

Universidad de Panamá
Vicerrectoría de Investigación y Postgrado
Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología

Programa de Maestría en Ciencias Biológicas
con Orientación en Biología Molecular

Identificación molecular de garrapatas y detección de sus patógenos asociados
en fincas de ganado bovino, Panamá.

Por:
Lic. Kiria Jearim Bernal López

Tesis de postgrado sometida a consideración, para optar por el título de Magister
en Ciencias Biológicas con orientación en Biología Molecular

2022

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

Programa de maestría en: Ciencias Biológicas con orientación en Biología
Molecular

Facultad de: Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología

Número de código:

Nombre del estudiante: Kiria Jearim Bernal López

Título al que aspira: Magíster en Ciencias Biológicas con orientación en Biología
Molecular

Tema de tesis: Identificación molecular de garrapatas que parasitan bovinos en
fincas ganaderas de Panamá.

Nombre del asesor: Dr. Ricardo Leonart Cruz

Firma del asesor: _____

Firma del estudiante: _____

Aprobado por: _____

Coordinador del programa

Director de la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado

Fecha:

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi motor, mi familia, a mi esposo Dario, quien es mi pilar de apoyo, quien compartió sacrificios desde el primer día y fue siempre mi voz de aliento en los momentos difíciles e igualmente celebró cada logro junto a mí. A mi hija, Valeria, quien desde el vientre compartió cada sentir en la última y difícil fase de este camino y al nacer es quien me recarga de fuerzas para ser mejor cada día, esto es por tí y para tí. A mis padres, Walkiria y Javier, quienes apoyan cada una de mis metas, siempre atentos y dispuestos a impulsarlas y celebrarlas. A mi hermano, Gamalier, por ser incondicional y siempre ávido a servir de apoyo en cada necesidad.

A todos, gracias. Las palabras no alcanzan para agradecer todo lo que por mí hacen. Mis metas y logros cumplidos son de ustedes, esta es una de ellas... gracias por hacerla posible.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primera oportunidad a mi Dios, porque todo lo que soy y tengo, a él se lo debo. Por abrir puertas y llenarme de fortaleza, sabiduría y resiliencia para seguir adelante.

También doy gracias a mi asesor de tesis, Dr. Ricardo Leonart del Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología (INDICASAT-AIP), por darme la oportunidad de trabajar en su equipo, por su valioso tiempo y paciencia para enseñarme las herramientas para el trabajo molecular en laboratorio y el desarrollo teórico de toda la investigación. Agradezco al Dr. Marcelino Jaén del Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá (IDIAP), quien fue parte fundamental en la colaboración con esta institución, por todo el apoyo durante la investigación; por estar siempre dispuesto y pendiente de la consecución de los objetivos. Al Dr. Carlos Restrepo y la Lic. Iliana Quintero del INDICASAT-AIP, así como a las estudiantes tesisistas Andreina Ayala de la Universidad Latina y Odette Velásquez de la Universidad de Panamá, por su importante y sensitiva colaboración en los trabajos de laboratorio. Muchas gracias, su ayuda fue vital para cumplir las metas propuestas.

A la MSc. Hilda Castillo, por su colaboración y guía durante la fase inicial, siendo parte del IDIAP; a la Ing. Carmen Bieberach Forero, a la Ing. Yarabis Navarro y a la Lic. Leydis Villegas de la misma institución (CIA Central-Divisa), por su amable disposición en brindar apoyo logístico e intelectual a la investigación y a mi persona. A mis amigos y compañeros: MSc. Luisa Collado, MSc. Edwin Hernandez, MSc. Indira Quintero, MSc. José Thomas y la MSc. Kayra Aguilar, gracias por todo el apoyo, por cada aporte desde el día uno para nutrir y apoyar esta investigación y además ser soporte intelectual y emocional a lo largo de toda la fase académica... somos un equipo y el cumplimiento de esta meta es de todos. Finalmente quiero agradecer al Programa de Maestría en Ciencias Biológicas y a la Secretaria Nacional de Ciencias y Tecnología (SENACYT), por darme la oportunidad de ser parte de este convenio, por todos los beneficios económicos y de formación educativa que se me otorgaron como becaria de estas instituciones. Gracias.

Contenido

I Resumen	viii
II Introducción.....	xi
Objetivos, pregunta e hipótesis de investigación.....	xv
CAPÍTULO I: Marco teórico	17
1.1 Taxonomía, registro fósil y especies descritas de Ixódidos	17
1.2 Biología, reproducción y ciclo de vida de la familia Ixodidae	19
1.3 La familia Ixodidae como vector de enfermedades.....	20
1.4 Garrapata tropical del ganado bovino	22
1.5 Impacto de la parasitosis de garrapatas en el sector ganadero	23
1.6 Uso de marcadores moleculares en identificación de garrapatas.....	25
1.7 Detección de patógenos mediante herramientas moleculares.....	29
CAPÍTULO 2: Metodología	32
2.1 Área de estudio.....	32
2.2 Colecta de muestras	33
2.3 Identificación Morfológica	35
2.4 Extracción de material genético	37
2.5 Amplificación de material genético	38
2.6 Secuenciación del material genético	47
2.7 Análisis de datos – herramientas bioinformáticas.....	47
CAPÍTULO 3	50
Resultados.....	50
3.1 Identificación morfológica de garrapatas del bovino	50
3.2 Identificación molecular y filogenia de garrapatas del bovino.....	52
3.3 Detección de patógenos asociados a las garrapatas del bovino	70
3.4 Discusión	79
Conclusiones	86
Recomendaciones.....	87
Limitantes	87
Referencias.....	88

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Familia Ixodidae, especies reportadas en Panamá por género.....	18
Cuadro 2: Datos de ubicación de las fincas ganaderas participantes del estudio.....	32
Cuadro 3: Protocolo de amplificación de marcadores de identificación molecular.....	40
Cuadro 4: Información de cebadores utilizados para cada gen marcador	41
Cuadro 5: Porcentaje de agarosa, cantidad de buffer de corrida TBE 0.5X y de tinte SYBR-Safe, para electroforesis de cada fragmento de marcador amplificado.....	42
Cuadro 6: Protocolo de amplificación para la detección de los patógenos.....	43
Cuadro 7: Características de los cebadores para detección de los patógenos.....	43
Cuadro 8: Protocolo de ciclado, PCR tiempo real para la detección de <i>Rickettsia sp.</i>	47
Cuadro 9: Reporte taxonómico del análisis morfológico de las muestras de garrapatas colectadas por finca.....	50
Cuadro 10: Secuencias del gen 12S ARNr usadas para evaluar al marcador en la identificación de <i>Rhipicehalus microplus</i>	53
Cuadro 11: Matriz de distancia genética, gen 12S ARNr de <i>Rhipicephalus microplus</i> con otras especies de <i>Rhipicephalus</i> y un grupo externo. Modelo Kimura 2-parámetros.....	54
Cuadro 12: Secuencias externas del gen 12S ARNr de <i>Rhipicephalus microplus</i> , usadas en la construcción del análisis filogenético intraespecífico.....	55
Cuadro 13: Matriz de distancia genética, gen 12S ARNr de <i>Rhipicephalus microplus</i> con otras secuencias de la misma especie. Modelo Kimura 2-parámetros.....	56
Cuadro 14: Secuencias del gen 16S ARNr usadas para evaluar al marcador en la identificación de <i>Rhipicehalus microplus</i>	59
Cuadro 15: Matriz de distancia genética, gen 16S ARNr de <i>Rhipicephalus microplus</i> y grupos externos. Modelo Kimura 2-parámetros.....	59
Cuadro 16: Secuencias externas del gen 16S ARNr de <i>Rhipicephalus microplus</i> , usadas en la construcción del análisis filogenético.....	61
Cuadro 17: Matriz de distancia genética, gen 16S ARNr de <i>Rhipicephalus microplus</i> , modelo Kimura 2-parámetros.....	62
Cuadro 18: Secuencias del ITS-2 usadas para evaluar al marcador en la identificación de <i>Rhipicehalus microplus</i>	65
Cuadro 19: Matriz de distancia genética, ITS-2 de <i>Rhipicephalus microplus</i> y grupos externos. Modelo Kimura 2-parámetros.....	65
Cuadro 20: Secuencias externas del ITS-2 de <i>Rhipicephalus microplus</i> , usadas en la construcción del análisis filogenético.....	67
Cuadro 21: Matriz de distancia genética ITS-2, modelo Kimura 2-parámetros.....	68
Cuadro 22: Muestras de ADN de garrapatas positivas para <i>Anaplasma marginale</i> y su ubicación en las fincas en estudio.....	70
Cuadro 23: Muestras de ADN de garrapatas positivas para <i>Rickettsia ssp</i> y su ubicación en las fincas en estudio.....	74
Cuadro 24: Muestras de ADN de garrapatas positivas para <i>Rickettsia ssp</i>	75

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ubicación geográfica de las fincas ganaderas en estudio.....	33
Figura 2: Resumen gráfico de la extracción y colecta de garrapatas.....	34
Figura 3: Diagrama de caracteres usados para identificación morfológica.....	36
Figura 4: Disección, pesaje y preparación del tejido de la muestra de garrapatas para la extracción de ADN.....	37
Figura 5: Protocolo gráfico de extracción de ADN del tejido de las muestras de garrapatas, kit comercial DNeasy Blood & Tissue Kit.....	39
Figura 6: Resumen gráfico del protocolo de amplificación de las muestras de ADN.....	44
Figura 7: Resumen gráfico de la electroforesis en gel de agarosa.....	45
Figura 8: Caracteres de identificación para <i>Rhipicephalus microplus</i>	51
Figura 9: Alineamiento de las 78 secuencias del gen 12S ARNr, del ADN extraído de garrapatas del bovino, Panamá.....	52
Figura 10: Árbol filogenético Neighbor-Joining, gen 12S ARNr de <i>Rhipicephalus microplus</i> y grupos externos.....	54
Figura 11: Árbol filogenético Neighbor-Joining, gen 12S ARNr de <i>Rhipicephalus microplus</i>	57
Figura 12: Alineamiento de 82 secuencias del gen 16S ARNr, del ADN de garrapatas del bovino, Panamá.....	58
Figura 13: Árbol filogenético Neighbor-Joining, gen 12S ARNr de <i>Rhipicephalus microplus</i> y grupos externos.....	60
Figura 14: Árbol filogenético Neighbor-Joining, gen 16S ARNr de <i>Rhipicephalus microplus</i>	63
Figura 15: Alineamiento de 82 secuencias del ITS-2, del ADN de garrapatas del bovino, Panamá.....	64
Figura 16: Árbol filogenético Neighbor-Joining, ITS-2 de <i>Rhipicephalus microplus</i> y grupos externos.....	66
Figura 17: Árbol filogenético Neighbor-Joining, ITS-2 de <i>Rhipicephalus microplus</i>	69
Figura 18: Geles de electroforesis de muestras de ADN de garrapatas positivas para <i>Anaplasma marginale</i>	71
Figura 19: Geles de electroforesis de muestras de ADN de garrapatas positivas para <i>Anaplasma marginale</i>	72
Figura 20: a) Muestras de ADN de garrapatas positivas a <i>Anaplasma marginale</i> por finca en estudio. b) Porcentaje de positividad a <i>Anaplasma marginale</i> por finca.....	73
Figura 21: Porcentaje de muestras de ADN positivas a <i>Anaplasma marginale</i> por provincia participante.....	74
Figura 22: a) Muestras de ADN de garrapatas positivas a <i>Rickettsia ssp.</i> por finca en estudio. b) Porcentaje de positividad a <i>Rickettsia ssp.</i> por finca.....	76
Figura 23: Porcentaje de muestras de ADN positivas a <i>Rickettsia ssp.</i> por provincia participante.....	77
Figura 24: Geles de electroforesis que muestran la amplificación del marcador en las muestras de ADN-C+ (control positivo) para los hemoparásitos <i>Babesia bovis</i> y <i>Babesia bigemina</i>	78

I
RESUMEN

Resumen

Uno de los organismos que se encuentra afectado por la parasitosis de garrapatas es el bovino; estos arácnidos se han convertido en una de las problemáticas más recurrentes de la industria ganadera en la mayoría de los hatos bovinos del mundo, incluyendo a Panamá, provocando millonarias pérdidas. No obstante, Panamá no cuenta con investigaciones moleculares publicadas, que analicen el material genético de la especie o especies que parasitan a los bovinos del país. Así pues, generar información taxonómica molecular de este parásito servirá de referencia y punto de partida para proveer al país soluciones innovadoras a esta problemática de la industria bovina. Por esta razón, este trabajo busca identificar mediante técnicas moleculares la o las especies de garrapatas que parasitan bovinos en ocho fincas ganaderas de Panamá y monitorear la presencia de patógenos asociados a este parásito. Para cumplir con el objetivo, se colectaron 82 muestras de garrapatas de bovinos de ocho fincas en diferentes provincias del país. Los genes marcadores ITS-2, 16S ARNr y 12S ARNr, amplificados del ADN extraído de las muestras de garrapatas, se secuenciaron y analizaron con herramientas bioinformáticas; además, se evaluó mediante prueba PCR, la presencia de los patógenos *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Anaplasma marginale* y *Rickettsia sp.* Los resultados morfológicos y moleculares señalan que todas las muestras de garrapatas colectadas pertenecen a la especie *Rhipicephalus microplus* y se valida la utilidad de los genes marcadores ITS-2, 16S ARNr y 12S ARNr en la identificación de esta especie. También fueron detectados los patógenos *A. marginale* y *Rickettsia spp.* en las muestras estudiadas.

II

INTRODUCCIÓN

Introducción

La identificación y clasificación de organismos se ha basado tradicionalmente en el uso de análisis anatómicos y/o morfológicos; sin embargo, estas herramientas pueden resultar difíciles en diferentes casos, por ejemplo, cuando existe plasticidad fenotípica, diferencias ontogénicas y dimorfismo sexual; así como en estudios con estadios larvales o con fragmentos de tejidos (Hebert, Cywinska, Ball, & deWaard, 2003; Packer *et al.*, 2009; Eaton *et al.*, 2010). Con el desarrollo de la biología molecular y las herramientas basadas en el análisis del material genético, surge una nueva metodología para el estudio taxonómico, que ha supuesto un nuevo salto para el mundo de la sistemática, ya que se cimenta en el último bastión de la variabilidad biológica, el ADN. No obstante, es importante señalar que las herramientas moleculares son un complemento a todas las otras técnicas empleadas en taxonomía; ya que la integración de estos métodos permite generar resultados más robustos y definitivos (Soriano, 2004).

Clásicamente, como en la mayoría de los organismos, la taxonomía y la sistemática de los arácnidos, específicamente de las garrapatas se han definido mediante estudios morfológicos; sin embargo, en las últimas décadas las herramientas moleculares han tenido un gran impacto en la sistemática de este grupo, permitiendo explorar las relaciones poblacionales, delimitar las especies, hacer análisis filogenéticos e incluso, identificar potenciales zonas de riesgo de transmisión de enfermedades.

De esta manera, para lograr un manejo y control sostenible de estos parásitos es importante destinar tiempo y esfuerzos para conocerlos a profundidad y detalle en el área molecular, haciendo uso de estas técnicas.

Uno de los organismos que se encuentra fuertemente afectado por la parasitosis de garrapatas es el bovino; convirtiéndose en una de las problemáticas más recurrentes en la industria ganadera en la mayoría de los hatos bovinos del mundo, generando pérdidas millonarias anualmente; por lo que en la actualidad se han aumentado las investigaciones basadas en la biología molecular de este parásito.

Al igual que en las diferentes regiones ganaderas a nivel mundial, en Panamá la problemática vinculada a las garrapatas y sus afectaciones en los bovinos ha sido y es la más recurrente en la industria ganadera, por lo que conseguir optimizar métodos de control es motivo de interés para los productores de carne y leche del país. Los métodos convencionales (organofosforados, piretroides sintéticos, amidinas cíclicas y lactonas macrocíclicas) para el control de las garrapatas, hoy resultan ineficientes, por el desarrollo paulatino de resistencia o multirresistencia (Jaén T *et al.*, 2015). Además, el uso indiscriminado del control químico, causa que trazas de estos plaguicidas se puedan concentrar en los productos derivados del ganado (leche y carne) (Cen-pacheco, 2017; Jaén T *et al.*, 2015).

Por otro lado, generan daño ambiental al no ser manipulados de la manera correcta, contaminando ríos, lagos y otras fuentes de agua, así como a otras especies de plantas y animales. Por lo que se hace imperante buscar soluciones eficaces, limpias y sostenibles para el control de las garrapatas en este sector.

No obstante, Panamá no cuenta con investigaciones genéticas y/o moleculares publicadas que analicen el material genético de la especie o especies que parasitan a los bovinos del país. Por lo que es necesario optimizar la especificidad, sensibilidad y rapidez de las técnicas aplicadas a la identificación mediante el uso de herramientas moleculares.

Así pues, generar información taxonómica molecular de este parásito servirá de referencia a futuras investigaciones y proporcionará un punto de partida para proveer al país soluciones innovadoras a la más recurrente problemática de la industria de producción bovina. Al establecer bases para el desarrollo de nuevos programas de control integral basados en biología molecular para prevenir y controlar las infestaciones por garrapatas en el ganado (Domínguez García *et al.*, 2016).

De igual manera, el monitoreo molecular de los patógenos que son transmitidos por las garrapatas y amenazan la salud de los hatos bovinos del país permite detectar la presencia de estos y establecer estrategias de prevención, mitigación y control de enfermedades de forma oportuna.

Considerando la información expuesta, en el capítulo uno de este trabajo se encuentra información general sobre las características, biología y efectos de las garrapatas sobre el ganado bovino información sobre el uso de herramientas moleculares para la identificación de garrapatas. En el capítulo dos se encuentra el proceso metodológico utilizado para cumplir los objetivos de la investigación, organizados y detallados de forma clara para su reproducibilidad en investigaciones futuras. Los resultados y el análisis

de cada uno de ellos se registran y explican en el capítulo tres. Finalmente, el capítulo cuatro se encuentra constituido por las conclusiones, recomendaciones y limitaciones de esta la investigación.

Objetivos, pregunta e hipótesis de investigación:

a. Objetivos

General:

Identificar mediante técnicas moleculares las especies de garrapatas que parasitan bovinos en ocho fincas ganaderas de Panamá y monitorear la presencia de patógenos asociados a este parásito.

Específicos:

- ✓ Preparar un reporte de las especies de garrapatas en el ganado bovino, usando claves morfológicas.
- ✓ Emplear los marcadores moleculares ITS-2, 16S ARNr y 12S ARNr, como técnica de identificación de garrapatas.
- ✓ Registrar la presencia de patógenos asociados a garrapatas en las explotaciones ganaderas investigadas, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Anaplasma marginale* y *Rickettsia sp.*, mediante detección por amplificación PCR.
- ✓ Establecer la filogenia de las garrapatas que parasitan al bovino en las fincas estudiadas.

b. Pregunta e hipótesis de investigación:

Pregunta de investigación:

¿Qué especies de garrapatas parasitan al ganado bovino de fincas ganaderas en Panamá y qué patógenos se encuentran presentes en éstas?

Hipótesis de investigación

La especie de garrapata que parasita al ganado bovino en fincas ganaderas de Panamá es *Rhipicephalus microplus* y es vector recurrente de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale*.

1

CAPÍTULO
MARCO TEÓRICO

CAPITULO I: Marco teórico

1.1 Taxonomía, registro fósil y especies descritas de Ixódidos

Las garrapatas son artrópodos que surgieron hace aproximadamente 120 millones de años en el Cretácico tardío (Klompen *et al.*, 1996) pertenecen a la clase Arachnida (Subclase Acari), superorden Parasitiformes, orden Ixodida, superfamilia Ixodoidea, dentro de la cual se han categorizado tres familias Argasidae, Ixodidae y Nuttalliellidae (Crampton, McKay, & Barker, 1996).

Recientes hipótesis basadas en evidencias fósiles sitúan el origen de este grupo en el Cretácico, entre los 146 millones de años y los 65 millones de años AP, con la mayor evolución y dispersión entre los 65 y los 5 millones de años AP, correspondiente al periodo Cenozoico. El fósil más antiguo es el del árgasido *Carios jerseyi*, con una antigüedad de 90 a 94 millones de años atrás, lo que pone de manifiesto la temprana diversificación de este grupo en las familias antes mencionadas (De La Fuente, 2003; Klompen *et al.*, 1996).

La población mundial de garrapatas cuenta con 19 géneros y 939 especies descritas, concentradas principalmente en las regiones tropicales y subtropicales del planeta; siendo la familia Ixodidae la de mayor diversidad con 14 géneros y 727 especies, un 77% del total de estas. Por su parte la familia Argasidae cuenta con 4 géneros y 211 especies, finalmente en la familia Nuttalliellidae solo hay registros de un único género, el género *Nuttalliella* y una especie, la denominada *Nuttalliella namaqua* (Nava, Venzal, González-Acuña, Martins, & Guglielmone, 2017; Rivera-Páez *et al.*, 2018).

1.1.1 Diversidad de la familia Ixóididae en Panamá

En Panamá se han registrado 47 especies de garrapatas pertenecientes a 8 géneros, 37 referidas a la familia Ixóididae (garrapatas duras) y 10 a la familia Argasidae (garrapatas blandas). El género *Amblyomma* es el más diverso en Panamá y cuenta con 19 especies (Cuadro 1) (Bermúdez, Apanaskevich & Domínguez, 2018; Murgas, Castro & Bermúdez, 2013).

Cuadro 1. Familia Ixóididae, especies reportadas en Panamá por género.

Amblyomma	Dermacentor	Haemaphysalis	Ixodes	Rhipicephalus
<i>A auricularium</i>	<i>D imitans</i>	<i>H juxtakochi</i>	<i>I affinis</i>	<i>R microplus</i>
<i>A calcaratum</i>	<i>D latus</i>	<i>H leporispalustris</i>	<i>I auritulus</i>	<i>R sanguineus</i>
<i>A coelebs</i>	<i>D nitens</i>		<i>I bequaerti</i>	
<i>A dissimile</i>	<i>D panamensis</i>		<i>I bocatorensis</i>	
<i>A geayi</i>			<i>I boliviensis</i>	
<i>A longirostre</i>			<i>I luciae</i>	
<i>A mixtum</i>			<i>I pomerantzi</i>	
<i>A naponense</i>			<i>I rubidus</i>	
<i>A nodosum</i>			<i>I tapirus</i>	
<i>A oblongoguttatum</i>			<i>I tiptoni</i>	
<i>A ovale</i>			<i>I venezuelensis</i>	
<i>A pacae</i>				
<i>A parvum</i>				
<i>A pecarium</i>				
<i>A rotundatum</i>				
<i>A sabanerae</i>				
<i>A tapirellum</i>				
<i>A varium</i>				

1.2 Biología, reproducción y ciclo de vida de la familia Ixodidae

Los ixódidos poseen una placa esclerotizada en el dorso de su cuerpo, que se le conoce como escudo, responsable de su epíteto “garrapatas duras”. De forma general el cuerpo de las garrapatas está dividido en gnatosoma o parte anterior e idiosoma o parte posterior. El gnathosoma contiene un par de palpos, un par de quelíceros y una pieza especializada, el hipostoma, con varias filas de dientes, que se utiliza como órgano de anclaje a la piel del hospedador (Sonenshine *et al.*, 2002). Estos organismos están bien adaptados para sobrevivir en múltiples condiciones por lo que han colonizado la mayoría de los ecosistemas, mayormente distribuidos en hábitats tropicales y subtropicales donde hay mayor diversidad de especies, de igual manera se pueden encontrar en zonas templadas e incluso regiones subárticas (Anderson & Magnarelli, 2008).

El modelo de reproducción es de tipo sexual con fecundación interna. Las hembras de las garrapatas duras, después de copular encima del hospedador, caen de él y buscan un sitio seguro donde ovipositar, generalmente en el suelo (Sonenshine *et al.*, 2002) cerca de la vegetación que les provee refugio y regulación de la temperatura y la humedad. Bajo condiciones climáticas óptimas de temperatura y humedad, oviponen dentro de los dos días siguientes, pero en épocas frías pueden tardar semanas o meses. Los huevos de las garrapatas duras son depositados en un solo grupo grande en sitios húmedos, cálidos y protegidos del calor extremo. Después de la oviposición la hembra muere, por tanto, cada hembra solo ovipone una vez en el transcurso de su vida. La tasa de oviposición en este tipo de garrapatas varía de acuerdo con la especie, con un rango muy amplio que va desde 4 500 huevos en el género

Rhipicephalus hasta 22 000 huevos en el género *Amblyomma* (Polanco-Echeverry & Ríos-Osorio, 2016).

Los miembros de la familia Ixodidae, se encuentran parasitando a todo tipo de vertebrados silvestres y domésticos constituyéndose desde sus inicios como organismos hematófagos por lo que se consideran ectoparásitos obligados, con un ciclo de vida que está formado por cuatro estadíos, huevo, larva, ninfa y adulto.

De acuerdo con el número de hospederos que intervienen se pueden distinguir tres tipos de ciclos, ciclos monofásicos o monoxénicos (un solo hospedador, la garrapata nunca deja al hospedador desde su fijación como larva, hasta su desprendimiento como teleógina) (Murrell *et al.*, 2001; Beati & Keirans, 2001), ciclos difásicos o dixénicos (la primera muda tiene lugar en un hospedador y la segunda en el suelo, por lo que necesitan un segundo hospedador) y ciclos trifásicos o trixénicos (ambas mudas tienen lugar en el suelo) las ninfas debe encontrar un segundo hospedador y las adultas un tercero (Anderson & Magnarelli, 2008)

1.3 La familia Ixodidae como vector de enfermedades

Luego que la garrapata se fija en el hospedador el proceso de su alimentación implica la liberación de saliva, la cual tiene propiedades farmacológicas; además el tráfico de sangre y saliva que se da entre el hospedador y el parásito hace posible que se transfieran agentes patógenos entre uno y otro (Márquez-Jiménez *et al.*, 2005). Además, las garrapatas pueden transmitir agentes patógenos a través de fluidos coxales, la regurgitación y las heces, que las hacen responsables de múltiples problemas sanitarios y poseen gran importancia biomédica.

Las garrapatas (precedida por los mosquitos) se encuentran encabezando la lista de vectores que causan enfermedades, debido a que cuantiosos hongos, virus, bacterias y otros parásitos están íntimamente asociados con las garrapatas (Socolovschi *et al.*, 2009) (Dantas-Torres *et al.*, 2012).

La mayoría de los animales domésticos y el ser humano se ven expuestos a la picadura de las garrapatas que a su vez se han alimentado de otros animales silvestres, por lo que se consideran uno de los vectores más importante en la transmisión de agentes patógenos causales de enfermedades en los animales y los seres humanos (Espí Felgueroso, 2011).

La cantidad de enfermedades transmitidas por garrapatas que afectan a humanos y animales domésticos ha ido en aumento en los últimos años, dentro de estas sobresalen la anaplasmosis, babesiosis, erlichiosis, borreliosis y enfermedad de Lyme; sin embargo, uno de los más importantes patógenos que usan a las garrapatas como vector son las bacterias del género *Rickettsia*, causante de rickettsiosis como, por ejemplo, la fiebre manchada de la montaña rocosa y el tifus. Por otro lado, los ixódidos pueden ocasionar parálisis letal, toxemias y anemias severas que pueden provocar la muerte del animal o generar susceptibilidad a otras enfermedades debido a su acción hematófaga (Guglielmone *et al.*, 2006; Acero Mondragón, Calixto, & Prieto, 2011) (Sonenshine *et al.*, 2002).

1.4 Garrapata tropical del ganado bovino

Estudios señalan que *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* es la especie mayormente asociada al ganado bovino y es causante de billonarias pérdidas en el sector ganadero, por lo que se le denomina, la garrapata tropical del ganado bovino; y es uno de los ectoparásitos de mayor importancia económica y sanitaria en este sector (Polanco-Echeverry & Ríos-Osorio, 2016). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* es de origen indo-asiático, distribuida en todo el mundo, mayormente asociada a regiones tropicales y subtropicales. En América se distribuye desde el norte de Argentina hasta México (Vecino *et al.*, 2010).

Es un ectoparásito con un ciclo de vida monoxénico, teniendo un periodo de vida libre y un periodo parasitario. El periodo de vida libre se desarrolla en la vegetación y puede durar hasta 9 meses en dependencia de la humedad y temperatura. Sobre el hospedero se inicia el periodo parasitario que puede durar de 18 a 35 días. En el verano, *Rhipicephalus microplus* puede sobrevivir hasta 3 o 4 meses sin alimentarse y en temperaturas frías pueden vivir sin alimento hasta seis meses; los individuos que no encuentran un hospedero mueren de inanición (Macías Ortiz, 2018).

En cada estado la garrapata se alimenta una vez, pero la alimentación dura varios días. Los machos maduran sexualmente después de la alimentación y se aparean con hembras que están alimentándose. La hembra apareada e ingurgitada se separa del hospedero y cae al suelo donde deposita una gran cantidad de huevos; la hembra muere después de la oviposición. En áreas de potrero, las condiciones de baja humedad y alta radiación provocan una disminución en la eclosión de los huevos y supervivencia de las ninfas de las garrapatas antes de llegar a su

hospedero. También poseen depredadores, los cuales participan como controladores naturales de sus poblaciones, como los nemátodos entomopatógenos las hormigas, hongos, bacterias, roedores, insectos y aves (Ojeda-Chi et al., 2011)

1.5 Impacto de la parasitosis de garrapatas en el sector ganadero

Las garrapatas son consideradas el ectoparásito de mayor importancia en las áreas de explotación pecuaria. Se estima que aproximadamente mil millones de cabezas de ganado bovino se encuentran en zonas tropicales y subtropicales del mundo expuestas a las infestaciones por garrapatas y/o las enfermedades que transmiten, causando pérdidas significativas en la producción pecuaria. Estos parásitos extraen volúmenes importantes de sangre que conllevan a un mayor tiempo de crecimiento y ceba de animales; también alteran la calidad y cantidad de producción de leche y carne. Por otro lado, las heridas por las picaduras de las garrapatas ocasionan en muchos casos infecciones por bacterias o por larvas de moscas, lo que produce un detrimento de la calidad del cuero (Santana Campos *et al.*, 2015); además estas heridas se pueden convertir en una puerta de entrada para el gusano barrenador del ganado.

Como se mencionó en el apartado anterior las garrapatas son vectores de patógenos que producen enfermedades en sus hospederos y los bovinos no escapan de esta realidad; estas enfermedades zoonóticas diezman la actividad productiva del ganado e incluso causan altas tasas de mortalidad. Dentro de estas enfermedades encontramos con mayor frecuencia la babesiosis (causada por los hemoparásitos *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*) y la anaplasmosis (causada por el agente bacteriano *Anaplasma marginale*).

Estos patógenos parasitan los glóbulos rojos y finalmente los destruyen, originando la aparición de anemias muy severas que pueden llegar a provocar abortos espontáneos e incluso la muerte del animal (Fouche *et al.*, 2016 ; Cen-pacheco, 2017).

El control químico es el método principal usado para el control de la parasitosis de garrapatas en hatos bovinos a nivel mundial. Los ganaderos dependen completamente del uso de acaricidas, pero la mayoría de las veces no cuentan con la asesoría técnica ni tienen información para elaborar programas de control eficaces; por lo que se incurre en malas prácticas como el uso de dosis elevadas, aumento en la frecuencia de baño y mezcla de diferentes acaricidas (Domínguez García *et al.*, 2016). El uso indiscriminado de estos productos ha provocado la selección de poblaciones de garrapatas resistentes, debido a la fuerte presión que elimina a los individuos susceptibles, disminuyendo progresivamente el efecto y elevando los costos tanto de desarrollo de nuevos ixodicidas como los costos de los ganaderos para controlar la parasitosis y evitar pérdidas mayores (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2006).

En otras palabras, las garrapatas producen pérdidas significativas por los efectos relacionados con: sus hábitos hematófagos, los daños a las pieles, la transmisión de enfermedades, pérdidas asociadas con la disminución de la ganancia de peso y la baja producción de leche, así como el alto costo de los métodos de control tradicionales.

En Brasil se realizó un cálculo económico de las pérdidas ocasionadas por las parasitosis, considerando solamente las reducciones en producción, sin contemplar el impacto económico relacionado con honorarios veterinarios, costo del personal de campo y de los

medicamentos. Esta investigación registró pérdidas de 3.24 billones de dólares asociadas con la parasitosis de garrapatas (Almada, 2015).

Un cálculo estimativo, realizado en Argentina, sobre las pérdidas para el productor por el efecto directo e indirecto de las garrapatas en los bovinos, rondaría los 250 a 300 millones de dólares al año (Mauricio Bulman, 2012).

Estimativos indican que la industria ganadera de EE. UU. se ha ahorrado al menos 3000 millones de dólares anuales, desde que el territorio fue declarado libre de las garrapatas que parasitan al bovino (Benavides *et al.*, 2016). Así pues, se estima que, en las regiones tropicales y subtropicales, con mayor abundancia de garrapatas, las pérdidas económicas asociadas a este parásito rondan los 2.5 billones de dólares anuales (Lew-Tabor *et al.*, 2014).

1.6 Uso de marcadores moleculares en identificación de garrapatas

Tradicionalmente la identificación de las garrapatas se ha basado en características morfológicas; incluyendo claves taxonómicas separadas cuando se trata de diferentes estadios del espécimen. En determinadas situaciones, pueden producirse daños en las partes del cuerpo de las garrapatas esenciales para su identificación (como el capítulo y las estructuras adyacentes) o hacerse una mala conservación de las muestras de garrapatas, lo que conduce a identificaciones incorrectas. De igual manera en situaciones donde es imperante identificar garrapatas que pertenecen a un mismo complejo taxonómico, la taxonomía tradicional se ve limitada (Abouelhassan *et al.*, 2019).

Aunque el genoma de las garrapatas no está completo, las técnicas moleculares se han puesto a disposición en los últimos años, para lograr identificar garrapatas cuando no se obtengan resultados concluyentes con otras herramientas. En la caracterización molecular taxonómica y estudios filogenéticos de las garrapatas es indispensable el uso de marcadores de ADN, incluidos genes nucleares y tramos reguladores nucleares no traducidos, así como genes mitocondriales (Abdullah *et al.*, 2016). De igual forma, se estudia el uso de diferentes secuencias genéticas a partir de genes mitocondriales para ser usadas como nuevos marcadores moleculares.

El Segundo Espaciador Transcrito Interno (ITS2) de ADN ribosómico nuclear fue una de las primeras secuencias utilizadas al iniciar la determinación de las secuencias de nucleótidos útiles para la identificación de diferentes grupos de garrapatas. El uso del ITS-2 ayudó a obtener resultados satisfactorios en múltiples estudios de identificación de garrapatas, donde se consolida como uno de los marcadores genéticos más usados para la diferenciación de garrapatas duras durante la primera década del siglo XXI.

Otra secuencia de origen nuclear usada para la identificación de garrapatas es el gen 18S ARN ribosomal; este gen es parte del ARN ribosómico y el ARN estructural, que forma parte de la subunidad ribosomal pequeña de los ribosomas eucarióticos (Sorof Uddin & Cheng, 2015). Esta secuencia genera mejores resultados en la identificación a nivel de género en el grupo de las garrapatas, mientras que el marcador ITS2 es más útil en la identificación a nivel de especie (Dobson & Barker, 1999; Lv *et al.*, 2014).

En las células animales el DNA mitocondrial (mtDNA) usualmente codifica componentes de la cadena respiratoria y componentes de la maquinaria para la traducción de proteínas mitocondriales (Guerra *et al.*, 2017). En este se encuentran múltiples genes que son empleados como marcadores moleculares en la determinación de un sin número de especies, incluidas las garrapatas.

La investigación molecular con este parásito utiliza con mayor frecuencia las secuencias de los genes mitocondriales, 12S ARNr, 16S ARNr y el Citocromo Oxidasa subunidad I (COI). En adición a esto, otras secuencias de ADN mitocondrial se han estudiado como nuevos diseños de marcador molecular para la identificación de garrapatas, dentro de estas tenemos los fragmentos nad1-16S ARNrARNr, nad2-cox1 y cox1-ARNt-Lys. Los resultados de las investigaciones con estas secuencias señalan que pueden ser herramientas moleculares adecuadas para identificar a este grupo de parásitos, especialmente miembros del género *Rhipicephalus* (Li *et al.*, 2017).

El ARNr 12S ARNr se utiliza como una herramienta para examinar las relaciones entre las ramas recientemente divergentes de la filogenia de las garrapatas (Norris *et al.*, 1999; Lv *et al.*, 2014). Por su parte, el gen 16S ARNr es de los genes marcadores de mayor aplicación en la identificación y filogenia de comunidades bacterianas; pero su uso no se limita a los procariontes, también es una de las herramientas moleculares útiles en la identificación de diferentes grupos eucariotas, siendo las garrapatas uno de ellos. Los resultados de múltiples estudios señalan que el gen 16S ARNr parece tener mejores características para los análisis filogenéticos interespecíficos dada su alta divergencia genética y baja saturación de transiciones (Paternina, Verbel-Vergara & Bejarano, 2016).

Por otro lado, las secuencias de nucleótidos del fragmento del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa Subunidad I (COI), usado como código de barras para la identificación exitosa de diferentes grupos taxonómicos, también se utiliza en la identificación de garrapatas, en especial en especies emparentadas o variabilidad genética intraespecífica (Paternina *et al.*, 2016).

El uso de marcadores moleculares de manera combinada es una metodología que se ha empleado en diferentes estudios, se ha convertido en una herramienta valiosa y eficiente para la identificación de garrapatas; el análisis de varios genes, cada uno con un patrón de digestión diferente, ayuda a que la identidad de una muestra determinada se identifique con mayor especificidad y permite obtener más información para establecer relaciones filogenéticas certeras (Erster *et al.*, 2013).

Además, se han podido identificar deficiencias en algunos de estos marcadores al usarlos de forma individual, tal es el caso del gen 16S ARNr, que es útil para construir relaciones filogenéticas de garrapatas, pero al usarlo por sí solo no es suficiente para obtener una resolución completa para los árboles filogenéticos, por lo que la mejor manera de resolver esta dificultad es combinarlo con otro marcador, frecuentemente el gen 12S ARNr es el que lo acompaña (Abouelhassan *et al.*, 2019);

En esa misma línea, también se han desarrollado estudios haciendo uso de varios marcadores moleculares simultáneamente para evaluar la eficacia de estas secuencias en la identificación molecular de garrapatas. Un ejemplo de esto es un análisis comparativo donde se utilizaron varios marcadores moleculares mitocondriales (12S ARNr, 16S ARNr, COXI) junto al marcador nuclear ITS2. Esta comparación buscaba medir la distancia genética dentro de cinco especies seleccionadas del género

Rhipicephalus. Las distancias genéticas interespecífica e intraespecífica medidas con los marcadores mitocondriales confirman la diferenciación de las cinco especies de Rhipicephalina evaluadas y el análisis filogenético mostró una clara separación de clados específicos.

Por su parte, el marcador nuclear ITS2 detectó poca divergencia interespecífica para especies del complejo *R. sanguineus* lo que resultó en una ubicación ambigua de *R. sanguineus* y *R. turanicus* en el árbol filogenético. Estos resultados sugieren la idoneidad de los marcadores mitocondriales para la identificación confiable de especies del género Rhipicephalus (Latrofa *et al.*, 2013).

1.7 Detección de patógenos mediante herramientas moleculares

El uso de herramientas moleculares no solo se ha aplicado a la identificación de garrapatas sino también a la detección de los patógenos que usan a este parásito como vector. Como se ha mencionado antes, las garrapatas son ectoparásitos obligados hematófagos que en su ciclo vital se alimentan de distintos hospedadores, lo cual las vuelve un trasmisor importante de patógenos.

Debido a su importancia epidemiológica, se hace necesario determinar la presencia y prevalencia de estos patógenos en garrapatas asociadas a animales tanto domésticos, como animales de granjas ganaderas (bovinos, caprinos, ovinos).

Dentro de las herramientas moleculares empleadas para cumplir este objetivo la más utilizada es la prueba PCR, que usa cebadores específicos para cada patógeno en estudio. La amplificación del material genético del patógeno en las muestras de garrapatas, mostrada por electroforesis, pone en evidencia la presencia del patógeno en el parásito; esto permite realizar estudios de seroprevalencia, así como identificar potenciales zonas de riesgo epidemiológico para los animales y humanos que la habitan.

2

CAPÍTULO METODOLOGÍA

CAPITULO 2: Metodología

2.1 Área de estudio

Las muestras de garrapatas fueron colectadas en ocho fincas ganaderas ubicadas en cinco provincias y una comarca de la República de Panamá (Cuadro 2; Figura 1). Las fincas se eligieron de forma dirigida o no probalística, es decir, la elección se realizó en dependencia del acceso o disponibilidad de estas, la condición de cada finca con respecto a la parasitosis de garrapatas y a la aplicación de acaricidas en fechas previas al muestreo.

Cuadro 2: Datos de ubicación de las fincas ganaderas participantes del estudio.

N°	Finca	Localidad	Distrito	Provincia/ Comarca	Georeferencia	
1	Dos Pinos	Volcán	Tierras Altas	Chiriquí	8°45'14.72"N	82°37'56" O
2	Sortová	Volcán	Tierras Altas	Chiriquí	8°46'19"N	82°38'20" O
3	Calabacito	Remance	San Francisco	Veraguas	08°14'71.5" N	81°04'79.8" O
4	El Ejido	El Ejido	Los Santos	Los Santos	7°55'00" N	80° 23'00" O
5	La Roca	Burí (El Valle)	Jirondai	Ngäbe-Buglé	8°49'35.4828"N	82°10'59.2536" O
6	La Escondida	Miramar (Las Cañas)	Chiriquí Grande	Bocas del Toro	9°1'33.8268"N	82° 16'14.6928" O
7	Bijao	Volcán	Tierras Altas	Chiriquí	8°42'27"N	82° 37'32" O
8	Flores	-----	Chepo	Panamá	9°10'N	79°0.6'O



Figura 1: Ubicación geográfica de las fincas ganaderas en estudio.

2.2 Colecta de muestras

Las muestras de garrapatas fueron colectadas usando el protocolo descrito a continuación:

- a. Como primer paso se seleccionaron de forma aleatoria diez bovinos de cada finca participante, de los cuales se extrajeron la muestra de garrapata.
- b. Las garrapatas fueron seleccionadas con algún grado de alimentación del animal (teleóginas).
- c. A cada bovino seleccionado se le extrajo un espécimen de garrapata con base en las siguientes recomendaciones encontradas en la guía Garrapatas Ixódidæ de Panamá (Bermúdez *et al.*, 2018).
 - Con la ayuda de pinzas entomológicas de punta fina tomar la garrapata tan cerca de la superficie de la piel, como sea posible.
 - Tirar hacia arriba con presión constante y uniforme, sin doblar o arrancar la garrapata.

- d. Las muestras de garrapatas colectadas se colocaron individualmente en tubos de 2 mL con etanol al 70% para ser conservadas. Cada vial fue debidamente rotulado con un código numérico, el nombre de la finca en la cual se colectó, la región geográfica y la fecha de colecta. Finalmente, los tubos se organizaron en cajas y estas a su vez fueron llevadas a las hieleras, para luego ser transportadas al laboratorio (Figura 2).

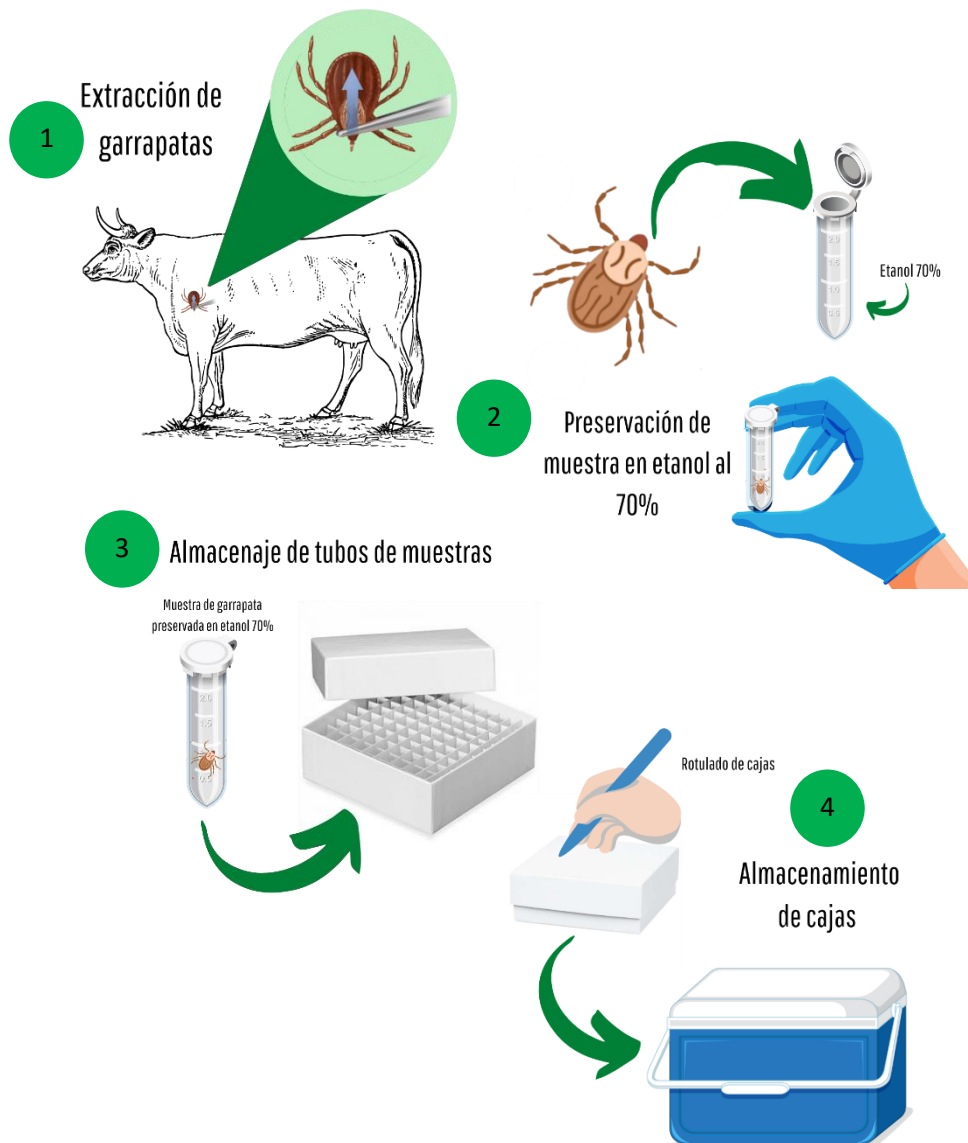


Figura 2: Resumen gráfico de la extracción y colecta de garrapatas.

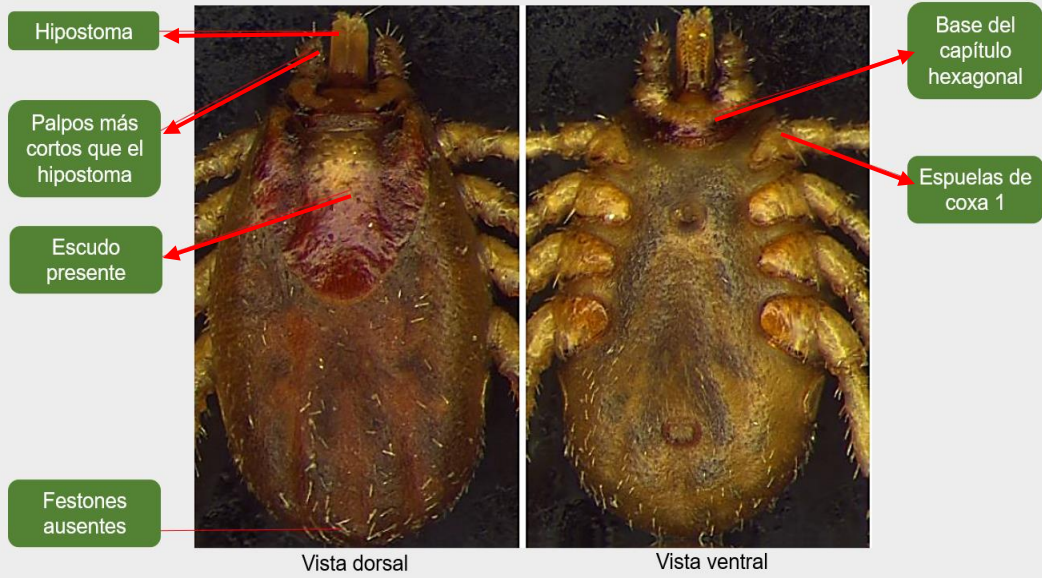
2.3 Identificación Morfológica

Cada una de las muestras de garrapatas se analizó bajo una lupa estereoscópica con la ayuda de una aguja enmangada y un plato Petri. La identificación se realizó hasta especie haciendo uso de las claves taxonómicas para ixódidos incluidas en la guía Garrapatas Ixóididae de Panamá (Bermúdez *et al.*, 2018), sección del género *Rhipicephalus*, la Clave Pictórica para Adultos de Garrapatas Duras, Familia Ixóididae (Keirans & Litwak 1989) y la clave pictórica de género de garrapatas de Estados Unidos (Pratt, 1967).

Estas claves taxonómicas se basan en los siguientes caracteres morfológicos para la identificación (figura 3):

- Presencia y distribución del escudo.
- Posición de piezas bucales.
- Base del capítulo hexagonal.
- Longitud de la coxa I.
- Presencia, ausencia y número de festones.
- Cantidad de placas adanales.
- Surco marginal ausente, presente o incompleto.
- Configuración del hipostoma.
- Longitud de palpos.

Rhipicephalus microplus (hembra)



Rhipicephalus microplus (macho)

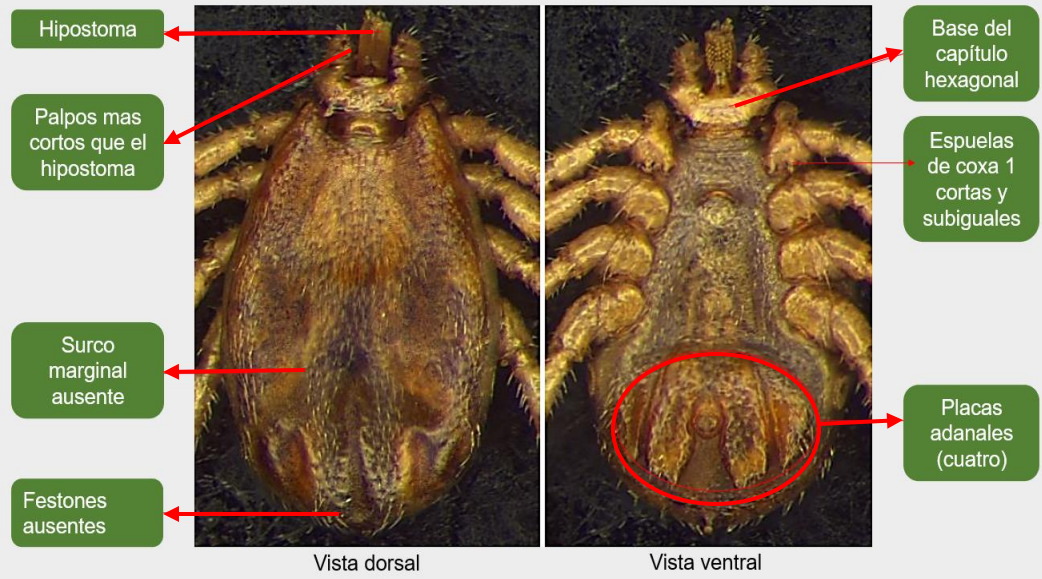


Figura 3: Diagrama de caracteres morfológicos usados para identificación morfológica (Ilustración adaptada de Bermúdez et al., 2018).

2.4 Extracción de material genético

El protocolo de extracción del ADN de las muestras de garrapatas colectadas fue el siguiente:

- Sobre un plato Petri estéril y con la ayuda de un escalpelo se cortó una sección del cuerpo de la garrapata de aproximadamente 10 mg (cantidad que luego fue pesada en la balanza analítica), el tejido seccionado se colocó en un nuevo tubo de 2 mL con etanol al 70% y el resto del espécimen fue devuelto al tubo original para almacenarlo a -10 °C. Cada muestra fue seccionada con hojas de escalpelo nuevas y esterilizadas para prevenir contaminación (Figura 4).

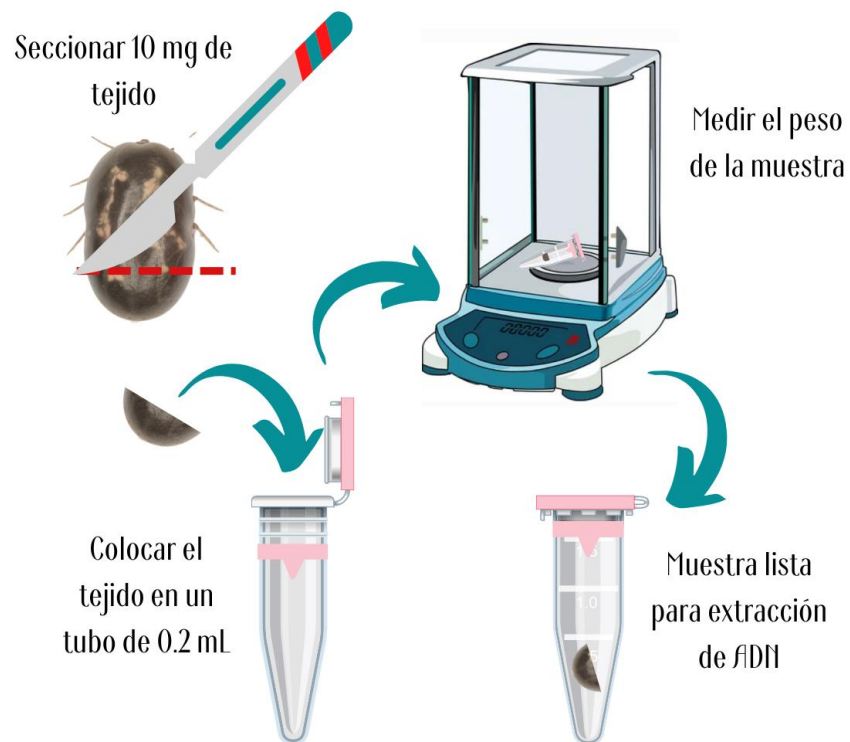


Figura 4: Disección, pesaje y preparación del tejido de la muestra de garrapatas para la extracción de ADN.

- El ADN total se aisló utilizando el kit comercial DNeasy Blood & Tissue Kit (250) (No. Catálogo/REF 69506, lote 148053092) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Figura 5). El ADN de cada garrapata se almacenó en 100 µl de agua destilada libre de nucleasas a -20°.
- Posteriormente se evaluó la calidad del ADN extraído de las muestras por electroforesis en gel de agarosa 0.8% con el buffer de corrida TAE 10X y Bromuro de Etidio (EtBr) fue usado para la tinción de las hebras de ADN.

2.5 Amplificación de material genético

2.5.1: Amplificación de marcadores para identificación molecular:

Para cumplir con el segundo objetivo específico, emplear marcadores moleculares como técnica de identificación de garrapatas; se seleccionaron tres genes utilizados para identificar ixódidos, basados en la literatura publicada. Los genes mitocondriales 16S ARNr, 12S ARNr y el gen nuclear ITS2. Mediante la prueba reacción en cadena de polimerasas (PCR) de punto final se amplificaron los fragmentos de estos cuatro marcadores de forma individual, en cada muestra de ADN extraído.

Las amplificaciones fueron realizadas usando un termociclador BIO RAD modelo T100 con un volumen de 25 µL de reacción, compuesta por: 12.5µl de Platinum Hot Start PCR 2X Master Mix (Thermo Fisher Scientific), 0.5 µL del cebador forward 10 mM, 0.5 µL del cebador reverse 10mM, 1.0 µL de ADN (muestra) y 10.5 µL de agua libre de nucleasas (figura 6).

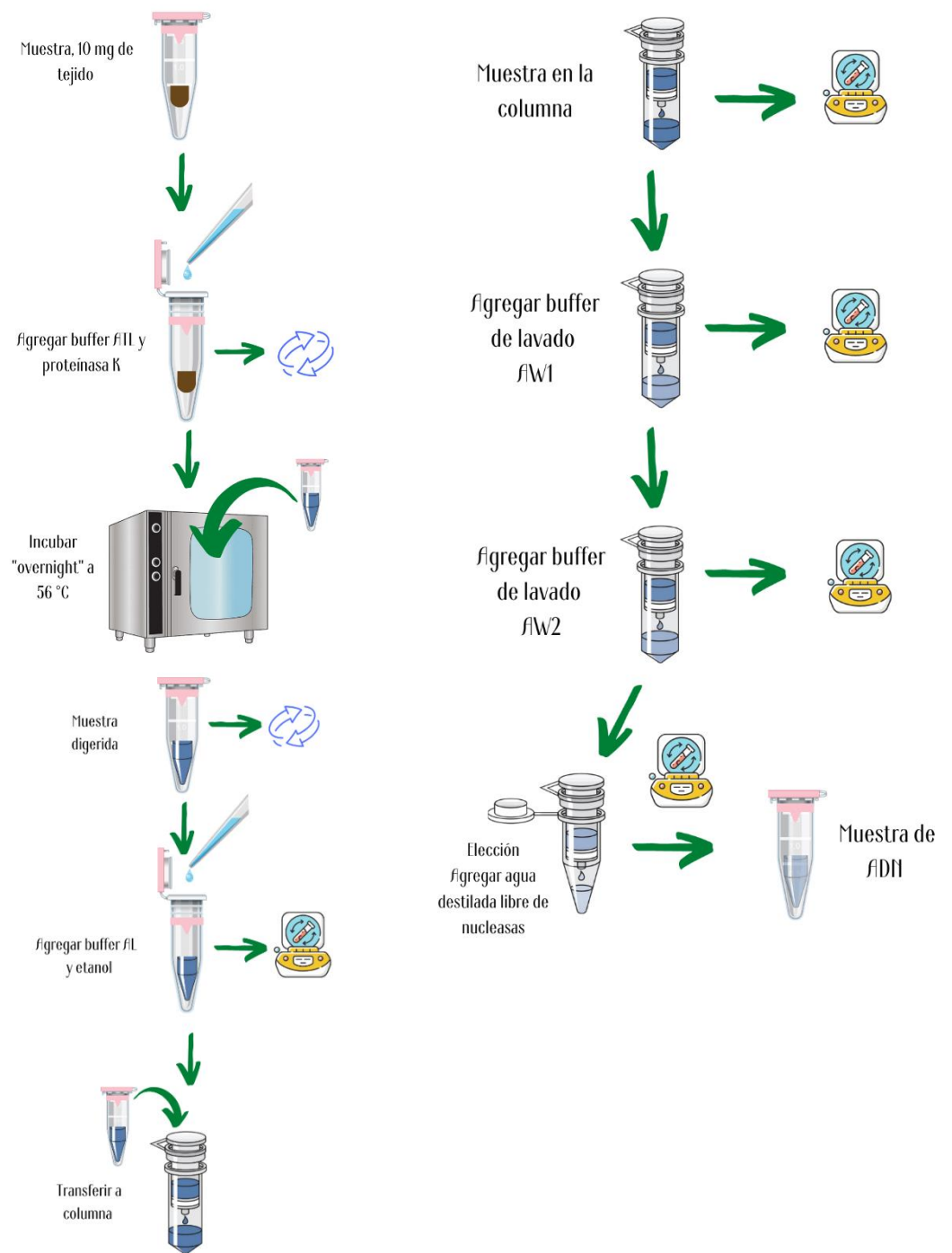


Figura 5: Protocolo gráfico de extracción de ADN del tejido de las muestras de garrapatas, kit comercial DNeasy Blood & Tissue Kit (250).

Cuadro 3: Protocolo de amplificación de marcadores de identificación molecular.

Gen	Paso	Ciclos	T° (°C)	Tiempo
12S ARNr	Hibridación Inicial	1	94	5 min
	Hibridación		94	15 s
	Hibridación	5	51	30 s
	Extención		68	30 s
	Hibridación		94	15 s
	Hibridación	25	53	30 s
	Extención		70	30 s
	Extención Final	1	70	5 min
	Hibridación Inicial	1	94	5 min
ITS2	Hibridación		94	30 s
	Hibridación	35	55	30 s
	Extención		68	2 min
	Extención Final	1	68	min
	Hibridación Inicial	1	94	5 min
16S ARNr	Hibridación		94	30 s
	Hibridación	5	49	30 s
	Extención		68	30 s
	Hibridación		94	30 s
	Hibridación	5	47	30 s
	Extención		68	30 s
	Hibridación		94	30 s
	Hibridación	5	45	30 s
	Extención		68	30 s
	Hibridación		94	30 s
	Hibridación	25	43	30 s
	Extención		68	30 s
	Extención final	1	68	5 min

La amplificación de los genes marcadores 12S ARNr, 16S ARNr e ITS2 se realizó con protocolos de amplificación diferentes para cada uno de ellos (Cuadro 4), con cebadores específicos (Cuadro 3).

Cuadro 4: Información de cebadores utilizados para cada gen marcador de identificación molecular.

Gen	Primer	Secuencias (5'-3')	Tamaño de amplicón (pb)
ITS2	TITS2-F	<i>ACA TTG CGG CCT TGG GTC TT</i>	1219
	TITS2-R	<i>TCG CCT GAT CTG AGG TCG AC</i>	
16S ARNr	T16S ARNr+1	<i>CTGCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGTGG</i>	456
	T16S ARNr-1	<i>CCGGTCTGAACTCAGATCAAGT</i>	
12S ARNr	T1B	<i>AACTAGGATTAGATACCCT</i>	338
	T2A	<i>AATGAGAGCGACGGGCGATGT</i>	

Los productos de PCR se visualizaron en gel de agarosa, el porcentaje de agarosa del gel dependió del tamaño del fragmento del marcador amplificado (Cuadro 5); el buffer de corrida usado fue TBE 0.5 X, para teñir las hebras de ADN se utilizó SYBR Safe de EDVOTEK, la fuente de poder empleada fue ENDURO Power Supplies a 65 V, 22 mA durante dos horas. La visualización del ADN amplificado fue en el transiluminador UVP BioDoc-It Imaging System (Figura 7).

Los fragmentos de ADN amplificados se almacenaron en el congelador SANYO Biomedical Freezer a -30 °C, hasta su posterior traslado a secuenciación.

Cuadro 5: Porcentaje de agarosa, cantidad de buffer de corrida TBE 0.5X y de tinte SYBR-Safe, para electroforesis de cada fragmento de marcador amplificado.

	Marcador	Tamaño de fragmento (pb)	Porcentaje de agarosa (%)	Cantidad de TBE 0.5X (mL)		
2	ITS-2	1219	0.8	50	150	340
5	16S ARNr	456	1.2	50	150	340
	12S ARNr	338	1.2	50	150	340
2	Cantidad de SYBR-Safe (µL)			5.0	15.0	34.0

:

Amplificación de marcadores moleculares para detección de patógenos:

Se seleccionaron cuatro marcadores de los patógenos más comunes asociados a las garrapatas del bovino, basados en la literatura publicada. Los patógenos seleccionados para la detección son los siguientes: los parásitos unicelulares *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*; y las bacterias *Anaplasma marginale* y *Rickettsia sp.* Mediante la prueba PCR de punto final se amplificaron los fragmentos de estos tres patógenos, en cada muestra de ADN extraído de forma individual.

Las amplificaciones fueron realizadas usando un termociclador BIO RAD modelo T100; con un volumen de 25 µL de reacción compuesta por: 12.5µl de Platinum Hot Start PCR 2X Master Mix (Thermo Fisher Scientific), 0.5 µL del cebador forward 10 mM, 0.5 µL del cebador reverse 10mM, 6.5 µL de agua libre de nucleasas y 5.0 µL de ADN (muestra) (Figura 6).

La amplificación de los patógenos *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale*, se realizó con un protocolo de amplificación establecido (Cuadro 6), con cebadores específicos; basados en las características de cada uno de estos (Cuadro 7).

Cuadro 6: Protocolo de amplificación para la detección de los patógenos seleccionados

Target	Paso	Ciclos	T° (°C)	Tiempo
<i>B. bovis</i>, <i>B. bigemina</i> y <i>A. marginale</i>	Hibridación Inicial	1	95	5 min
	Hibridación		95	1 min
	Hibridación	35	58	1 min
	Extención		72	1 min
	Extención Final	1	72	10 min

Cuadro 7: Características de los cebadores para la detección de los patógenos seleccionados

Patógeno	Primer	Secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)
<i>Babesia bovis</i>	BoF	CACGAGGAAGGAACTACCGATGTTGA	356
	BoR	CCAAGGAGCTTCAACGTACGAGGTCA	
<i>Babesia bigemina</i>	BiIA	CATCTAATTTCTCTCCT ACCCCTCC	278
	BiIB	CCTCGGCTTCAACTCTGATGCCAAAG	
<i>Anaplasma marginale</i>	1773F	TGTGCTTATGGCAGACATTTCC	1000
	2957R	AAACCTTG TAGCCCCAACTTATCC	
<i>Rickettsia sp.</i>	RpCS.877p	GGGGGCCTGCTCACGGCGG	382
	RpCS.1258n	ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA	

Nota: Para *Anaplasma marginale* el producto esperado es de 600 y 1000 pb, presentando una o varias bandas (en el gel de electroforesis) en ese rango.

La visualización de los fragmentos de ADN amplificados se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa con el mismo protocolo empleado para la electroforesis de los marcadores taxonómicos descritos en el punto anterior (Figura 7).

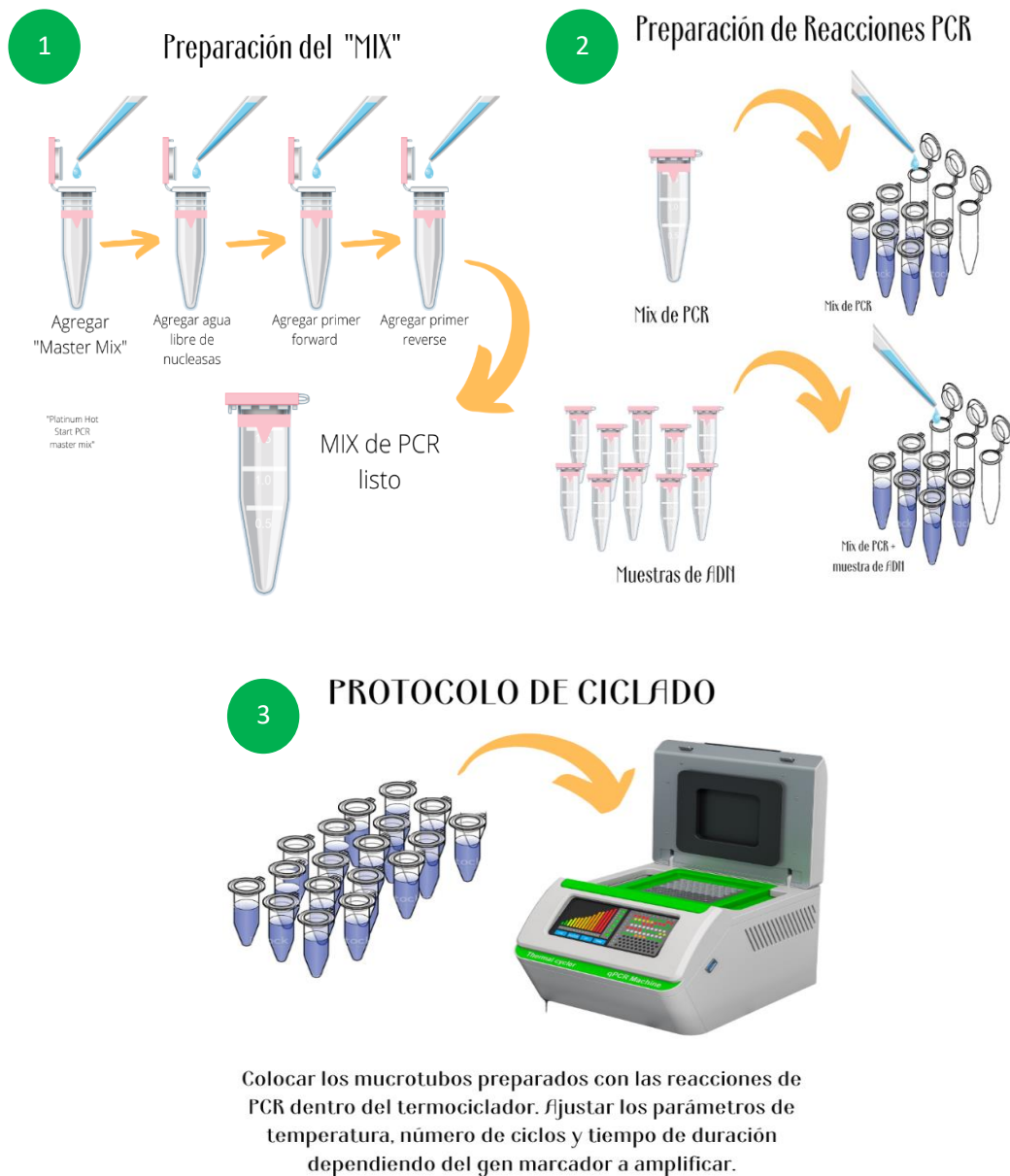


Figura 6: Resumen gráfico del protocolo de amplificación de las muestras de ADN.

VERIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR

Electroforesis en gel de agarosa

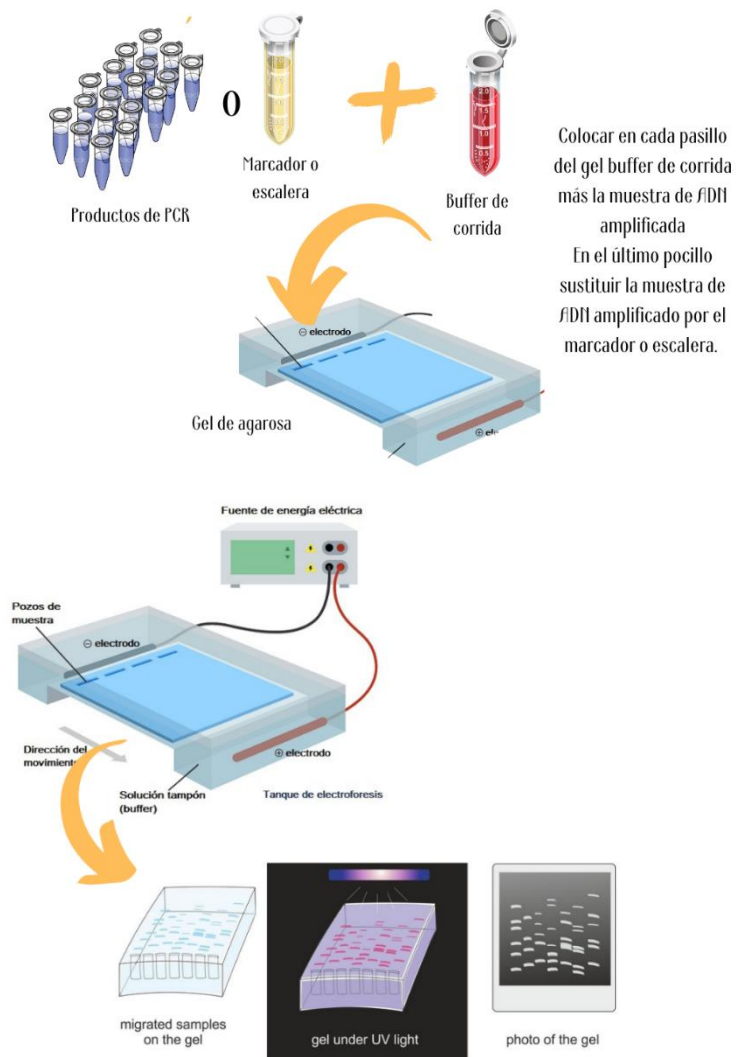


Figura 7: Resumen gráfico de la electroforesis en gel de agarosa.

Para la detección del patógeno *Rickettsia sp.* se empleó una variante de la PCR de punto final, la PCR tiempo real, que amplifica y simultáneamente cuantifica de forma absoluta el producto de la amplificación de ácido ADN, haciendo uso de un fluoróforo que mide la tasa de generación de uno o más productos específicos.

La PCR tiempo real fue realizada usando un termociclador QuantStudio 5 System. Se preparó una solución de trabajo “stock” para 1000 μL con los siguientes componentes y cantidades:

- Primer Mix (CS-5 +CS-6):
 - Forward primer: 22.5 μL
 - Reverse primer: 22.5 μL
 - Agua libre de nucleasas: 955 μL
- Sonda:
 - Sonda stock: 7.5 μL
 - Agua libre de nucleasas: 992.5 μL

La solución final para 25 μL de reacción estaba compuesta por: 12.5 μL de Master Mix 2X, Mix de primers de trabajo 5.0 μL , solución de trabajo de la sonda fluorogénica 5.0 μL y 0.5 μL de agua libre de nucleasas, para un total de 23 μL , al que se le agregaron 2 μL de la muestra de ADN completando los 25 μL por reacción. El protocolo de ciclado de la prueba se detalla en el siguiente cuadro (cuadro 8).

Cuadro 8: Protocolo de ciclado, PCR tiempo real para la detección de *Rickettsia sp.*

Paso	N° de ciclos	Temperatura	Tiempo
Hibridación	50	95	15 segundos
Hibridación		50	30 segundos
Extensión		60	30 segundos

2.6 Secuenciación del material genético

Las muestras de ADN producto de la amplificación por PCR de los marcadores ITS-2, 16S ARNr y 12S ARNr destinados al análisis taxonómico, fueron purificadas y secuenciadas por la empresa MacroGen, en Corea del Sur, utilizando secuenciación Sanger.

2.7 Análisis de datos – herramientas bioinformáticas

Las secuencias obtenidas de los marcadores ITS-2, 16S ARNr y 12S ARNr fueron procesadas y analizadas con el siguiente protocolo bioinformático:

2.7.1 Alineamiento de secuencias

- **Limpieza y ensamblaje de secuencias forward y reverse:**

Las secuencias enviadas por MacroGen, Corea del Sur, fueron limpiadas cortando los picos inespecíficos en el cromatograma y ensambladas haciendo uso del software CodonCode Aligner 10.0.2. (CodonCode Corporation, Dedham, Massachusetts, USA).

Nota: La secuencia consenso de cada marcador se obtuvo con la ayuda del software CodonCode Aligner 10.0.2 (CodonCode Corporation, Dedham, Massachusetts, USA).

- **Edición de secuencias:**

Las secuencias ensambladas de cada muestra se editaron en el programa **BioEdit** (Alzohairy, 2011), se evaluó el alineamiento valorando la identidad de los residuos en cada posición.

2.7.2 Alineamiento y análisis filogenético de secuencias

- **Alineamiento múltiple de secuencias**

El alineamiento de las secuencias ensambladas y editadas se realizó por alineamiento CLUSTALW, haciendo uso del software MEGA X 10.0.5 (Kumar et. al, 2001).

- **Creación de matriz de distancia genética**

La matriz de distancia genética fue construida con el método Bootstrap de 500 réplicas y el modelo de sustitución (nucleótidos) Kimura-2-Parámetros, en el software MEGA X 10.0.5. (Kumar et. al, 2001).

- **Construcción de dendrograma o árbol filogenético**

El método estadístico usado para la construcción de los árboles filogenéticos fue Neighbor-joining, la prueba filogenética del método Bootstrap de 500 réplicas y el modelo de sustitución Kimura-2-parámetros, en el software MEGA X 10.0.5. (Kumar et. al, 2001).

3

CAPÍTULO
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPITULO 3

Resultados

Como resultado de las colectas se obtuvieron 82 muestras de garrapatas parasitando bovinos de ocho fincas ganaderas ubicadas en diferentes provincias a lo largo del país; los muestreos se realizaron entre los meses de diciembre de 2018 y febrero del 2019.

A continuación, se muestra el resultado de los análisis y el procesamiento de datos, basados en los cuatro objetivos específicos de esta investigación:

3.1 Identificación morfológica de garrapatas del bovino

El análisis morfológico reportó que el 100% de estas pertenecían a la especie *Rhipicephalus microplus* (cuadro 9), todas hembras ingurgitadas (estadio teleóginas).

Cuadro 9: Reporte taxonómico del análisis morfológico de las muestras de garrapatas colectadas por finca

N° de finca	Finca	Provincia	Cantidad de muestras coleccionadas	Reporte taxonómico morfológico
1	Dos Pinos	Chiriquí	10	<i>Rhipicephalus microplus</i>
2	Sortová	Chiriquí	12	<i>Rhipicephalus microplus</i>
3	Calabacito	Veraguas	8	<i>Rhipicephalus microplus</i>
4	El Ejido	Los Santos	12	<i>Rhipicephalus microplus</i>
5	La Roca	Ngäbe-Buglé	10	<i>Rhipicephalus microplus</i>
6	La Escondida	Bocas del Toro	12	<i>Rhipicephalus microplus</i>
7	Bijao	Chiriquí	9	<i>Rhipicephalus microplus</i>
8	Flores	Panamá	8	<i>Rhipicephalus microplus</i>
Total de muestras colectadas			82	<i>Rhipicephalus microplus</i>

La identificación morfológica se realizó considerando diferentes caracteres morfológicos determinantes establecidos en las claves taxonómicas reportadas en la literatura (Bermudez et al., 2018) (Figura 8).



Figura 8: Caracteres de identificación para *Rhipicephalus microplus*. Arriba en vista dorsal se observa el escutelo presente solo en una porción del dorso (hembra), festones y surco marginal ausentes, abajo en vista ventral se observa la ausencia de placas adanales (hembra).

3.2 Identificación molecular y filogenia de garrapatas del bovino

3.2.1 Marcador mitocondrial 12S ARNr

Las 78 secuencias viables de 325 pb obtenidas con el marcador 12S ARNr fueron analizadas con Blast (Basic local alignment search tool) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) lo que permitió confirmar el resultado de la identificación morfológica, señalando a la especie *Rhipicephalus microplus* con valores de 99 y 100% en el porcentaje de identidad.

La matriz de distancia genética (modelo Kimura 2-parámetros) de las 78 secuencias, señaló una divergencia intraespecífica del 0.0%; es decir, las secuencias fueron totalmente idénticas.



Figura 9: Alineamiento de las 78 secuencias del gen 12S ARNr, del ADN extraído de garrapatas del bovino, Panamá (MEGA-X 10.0.5).

Al conocer el resultado del alineamiento, se generó una secuencia consenso del marcador 12S ARNr de *Rhipicephalus microplus* y esta fue alineada con tres secuencias de especies de este género y una secuencia de un grupo externo, secuencias obtenidas del sitio web Genbank, del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (cuadro 10), para evaluar el rendimiento del marcador en la identificación de la especie.

Cuadro 10: Secuencias del gen 12S ARNr usadas para evaluar el rendimiento del marcador en la identificación de *Rhipicephalus microplus*

Acceso Genebank	Especie	Gen
JQ480847.1	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	12S ARNr
LC612500.1	<i>Rhipicephalus annulatus</i>	12S ARNr
JQ480850.1	<i>Rhipicephalus turanicus</i>	12S ARNr
MK457169.1	<i>Amblyomma mixtum</i>	12S ARNr

La matriz de distancia genética calculada a partir del alineamiento con especies de este género más un grupo externo, mostró valores de variación entre 0.03 y 0.25; considerando a *Rhipicephalus microplus*, señala menor variación con *Rhipicephalus annulatus* y mayor variación genética con *Amblyomma mixtum* (cuadro 11).

Cuadro 11: Matriz de distancia genética, gen 12S ARNr de *Rhipicephalus microplus* con otras especies de *Rhipicephalus* y un grupo externo. Modelo Kimura 2-parámetros (MEGA-X 10.0.5).

		1	2	3	4
1	JQ480847.1 <i>Rhipicephalus sanguineus</i>				
2	LC612500.1 <i>Rhipicephalus annulatus</i>	0.13			
3	MK457169.1 <i>Amblyomma mixtum</i>	0.30	0.22		
4	JQ480850.1 <i>Rhipicephalus turanicus</i>	0.06	0.12	0.25	
5	<i>Rhipicephalus microplus</i> , Panama	0.12	0.03	0.23	0.10

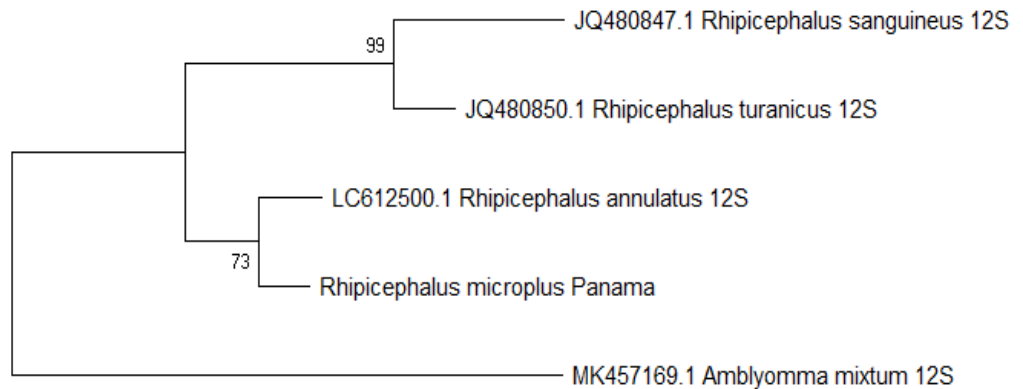


Figura 10: Árbol filogenético Neighbor-Joining, gen 12S ARNr de *Rhipicephalus microplus* y grupos externos; los números indicados en los nodos son los valores de soporte de Bootstrap (500 réplicas). Las distancias genéticas fueron calculadas usando el método Kimura 2-parámetros. El análisis incluyó a tres secuencias de gen 12S ARNr rADN del género *Rhipicephalus* y una secuencia de un grupo externo, *Amblyomma mixtum* (MEGA-X 10.0.5)

El árbol filogenético construido corresponde con el resultado de la medición de distancias genéticas, en este se observan dos ramas principales; en la primera, se agrupan todas las especies del género *Rhipicephalus* y en la segunda el grupo externo. Se agrupa a *Rhipicephalus microplus* y *Rhipicephalus annulatus* en el mismo clado (figura 10).

Variación genética intraespecífica de *Rhipicephalus microplus* usando el marcador 12S ARNr

La secuencia consenso del gen 12S ARNr de *Rhipicephalus microplus* generada para Panamá, fue alineada con ocho secuencias del gen 12S ARNr de *Rhipicephalus microplus*, de diferentes países y regiones (cuadro 12), obtenidas del sitio web Genbank, del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Cuadro 12: Secuencias externas del gen 12S ARNr de *Rhipicephalus microplus*, obtenidas de Genebank usadas en la construcción del análisis filogenético intraespecífico.

Acceso Genebank	Especie	Gen	País
EU921758.1	<i>Rhipicephalus microplus</i>	12S ARNr	Argentina
MK031689.1	<i>Rhipicephalus microplus</i>	12S ARNr	Brasil
KF583590.1	<i>Rhipicephalus microplus</i>	12S ARNr	China
EU921761.1	<i>Rhipicephalus microplus</i>	12S ARNr	Costa Rica
MT499890.1	<i>Rhipicephalus microplus</i>	12S ARNr	Cuba
MT499889.1	<i>Rhipicephalus microplus</i>	12S ARNr	México
MG459959.1	<i>Rhipicephalus microplus</i>	12S ARNr	Pakistán
EU921764.1	<i>Rhipicephalus microplus</i>	12S ARNr	Sudáfrica

La matriz de distancia genética (modelo Kimura 2-parámetros), resultante de este alineamiento señala valores entre 0.00 y 0.06 de divergencia intraespecífica (cuadro 13), encontrándose una divergencia mayor entre las secuencias de Panamá y Pakistán.

Cuadro 13: Matriz de distancia genética, gen 12S ARNr de *Rhipicephalus microplus* con otras secuencias de la misma especie. Modelo Kimura 2-parámetros (MEGA-X 10.0.5).

	1	2	3	4	5	6	7	8
1 EU921764.1 Sudáfrica								
2 MG459959.1 Pakistán	0.04							
3 MT499889.1 México	0.00	0.03						
4 MT499890.1 Cuba	0.02	0.06	0.02					
5 EU921761.1 Costa_Rica	0.00	0.04	0.00	0.02				
6 KF583590.1 China	0.03	0.02	0.03	0.06	0.03			
7 MK031689.1 Brasil	0.00	0.03	0.00	0.02	0.00	0.03		
8 EU921758.1 Argentina	0.00	0.04	0.00	0.02	0.00	0.03	0.00	
9 Panamá	0.02	0.07	0.00	0.02	0.02	0.03	0.00	0.02

Una vez obtenida la matriz de distancias genéticas, se construyó un fenograma o árbol filogenético, a partir del método de Neighbor-Joining, con un bootstrap de 500 repeticiones (figura 11).

El árbol obtenido está formado por dos ramas principales (con un soporte de Bootstrap mayor a 50%), en la primera se ubican las secuencias provenientes de América y Sudáfrica y en la segunda las secuencias generadas en Asia.

El primer grupo lo componen dos ramas principales, en la primera se ubican Costa Rica, Argentina, Sudáfrica, México, Cuba y Panamá, en la segunda rama se encuentra Brasil; siendo la secuencia de Cuba agrupada con la secuencia panameña, en el mismo clado (figura 11).

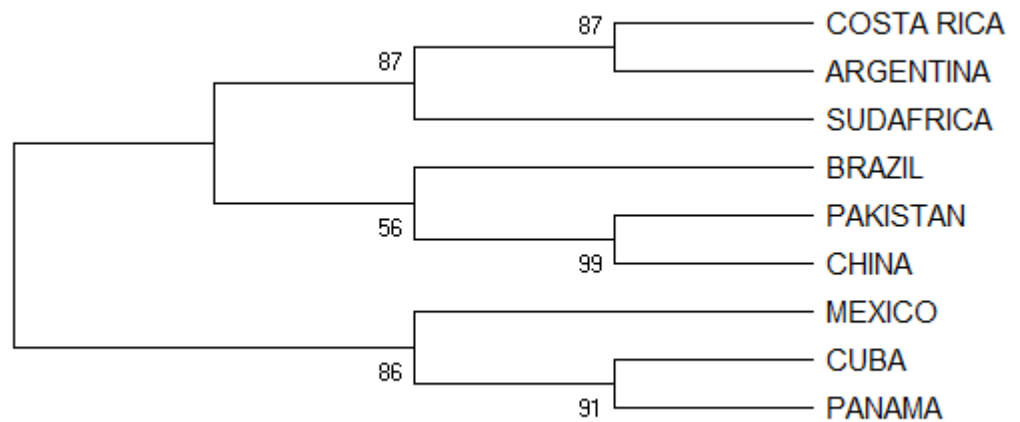


Figura 11: Árbol filogenético Neighbor-Joining, gen 12S ARNr de *Rhipicephalus microplus*; los números indicados en los nodos son los valores de soporte de Bootstrap (500 réplicas). Las distancias genéticas fueron calculadas usando el método Kimura 2-parámetros. El análisis incluyó a 8 secuencias de gen 12S ARNr rADN externas y una secuencia consenso 12S ARNr de Panamá (MEGA-X 10.0.5).

3.2.2 Marcador mitocondrial 16S ARNr

Las secuencias amplificadas del gen 16S ARNr fueron viables para las 82 muestras con 450 pb. El análisis de Blast (NCBI) permitió confirmar la identificación morfológica de *Rhipicephalus microplus*, generando “hits” con porcentaje de identidad de 100 y 99%.

La matriz de distancia genética (modelo Kimura 2-parámetros) de las 82 secuencias, señaló una divergencia intraespecífica del 0.0%; es decir, las secuencias fueron totalmente idénticas (figura 12).

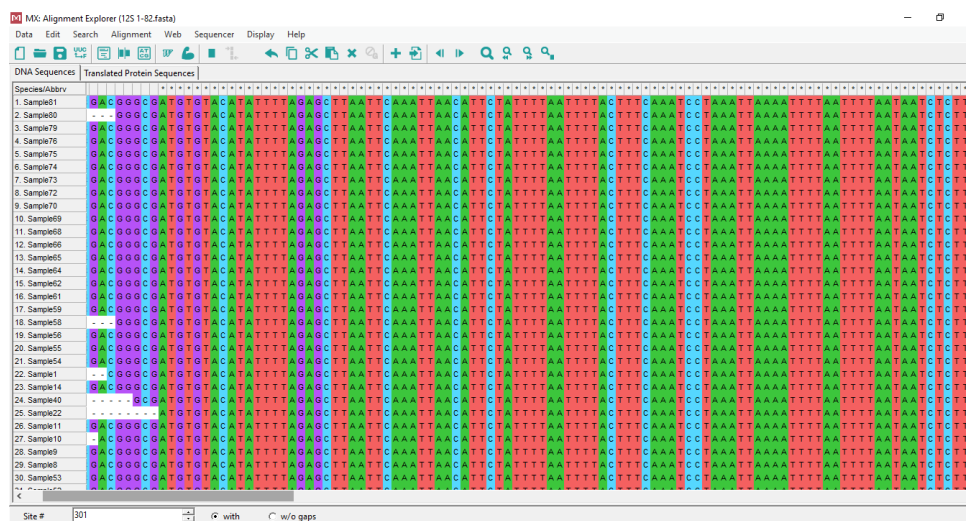


Figura 12: Alineamiento de 82 secuencias del gen 16S ARNr, del ADN de garrapatas del bovino, Panamá (MEGA-X 10.0.5).

Se generó una secuencia consenso del marcador 16S ARNr de *Rhipicephalus microplus* y fue alineada con tres secuencias de este género y una secuencia de un grupo externo, obtenidas de Genebank (cuadro 14), para evaluar el rendimiento del marcador en la identificación de la especie.

Cuadro 14: Secuencias del gen 16S ARNr usadas para evaluar el rendimiento del marcador en la identificación de *Rhipicephalus microplus*

Acceso Genebank	Especie	Gen
MF425982.1	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	16S ARNr
MK737647.1	<i>Rhipicephalus annulatus</i>	16S ARNr
MK158992.1	<i>Rhipicephalus turanicus</i>	16S ARNr
MF353125.1	<i>Amblyomma mixtum</i>	16S ARNr

La matriz de distancia genética calculada a partir del alineamiento con especies de este género más un grupo externo, mostró valores de variación entre 0.02 y 0.33; considerando a *Rhipicephalus microplus*, se señala menor variación con *Rhipicephalus annulatus* y mayor variación genética con *Amblyomma mixtum* (cuadro 15).

Cuadro 15: Matriz de distancia genética, gen 16S ARNr de *Rhipicephalus microplus* y grupos externos. Modelo Kimura 2-parámetros (MEGA-X 10.0.5).

	1	2	3	4
1 MF353125.1 <i>Amblyomma mixtum</i>				
2 MF425982.1 <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	0.33			
3 MK158992.1 <i>Rhipicephalus turanicus</i>	0.27	0.13		
4 MK737647.1 <i>Rhipicephalus annulatus</i>	0.26	0.20	0.13	
5 <i>Rhipicephalus microplus</i> Panamá	0.23	0.18	0.13	0.02

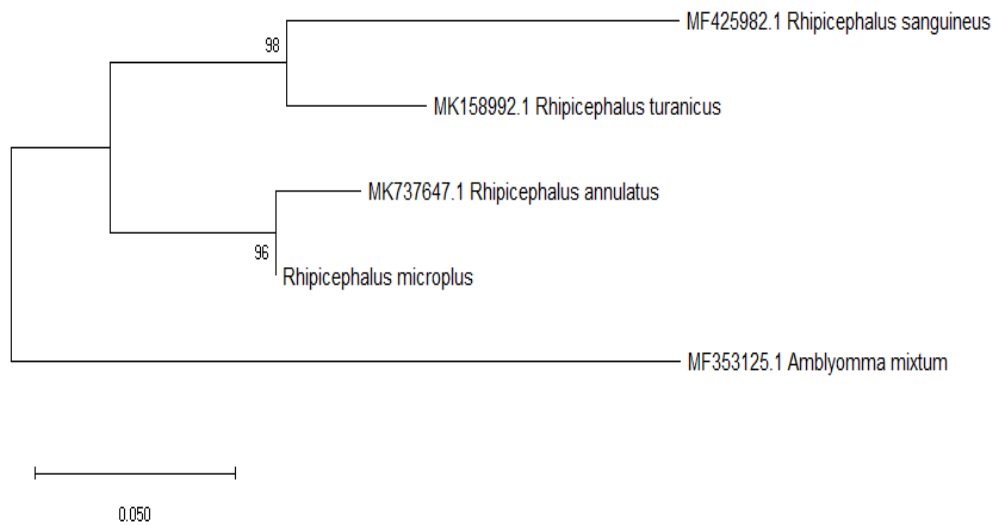


Figura 13: Árbol filogenético Neighbor-Joining, gen 16S ARNr de *Rhipicephalus microplus* y grupos externos; los números indicados en los nodos son los valores de soporte de Bootstrap (500 réplicas). Las distancias genéticas fueron calculadas usando el método Kimura 2-parámetros. El análisis incluyó a tres secuencias de gen 16S ARNr rADN del género *Rhipicephalus* y una secuencia de un grupo externo, *Amblyomma mixtum* (MEGA-X 10.0.5)

El árbol filogenético construido corresponde con el resultado de la medición de distancias genéticas, en este se observan dos ramas principales, en la primera se agrupan todas las especies del género *Rhipicephalus* y en la segunda el grupo externo. Se agrupa a *Rhipicephalus microplus* y *Rhipicephalus annulatus* en el mismo clado (figura 13).

Variación genética intraespecífica de *Rhipicephalus microplus* usando el marcador 16S ARNr

La secuencia consenso del gen 16S ARNr de *Rhipicephalus microplus* generada para Panamá, fue alineada con siete secuencias del gen 16S ARNr de *Rhipicephalus microplus* de diferentes países y regiones (cuadro 16) obtenidas del sitio web Genbank del National Center for Biotechnology Information (NCBI)

Cuadro 16: Secuencias externas del gen 16S ARNr de *Rhipicephalus microplus*, obtenidas de Genebank, usadas en la construcción del análisis filogenético

Acceso Genebank	Especie	Gen	País
AY974232.1	<i>Rhipicephalus microplus</i>	16S ARNr	Taiwan
MN396583.1	<i>Rhipicephalus microplus</i>	16S ARNr	Brasil
KY020993.1	<i>Rhipicephalus microplus</i>	16S ARNr	Brasil
KC170742.1	<i>Rhipicephalus microplus</i>	16S ARNr	Tailandia
MZ959859.1	<i>Rhipicephalus microplus</i>	16S ARNr	Colombia
MH208600.1	<i>Rhipicephalus microplus</i>	16S ARNr	China
KP210059.1	<i>Rhipicephalus microplus</i>	16S ARNr	India

La matriz de distancia genética (modelo Kimura 2-parámetros), resultante de este alineamiento señala valores entre de divergencia intraespecífica entre 0.00 y 0.09 (cuadro 17); con relación a la secuencia panameña, se señala la divergencia mayor con la secuencia de India.

Cuadro 17: Matriz de distancia genética, gen 16S ARNr de *Rhipicephalus microplus*, modelo Kimura 2-parámetros (MEGA-X 10.0.5).

	1	2	3	4	5	6	7
1 MZ959859.1 Colombia							
2 AY974232.1 Taiwan	0.00						
3 MN396583.1 Brasil	0.00	0.00					
4 Panamá	0.00	0.00	0.00				
5 KC170742.1 Tailandia	0.00	0.00	0.00	0.00			
6 KY020993.1 Brasil	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
7 KP210059.1 India	0.09	0.09	0.08	0.08	0.09	0.08	
8 MH208600.1 China	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.02

Una vez obtenida la matriz de distancias genéticas, se construyó un fenograma o árbol filogenético, a partir del método de Neighbor-Joining, con un bootstrap de 500 repeticiones (figura 14).

El árbol obtenido está formado por dos grandes grupos, el primero con las secuencias provenientes de América, Taiwan y Tailandia y las secuencias generadas en India y China. El primer grupo lo componen dos ramas principales, en la primera se ubican Colombia, Taiwan, Tailandia, Panamá y Brasil I, en la segunda rama se encuentra Brasil II.

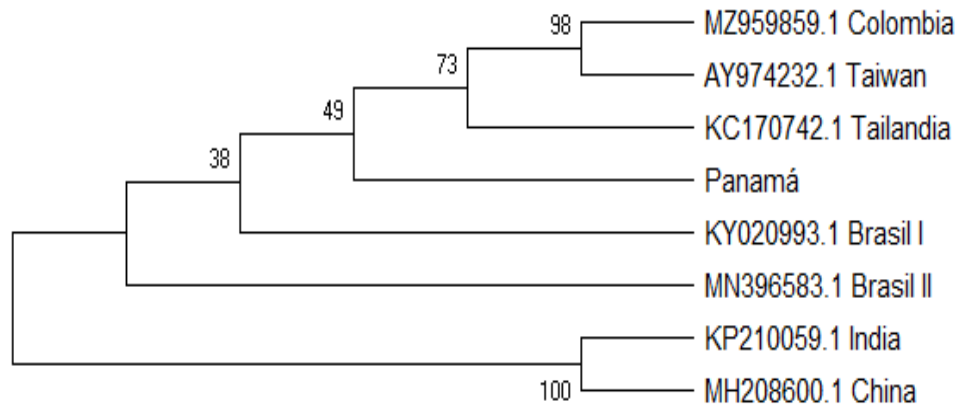


Figura 14: Árbol filogenético Neighbor-Joining, gen 16S ARNr de *Rhipicephalus microplus*; los números indicados en los nodos son los valores de soporte de Bootstrap (500 réplicas). Las distancias genéticas fueron calculadas usando el método Kimura 2-parámetros. El análisis incluyó a 7 secuencias de gen 16S ARNr rADN externas y la secuencia consenso 16S ARNr de Panamá (MEGA-X 10.0.5).

3.2.3 Marcador nuclear ITS-2

Todas las secuencias obtenidas con el marcador ITS-2 fueron viables con 1 250 pb. El análisis de Blast (Basic Local Alignment Search Tool) del National Center for Biotechnology Information, permitió confirmar la identificación morfológica de *Rhipicephalus microplus*, generando “hits” con porcentajes de identidad de 99 y 100%.

La matriz de distancia genética (modelo Kimura 2-parámetros) de las 82 secuencias, señaló una divergencia intraespecífica del 0.00% en 76 secuencias que fueron totalmente idénticas. Sin embargo, un grupo de 6 secuencias idénticas generó un valor de divergencia genética de 1.83% con respecto al resto.

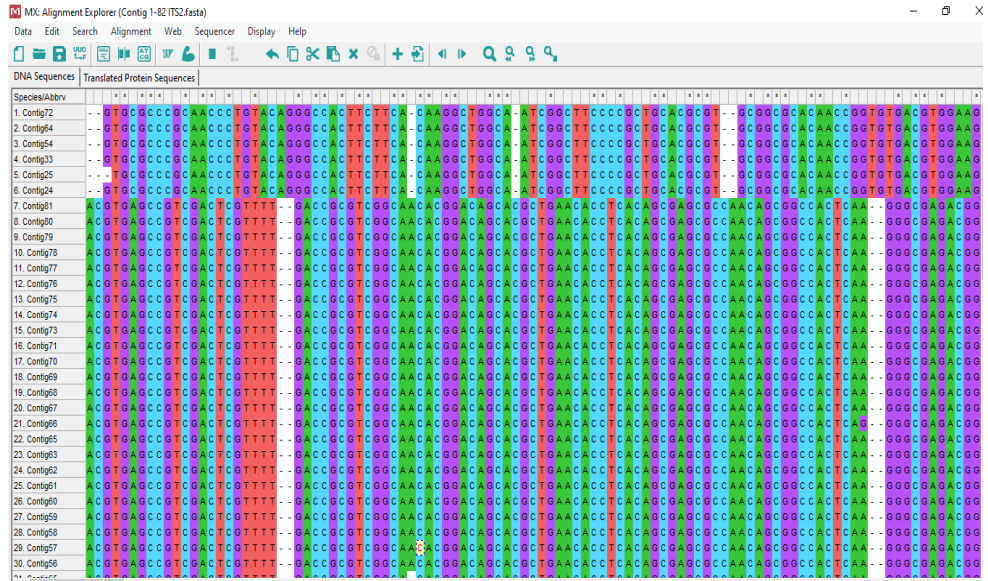


Figura 15: Alineamiento de 82 secuencias del ITS-2, del ADN de garrapatas del bovino, Panamá (MEGA-X 10.0.5).

Se generó una secuencia consenso del marcador ITS-2 de *Rhipicephalus microplus* y fue alineada con tres secuencias de este género y una secuencia de un grupo externo, obtenidas de Genebank (cuadro 18) para evaluar el rendimiento del marcador en la identificación de la especie.

Cuadro 18: Secuencias del ITS-2 usadas para evaluar el rendimiento del marcador en la identificación de *Rhipicephalus microplus*

Acceso Genebank	Especie	Gen
AF271283.1	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	ITS-2
KC108908.1	<i>Rhipicephalus annulatus</i>	ITS-2
AF271271.1	<i>Rhipicephalus turanicus</i>	ITS-2
MT462242.1	<i>Amblyomma mixtum</i>	ITS-2

La matriz de distancia genética calculada a partir del alineamiento con especies de este género más un grupo externo, mostró valores de variación entre 0.01 y 1.19; considerando a *Rhipicephalus microplus*, señala menor variación con *Rhipicephalus annulatus* y mayor variación genética con *Amblyomma mixtum* (cuadro 19).

Cuadro 19: Matriz de distancia genética, ITS-2 de *Rhipicephalus microplus* y grupos externos. Modelo Kimura 2-parámetros (MEGA-X 10.0.5).

		1	2	3	4
1	MT462242.1 <i>Amblyomma mixtum</i>				
2	AF271271.1 <i>Rhipicephalus turanicus</i>	1.21			
3	KC108908.1 <i>Rhipicephalus annulatus</i>	1.18	0.14		
4	AF271283.1 <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	1.19	0.01	0.13	
5	<i>Rhipicephalus microplus</i>	1.19	0.13	0.01	0.13

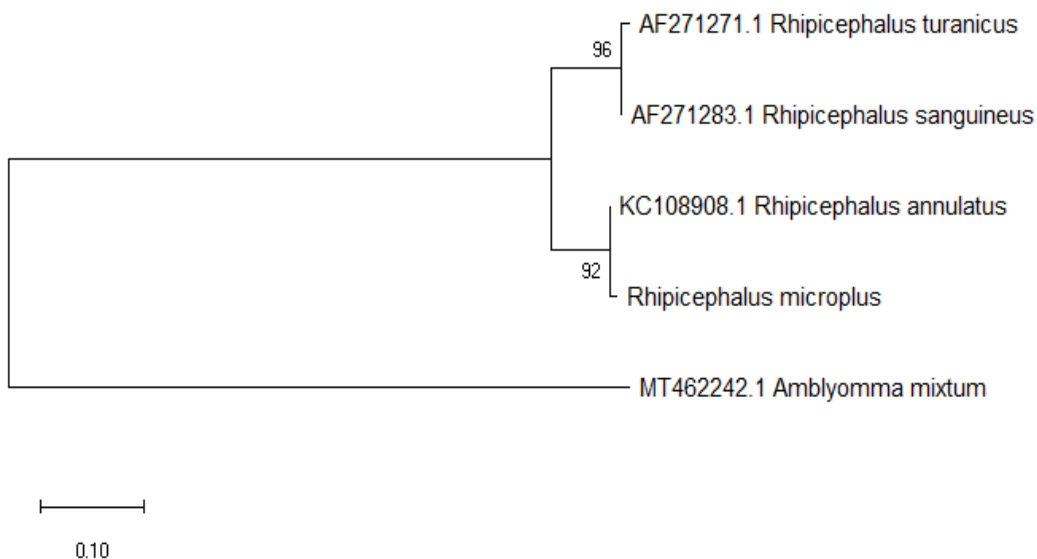


Figura 16: Árbol filogenético Neighbor-Joining, gen ITS-2 de *Rhipicephalus microplus* y grupos externos; los números indicados en los nodos son los valores de soporte de Bootstrap (500 réplicas). Las distancias genéticas fueron calculadas usando el método Kimura 2-parámetros. El análisis incluyó a tres secuencias de gen ITS-2 ARNr rADN del género *Rhipicephalus* y una secuencia de un grupo externo, *Amblyomma mixtum* (MEGA-X 10.0.5)

El árbol filogenético construido corresponde con el resultado de la medición de distancias genéticas, en este se observan dos ramas principales, en la primera se agrupan todas las especies del género *Rhipicephalus* y en la segunda el grupo externo. Se agrupa a *Rhipicephalus microplus* y *Rhipicephalus annulatus* en el mismo clado (figura 16).

Variación genética intraespecífica de *Rhipicephalus microplus* usando el marcador ITS-2

La secuencia consenso del ITS-2 de *Rhipicephalus microplus* generada para Panamá, fue alineada con siete secuencias del ITS-2 de *Rhipicephalus microplus*, de diferentes países y regiones (cuadro 20), obtenidas del sitio web Genbank, del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Cuadro 20: Secuencias externas del ITS-2 de *Rhipicephalus microplus*, obtenidas de Genebank, usadas en la construcción del análisis filogenético.

Acceso Genebank	Especie	Gen	País
KP226151.1	<i>Rhipicephalus microplus</i>	ITS-2	Brasil
MN266953.2	<i>Rhipicephalus microplus</i>	ITS-2	Kenia
MT462236.1	<i>Rhipicephalus microplus</i>	ITS-2	Cuba
OP342610.1	<i>Rhipicephalus microplus</i>	ITS-2	India
KC503273.1	<i>Rhipicephalus microplus</i>	ITS-2	Brasil
KY457506.1	<i>Rhipicephalus microplus</i>	ITS-2	Sudáfrica
MK224566.1	<i>Rhipicephalus microplus</i>	ITS-2	China

La matriz de distancia genética (modelo Kimura 2-parámetros), resultante de este alineamiento señala valores de divergencia intraespecífica entre 0.00 y 0.01 (cuadro 21), lo que señala una alta similitud entre ellas.

Cuadro 21: Matriz de distancia genética ITS-2, modelo Kimura 2-parámetros (MEGA-X 10.0.5).

		1	2	3	4	5	6	7
1	KP226151.1 Brasil							
2	MN266953.2 Kenia	0.01						
3	MT462236.1 Cuba	0.01	0.00					
4	OP342610.1 India	0.01	0.00	0.00				
5	KC503273.1 Brasil	0.01	0.00	0.00	0.01			
6	KY457506.1 Sudáfrica	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00		
7	MK224566.1 China	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
8	Panamá	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Una vez obtenida la matriz de distancias genéticas, se construyó un fenograma o árbol filogenético, a partir del método de Neighbor-Joining, con un bootstrap de 500 repeticiones (figura 17).

El árbol obtenido está formado por dos grandes grupos, el primero con las secuencias provenientes de India, Sudáfrica, China, Kenia, Brasil y Panamá; la segunda rama está compuesta por la secuencia de Cuba únicamente (figura 17).

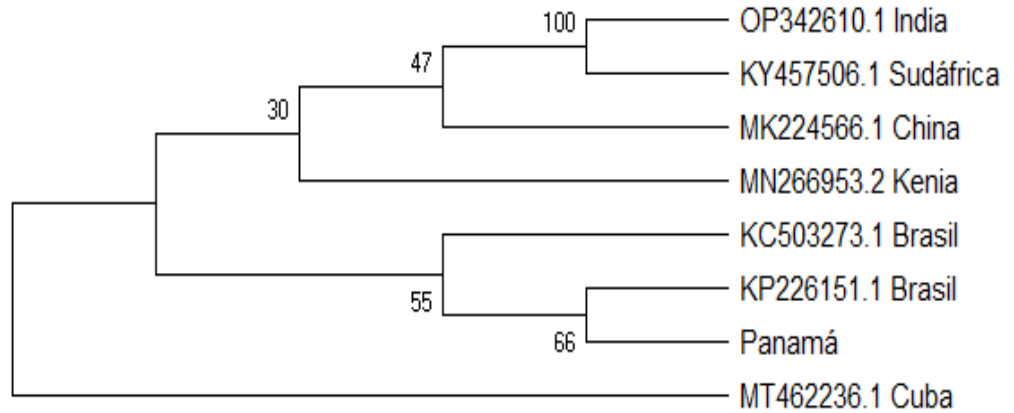


Figura 17: Árbol filogenético Neighbor-Joining, ITS-2 de *Rhipicephalus microplus*; los números indicados en los nodos son los valores de soporte de Bootstrap (500 réplicas). Las distancias genéticas fueron calculadas usando el método Kimura 2-parámetros. El análisis incluyó a 7 secuencias de gen 16S ARNr rADN externas y la secuencia consenso ITS-2 de Panamá (MEGA-X 10.0.5).

3.3 Detección de patógenos asociados a las garrapatas del bovino

Todas las garrapatas colectadas fueron analizadas para la presencia de los hemoparásitos *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, así como para las bacterias *Anaplasma marginale* y *Rickettsia sp.*

La amplificación del ADN extraído mostró positividad en la detección de *Anaplasma marginale* en 15 muestras, generando bandas en la electroforesis entre los 600 y 1000 pb, representando el 18.3% del total de estas (Figura 18 y 19). El ADN de las muestras positivas pertenece a garrapatas colectadas en seis de las ocho fincas en estudio, lo que corresponde al 75% del total de ellas (cuadro 22).

Cuadro 22: Muestras de ADN de garrapatas positivas para *Anaplasma marginale* y su ubicación en las fincas en estudio.

Finca	Provincia	N° de muestra	Muestras positivas	Porcentaje de positividad (%)	Porcentaje de positividad (%) por finca
Dos Pinos	Chiriquí	10	3	3.66	30
Sortová	Chiriquí	12	1	1.22	8.3
Calabacito	Veraguas	8	1	1.22	12.5
El Ejido	Los Santos	12	4	4.88	33.3
La Roca	Ngäbe-Buglé	10	0	0	0
La Escondida	Bocas del Toro	12	5	6.10	41.2
Bijao	Chiriquí	9	1	1.22	11.1
Flores	Panamá	8	0	0	0
Total		82	15	18.3	

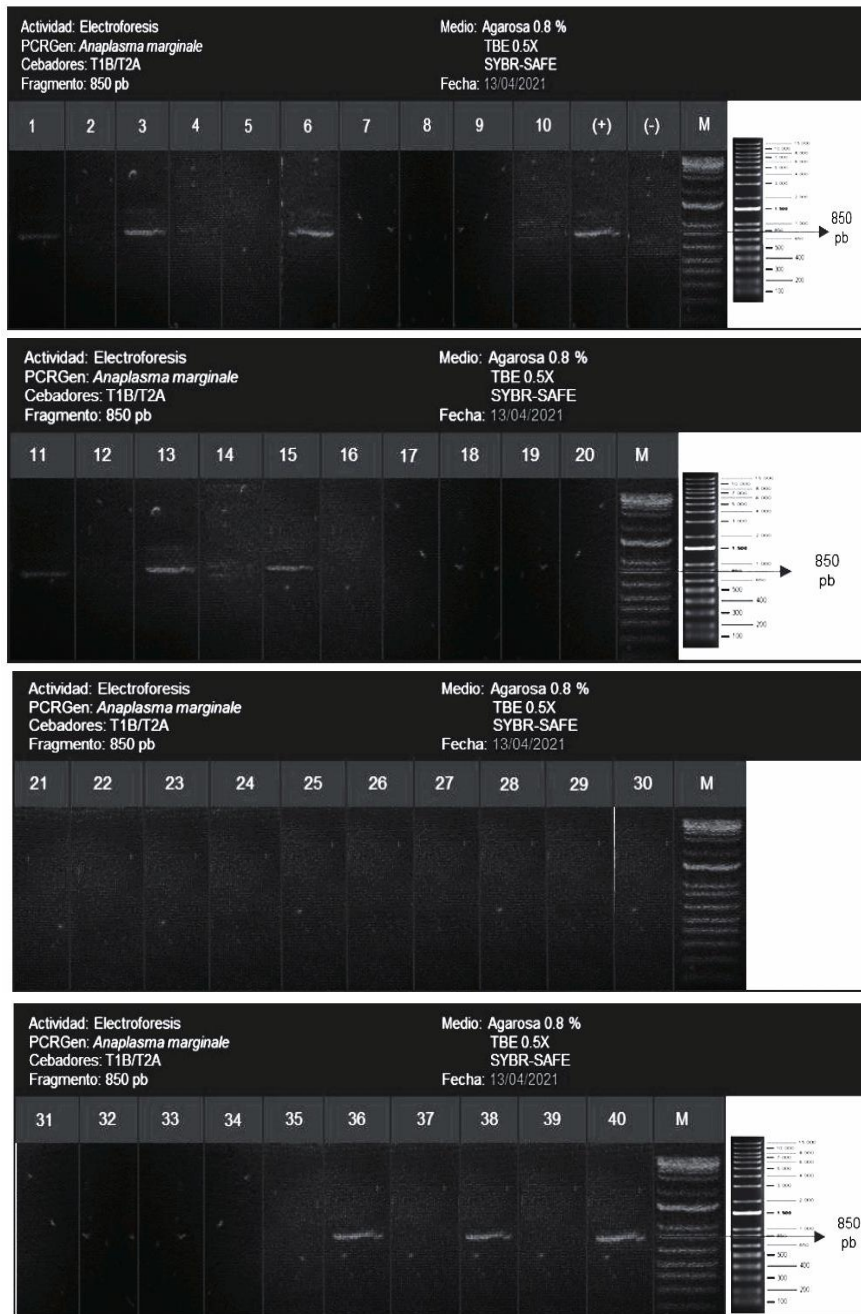


Figura 18: Geles de electroforesis de muestras de ADN de garrapatas positivas para *Anaplasma marginale* (muestras 1-40 más control positivo y negativo)

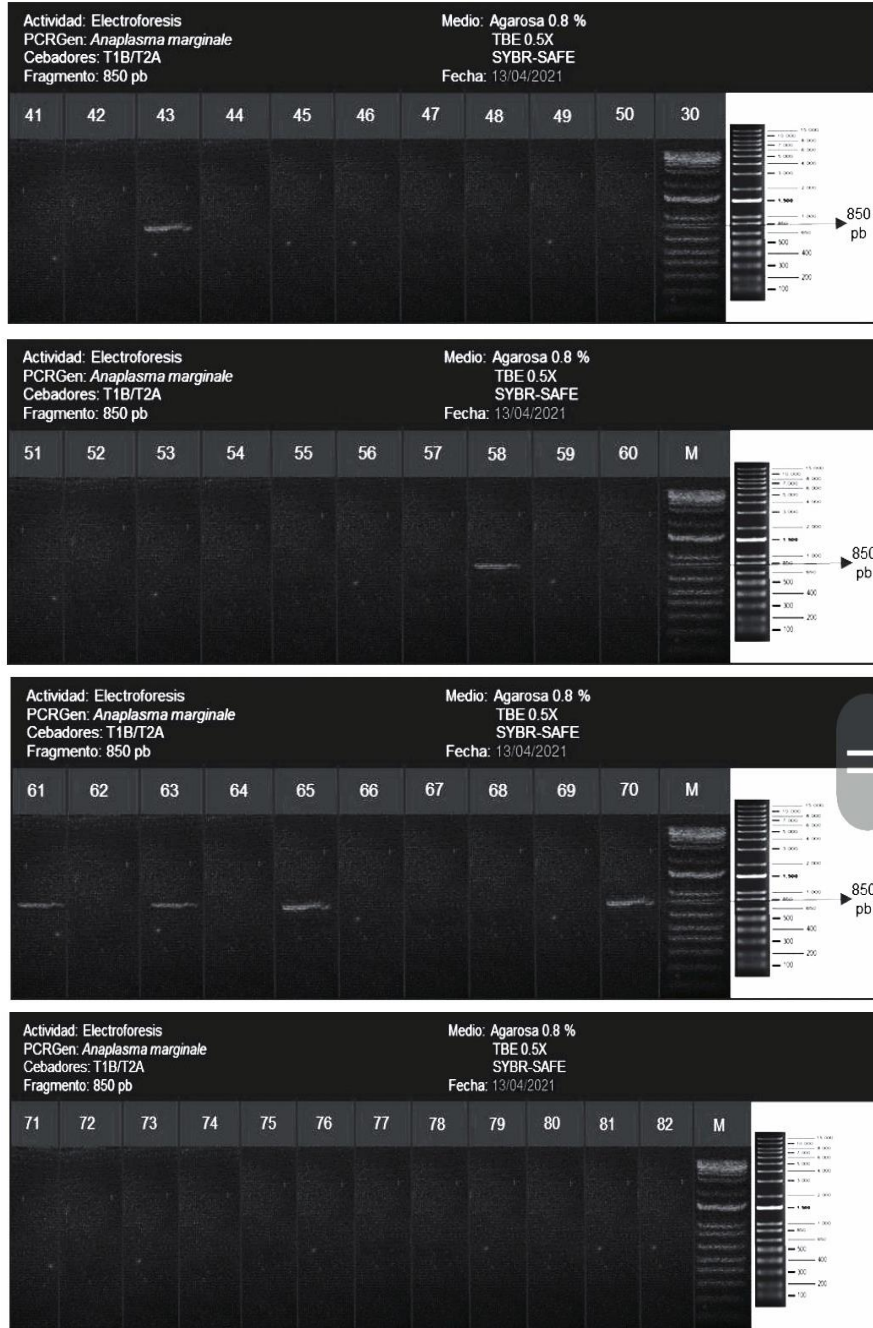


Figura 19: Geles de electroforesis de muestras de ADN de garrapatas positivas para *Anaplasma marginale* (muestras 41-82).

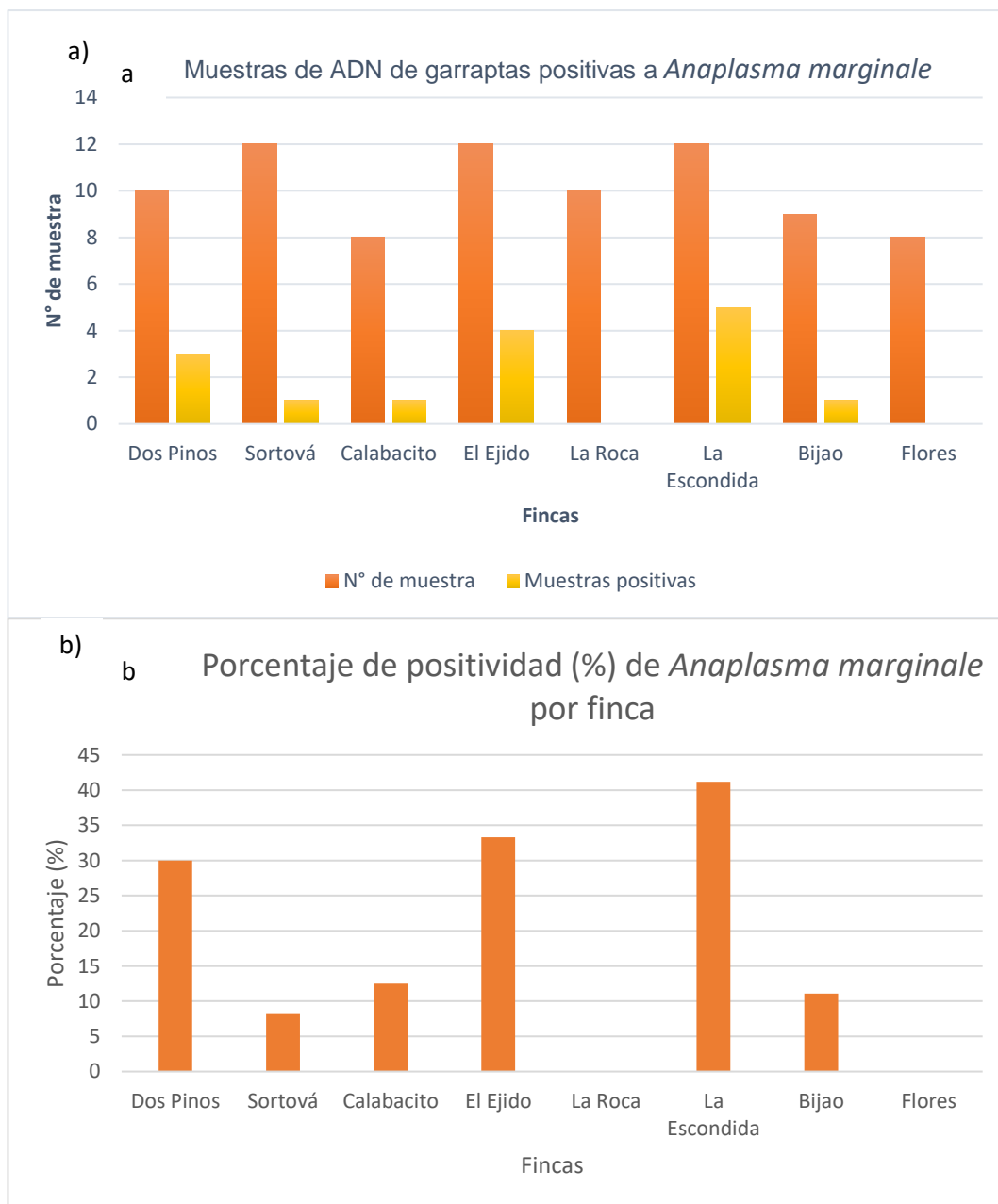


Figura 20: a) Muestras de ADN de garrapatas positivas a *Anaplasma marginale* por finca en estudio. b) Porcentaje de positividad a *Anaplasma marginale* por finca.

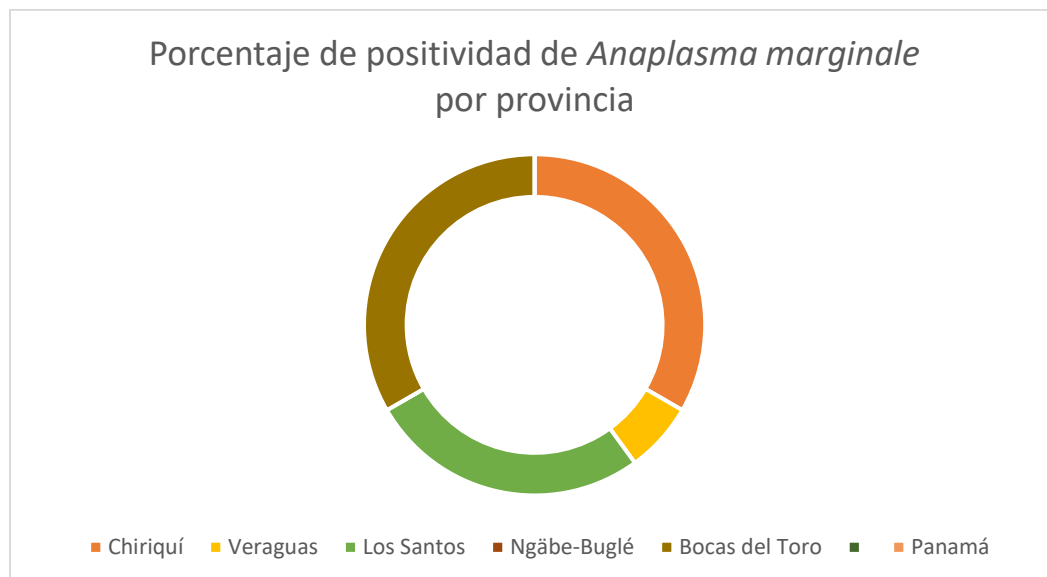


Figura 21: Porcentaje de muestras de ADN positivas a *Anaplasma marginale* por provincia participante.

La detección de la bacteria *Rickettsia ssp.* reportó positividad en 34 muestras, lo que representa el 41.5% del total. Las muestras de garrapatas positivas se colectaron en las ocho fincas en estudio, lo que corresponde al 100% de estas (cuadro 23).

Cuadro 23: Muestras de ADN de garrapatas positivas para *Rickettsia ssp.* y su ubicación en las fincas en estudio.

Finca	Provincia	N°	Muestras positivas	Porcentaje de positividad (%)	Porcentaje de positividad (%) por finca
Dos Pinos	Chiriquí	10	6	7.3	60
Sortová	Chiriquí	12	3	3.7	25
5Calabacito	Veraguas	8	4	4.9	50
El Ejido	Los Santos	12	7	8.5	58.3
La Roca	Ngäbe-Buglé	10	2	2.4	20
La Escondida	Bocas del Toro	12	6	7.3	50
Bijao	Chiriquí	9	2	2.4	22.2
Flores	Panamá	8	4	4.9	50
Total		82	34	41.5	

Cuadro 24: Muestras de ADN de garrapatas positivas para *Rickettsia ssp.*

Muestra	CT
1	14.040
4	32.805
6	28.656
7	25.356
10	15.246
12	16.649
14	21.740
15	14.112
16	13.954
18	18.265
23	15.202
25	10.652
31	31.606
32	14.163
33	17.594
34	15.879
39	15.157
40	16.851
41	23.704
42	33.928
43	15.161
45	9.201
50	17.195
54	15.574
58	10.901
59	22.854
62	13.540
63	16.848
66	30.207
67	15.604
75	4.092
80	25.023
81	27.128
82	15.429
Control +	17.105

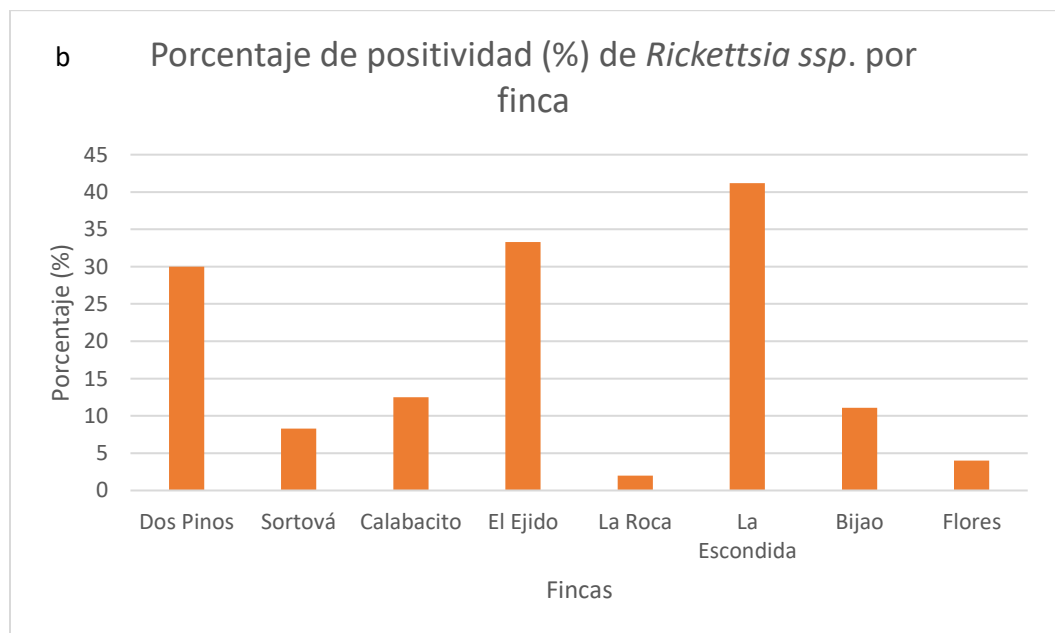
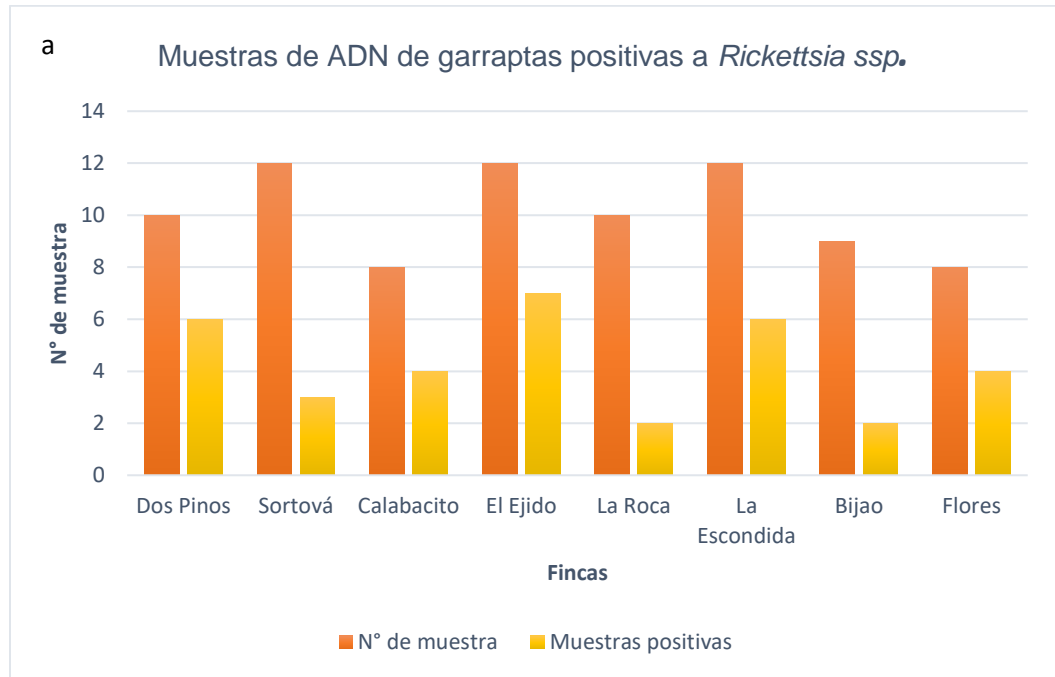


Figura 22: a) Muestras de ADN de garrapatas positivas a *Rickettsia ssp.* por finca en estudio. b) Porcentaje de positividad a *Rickettsia ssp.* por finca.

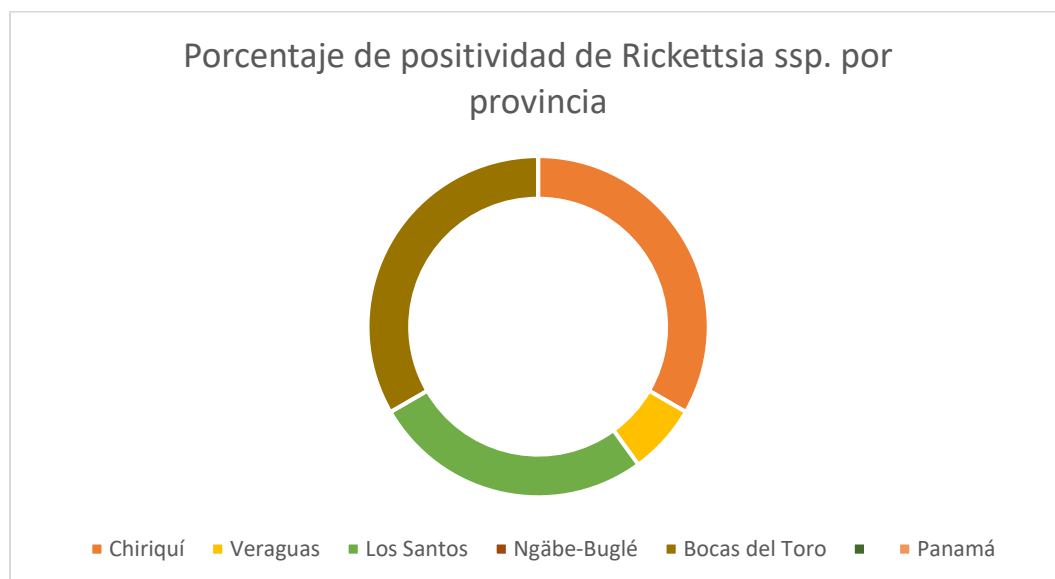


Figura 23: Porcentaje de muestras de ADN positivas a *Rickettsia* ssp. por provincia participante.

La amplificación de los marcadores para la detección de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* no mostraron positividad en ninguna de las 82 muestras de ADN de garrapatas colectadas en las fincas en estudio, lo que indica un 0% de detección de estos hemoparásitos. La electroforesis de ambos hemoparásitos mostró amplificación en la muestra control positivo, lo que valida los resultados obtenidos (Figura 24).

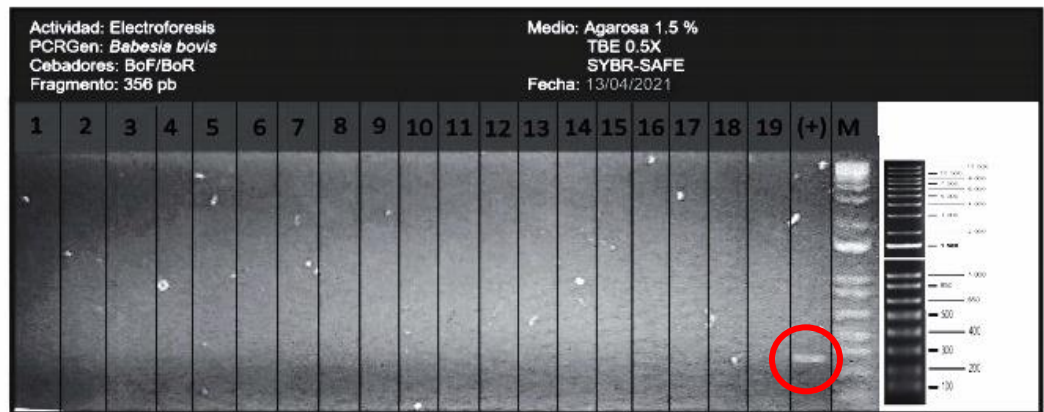
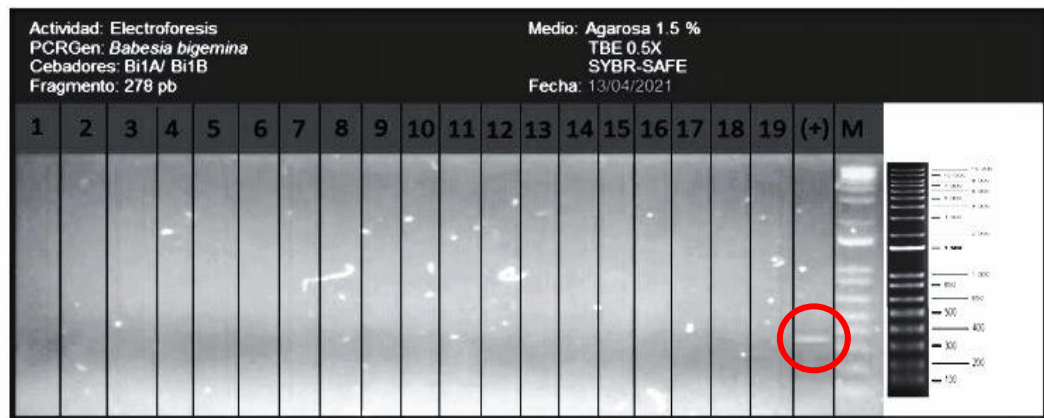


Figura 24: Geles de electroforesis que muestran la amplificación del marcador en las muestras de ADN-C+ (control positivo) para los hemoparásitos *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*.

3.4 Discusión

3.4.1 Identificación morfológica

Los bovinos son parasitados por distintas especies de garrapatas en el mundo. Sin embargo, en la zona tropical, en la que se encuentra ubicado Panamá, existe una especie en particular que ha monopolizado al bovino como su hospedero exclusivo, nos referimos a *Rhipicephalus microplus*; la denominada, garrapata tropical del ganado bovino (Jaén *et al.*, 2015). Si bien es cierto, podemos encontrar a otras especies de garrapatas como *Amblyomma mixtum* (antes *Amblyomma cajennense*) cohabitando con *Rhipicephalus microplus* en el bovino en la zona tropical, este escenario no es frecuente y los reportes publicados señalan que *R. microplus* se encuentra siempre parasitando al bovino en mayor cantidad.

Ejemplo de esto es un reporte hecho en Yucatán, México, donde se detectó la coexistencia de estas dos especies sobre los bovinos, siendo *Rhipicephalus microplus* la que fue colectada en mayor cantidad (Peniche-Lara *et al.*, 2014), así como en Honduras, donde el 84.2% de las garrapatas colectadas sobre bovinos son de la especie *Rhipicephalus microplus* y el 15.8% pertenecían a *A. mixtum* (Villarreal & Flores, 2022).

En Panamá no hay publicaciones sobre el inventario de especies de garrapatas que parasitan al ganado bovino con las que se pueda contrastar el reporte de especies resultante de esta investigación. La identificación morfológica señaló que el 100% de las garrapatas colectadas sobre los bovinos estudiados pertenecen a la especie *Rhipicephalus microplus*, resultado que se encuentra dentro de lo esperado, al ubicarse Panamá dentro de la zona tropical.

3.4.2 Identificación molecular y filogenia de garrapatas

Las secuencias obtenidas de los tres marcadores moleculares evaluados, ITS-2, 12S ARNr y 16S ARNr, fueron analizadas mediante herramientas bioinformáticas; de esta manera, la prueba realizada con la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), señala que las 82 secuencias evaluadas pertenecen a *Rhipicephalus microplus*, generando “hits” con porcentaje de identidad de 99 y 100%, resultado que es el mismo para los tres genes marcadores. De esta manera, se confirma la identificación morfológica y se valida la hipótesis de trabajo de esta investigación que señala a *Rhipicephalus microplus* como la especie de garrapata que parasita al bovino en Panamá.

El alineamiento y la medición de las distancias genéticas de las secuencias de ADN generaron valores de 0.00% para los tres marcadores, lo que nos indica que se trata de una sola secuencia; es decir que, no hay variación genética en los genes marcadores, reportando así un alto nivel de conservación evolutiva, en la población de *Rhipicephalus microplus* que se encuentra parasitando a los bovinos en las fincas ganaderas estudiadas.

Estos resultados también nos hacen inferir que los tres genes marcadores generan resultados confiables y robustos, en la identificación de *Rhipicephalus microplus* en Panamá; inferencia que se valida al analizar de forma individual la secuencia consenso de *Rhipicephalus microplus* de cada marcador, con tres secuencias de especies de este género y una secuencia de un grupo externo. Los árboles filogenéticos resultantes agrupan de forma idéntica a las cinco secuencias, ubicando a las cuatro especies del género *Rhipicephalus* en el mismo nodo y rama, y al grupo externo *Amblyomma mixtum* en una rama y nodo separados.

Este análisis de divergencia interespecífica también señala a *Rhipicephalus annulatus* como la especie más cercana genéticamente a *Rhipicephalus microplus* ubicándolas en un mismo clado. Esta agrupación corresponde con los resultados de la evaluación de cuatro genes marcadores para la identificación de ixódidos en China, donde se señala que *Rhipicephalus microplus* y *Rhipicephalus annulatus* generaron valores de distancia genética entre 1.0 y 1.2% (Lv *et al.*, 2014).

En el análisis de variación intraespecífica, se alinearon siete secuencias de *Rhipicephalus microplus* de diferentes países y continentes, con la secuencia consenso generada en Panamá, para cada gen marcador por separado.

Los genes marcadores 12S ARNr y 16S ARNr mostraron mayor divergencia intraespecífica con respecto al marcador ITS-2, el cual produjo valores de distancia genética de 0.00% en la medición entre las secuencias internacionales y la secuencia consenso generada para Panamá. Asimismo, esta característica se pone de manifiesto cuando en China, Lv y colaboradores señalan que ITS-2 mostró valores mínimos de variación intraespecífica, comparándolo con 12S ARNr, 16S ARNr y COI (Lv *et al.*, 2014). Igualmente, otro análisis filogenético de *Rhipicephalus microplus*, pone de manifiesto que el gen marcador ITS-2 no tiene potencial para resolver relaciones filogenéticas dentro de la especie, pero es muy útil para evaluar relaciones filogenéticas con otras especies dentro del género (Burger *et al.*, 2014).

3.4.3 Detección de patógenos

La detección de patógenos hemoparásitos, realizada mediante prueba PCR a las muestras de ADN de garrapatas, reportó 18.3% de positividad para *A. marginale* y 0% de positividad para los agentes causantes de babesiosis, *B. bovis* y *B. bigemina*.

Panamá no cuenta con publicaciones de investigaciones previas basadas en la detección de estos hemoparásitos en garrapatas; sin embargo, se han realizado estudios para detectar la presencia de estos parásitos en la sangre de bovinos de fincas ganaderas.

Los resultados de dos de estos estudios, realizados en la sangre bovina, señalan, al igual que esta investigación, mayor detección de *A. marginale* en sangre de bovinos frente a ambas especies de *Babesia*. Uno de estos estudios fue realizado en 2015 en las provincias de Coclé y Los Santos y reportó 81.8% de positividad para *A. marginale*, 72.7% de positividad para *B. bigemina* y 27.2% para *B. bovis* (Gonzales *et al.*, 2018). Un resultado similar se reportó en 2022, cuando se realizó una detección de estos tres hemoparásitos en la sangre de bovinos de cuatro fincas ganaderas ubicadas en Veraguas, Coclé y Panamá Oeste, en este caso el porcentaje de positividad para *A. marginale* fue 29.2% y 8.3% para *B. bigemina* (4 muestras de 48); reportando 0 % para *B. bovis* (Rodriguez, 2022).

Es válido mencionar que este último estudio colectó sangre de 12 bovinos de una de las fincas ganaderas que forma parte de este estudio (Calabacito, en Veraguas).

Los resultados individuales de detección de hemoparásitos de esta finca son semejantes tanto en la detección en sangre, como la detección en garrapatas; la positividad para *A. marginale* en sangre bovina es de 33,3% y la positividad para esta bacteria en la garrapata es de 12.5%. Además no se reporta detección de *B. bovis* y *B. bigemina* ni en sangre ni en la garrapata.

El mismo escenario se repite a nivel regional. Estudios de detección de estos hemoparásitos en garrapatas son escasos, pero podemos encontrar información de la detección de estos en la sangre de los bovinos; por ejemplo, una evaluación hecha en Ecuador obtuvo una prevalencia por PCR del 65,5 % de anticuerpos para *A. marginale* y 0 % para *Babesia spp.* (Medina-Naranjo *et al.*, 2017). También en el sur de Brasil, se evaluó la presencia de estos hemoparásitos mediante la técnica PCR múltiple (mPCR) y se detectó mayor prevalencia de *A. marginale*, con un 27% (Vieira *et al.*, 2019).

Considerando los resultados de estas investigaciones, nacionales y regionales, sobre detección de hemoparásitos en la sangre bovina, se infiere que la nula detección de los agentes causantes de babesiosis en este trabajo atiende a un sesgo en la colecta de muestras. La menor prevalencia de Babesias en sangre bovina, es indicativo de que la transmisión de éstos por medio de la garrapata también es menor; es decir, hay menos garrapatas infectadas por este patógeno sobre el hospedero. Al colectarse una sola muestra de garrapata por animal, es menos probable colectar una garrapata infectada con *B. bovis* o *B. bigemina*.

Por otro lado, la detección molecular de *Rickettsia ssp.* reportó 34 muestras positivas, que corresponde al 41.5% del total de las muestras. Un resultado muy similar se publicó en China, donde se evaluó la presencia de agentes patógenos en la garrapata *Rhipicephalus microplus* colectada del ganado en la parte sur-este y sur-central y se identificó mediante PCR 35.8% de muestras de garrapatas positivas a *Rickettsia ssp.* (Lu et al., 2022).

Considerando el tamaño de la muestra de esta investigación, es preocupante el porcentaje de positividad presentada a *Rickettsia spp.*, que se encuentra infectando a poco menos de la mitad de las garrapatas colectadas, estando presente en 100% de las fincas ganaderas en estudio. Tomando en cuenta que *A. marginale* pertenece al orden Rickettsiales, se puede advertir el elevado potencial de infección de estas bacterias y su consecuente posible efecto sobre la salud del bovino, así como de los colaboradores y dueños de las fincas. Frecuentemente dentro de los agentes rickettsiales se valora solo a *A. marginale* en la sangre bovina; sin embargo, estos resultados muestran que incluir a especies del género *Rickettsia* pudiera ser de beneficio para salvaguardar la salud y generar herramientas de control y mitigación de los efectos de estos patógenos.

4 CAPÍTULO **CONCLUSIONES, RECOMENDACIONES Y LIMITANTES**

Conclusiones

- El reporte de las especies de garrapatas colectadas parasitando al ganado bovino, usando claves morfológicas, señala que el 100% pertenecen a la especie *Rhipicephalus microplus*.
- El análisis de las secuencias de los marcadores evaluados ITS-2, 12S ARNr y 16S ARNr, confirmaron que la totalidad de las muestras de garrapatas colectadas de bovinos en fincas ganaderas de Panamá, pertenecen a la especie *Rhipicephalus microplus*.
- En las fincas ganaderas estudiadas se registra la presencia de dos hemoparásitos, los agentes Rickettsiales, *Anaplasma marginale* y *Rickettsia spp.* Siendo el segundo identificado en mayor cantidad.
- El análisis filogenético de las secuencias de los tres marcadores usados agrupó a *Rhipicephalus microplus* (secuencia panameña) en el mismo clado con *Rhipicephalus annulatus*, estableciendo su cercanía filogenética. El análisis de la variación intraespecífica agrupó a la secuencia de *Rhipicephalus microplus* más cercana genéticamente a secuencias de *Rhipicephalus microplus* provenientes de América.

Recomendaciones

- Aumentar el número de muestras colectadas de garrapatas por animal, para evitar sesgos en la detección de patógenos.
- Incluir la detección de especies del género *Rickettsia* en las investigaciones dirigidas a evaluar la prevalencia de hemoparásitos bovinos, ya que estos tienen alto potencial de patogenicidad y la mayoría de las investigaciones solo incluyen a *A. marginale*.
- Secuenciar las muestras positivas a hemoparásitos para obtener más información molecular de estos, lo cual se traduciría en beneficio a la salud animal.

Limitantes

- El mayor factor limitante fue el capital disponible para la realización de la investigación, ya que las pruebas moleculares generan altos costos en la obtención de material y reactivos.
- Los efectos del desarrollo de la investigación durante la pandemia global Covid-19 por el virus SARSCoV-2, 2020-2021; causaron retrasos importantes en los tiempos programados y la subsecuente dificultad logística para la adquisición de reactivos.

Referencias

- Abdullah, H. H. A. M., El-Molla, A., Salib, F. A., Allam, N. A. T., Ghazy, A. A., & Abdel-Shafy, S. (2016). Morphological and molecular identification of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* and the camel tick *Hyalomma dromedarii* (Acari: Ixodidae) vectors of Rickettsioses in Egypt. *Veterinary World*, 9(10), 1087–1101. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.1087-1101>
- Abouelhassan, E. M., ElGawady, H. M., AbdelAal, A. A., El-Gayar, A. K., & Esteve-Gassent, M. D. (2019). Comparison of some molecular markers for tick species identification. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 13(2), 153–164. <https://doi.org/10.18502/jad.v13i2.1241>
- Aceró Mondragón, E. J., Calixto, O. J., & Prieto, A. C. (2011). Garrapatas (Acari: Ixodidae) prevalentes en caninos no migrantes del noroccidente de Bogotá, Colombia. *Nova*, 9(16), 158. <https://doi.org/10.22490/24629448.498>
- Almada, A. (2015). *Parasitosis: Pérdidas productivas e impacto económico*. Boletín Técnico, Merial LATAM. <https://www.ganaderia.com/destacado/Parasitosis:-Pérdidas-productivas-e-impacto-económico>
- Alzohairy, A. (2011). Bioedit: an important software for molecular biology. *GERF Bull. Biosci.* 2, 60–61
- Anderson, J., & Magnarelli, L. (2008). Biology of ticks. *Elsevier*, 22(2), 195–215.
- Beati, L., & Keirans, J. E. (2001). Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S rRNA ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. *Journal of Parasitology*, 87(1), 32–48. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[0032:aotsra\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0032:aotsra]2.0.co;2)
- Benavides, E., Jaime, O., Prada, R., Carlos, L., Jiménez, V., Benavides Ortiz, E., & Ricardo, J. (2016). *Las garrapatas del ganado bovino Guía para el manejo de garrapatas y adaptación al cambio climático*.
- Bermúdez, S., Apanaskevich, D. A., & Domínguez, L. (2018). *Garrapatas Ixodidae de Panamá [in Spanish]*.
- Burger, T. D., Shao, R., & Barker, S. C. (2014). Phylogenetic analysis of mitochondrial genome sequences indicates that the cattle tick, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*, contains a cryptic species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 76(1), 241–253. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.03.017>
- Cen-pacheco, F. (2017). *La garrapata común del ganado: antecedentes, problemática actual y alternativa de control*. 3, 37–43.
- CodonCode Aligner. CodonCode Corporation. <http://www.codoncode.com>

- Crampton, A., McKay, I., & Barker, S. C. (1996). Phylogeny of ticks (Ixodida) inferred from nuclear ribosomal DNA. *International Journal for Parasitology*, 26(5), 511–517. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(96\)89379-9](https://doi.org/10.1016/0020-7519(96)89379-9)
- Dantas-Torres, F., Chomel, B. B., & Otranto, D. (2012). Ticks and tick-borne diseases: A One Health perspective. In *Trends in Parasitology* (Vol. 28, Issue 10, pp. 437–446). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.07.003>
- De La Fuente, J. (2003). The fossil record and the origin of ticks (Acari: Parasitiformes: Ixodida). *Experimental and Applied Acarology*, 29(3–4), 331–344. <https://doi.org/10.1023/A:1025824702816>
- Dobson, S. J., & Barker, S. C. (1999). Phylogeny of the Hard Ticks (Ixodidae) Inferred from 18S rRNA Indicates That the Genus *Aponomma* is Paraphyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 11(2), 288–295. <https://doi.org/10.1006/MPEV.1998.0565>
- Domínguez García, D. I., Torres Agatón, F., & Rosario-Cruz, R. (2016). Evaluación económica del control de garrapatas *Rhipicephalus microplus* en México. *Revista Iberoamericana de Las Ciencias Biológicas y Agropecuarias*, 5(9), 1–10.
- Eaton, M. J., Meyers, G. L., Kolokotronis, S. O., Leslie, M. S., Martin, A. P., & Amato, G. (2010). Barcoding bushmeat: Molecular identification of Central African and South American harvested vertebrates. *Conservation Genetics*, 11(4), 1389–1404. <https://doi.org/10.1007/s10592-009-9967-0>
- Erster, O., Roth, A., Wolkomirsky, R., Leibovich, B., & Shkap, V. (2013). Comparative analysis of mitochondrial markers from four species of *Rhipicephalus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 198(3–4), 364–370. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.09.005>
- Espí Felgueroso, A. (2011). Las garrapatas como agentes transmisores de enfermedades para los animales y el hombre. *Tecnología Agroalimentaria*, 9, 21–24.
- Fouche, G., Ramafuthula, M., Maselela, V., Mokoena, M., Senabe, J., Leboho, T., Sakong, B. M., Adenubi, O. T., Eloff, J. N., & Wellington, K. W. (2016). Acaricidal activity of the organic extracts of thirteen South African plants against *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *decoloratus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 224, 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.05.011>
- González H., Rita; Jaén T., Marcelino; Villalobos C., Axel; Ávila R., Lissy; Vigil M; Osiris. (2018). Estudio preliminar del diagnóstico molecular de hemoparásitos bovinos en Panamá. Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP). LXIII Reunión Anual del Programa Cooperativo Centroamericano para el Mejoramiento de Cultivos y Animales.
- Guerra, K. A., Vilchis Peluyera, A., & Valdés López, V. (2017). *LOS CÓDIGOS GENÉTICOS MITOCONDRIALES: CARACTERÍSTICAS, ORIGEN Y EVOLUCIÓN*.
- Guglielmone, A. A., Beati, L., Barros-Battesti, D. M., Labruna, M. B., Nava, S., Venzal, J. M., Mangold, A. J., Szabó, M. P. J., Martins, J. R., González-Acuña, D., & Estrada-Peña, A.

- (2006). Ticks (Ixodidae) on humans in South America. *Experimental and Applied Acarology*, 40(2), 83–100. <https://doi.org/10.1007/s10493-006-9027-0>
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Jaén T, M., Álvarez C, V., Rangel T, G., Espinales D, K., Quintero V, N., & Quintero N, R. (2015). Sensibilidad Del Clorpirifos Y Cipermetrina En La Garrapata Rhipicephalus microplus En Fincas De Panamá. *Congreso Internacional*, 25–26.
- Klompen, J. S. H., Black, W. C., Keirans, J. E., & Oliver, J. H. (1996). Evolution of Ticks. *Annual Review of Entomology*, 41(1), 141–161. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.41.010196.001041>.
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen B, Nei M. 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Version 2.1. USA: Arizona State University.
- Latrofa, M. S., Dantas-Torres, F., Annoscia, G., Cantacessi, C., & Otranto, D. (2013). Comparative analyses of mitochondrial and nuclear genetic markers for the molecular identification of Rhipicephalus spp. *Infection, Genetics and Evolution*, 20, 422–427. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.09.027>
- Lew-Tabor, A. E., Bruyeres, A. G., Zhang, B., & Rodriguez Valle, M. (2014). Rhipicephalus (Boophilus) microplus tick in vitro feeding methods for functional (dsRNA) and vaccine candidate (antibody) screening. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5(5), 500–510. <https://doi.org/10.1016/J.TTBDIS.2014.03.005>
- Li, H. Y., Zhao, S. S., Hornok, S., Farkas, R., Guo, L. P., Chen, C. F., Shao, R. F., Lv, J. Z., & Wang, Y. Z. (2017). Morphological and molecular divergence of Rhipicephalus turanicus tick from Albania and China. *Experimental and Applied Acarology*, 73(3–4), 493–499. <https://doi.org/10.1007/s10493-017-0189-8>
- Lu, M., Tian, J., Pan, X., Qin, X., Wang, W., Chen, J., Guo, W., & Li, K. (2022). Identification of Rickettsia spp., Anaplasma spp., and an Ehrlichia canis-like agent in Rhipicephalus microplus from Southwest and South-Central China. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 13(2), 101884. <https://doi.org/10.1016/J.TTBDIS.2021.101884>
- Lv, J., Wu, S., Zhang, Y., Chen, Y., Feng, C., Yuan, X., Jia, G., Deng, J., Wang, C., Wang, Q., Mei, L., & Lin, X. (2014). Assessment of four DNA fragments (COI, 16S ARNr rDNA, ITS2, 12S ARNr rDNA) for species identification of the Ixodida (Acari: Ixodida). *Parasites and Vectors*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-93>
- Lv, Jizhou, Wu, Shaoqiang, Zhang Yongning, Chen Yan, Feng Chunyan, Yuan Xiangfen, Jia Guangle, Deng Junhua, Wang Caixia, Wang Qin, Mei Lin, L. X. (2014). Assessment of four DNA fragment for species identification of the Isodida.pdf. *Parasites & Vectors*, 7(1), 1–11.

- Macías Ortiz, E. J. (2018). *Detección de anaplasmosis y babesiosis bovina transmitida por la garrapata Rhipicephalus microplus en ganado bovino ubicado en el municipio de Tlahuiltepa, Hidalgo y Coatzintla, Veracruz.*
- Márquez-Jiménez, F. J., Hidalgo-Pontiveros, A., Contreras-Chova, F., Rodríguez-Liébana, J. J., & Muniain-Ezcurra, M. Á. (2005). Ticks (Acarina: Ixodidae) as vectors and reservoirs of pathogen microorganisms in Spain. In *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Vol. 23, Issue 2, pp. 94–102). Ediciones Doyma, S.L. <https://doi.org/10.1157/13071613>
- Mauricio Bulman, G. (2012). PERDIDAS ECONOMICAS DIRECTAS E INDIRECTAS POR PARASITOS INTERNOS Y EXTERNOS DE LOS ANIMALES DOMESTICOS EN ARGENTINA. *Anales de La Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria.*, 76–176.
- Medina-Naranjo, V. L., Reyna-Bello, A., Tavares-Marques, L. M., Campos, A. M., Ron-Román, J. W., Moyano, J. C., Jarrín-Porras, E. C., Sandoval-Morejón, E. D., & Chávez-Larrea, M. A. (2017). Diagnosis of hemotropics Anaplasma marginale, Trypanosoma spp. and Babesia spp. by ELISAi and PCR techniques in three livestock farms of Pastaza Province, Ecuador. *Revista Científica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Del Zulia*, 27(3), 162–171.
- Murgas, I. L., Castro, A. M., & Bermúdez, S. E. (2013). Current status of Amblyomma ovale (Acari: Ixodidae) in Panama. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 4(1–2), 164–166. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.09.002>
- Murrell, A., Campbell, N. J. H., & Barker, S. C. (2001). A total-evidence phylogeny of ticks provides insights into the evolution of life cycles and biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 21(2), 244–258. <https://doi.org/10.1006/mpev.2001.1018>
- Nava, S., Venzal, J. M., González-Acuña, D., Martins, T. F., & Guglielmo, A. A. (2017). Genera and Species of Ixodidae. In *Ticks of the Southern Cone of America* (pp. 25–267). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811075-1.00002-9>
- Norris, D. E., Klompen, J. S. H., & Black, W. C. (1999). Comparison of the Mitochondrial 12S ARNr and 16S ARNr Ribosomal Dna Genes in Resolving Phylogenetic Relationships among Hard Ticks (Acari: Ixodidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 92(1), 117–129. <https://doi.org/10.1093/AESA/92.1.117>
- Ojeda-Chi, M. M., Rodríguez-Vivas, R. I., Galindo-Velasco, E., Lezama-Gutiérrez, R., & Cruz-Vázquez, C. (2011). Control de Rhipicephalus microplus (Acari: Ixodidae) mediante el uso del hongo entomopatógeno Metarhizium anisopliae. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 2(2), 177–192.
- Packer, L., Gibbs, J., Sheffield, C., & Hanner, R. (2009). DNA barcoding and the mediocrity of morphology. *Molecular Ecology Resources*, 9(SUPPL. 1), 42–50. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02631.x>
- Paternina, L. E., Verbel-Vergara, D., & Bejarano, E. E. (2016). Comparación y utilidad de las regiones mitocondriales de los genes 16S ARNr y COX1 para los análisis genéticos en

- garrapatas (Acari: Ixodidae). *Biomédica*, 36(2), 295–302. <https://doi.org/10.7705/BIOMEDICA.V36I2.3116>
- Peniche-Lara, G., Dzul-Rosado, K., Jiménez-Delgadillo, B., Vado-Solís, I., Pérez-Osorio, C., & Zavala-Castro, J. (2014). *Artículo Original*. 1(1), 23–27.
- Polanco-Echeverry, D. N., & Ríos-Osorio, L. A. (2016). Biological and ecological aspects of hard ticks. *Ciencia Tecnología Agropecuaria*, 17(1), 81–95. https://doi.org/10.21930/rcta.vol17_num1_art:463
- Pratt, H. D. (1967). Ticks: Key to genera in United States. *Pictorial Keys to Arthropods, Reptiles, Birds and Mammals of Public Health Significance*, 37–41.
- Rivera-Páez, F. A., Labruna, M. B., Martins, T. F., Perez, J. E., Castaño-Villa, G. J., Ossa-López, P. A., Gil, C. A., Sampieri, B. R., Aricapa-Giraldo, H. J., & Camargo-Mathias, M. I. (2018). Contributions to the knowledge of hard ticks (Acari: Ixodidae) in Colombia. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 9(1), 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.10.008>
- Rodriguez, S. (2022). *Prevalencia de la anaplasmosis y babesiosis en cuatro fincas de ganado bovino criollo guaymí y guabalá localizados en dos zonas agroecológicas de Panamá*. Universidad de Panamá.
- Rodriguez-Vivas, R. I., Alonso-Díaz, M. A., Rodríguez-Arevalo, F., Fragoso-Sanchez, H., Santamaria, V. M., & Rosario-Cruz, R. (2006). Prevalence and potential risk factors for organophosphate and pyrethroid resistance in *Boophilus microplus* ticks on cattle ranches from the State of Yucatan, Mexico. *Veterinary Parasitology*, 136(3–4), 335–342. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.05.069>
- Santana Campos, R. N. de, Nascimento Lima, C. B., Passos Oliveira, A., Albano Araújo, A. P., Fitzgerald Blank, A., Barreto Alves, P., Nascimento Lima, R., Albano Araújo, V., Santana, A. S., & Bacci, L. (2015). Acaricidal properties of vetiver essential oil from *Chrysopogon zizanioides* (Poaceae) against the tick species *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 212(3–4), 324–330. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.08.022>
- Socolovschi, C., Mediannikov, O., Raoult, D., & Parola, P. (2009). The relationship between spotted fever group rickettsiae and ixodid ticks. In *Veterinary Research* (Vol. 40, Issue 2, pp. 1–20). EDP Sciences. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009017>
- Sonenshine, D., Lane, R., & Nicholson, W. (2002). Ticks (Ixodida). *Medical and Veterinary Entomology*, 517–518.
- Soriano, J. L. (2004). Técnicas de Biología Molecular Aplicadas a la Taxonomía y Filogenia de Moluscos. *Spira*, 1, 23–33.
- Sorof Uddin, M., & Cheng, Q. (2015). Recent application of biotechniques for the improvement of mango research. In *Applied Plant Genomics and Biotechnology* (pp. 195–212). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100068-7.00012-4>

- Vieira, L. L., Canever, M. F., Cardozo, L. L., Cardoso, C. P., Herkenhoff, M. E., Neto, A. T., Vogel, C. I. G., & Miletti, L. C. (2019). Prevalence of *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis*, and *Babesia bigemina* in cattle in the Campos de Lages region, Santa Catarina state, Brazil, estimated by multiplex-PCR. *Parasite Epidemiology and Control*, 6, e00114. <https://doi.org/10.1016/J.PAREPI.2019.E00114>
- Villarreal P, E. A., & Flores R, T. F. (2022). *Porcentaje de prevalencia e identificación de Anaplasma marginale (Theiler), agente causante de la anaplasmosis, mediante técnicas convencionales y moleculares, en una finca bovina en El Paraíso, Honduras* [Universidad Zamorano]. <https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/7275>