio corrobora que las comunidades microbianas dentro de las garrapatas son consorcios complejos, y la presencia de patógenos las modifican para facilitar su establecimiento y su transmisión a hospederos no infectados. Las comunidades microbianas de *R. microplus* expuestas a la presencia de *A. marginale* en el tiempo, mostraron que el patógeno pasó de tener conexiones diversas iniciales a ser un taxón clave que induce una disbiosis y cambia las interacciones dentro de la comunidad probablemente para la creación de un ambiente favorable que facilite su colonización dentro de la garrapata. Su mayor presencia en el estadio de ninfas, subraya la importancia potencial de dirigir las estrategias de control de la transmisión de esta enfermedad hacia esta etapa de desarrollo de *R. microplus*. Estos resultados constituyen estudios pioneros en Cuba y aportan nuevos datos sobre la interacción de un agente patógeno como *A. marginale* con la microbiota de la especie de

garrapatas que lo transmiten. La identificación de taxones clave dentro de la comunidad como CLE y *Rickettsiella* que interactúan negativamente con *A. marginale* y la interacción positiva con taxones como *Pseudoalteromonas* constituyen el primer paso para una futura manipulación del microbioma como una estrategia eficaz para controlar la propagación y el desarrollo de Anaplasmosis bovina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hopla CE, Durden LA, Keirans JE. Ectoparasites and classification. Rev Sci Tech. 1994;13(4):985-1017.
- Jasiorowski HA. Opening statement for the FAO Expert Consultation on Revision of Strategies for the Control of Ticks and Tick-borne Diseases. Parassitologia. 1990;32(1):13-4.
- Graf JF, Gogolewski R, Leach-Bing N, Sabatini GA, Molento MB, Bordin EL, *et al.* Tick control: an industry point of view. Parasitology. 2004;129 Suppl:S427-42.
- Heath A, Levot GW. Parasiticide resistance in flies, lice and ticks in New Zealand and Australia: mechanisms, prevalence and prevention. N Z Vet J. 2015;63(4):199-210.
- Wang J, Gao L, Aksoy S. Microbiota in disease-transmitting vectors. Nature Reviews Microbiology. 2023;21(9):604-18.
- Fogaça AC, Sousa G, Pavanelo DB, Esteves E, Martins LA, Urbano-vá V, Kopáček P, Daffre S. Tick Immune System: What Is Known, the Interconnections, the Gaps, and the Challenges. Frontiers in immunology. 2021;12: 628054.
- Wei N, Cao J, Zhang H, Zhou Y, Zhou J. The Tick Microbiota Dysbiosis Promote Tick-Borne Pathogen Transstadial Transmission in a *Babesia microti*-Infected Mouse Model Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2021;11:713466.
- Mateos-Hernández L OD, Wu-Chuang A, Maye J, Bornères J, Versillé N, *et al.* Anti-Microbiota Vaccines Modulate the Tick Microbiome in a Taxon-Specific Manner. Front Immunol 2021(12):704621.
- Mateos-Hernandez L, Obregon D, Maye J, Borneres J, Versille N, de la Fuente J, Estrada-Peña A, Hodzic A, Simo L, Cabezas-Cruz A. Anti-Tick Microbiota Vaccine Impacts *Ixodes ricinus* Performance during Feeding. Vaccines. 2020;8(4).
- Abraham NM, Liu L, Jutras BL, Yadav AK, Narasimhan S, Gopalakrishnan V, *et al.* Pathogen-mediated manipulation of arthropod microbiota to promote infection. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017;114(5):E781-e90.
- Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2 Nature Biotechnology. 2019;37(8):852-7.
- Katoh K, Misawa K, Kuma KI, Miyata T. MAFFT: A novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. Nucleic Acids Research. 2002;30(14):3059-66.
- Price MN, Dehal PS, Arkin AP. FastTree 2-approximately maximum-likelihood trees for large alignments. PLoS ONE. 2010;5(3):e9490.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and webbased tools Nucleic Acids Res. 2013;41(Database issue):D590-D6.

15. DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, Huber T, Dalevi D, Hu P, Andersen GL. Greengenes, a Chimeric-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72 (7):5069-72.
16. Faith DP. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biol Conserv* 1992;61:1-10.
17. Pielou EC. Species-diversity and pattern-diversity in the study of ecological succession *J Theor Biol*. 1966;10 (2):370-83.
18. Bray JR, Curtis, J. T. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecological Monographs*. 1957;27(4):326-49.
19. Friedman J, Alm EJ. Inferring correlation networks from genomic survey data. *PLoS Computational Biology*. 2012;8(9):e1002687.
20. Estrada-Peña A, Bouattour A, Camicas J, Walker A. Ticks of domestic animals in the Mediterranean region. A guide to identification of species. Zaragoza, España: University of Zaragoza. 2004.
21. Gondard MD S, Pinarello V, Aprelon R, Devillers E, Galon C, Pradel J, Vayssier-Taussat M, Albina E, Moutailler S. Upscaling the surveillance of tick-borne pathogens in the French Caribbean islands. *Pathogens*. 2020;9:176.
22. Mateos-Hernández L, Obregon D, Wu-Chuang A, Maye J, Bornères J, Versillé N, de La Fuente J, Díaz-Sánchez S, Bermúdez-Humarán LG, Torres-Maravilla E, Estrada-Peña A, Hodžić A, Šimo L, Cabezas-Cruz A. Anti-microbiota vaccines modulate the tick microbiome in a taxon-specific manner. *Frontiers in immunology*. 2021;12:704621.
23. Guizzo MG, Tirloni L, Gonzalez SA, Farber MD, Braz G, Parizi LF, Dedavid E Silva LA, Da Silva Vaz I, Oliveira PL. *Coxiella* endosymbiont of *Rhipicephalus microplus* modulates tick physiology with a major impact in blood feeding capacity. *Front Microbiol* 2022;13:868575.
24. Rialch A, Sankar M, Silamparasan M, Madhusoodan AP, Kharyat NS, Gautam S, Gurav AR, Thankappan S. Molecular detection of *Coxiella*-like endosymbionts in *Rhipicephalus microplus* from north India. *Vet Parasitol: Reg Stud Rep* 2022;36:100803.
25. Encinosa Guzmán PE, Fernández C, Cano Argüelles AL, Fuentes Castillo A, García Y, Rodríguez R, *et al*. Characterization of two Cuban colonies of *Rhipicephalus microplus* ticks. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*. 2021;25:100591.
26. Duron O, Jourdain E, McCoy KD. Diversity and global distribution of the *Coxiella* intracellular bacterium in seabird ticks. *Ticks Tick Borne Dis*. 2014;5(5):557-63.
27. Hammer Ø, Harper DA. Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*. 2001;4(1):1.
28. Abuin-Denis L, Piloto-Sardiñas E, Maitre A, Wu-Chuang A, Mateos-Hernández L, Obregon D, Cabezas-Cruz A. Exploring the impact of *Anaplasma phagocytophilum* on colonization resistance of *Ixodes scapularis* microbiota using network node manipulation. *Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases*. 2024;5:100177.
29. Spragge F, Bakkeren E, Jahn MT, BN Araujo E, Pearson CF, Wang X, Foster KR. Microbiome diversity protects against pathogens by nutrient blocking. *Science*. 2023;382:6676 ead3502.
30. Piloto-Sardiñas E, Foucault-Simonin A, Wu-Chuang A, Mateos-Hernández L, Marrero-Perera R, Abuin-Denis L, Roblejo-Arias L, Díaz-Corona C, Zaja Z, Kulisz J, Wozniak A, Moutailler S, Corona-González B, Cabezas-Cruz A. Dynamics of infections in cattle and *Rhipicephalus microplus*: A preliminary study. *Pathogens*. 2023;12(8):998.
31. Woolhouse MET, SM, Jennings A, Chase-Topping M, Callaby R, Kiara H, Oosthuizen MC, Mbole-Kariuki MN, Conradie I, Handel IG, *et al*. Co-infections determine patterns of mortality in a population exposed to parasite infection. *Sci Adv Virus Res*. 2015(1):1400026.
32. Eriks IS, Stiller D, Palmer GH. Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission. *J Clin Microbiol*. 1993;31(8):2091-6.
33. Nair ASR R, Lakshmanan B, Sreekumar C, Kumar SS, Raju R, Tre-samol PV, Vimalkumar MB Saseendranath MR. Bovine carriers of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma bovis* in South India. *Trop Biomed*. 2013;30:105-12.
34. Wei Z, Yang T, Friman VP, Xu Y, Shen Q, Jousset A. Trophic network architecture of root-associated bacterial communities determines pathogen invasion and plant health. *Nature communications*. 2015;6:8413.
35. Piloto-Sardiñas E, Abuin-Denis L, Maitre A, Foucault-Simonin A, Corona-González B, Díaz-Corona C, Roblejo-Arias L, Mateos-Hernández L, Marrero-Perera R, Obregon D, Svobodová K, Wu-Chuang A, Cabezas-Cruz A. Dynamic nesting of *Anaplasma marginale* in the microbial communities of *Rhipicephalus microplus*. *Ecology and Evolution*. 2024;14(4):e11228.
36. Abuin-Denis L, Piloto-Sardiñas E, Maitre A, Wu-Chuang A, Mateos-Hernández L, Paulino PG, Bello Y, Ledesma Bravo F, Alvarez Gutierrez A, Rodríguez R, Fuentes Castillo A, Méndez L, Foucault-Simonin A, Obregon D, Estrada-García MP, Rodríguez-Mallón A, Cabezas-Cruz A. Differential nested patterns of *Anaplasma marginale* and *Coxiella*-like endosymbiont across *Rhipicephalus microplus* ontogeny. *Microbiological Research*. 2024:127790.
37. Maitre A, Wu-Chuang A, Mateos-Hernández L, Piloto-Sardiñas E, Foucault-Simonin A, Cicculli V, Moutailler S, Paoli JC, Falchi A, Obregón D, Cabezas-Cruz A. Rickettsial pathogens drive microbiota assembly in *Hyalomma marginatum* and *Rhipicephalus bursa* ticks. *Molecular Ecology*. 2023;32(16):4660-76.
38. Duron O, Binetruy F, Noël V, Cremaschi J, McCoy KD, Arnathau C, Chevillon C. Evolutionary changes in symbiont community structure in ticks. *Molecular ecology*. 2017;26(11):2905-21.
39. Pavanelo DB P-SE, Maitre A, Abuin-Denis L, Kopa' c' ek P, Cabezas Cruz A and Fogac,a AC. Arthropod microbiota: shaping pathogen establishment and enabling control. *Front Arachn Sci*. 2023;2:1297733.
40. Duron O, Gottlieb Y. Convergence of nutritional symbioses in obligate blood feeders. *Trends Parasitol*. 2020;36(10):816-25.

Recibido: 18/09/2025

Aprobado: 28/09/2025

Agradecimientos

Los autores agradecen a los investigadores Zbigniew Zaja, Joanna Kulisz y Aneta Wozniak de la Universidad Médica de Lublin en Polonia por su contribución a la realización de estas investigaciones. Los autores también reconocen el papel de la Dra. Sara Moutailler de ANSES por su apoyo a la realización de estas investigaciones. Agradecemos a la Dra. Andréa Cristina Fogaça de la Universidad

de São Paulo, en Brasil por su revisión de los trabajos y a los investigadores Vaidas Palinauskas y Justė Aželytė del Centro de Investigación de la Naturaleza de Lituania por su apoyo en la realización de estos trabajos.

Contribución de los autores

- Conceptualización: Belkis Corona González, Alina Rodríguez Mallon, Alejandro Cabezas Cruz, Mario Pablo Estrada García
- Curación de datos: Lianet Abuin Denis, Elianne Piloto Sardiñas, Lourdes Mateos-Hernández, Alejandra Wu-Chuang, Apolline Maitre, Angélique Foucault-Simonin
- Análisis formal: Lourdes Mateos-Hernández, Alejandra Wu-Chuang, Apolline Maitre, Angélique Foucault-Simonin, Karolína Svobodová, Patrícia Gonzaga Paulino
- Adquisición de fondos: Belkis Corona González, Alina Rodríguez Mallon, Alejandro Cabezas Cruz
- Investigación: Lianet Abuin Denis, Elianne Piloto Sardiñas, Roxana Marrero-Perera, Lisset Roblejo Arias, Cristian Díaz-Corona, Alier Fuentes Castillo, Rafmary Rodríguez Fernández, Frank Luis Ledesma, Yamil Bello Soto, Anays Álvarez Gutiérrez
- Metodología: Lianet Abuin Denis; Elianne Piloto Sardiñas, Belkis Corona González, Alina Rodríguez Mallon, Alejandro Cabezas Cruz, Dasiel Obregón, Luis Méndez Mellor
- Administración del proyecto: Alejandro Cabezas Cruz, Mario Pablo Estrada García, Luis Méndez Mellor
- Recursos: Alejandro Cabezas Cruz
- Software: Dasiel Obregón
- Supervisión: Belkis Corona González, Alina Rodríguez Mallon, Alejandro Cabezas Cruz, Lourdes Mateos-Hernández, Alejandra Wu-Chuang, Mario Pablo Estrada García, Luis Méndez Mellor
- Redacción-borrador original: Lianet Abuin Denis, Elianne Piloto

Sardiñas, Lourdes Mateos-Hernández, Alejandra Wu-Chuang

- Redacción-revisión y edición: Belkis Corona González, Alina Rodríguez Mallon, Alejandro Cabezas Cruz; Dasiel Obregón, Apolline Maitre, Angélique Foucault-Simonin, Karolína Svobodová, Patrícia Gonzaga Paulino

Conflictos de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses entre ellos, ni con la investigación presentada, ni con la institución que representa.

Financiamientos

La investigación fue financiada por el CIGB, el CENSA, el LNP y 2 becas de doctorado de ANSES, INRAE, UMR BIPAR, Francia cotutoreadas con el CIGB y el CENSA respectivamente.

Cómo citar este artículo

Abuin Denis L, Piloto Sardiñas E, Corona González B, Rodríguez Mallon A, Cabezas Cruz A, Mateos-Hernández L, et al. Interacción de la microbiota de la garrapata *Rhipicephalus microplus* con el patógeno *Anaplasma marginale*. An Acad Cienc Cuba [Internet] 2025 [citado en día, mes y año];15(2):e3171. Disponible en: <http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/3171>

El artículo se difunde en acceso abierto según los términos de una licencia Creative Commons de Atribución/Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0), que le atribuye la libertad de copiar, compartir, distribuir, exhibir o implementar sin permiso, salvo con las siguientes condiciones: reconocer a sus autores (atribución), indicar los cambios que haya realizado y no usar el material con fines comerciales (no comercial).

© Los autores, 2025.

